

PCR 法快速检测扩张青霉

樊明涛¹, 毕静莹¹, Mansel W Graffith², Wang Haifeng²

(¹西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100, 中国;

²Canadian Research Institute for Food Safety and Food Science Department, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

摘要: 【目的】研究棒曲霉素扩张青霉菌 (*Penicillium expansum*) 的快速和特异性 PCR 检测方法。【方法】通过 *P. expansum* 的纯菌平板和液体培养以及纯菌接种于苹果、苹果果肉和苹果汁, 用 Cenis 改良方法提取 DNA, 以基于 isoeoxydon dehydrogenase 和 polygatacturonase 编码基因的两对引物扩增 *P. expansum* DNA, 建立特异和快速的检测 *P. expansum* 的方法。【结果】基于 polygatacturonase 基因的引物具有很强的特异性, 只有目标 DNA 片段被扩增, 而基于 isoeoxydon dehydrogenase 基因的引物扩增特异性较差。纯培养可以检测到 $5 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ DNA/每反应体系, 整个检测时间约为 5 h, 比传统培养法 (4~6 d) 时间大大缩短。苹果、苹果果肉和果汁接种纯 *P. expansum* 后所提 DNA 都得到了很好的扩增, 具有很高的特异性, 不受苹果样品 DNA 的干扰。【结论】本研究建立的 *P. expansum* 的 PCR 检测方法特异、快速、灵敏, 可用于商品果汁和苹果汁工业化生产中 *P. expansum* 的快速检测和质量控制, 也可用于工艺过程对 *P. expansum* 污染的快速溯源。

关键词: 苹果; 扩张青霉; PCR; 快速检测

Rapid Detection of *Penicillium expansum* Using PCR Technology

FAN Ming-tao¹, BI Jing-ying¹, Mansel W Griffith², WANG Hai-feng²

(¹College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China;

²Canadian Research Institute for Food Safety and Food Science Department, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

Abstract: 【Objective】To study the fast and specific detective method of patulin-producing *Penicillium expansum*. 【Method】Through pure culture of *P. expansum* in malt extract agar and malt extract broth, and cultivating *Penicillium expansum* in apples, apple flesh and apple juice, the *P. expansum* DNA was extracted by using modified Cenis method. Two pairs of primers based on isoeoxydon dehydrogenase and polygalacturonase were used to amplify *P. expansum* DNA, and a method to specifically and quickly detect *P. expansum* DNA was established. 【Result】Primers based on polygatacturonase have high specificity that only target DNA was amplified, however, primers based on isoeoxydon dehydrogenase have poor specificity. $5 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ DNA per reaction in pure culture could be detected. The detection time (about 5 h) was remarkably shortened compared with conventional plate culture method (about 4-6 d). DNA from apples, apple flesh and apple juice cultured with *P. expansum* was also remarkably amplified with high specificity, and without interference from apple DNA. 【Conclusion】The PCR method established in this study is specific, fast and sensitive to detect *Penicillium expansum*, it can be used in detection of *P. expansum* in apple juice production and quality control, it can also be used for tracing *P. expansum* contamination in processing.

Key words: Apple; *Penicillium expansum*; PCR; Rapid detection

0 引言

【研究意义】苹果浓缩汁是中国苹果深加工的主

导产品, 陕西省是中国苹果浓缩汁生产的主要省份之一, 出口量位居全国第一^[1]。苹果汁质量决定其出口量和价格, 其质量受诸多因素影响, 棒曲霉素含量是

收稿日期: 2006-09-25; 接受日期: 2007-01-29

基金项目: 教育部国家留学基金资助, 国家科技支撑计划项目 (2006BAK02A24), 陕西省科技攻关项目 (2007K01-12)

作者简介: 樊明涛 (1963-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物和食品安全。E-mail: mingtaofan@tom.com。通讯作者 Mansel W Graffith (1953-), 男, 英国人, 教授, 博士, 研究方向为食品中有害微生物的快速检测。E-mail: mgriffit@uoguelph.ca

苹果汁出口中一项要求很严的指标^[2-4]。苹果汁及苹果汁饮料的主要消费群体是青少年^[5-7]，如果长期饮用含有棒曲霉素的苹果汁，对这部分群体产生的身体伤害将是难以估量的。因此，降低苹果汁中棒曲霉素的含量已引起人们广泛关注，围绕着如何降低棒曲霉素含量，科技工作者做了大量工作^[8-11]。但这一问题却一直困扰着苹果汁生产企业，现有的办法主要是加工后的吸附脱除，不能从根本上解决问题，而吸附脱除时也对其营养成分造成一定的影响。【前人研究进展】科技工作者试图从控制棒曲霉素产生菌扩张青霉污染出发，减少产生量，免除后续的脱除工艺。要控制该菌的污染，需要知道该菌最主要的污染途径，因而需要对该菌进行检测。扩张青霉的传统检验方法是培养法，不仅费时（4~6 d）、费力，而且只能检测活菌。PCR 技术目前已经广泛应用到生物检测的各个方面，特别是在细菌和病毒的检测上，表现出非常强的优越性^[12-17]，而利用 PCR 技术检测棒曲霉素菌的报道还不多^[7,18]，且已有的报道都是实验室纯菌培养，没有涉及到苹果本身。尽管 PCR 法检测棒曲霉素菌还存在一些问题，但其快速和特异的优点显出了明显的优势和极具吸引力的前景。【本研究切入点】在前人对棒曲霉素产生菌纯菌检测方法的基础上，探讨 PCR 技术检测苹果汁生产中棒曲霉素菌的可行性，为检测棒曲霉素菌寻找快速、可靠的方法。【拟解决的关键问题】消除苹果本身 DNA 对 PCR 扩增的影响，优化扩增条件和参数，使该方法在苹果汁生产中检测棒曲霉素菌的灵敏度尽可能提高。

1 材料与方 法

1.1 菌种

扩张青霉 (*Penicillium expansum*) 和其它几个真菌菌株均由加拿大国家食品安全研究所 (Canadian Research Institute for Food Safety) 收集和保藏。

主要试剂: dNTP, DNA 聚合酶从德国 Roche 公司购得, EB 为新西兰产品, 琼脂糖为西班牙产品, DNAMarker 为 Invitrogen 公司产品。

主要仪器设备: BioRad 公司 PCR 仪, 电泳仪和凝胶成像仪等。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的培养 在无菌操作条件下, 将 *P. expansum* 接种到 Malt extract agar 和 Malt extract broth, 30℃ 避光培养 3~4 d, 同时将 *P. expansum* 接种于洗净晾干的苹果、苹果果肉和鲜榨果汁中, 然后

将接种的苹果和果肉装入无菌塑料袋中, 将果汁装入无菌管中, 在 30℃ 条件下避光培养 4~5 d。取腐烂果肉无菌条件下捣成匀浆, 然后取 1 g 匀浆, 将果汁混匀, 取 1 ml, 同法提取 DNA, 备用。

1.2.2 DNA 的提取 参考 Cenis^[20]的方法并做一些修改, 具体过程为: 菌体培养结束后, 用 10 ml 无菌水冲洗培养平板, 并用无菌接种环轻轻刮擦, 使菌体以及孢子尽可能多地存在于水中, 然后用无菌吸管吸取 1 ml 装入 1.5 ml 的离心管中。液体培养经匀化后, 用吸管吸取 1 ml 放入 1.5 ml 的离心管中。装有菌液的离心管在 14 000 r/min 的转速下离心 20 min, 小心弃掉上清液, 沉淀中加入 500 μl 裂解液 (1.5% SDS 和 0.25% Tris, pH 8), 溶解后在沸水浴中加热 30 min, 之后加入 500 μl phenol-chloroform-isoamyl alcohol (体积比 25 : 24 : 1) 有机溶剂并强烈振荡 10 min 以提取 DNA。之后该溶液在 14 000 r/min 下离心 20 min 分离 DNA 和菌丝体。离心之后, 将上清液细心转入另一离心管中, 在上清液中加入 1 ml 预冷的丙酮并离心以析出 DNA, 离心后小心去掉上清液, 将 DNA 沉淀阴干, 之后加入 50 μl 超纯水溶解 DNA, 备用。

接种 *P. expansum* 的苹果、果肉以及浊汁用同样的方法提取 DNA。

1.2.3 引物选择 第一对引物基于 isoeopoxidon dehydrogenase (ISO) 编码基因^[21]设计扩增目标片段大小为 600 bp, 正向引物为 5'-CAA TGT GTC GTA CTG TGCCC-3', 反向引物为 5'-ACC TTC AGT CGC TGT TCCTC-3'。第二对引物为 polygalacturonase (POL) 基因内一段保守区段, 设计扩增目的片段大小为 404 bp, 正向引物为 5' ATC GGC TGC GGA TTG AAA G 3', 反向引物为 5' AGT CAC GGG TTT GGA GGG A 3' (GenBank, AF 047713, 1998)^[7]。引物由加拿大圭尔夫大学实验服务中心合成, -20℃ 保存。

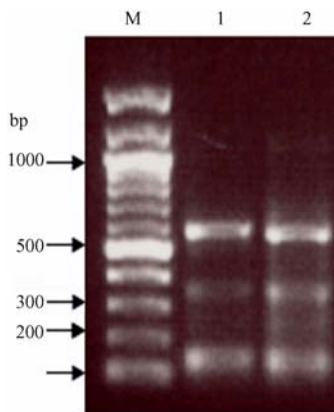
1.2.4 PCR 扩增条件 两对引物的扩增都在 25 μl 的 PCR 管中进行, 每管含 5 μl DNA 模板, 0.8 μmol·L⁻¹ 正反引物, 2.5 μl 10 倍 PCR 缓冲液, 0.25 μl dNTPs (100 mmol·L⁻¹) 以及 0.2 μl Tth DNA 聚合酶 (5 U·μl⁻¹)。通过预备试验, 两对引物的扩增温度条件分别为: 第一对引物, 94℃ 预热 5 min, 然后进行 40 个循环, 解链 94℃ 1 min, 退火 52℃ 45 s, 延长 72℃ 1 min, 最后在 72℃ 延长 5 min 结束循环。第二对引物的循环条件是 94℃ 预热 5 min, 然后进行 40 个循环, 解链 94℃ 1 min, 退火 57℃ 45 s, 延长 72℃ 45 s, 最后在 72℃ 延长 5 min 结束循环。

1.2.5 产物检测 用琼脂糖凝胶电泳法进行检测,胶浓度为 1.5%,点样量为 4 μ l 扩增产物,溴化乙锭染色。标准 DNA 用 Invitrogen 公司 100~1 400 bp 产品。

2 结果与分析

2.1 两种引物的 PCR 结果

引物 1 基于 isospoxydon dehydrogenase 基因,和棒曲霉素的合成有关,设计扩增 600 bp 的 DNA 片段,但试验中发现,该对引物除了扩增 600 bp 的主带以外,电泳图上还有其它一些扩增比较弱的条带,虽经过 PCR 条件的优化,主带以外仍隐约可见一些弱带(图 1),利用该引物扩增食品和饲料中常见的几种真菌,也有不同大小的扩增片段存在,说明该引物的特异性较差,不能作为检测 *P. expansum* 的专用引物。

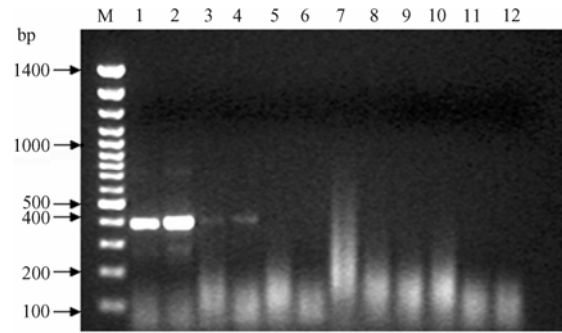


M. DNA Marker (100, 200, 300, 500, 1000 bp); 1. 液体培养所提 DNA; 2. 琼脂平板所提 DNA
M. DNA Marker (100, 200, 300, 500, 1000 bp); 1. DNA from liquid broth; 2. DNA from gar plate

图 1 引物 ISO 扩增 *P. expansum* DNA 的结果

Fig. 1 *P. expansum* DNA amplification by primers ISO

引物 2 基于 polygalacturonase 基因内一段保守片段,设计应扩增 404 bp 大小的 DNA 片段。试验结果表明,该引物扩增的特异性非常高,经扩增后,产物只有 404 bp 大小的片段,无任何其它片段的的存在,同时该对引物对食品和饲料中常见的真菌 DNA 也不予扩增,说明该引物对 *P. expansum* 具有很高的特异性。由于该引物对其它真菌的 DNA 不予扩增,反应液中引物几乎没有被消耗,在这些真菌的 DNA 的 PCR 扩增产物中,形成引物二聚体的可能性就大,因此在 PCR 的产物电泳图上,可以看到有一个较强的引物二聚体存在 (primer-dimers) (图 2)。



M. DNA Marker (100 bp, 200 bp, 400 bp, 500 bp, 1 000 bp, 1 400 bp); 1. 液体培养所提 *P. expansum* DNA; 2. 琼脂培养所提 *P. expansum* DNA; 3. *P. lorylophilum* CB11; 4. *P. lorylophilum* CB23; 5. *P. chrysogenum*; 6. *Aspergillus fumigatus*; 7. *A. flavus* I; 8. *A. flavus* 5; 9. *A. versicolor*; 10. *A. ochraceus*; 11. *A. niger*; 12. 空白对照
M. DNA Marker (100 bp, 200 bp, 400 bp, 500 bp, 1 000 bp, 1 400 bp); 1. *P. expansum* DNA from broth; 2. *P. expansum* DNA from agar plate; 3. *P. lorylophilum* CB11; 4. *P. lorylophilum* CB23; 5. *P. chrysogenum*; 6. *Aspergillus fumigatus*; 7. *A. flavus* 1; 8. *A. flavus* 5; 9. *A. versicolor*; 10. *A. ochraceus*; 11. *A. niger*; 12. Control

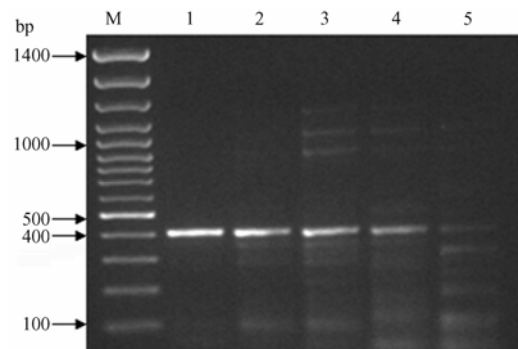
图 2 引物 POL 扩增 *P. expansum* DNA 和食品及饲料中常见真菌 DNA 的结果

Fig. 2 DNA amplification by primers POL for *P. expansum* and commonly occurred fungi in food and feeds

试验中发现,固体培养和液体培养所获 *P. expansum* 的 DNA 的 PCR 扩增结果没有明显差异,但液体培养易于操作,而且不易污染。

2.2 DNA 提取液的梯度稀释 PCR

梯度稀释可以检验 PCR 扩增的灵敏度。图 3 和图 4 分别是固体和液体培养 *P. expansum* 提取的 DNA 梯



M. DNA Marker (100, 400, 500, 1 000, 1 400 bp); 1. 提取液; 2. 10^{-1} 倍稀释液; 3. 10^{-2} 倍稀释液; 4. 10^{-3} 倍稀释液; 5. 10^{-4} 倍稀释液; 6. 10^{-5} 倍稀释液。图 4 同
M. DNA Marker (100, 400, 500, 1 000, 1 400 bp); 1. Original extraction; 2. 10^{-1} serial dilution; 3. 10^{-2} serial dilution; 4. 10^{-3} serial dilution; 5. 10^{-4} serial dilution; 6. 10^{-5} serial dilution. The same as Fig. 4

图 3 琼脂平板培养所提 DNA 系列稀释 PCR 扩增结果

Fig. 3 DNA and its serial dilution amplification from agar plate

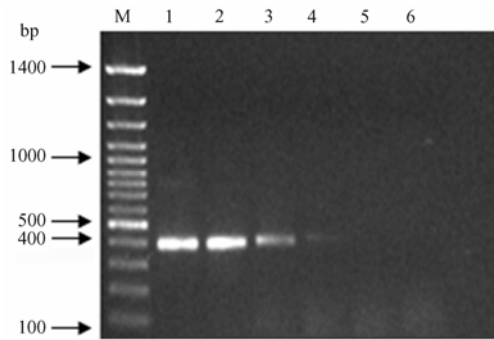


图4 液体培养所提DNA系列稀释PCR扩增结果

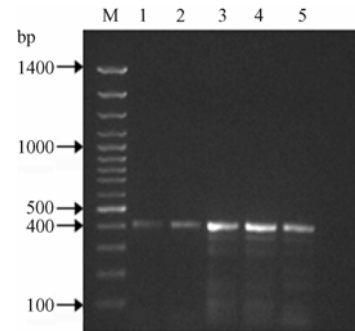
Fig. 4 DNA and its serial dilution amplification from liquid broth

度稀释的PCR电泳结果(引物为POL),从图中可以明显地看到,从琼脂平板提取的DNA可扩增到 10^{-3} 稀释度,而液体培养基提取物只能扩增到 10^{-2} 稀释度,两者的扩增灵敏度相差一个数量级。经DNA浓度测定得知,琼脂平板培养物提取液中DNA浓度较大,约为 $1115.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,而液体培养基提取物中DNA浓度较低,大约只有琼脂平板提取物浓度的 $1/4$,DNA浓度大约为 $280.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。造成两者之间DNA浓度有如此大的差异的原因是从琼脂平板上获得的菌体密度远远大于液体培养基中的菌体密度。

2.3 *P. expansum*接种苹果、果肉和果汁提取物的PCR

苹果、苹果果肉和鲜榨苹果汁接种*P. expansum*培养后所提取的DNA的PCR结果分别见图5、图6和图7。由图可以明显地看到,试验所用5种苹果接种*P. expansum*后所提DNA经引物POL扩增,电泳图上在404 bp处都有明显的条带存在,无其它任何杂条带,但电泳条带的亮度却有较大差异,说明5种苹果接种*P. expansum*后所提DNA均含有*P. expansum*的DNA,但DNA浓度有较大差异。从图5可以明显看到,Golden delicious和Granny smith苹果接种*P. expansum*后所提DNA的扩增条带最亮,其次为4152 McIntosh,而从Gala 4132所提DNA的扩增条带最弱,说明*P. expansum*在5种苹果中的生长有较大差异。已知pH、固形物非常显著地影响菌类的生长,但经测定,5种苹果鲜榨果汁的pH差别不大,最高值3.55(Granny smith),最低3.37(Golden delicious),pH相差仅为0.18,同时5种苹果固形物的含量差异也不大,只有1.2%,据此推断,造成这种生长差异的最可能原因是不同品种苹果对*P. expansum*的抗性不同,

而不是由苹果所含成分差异引起的,还有待于进一步研究予以证实。



M. DNA Marker (100 bp, 400bp, 500bp,1000bp, 1400bp), 1. Gala 4132; 2. Red delicious; 3. Golden delicious; 4. Granny smith; 5. 4152 McIntosh. 下同 The same as below

图5 5种苹果接种*P. expansum*培养后所提DNA的扩增结果
Fig. 5 DNA amplification of 5 apples inoculated with *P. expansum*

与完整苹果接种*P. expansum*的情况不同,5种苹果果肉接种*P. expansum*培养后所提DNA的PCR泳条带均较强(图6),条带亮度几乎没有差异,这可能是因为苹果果肉失去了完整苹果对*P. expansum*的抵抗力,*P. expansum*在5种苹果果肉中均能很好生长,所以果肉接种*P. expansum*所提DNA的PCR扩增结果比较强。

5种苹果鲜榨果汁接种*P. expansum*后所提DNA也同样可以扩增404 bp大小的DNA片段,但扩增的条带亮度较弱,几乎与液体培养*P. expansum*时所提

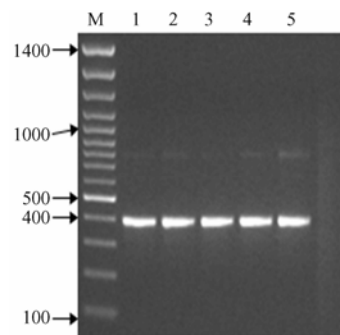


图6 5种苹果果肉接种*P. expansum*培养后所提DNA的扩增结果

Fig. 6 DNA amplification of 5 apple flesh inoculated with *P. expansum*

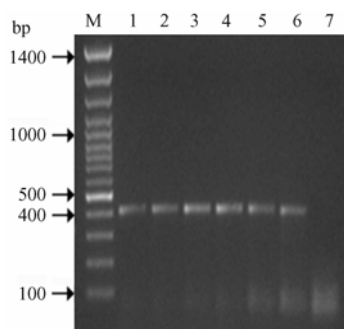


图 7 5 种苹果鲜榨果汁接种 *P. expansum* 培养后所提 DNA 的扩增结果

Fig. 7 DNA amplification of 5 apples juices inoculated with *P. expansum*

DNA 浓度低一样,表明 *P. expansum* 在浊汁中的生长差一些,为什么会造成这样的结果,还有待于进一步研究。

另外从图上可以清楚地看到,接种 *P. expansum* 的苹果、果肉以及果汁所提 DNA 进行 PCR 扩增时仍具有很高的扩增特异性,只有目的条带扩增,没有其它任何杂带存在,说明苹果本身的 DNA 对 *P. expansum* DNA 的扩增没有影响,该对引物具有非常高的扩增特异性。

3 讨论

在耐热耐酸菌的 PCR 快速检测和控制方面, Luo H^[12]、王思高^[22]、薛晚利^[23]、李建科^[24]、王宏^[26]等进行了广泛研究,基本探明了耐热菌发生的规律和控制措施。但在扩张青霉的快速检测方面进行的研究却不多。据资料检索和加拿大国家食品安全研究所有关扩张青霉研究的记录,目前只有 Patrick^[7]、Paterson^[15]和 Russel^[21]对该菌的 PCR 快速检测进行了研究,但都是利用纯菌的平板培养后所提 DNA 进行 PCR 的,没有涉及到苹果样品; Lars^[21]用 PCR 技术检测了复杂样品体系中的青霉属真菌,但特异性和灵敏度不高。本文在纯菌培养研究的基础上,对苹果、苹果果肉和果汁接种扩张青霉培养之后进行 PCR 检测,获得了良好结果,可以为苹果汁生产中扩张青霉的快速和特异检测提供方法依据,也可作为其它真菌检测的方法学参考。

4 结论

本研究建立的 PCR 方法可以快速和特异检测苹

果汁加工中的扩张青霉,在 25 μl 的 PCR 管中扩增的条件为:每管含 5 μl DNA 模板(含 DNA 约为 5×10^{-6} μg), 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反引物, 2.5 μl 10 倍 PCR 缓冲液, 0.25 μl dNTPs ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及 0.2 μl Tth DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)。扩增循环条件是 94°C 预热 5 min, 然后进行 40 个循环,解链 94°C 1 min,退火 57°C 45s, 延长 72°C 45 s,最后在 72°C 延长 5 min 结束循环。PCR 循环需要 2.5~3 h。该方法比传统的培养检测法(4~6 d) 时间大大缩短,最低检测限可以达到 5×10^{-6} μg DNA/每反应体系。

References

- [1] 李佑民. 我省成为世界最大苹果浓缩果汁生产基地. 陕西日报, 2006-02-08 (1 版).
Li Y M. Shaanxi Province has become the world's biggest apple juice concentrate production base. *Shaanxi People's Daily*, 2006-02-08. (First page). (in Chinese)
- [2] Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad J C. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 2421-2428.
- [3] Ritieni A. Patulin in Italian commercial apple products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 6086-6090.
- [4] Leggot N L, Shephard G S. Patulin in south African commercial apple products. *Food Control*, 2001, 12: 73-76.
- [5] Gokmen V, Acar J. Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *Journal of Chromatography*, 1996, 730: 53-58.
- [6] Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.8, March, 2002, Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Directorate-General Health and Consumer Protection. 2002.
- [7] Marek P, Annamalai T, Venkitanarayanan K. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 89: 139-144.
- [8] Bissessur J, Permaul K, Odhav B. Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(8): 1216-1219.
- [9] Dombink Kurtzman M A, Blackburn J A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 98(3): 241-248.
- [10] McCallum J L, Tsao R, Zhou T. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(12):

- 1937-1942.
- [11] Moodley R S, Govinden R, Odhava B. The effect of modified atmosphere and packaging on patulin production in apples. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(5): 867-871.
- [12] Luo H, Yousef A E, Wang H H. A real-time polymerase chain reaction based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp in apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39: 376-382.
- [13] Wan Kai, A E Yousef, S J Schwartz, Wang H H. Rapid, specific and sensitive detection of spoilage molds in orange juice using a real time Taqman PCR assay. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(2): 385-390.
- [14] Casey G D, Dobson A D W. Potential of using real time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice-a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 91: 327-335.
- [15] Paterson R R M, Kozakiewicz Z, Locke T, Brayford D, Jones S C B. Novel use of the isopoxydon dehydrogenase gene probe of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin. *Food Microbiology*, 2003, 20: 359-364.
- [16] T R Dean, B Roop, D Betancourt, M Y Menetrez. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61: 9-16.
- [17] Sugita C, Makimura K, Uchida K, Yamaguchi H, Nagai A. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology*, 2004, 42(5): 433-437.
- [18] Pedersen L H, Skouboe P, Boysen M, Soule J, Rossen L. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 35: 169-177.
- [19] B Patiño, González-Salgado A, González-Jaén M T. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 104: 207-214.
- [20] Ceniz J L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(9): 2380.
- [21] Paterson R M. The isopoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. *Mycology Research*, 2004, 108(12): 1431-1437.
- [22] 王思新, 焦中高, 王晓燕. 浓缩苹果汁加工中耐热菌的分析与控制. *食品科学*, 2000, 21(9): 54-56.
- Wang S X, Jiao Z G, Wang X Y. Analysis and control of *Alicyclobacillus acidoterrestis* in apple juice concentrate processing. *Food Science*, 2000, 21(9): 54-56. (in Chinese)
- [23] 薛晚利, 周玲, 李选社, 石兴民. 浓缩苹果汁中嗜酸耐热菌的分离及检测条件探讨. *西安交通大学学报(医学版)*, 2005, 26(2): 199-2001.
- Xue W L, Zhou L, Li X S, Shi X M. Study on isolation and detection of thermo-acidophilic bacteria in apple juice concentrate. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Science)*, 2005, 26(2): 1999-2001. (in Chinese)
- [24] 李建科, 冯再平, 仇农学. 耐热菌的竞争定量 PCR 检测方法优化与建立. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 375-380.
- Li J K, Feng Z P, Qiu N X. Optimization and establishment of quantitatively competitive PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 375-380. (in Chinese)
- [25] 王宏, 常玉华, 仇农学. PCR 法检测耐热耐酸菌条件的优化. *食品与发酵工业*, 2004, 30(11): 99-101.
- Wang H, Chang Y H, Qiu N X. Optimization of PCR reaction conditions in detection of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(11): 99-101. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)