

分子生物学技术在食源性致病菌检测中的研究进展

唐廷廷^{1,3}, 韩国全^{1*}, 王利娜², 肖玲¹, 王成程¹, 文昕¹

(1. 四川农业大学食品学院, 雅安 625014; 2. 四川省成都市食品药品检验研究院, 成都 610000;
3. 重庆三峡职业学院农林科技系, 万州 404155)

摘要: 食源性致病菌是导致食源性疾病的重要爆发根源之一。分子生物学检测技术因其灵敏性强、特异性高、快速简便、省时省力等优点, 在食源性致病菌的鉴定与检测中扮演着重要角色。本文系统阐述了利用分子生物学技术检测食源性致病菌的方法, 包括多重 PCR、实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增技术、基因芯片、液相芯片和基因探针技术等, 分析了目前国内外学者对于这些技术由单一检测向多重检测的突破, 及实现快速、高通量检测食源性致病菌的应用研究成果, 总结了各种检测技术的优缺点, 旨在为未来更好地发展快速、高通量检测食源性致病菌的技术方法提供参考。

关键词: 分子生物学技术; 食源性致病菌; 检测方法; 食品安全

Research progress of molecular biology techniques on detecting foodborne pathogens

TANG Ting-Ting^{1,3}, HAN Guo-Quan^{1*}, WAN Li-Na², XIAO Ling¹, WANG Cheng-Cheng¹, WEN Xin¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Sichuan Province Food and Drug Inspection Institute, Chengdu 610000, China; 3. Department of Agriculture and Forestry, Chongqing Three Gorges College, Wanzhou 404155, China)

ABSTRACT: Foodborne diseases are mainly caused by foodborne pathogens. Molecular biological detection technology which possesses the advantages of high sensitivity, high specificity, rapid and easy, and time-saving, and so on plays an important role in identification and detection of food-borne pathogens. This paper elaborated systematically the molecular biology technique adopted in detection of food-borne pathogens, including traditional PCR, multiple PCR, real-time fluorescent quantitative PCR, loop-mediated isothermal amplification technology, gene chips, liquid phase chips, and gene probes, and analyzed the breakthrough of single to multiple detection and research results of rapid and high-throughput detection of food borne pathogens from studies at home and abroad. Finally, the paper summarized the advantages and disadvantages of various detection techniques for the purpose that providing a reference for the better development of rapid, high-throughput detection food-borne pathogens in the future.

KEY WORDS: molecular biological technology; foodborne pathogens; detection method; food safety

*通讯作者: 韩国全, 博士, 副研究员, 主要研究方向为微生物与食品安全, 农产品加工与品质控制。E-mail: hans_980306@sicau.edu.cn

*Corresponding author: HAN Guo-Quan, Ph.D., Associate Research Fellow, College of Food Science, Sichuan Agricultural University, No.46, Xinkang Road, Yucheng District, Ya'an 625014, China. E-mail: hans_980306@sicau.edu.cn

1 引言

食源性致病菌(foodborne pathogen)是指以食物为载体而导致人类发生疾病的一大类细菌^[1]。包括沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、志贺氏菌等。美国疾病控制预防中心(CDC)统计,美国 2012~2015 年间共爆发 20107 起食源性感染病例,有 4531 人住院,77 人死亡,其中沙门氏菌、弯曲杆菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157 等食源性致病菌是引起疾病的爆发根源^[2]。中国 2001~2010 年间共爆发 5021 起食源性疾病疫情,发病人数 140101,死亡 1427 人,其中以微生物引起的爆发事件起数和发病人数最多,分别占总数的 40.93% 和 56.39%^[3]。由此可见,食源性疾病的爆发与食品受食源性致病菌污染密切相关,而如何检查出食源性致病菌的存在已成为控制食品安全的关键之一。

分子生物学的发展始于 1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构,这标志着现代分子生物学的兴起,由其通过分析不同基因组的区别以达到鉴定的目的^[4]。随着社会的发展,市场贸易的活跃,据美国食品工业协会预测,中国进口食品的销量将以每年 15% 的速度高速增长,到 2018 年中国将成为全球进口食品最大的消费国^[5]。进出口食品检疫作为食品流通的必要关卡,在这个过程中实现食品检测快速、高通量对食品贸易安全、高效流通具有重要的推动作用。由此,单一检测需向多重检测突破与发展。随着科学的不断发展,分子生物学技术并不只局限于单个技术的运用与推广,多种技术相结合优势互补正成为实现快速、高通量检测的一个突破口。本文以 PCR 技术、环介导等温扩增技术、生物芯片、基因探针技术等食源性致病菌检测的应用做一综述,指出其存在的问题,并提出改进建议和下一步发展的重点及前景展望,以期对我国致病菌检测技术的发展提供参考。

2 聚合酶链式反应技术

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种体外核酸扩增技术,始于 20 世纪 80 年代中期。因其具有灵敏度高、操作简便、检测效率高、特异性强、检测样品质量要求低等优点,已获得生命科学界的广泛认可。近年来,随着 PCR 技术的不断发展与完善,PCR 已从只能单一扩增检测,发展到应用于多个领域的多种 PCR 技术检测与分析。其中,就包括常规 PCR、多重 PCR、实时荧光 PCR、不对称 PCR、巢式(半巢式)PCR、反转录 PCR 等^[6],并以多重 PCR 与定量 PCR 的研究最多,运用也较广泛。

2.1 多重 PCR

多重 PCR(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)又称复合 PCR,是以常规 PCR 为基础发展起来的新技术。

1988 年首次由 Chamberlian 等提出^[7],其是多对引物同时存在一个反应体系,进而实现不同模板的扩增,获得目的片段,一方面保留单一检测的敏感性、特异性,另一方面又减少了人力物力的投入,提高检测效率^[8]。目前多重 PCR 正应用于医学、遗传学、免疫学、微生物学、寄生虫学等领域,主要作用于基因敲除、多态性分析和分析突变、RNA 检测等。

多重 PCR 技术可分为两类:一类是利用多对特异性引物检测一个致病菌, Molina 等^[9]以 *lacZ* 基因和 *yaiO* 基因为靶基因,利用双重 PCR 检测大肠菌群中是否存在与食源性致病菌爆发相关的病原体大肠杆菌。Rosimin 等^[10]通过建立四重 PCR 对单核细胞李斯特菌、绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌、非典型英诺克李斯特菌在蔬菜中的快速检测,有效保证了李斯特氏菌种属的鉴定。强世龙等^[11]以副溶血性弧菌 *tdh* 基因及 *tl* 基因为靶基因设计两对引物,实现了模拟污染样品检出限为 10 CFU/g 对贝类中副溶血性弧菌的双重 PCR 检测。总的来说,这类多重 PCR 在种属分型上具有着重要的应用价值。

另一类是同一反应体系中检测两个或两个以上的不同致病菌, Kim 等^[12]对 30 株弧菌进行基因组序列比对,找出弧菌属共有的基因序列,结合霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和拟态弧菌的特有序列建立了六重 PCR,实现了弧菌属中主要 5 种致病菌的快速检测。张秀芳等^[13]以大肠杆菌 O157: H7 的 *rfaE* 基因和沙门氏菌 *ivA* 基因为靶基因,在同一体系中实现对生鲜猪肉中大肠杆菌 O157: H7 和沙门氏菌的双重 PCR 检测,灵敏度达到 10 pg/μL,远高于杨小鹏等^[11]所建立的灵敏度为 32 pg/μL 的类似方法。由此,多重 PCR 技术是实现微生物快速检测的有效途径之一,但传统的多重 PCR 技术一直存在多对引物同时扩增易出现扩增失败或产生非特异性产物等问题^[14]。徐义刚等^[15]采用了一种新开发的双启动寡核苷酸引物(dual-priming oligonucleotide, DPO)系统对目标基因实现内部放大控制(internal amplification control, IAC),用于同时检测霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌和溶藻弧菌,相比于传统 PCR,基于 DPO 系统的多重 PCR 具有更宽的退火温度在 48℃~68℃,以有效扩增靶序列,在纯培养条件下或人工污染样品基质中最低检出限为 1.5×10^2 CFU/mL。假阳(阴)性问题作为制约 PCR 技术推广的原因之一,张志宏等^[16]将丙啶单氮化合物与多重 PCR 结合进行研究,开发一种在奶粉、面条和米饭中能够选择性检测活的产肠毒素的蜡芽芽孢杆菌的方法,纯培养状态下检测限为 10^2 CFU/mL,非纯培养状态下检出限为 10^5 CFU/mL。值得注意的是,目前所建立的多重 PCR 技术的确能够实现快速、高通量检测多种食源性致病菌,但从目前的研究结果来看,其灵敏性在实际样品检测过程中与纯培养条件下相比存在较大差异,这有待于对多重 PCR 技术抗干扰能力的提高。

并且随着多学科之间的相互渗透,多重 PCR-ELISA^[17]等新技术的出现也为检测技术的发展增添了新活力。

2.2 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(Real-time PCR, RT-PCR)实现了 PCR 技术从定性到定量的飞跃,1996 年由美国应用生物系统公司(Applied Biosystem)发明,Heid 等^[17]作为第一个使用 Taqman 探针以 TAMRA 和 FAM 分别作为荧光染料和淬灭基团发展了该方法。其能够通过计算机对扩增产物直接进行精确的定量分析,显著提高了灵敏性,并采用全密闭管检测,不需要再进行繁琐的电泳、紫外线观察,不仅简化了试验步骤而且避免了电泳对扩增产物的污染及产生的误差,具有效率高、重复性好、自动化程度高等优点,在实现定量检测中具有重要的应用价值^[18,19]。

实时荧光定量 PCR 技术因荧光模式不同分为二类:一类是荧光染料法,另一类是荧光探针法。目前在实现高通量多重检测上荧光探针法的发展前景较大,其是利用能与目的 DNA 片段特异性杂交的探针,对 PCR 扩增产物进行定量指示,有 TaqManTM 探针, TaqMan MGB, LightCycler 探针等,现在以 TaqMan 探针和 LightCycler 较为常见^[20]。随着荧光探针的发展与成熟,实时定量 PCR 技术正被广泛运用于食品生产链病原菌的高通量检测,Maxim 等^[21]利用实时定量 PCR 技术建立了最佳的定量检测空肠弯曲杆菌的方法,并在基于量化的过程中为空肠弯曲杆菌提供一个新的评估检测框架。郑秋月等^[22]根据金黄色葡萄球菌种属鉴定 *nuc* 基因和 MRSA 决定因子 *mecA* 建立了 TaqMan 探针双色荧光 PCR 方法快速检测金黄色葡萄球菌,灵敏度达到 2.7×10^3 CFU/mL,且检测过程只需 1 h 左右,极大缩短了检测周期,但其并不包括前增菌处理的时间。Tetsuya 等^[23]通过利用多重实时荧光定量 PCR 技术已实现对志贺毒素的 3 个 *Stx1* 亚型和 7 个 *Stx2* 亚型的检测、筛选。Huang 等^[24]基于一个 TaqMan 多色组合探针实时定量 PCR 技术,成功突破金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、伤寒沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7、霍乱弧菌、副溶血性弧菌和链球菌 8 种食源性致病菌的快速检测。

目前食品生产不仅需要现场定性检测系统的建立,还需要量化和表征病原体,由此,发达国家在较多领域已经开始尝试用定量 PCR 技术代替常规的基于培养的检测方法,尤其在病原菌检测领域^[25],但目前仍然面临较多的挑战。保证检测质量就是挑战之一,对于分子生物学方法经验不足的检测员是很难去保证检测结果的准确性,例如对于 PCR 热循环仪软件的使用。考虑的另一个重要问题是,定量 PCR 检测的 DNA 包含死细胞的 DNA,现已有一些解决这一问题的方法,如使用丙啉单氮化合物^[26]或浮力密度离心^[27]等,但这些处理往往会增加 PCR 预处理的工作,并且其对检测结果的准确性是否具有影响还有待进一步的研究。目前在我国,定量 PCR 技术还是以科研运用为主,其

主要在于存在设备要求高、实验材料价格昂贵、数据处理复杂,且还不能实现对 PCR 产物大小进行检测等问题^[28],制约着荧光定量 PCR 技术在我国推广与发展。

3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种体外扩增 DNA 片段的现代分子生物学技术,由 Nimitphak 等^[29]在 2000 年首次提出。其是以靶基因 6 个区域设计 4 条特异性引物,在恒温状态下依靠具有链置换活性的 DNA 聚合酶进行反应,实现核酸扩增,最后可通过扩增副产物(焦磷酸镁沉淀)的浊度直接进行结果判断^[30]。因其不需要模板的热变性、长时间温度循环、繁琐的电泳等过程,且检测速度快、特异性强、灵敏度高、设备需求简单及扩增效率高等优点,具有实现现场快速检测的应用价值^[31,32]。

随着技术的不断完善与发展,LAMP 技术也在不断的改进^[33,34]。于颖等^[35]在 LAMP 体系中加入 SYBR Green I 染料建立实时荧光 LAMP 方法检测牛乳中金黄色葡萄球菌,其比普通 LAMP 法灵敏度提高 10 倍。姜佩等^[36]针对沙门氏菌的 *invA* 基因和金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因设计引物,实现了同时检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的多重 LAMP 技术,单独检测灵敏度可达 10 fg/ μ L,而再采用 RT-PCR 对产物分析时灵敏度达到 1 fg/ μ L,远高于常规 PCR 方法 10 pg/ μ L 的灵敏度。但现阶段 LAMP 技术的运用较少,在多重检测中更是困难重重,主要原因在于实现多重 LAMP 检测时其引物要在单重 LAMP 的 4 条引物的基础上将成倍增加,引物间的相互干扰及不确定因素太多,使得多重方法的建立较困难,同时由于单重 LAMP 检测反应产物是通过焦磷酸镁沉淀的浊度直接进行结果判断,由此产物如何有效鉴定与区分成为了多重 LAMP 检测的短板^[32,35]。

4 生物芯片技术

生物芯片技术始于 20 世纪 80 年代,是一个分子微点阵的微型生物化学分析系统,利用机械手臂点样技术或者微电子光刻技术在一定体积的固相载体表面构建多至上万个不同探针,以实现多种生物组分的检测^[37]。具有多元化、高通量、检测时间短、便于携带等优点,目前以基因芯片、液相芯片在食源性致病菌检测中运用比较多。

4.1 基因芯片

基因芯片又称寡核苷酸芯片,最早是由 E. Southern 在 1989 年提出的一项新生物技术^[38],运用核酸杂交的原理来实现样品基因的检测,将大量 DNA 或 RNA 片段按碱基配对的方式在固相载体表面进行杂交,再通过扫描系统检测杂交信号和强度,进而获取样品基因信息,实现定性、定量^[39]。

基因芯片是生物芯片技术中最先发展、最早研究与开发、目前运用也最多的技术^[37]。祝儒刚等^[40]分别以大肠埃希氏菌 *slt* 基因、沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因、志贺氏菌 *ipaH* 基因和单核细胞增生李斯特菌 *inlA* 基因为编码,设计引物和探针,进行多重 PCR 扩增,产物与含特异性探针的芯片杂交,实现了运用多重 PCR 结合基因芯片技术检测肉及肉制品中的 5 种致病菌,灵敏度达到 2 pg,远高于多重 PCR 检测灵敏度 20 pg,且该方法能够有效区分死活菌。Eom 等^[41]通过 16S rDNA-based 基因芯片技术,实现了对志贺氏菌、大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲杆菌、创伤弧菌的同时检测,但不足的是在对实际样品进行多重检测的过程中极易出现假阳性结果。

4.2 液相芯片

液相芯片又称微球悬浮芯片(suspension array, liquid chip)是一个基于 Xmap(flexible multi-analyte profiling)技术的新型生物芯片技术平台,始于 20 世纪 90 年代中期,利用其具有多种不同的荧光编码微球通过不同方式的结合与杂交交联能多至 100 种不同的探针,通过两束不同激光分别检测微球荧光编码和分子荧光强度来实现定性和定量,是继 DNA 芯片、蛋白质微阵列后新一代的高通量分子检测技术平台^[42]。

液相芯片技术分为二类:一类是基于抗原-抗体反应,另一类是基于核酸杂交反应。金玉娟等^[43]以副溶血性弧菌 *tdh* 基因、沙门菌 *invA* 基因、单增李斯特氏菌 *hlyA* 基因、肠出血性大肠埃希氏菌 *stx1* 和 *stx2* 基因,建立了基于多重 PCR 结合液相芯片技术同时检测四种食源性致病菌的方法,特异性达 100%。吕东月等^[44]通过在同一体系中将多种偶联探针的微球进行杂交,利用藻红蛋白和生物素的亲和作用报告荧光,建立了一种能够同时筛选金黄色葡萄球菌、沙门菌、副溶血性弧菌、单增李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7、创伤弧菌、空肠弯曲菌的 xMAP 液相芯片技术,其从样品处理到检测结果只需 3.5 h,但因微球偶联的效率较差,使其敏感性偏低,因此在实现多重检测的过程中,反应体系的优化和微球偶联的效率尤为重要。

5 基因探针技术

基因探针又称核酸探针,是 1975 年由 Sobuthem 首次提出。利用 DNA 碱基互补配对原则,在适宜条件下形成杂交 DNA 分子,通过对某一微生物的特征 DNA 双链中的一条进行标记,制成探针,进而观察待测样品与标记的探针之间是否形成杂交分子,由此可判断样品中是否含有某种致病菌,并通过放射性强度定量分析样品中致病菌^[45]。目前基因探针技术在单一食源性致病菌检测中的应用研究已经较为成熟,食品中的大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌等食源性致病菌已可以用基因探针

技术进行快速检测^[46,47]。目前,其在实现多重检测中与 PCR 技术结合运用、发展较多,但由于在食品检测中组分十分复杂,可能出现荧光探针的非特异性导致结果失真,因此选择出高选择性、高特异性的生物分子并链接于量子点上,是实现准确多重检测的关键,也是目前技术突破的难点。

6 问题与展望

人类的生存与发展无法离开食品,保证“食品安全”那就是保障人类健康与社会发展。随着国内外食品安全问题的不断出现,全球食品工业的快速发展,建立特异、高效、便捷、灵敏的检验食源性致病菌的方法是保证食品安全的重要前提,并对防止食源性疾病的发生、检测与危险性评估都具有着重要意义。

近几年来,现代分子生物学在食源性致病菌检测的新技术不断被开发,结合 PCR、环介导等温扩增、生物芯片、基因探针各技术的发展现状与各技术之间的相互融合的情况、存在的问题,针对下一步多重检测研究工作的开展,提出个人的看法及建议:(1)污染问题,以操作污染为主要原因,分子生物学技术其灵敏度较高,如果出现微量靶序列的污染将对检测结果造成很大影响,因此做分子生物学实验的过程中谨慎、小心是必要的原则,这样才能有效的保证检测质量。(2)出现假阳(阴)性结果,在 PCR 检测过程中如果体系中存在与模板相似的碱基序列,则将导致检测结果失真,并且在多重 PCR 检测过程中更容易出现碱基错配、漏配等问题。因此,避免假阳(阴)性结果的出现必须选择、确定具有高特异性的基因序列、探针,细心设计、优化合成引物,开发、改进新方法有效区别死活菌,提高检测结果的准确性。(3)前增菌问题,分子生物学检测食源性致病菌,由于其存在量极少,为使其达到最低检出限,往往需要一个增菌培养过程,目前还主要以传统培养方法富集目标菌,但其往往培养时间较长,故建立多重检测,选择确定一种能够同时稳定、准确富集多种致病菌的培养基在实现高通量检测上非常有必要,但多重富集培养基目前还不能较好的解决稳定、准确培养目标菌的难题。现在较多生物公司大力推出 DNA/RNA 快速提取试剂盒,但其成本较高,运用于高通量检测不具有实际意义,因此目前试剂盒还是主要运用于科研或复检。

目前我国病原菌检测中还是以传统的基于培养的方法进行检测,虽然传统国标检测存在检测时间长、操作复杂等问题,但其在实际样品检测过程中检测结果的准确性还是较优于其它技术。尽管如此,在特异性、灵敏度有保障的前提下实现检测技术快速、高通量是目前或者未来必定的发展方向。目前 PCR、环介导等温扩增、生物芯片、基因探针等技术存在的不足,需要科学研究工作者们继续不断的完善与改进,科研技术继续不断的创新,推广、发展分子生物学技术。

参考文献

- [1] 叶明强. 免疫荧光法及红外光谱法在食源性致病菌检测中的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2009.
Ye MQ. Study on the detection of food borne pathogens by immunofluorescence and infrared spectroscopy [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2009.
- [2] Huang JY, Henao OL, Griffin PM, *et al.* Infection with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture-independent diagnostic tests on surveillance - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2012-2015 [J]. *Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report*, 2016, 65(14): 368-371.
- [3] 徐君飞, 张居作. 2001-2010年中国食源性疾病暴发情况分析[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(27): 313-316.
Xu JF, Zhang JZ. Analysis on outbreak of food borne diseases in China during 2001-2010 [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(27): 313-316.
- [4] Van BA. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7(2): 174-184.
- [5] 商务部中国世界贸易组织研究会. 进口食品将达 4800 亿, 万国码头等“第三级”期待突围[DB/OL]. [2016-9-8]. <http://apfc-cwto.org/newsitem/277467063>.
The ministry of commerce Chinese society for the study of the world trade organization. Food imports will reach 480 billion, Universal terminal "third grade" expect to break [DB/OL]. [2016-9-8]. <http://apfc-cwto.org/newsitem/277467063>.
- [6] Wei J, Zhou XM, Xing D, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea foods by electrochemiluminescence polymerase chain reaction method [J]. *Food Chem*, 2010, 123(3): 852.
- [7] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141-11156.
- [8] 余倩, 黄梦娜. 食源性致病菌多重 PCR 快速检测研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(19): 125-127.
YU Q, Huang MN. Research on rapid detection of food borne pathogenic bacteria by multiplex PCR [J]. *Food Res Dev*, 2014, 35(19): 125-127.
- [9] Molina F, López-Acedo E, Tabla R, *et al.* Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR [J]. *BMC Biotechnol*, 2015, 15(1): 1-9.
- [10] Rosimin AA, Kim MJ, Joo IS, *et al.* Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2016, 69: 601-607.
- [11] 强世龙, 张公亮, 孙黎明, 等. 双重 PCR 快速检测海水贝类中副溶血性弧菌[J]. *大连工业大学学报*, 2015, 34(1): 6-10.
Qiang SL, Zhang SL, Shun LM, *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater shellfish double PCR [J]. *J Dalian Inst Light Ind*, 2015, 34(1): 6-10.
- [12] Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, *et al.* Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1): 1-11.
- [13] 张秀方, 武二丽, 刘肖, 等. 双重 PCR 检测生鲜猪肉中大肠杆菌 O157:H7 和沙门菌方法的建立与应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(2): 150-154.
Zhang QF, Wu EL, Liu X, *et al.* The establishment and application of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* double PCR detection methods in fresh pork [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(2): 150-154.
- [14] 刘志梅, 徐义刚, 曲敏, 等. 3 种食源性致病菌 Tem-PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2016, 37(4): 186-190.
Liu ZM, Xu YG, Qu M, *et al.* Establishment of Tem-PCR detection method for 3 kinds of food borne pathogens [J]. *Food Sci*, 2016, 37(4): 186-190.
- [15] Xu YG, Sun LM, Wang YS, *et al.* Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*, in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay [J]. *Food Contr*, 2017, 71: 64-70.
- [16] Zhang ZH, Feng LX, Xu HY, *et al.* Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(2): 1047-1055.
- [17] Santaclara FJ, Velasco A, Pérez-Martín RI, *et al.* Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus*, species and *Katsuwonus pelamis*, in food products [J]. *Food Chem*, 2015, 180(47): 9-16.
- [18] 胡金强, 雷俊婷, 詹丽娟, 等. 食源性微生物的分子生物学检测方法的研究进展[J]. *食品工业*, 2014, 37(7): 201-204.
Hu JQ, Lie JT, Zhan LJ, *et al.* Research progress in molecular biological detection methods of food borne microorganisms [J]. *Food Ind*, 2014, 37(7): 201-204.
- [19] 景建洲, 李红利, 孙新城, 等. 食源性致病菌分子生物学检测技术研究进展[J]. *郑州轻工业学院学报:自然科学版*, 2015, 56(5): 27-32.
Jing JZ, Li HL, Shun XC, *et al.* Research progress in molecular biological detection of food borne pathogens [J]. *J Zhengzhou Univ Light Ind*, 2015, 56(5): 27-32.
- [20] 张惟材. 生物实验室系列实时荧光定量 PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013: 5-10.
Zhang HC. Real time fluorescence quantitative PCR in biological laboratory [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013: 5-10.
- [21] Gosselin-Théberge M, Taboada E, Guy RA. Evaluation of real-time PCR assays and standard curve optimisation for enhanced accuracy in quantification of *Campylobacter*, environmental water isolates [J]. *J Microbiol Meth*, 2016, 129: 70-77.
- [22] 郑秋月, 战晓微, 那晗, 等. 食源性 MRSA 双色荧光 PCR 检测方法建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(1): 113-118.
Zheng QY, Zhan XW, Na H, *et al.* Establishment of a method for detection of food borne MRSA double color fluorescence PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(1): 113-118.
- [23] Tetsuya H, Atsusi I, Sunao I, *et al.* Multiplex real-time pcr assays for screening of shiga toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures [J]. *J Food Protect*, 2015, 78(10): 1800-1811.
- [24] Huang QY, Hu QH, Li QG. Identification of 8 foodborne pathogens by multicolor combinational probe coding technology in a single real-time PCR [J]. *Clin Chem (Washington, DC)*, 2007, 53(10): 1741-1749.
- [25] Löfström C, Josefson MH, Hansen T, *et al.* 9-Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens [J]. *High Throughput Screening Food Safety Assessment*, 2015: 219-248.

- [26] Lv XC, Li Y, Qiu WW, *et al.* Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine [J]. *Food Contr*, 2016, 66: 69–78.
- [27] Löfström C, Schelin J, Norling B, *et al.* Culture-independent quantification of *Salmonella enterica*, in carcass gauze swabs by flotation prior to real-time PCR [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145(3): S103–S109.
- [28] 程海星, 郭月英, 任霆, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(3): 243–247.
Chen HX, Guo Y, Ren X, *et al.* The principle of real time fluorescent quantitative PCR and its application in food inspection [J]. *Food Ferment Ind*, 2015, 41(3): 243–247.
- [29] Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63–E63.
- [30] Notomi T, Mori Y, Tomita N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1): 1–5.
- [31] Zhuang LL, Gong J, Li Q, *et al.* Detection of *Salmonella* spp. by a Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)method targeting *bcfD* gene[J]. *Letter Appl Microbiol*, 2014, 59(6): 658–664.
- [32] 何晓华, 顿玉慧, 卢力, 等. 环介导等温扩增技术在肠杆菌科致病菌检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(19): 312–317.
Hu XH, Dun YH, Lu L, *et al.* Progress in loop mediated isothermal amplification for detection of pathogenic bacteria in the Department of intestinal bacteria [J]. *Food Sci*, 2014, 35(19): 312–317.
- [33] Biswas G, Sakai M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(7): 2881–2895.
- [34] 于颖. 实时荧光 LAMP 技术检测牛乳中金黄色葡萄球菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
Yu Y. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by real time fluorescent LAMP [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015.
- [35] 姜侃, 张慧, 汪新, 等. 多重 LAMP—熔解曲线法检测食品中两种食源性致病菌[J]. *食品与机械*, 2015, 31(2): 87–92.
Jiang K, Zhang H, Wang X, *et al.* Two kinds of multiple LAMP detection of food borne pathogens in melting curve Method [J]. *Food Mach*, 2015, 31(2): 87–92.
- [36] 肖守军, 陈凌, 许宁. 生物芯片进展[J]. *化学进展*, 2009, 21(11): 2397–2410.
Xiao SJ, Chen L, Xu N. Advances in biological chip [J]. *Progress Chem*, 2009, 21(11): 2397–2410.
- [37] Fodor SP, Rava RP, Huang XC, *et al.* Multiplexed biochemical assays with biological chips [J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 555–556.
- [38] 李山云, 林奇, 李维强. 基因芯片技术及其在食品工业中的应用[J]. *食品与机械*, 2005, 22(4): 72–75.
Li S Y, Lin Q, Li W Q. Gene chip technology and its application in food industry [J]. *Food Mach*, 2005, 22(4): 72–75.
- [39] 祝儒刚, 李拖平, 宋立峰. 应用基因芯片技术检测肉及肉制品中 5 种致病菌[J]. *食品科学*, 2012, 33(14): 211–215.
Zhu RG, Li TP, Song LF. Detection of 5 pathogenic bacteria in meat and meat products by gene chip technology [J]. *Food Sci*, 2012, 33(14): 211–215.
- [40] Eom HS, Hwang BH, Kim DH, *et al.* Multiple detection of food-borne pathogenic bacteria using a novel 16S rDNA-based
- [41] oligonucleotide signature chip [J]. *Biosens Bioelectro*, 2007, 22(6): 845–85.
- [42] 陈玮. 液相芯片技术的原理与应用进展[J]. *成都医学院学报*, 2008, 3(3): 225–231.
Chen W. The principle and application progress of liquid phase chip technology [J]. *J Chengdu Med Coll*, 2008, 3(3): 225–231.
- [43] 金玉娟, 陈应坚, 甘莉萍, 等. 应用液相芯片技术联合多重 PCR 快速检测四种常见食源性致病菌的研究[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(6): 735–740.
Jin YJ, Chen YY, Gan LP, *et al.* Rapid detection of four common food borne pathogens by using liquid phase chip technology combined with multiplex PCR [J]. *J Trop Med*, 2015, 15(6): 735–740.
- [44] 吕东月, 石晓路, 陈妙龄, 等. 常见 7 种食源性致病菌 xMAP 液相芯片快速筛查方法的建立及应用[J]. *卫生研究*, 2012, 41(1): 96–101.
Lv DY, Shi XL, Chen ML, *et al.* Establishment and application of xMAP liquid phase chip rapid screening method for 7 common food borne pathogens [J]. *Health Res*, 2012, 41(1): 96–101.
- [45] 徐茂军. 基因探针技术及其在食品卫生检测中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(2): 66–71.
Xu MJ. Gene probe technology and its application in food hygiene detection [J]. *Food Ferment Ind*, 2001, 27(2): 66–71.
- [46] 张小苗. 基因探针法应用于食品中金黄色葡萄球菌快速检测的效果[J]. *生物技术世界*, 2015, (9): 12–12.
Zhang XM. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food by gene probe method [J]. *Biotech World*, 2015, (9): 12–12.
- [47] 赵铜, 戎奇吉, 叶菊莲, 等. 致病性大肠埃希菌毒素基因的 Allglo 探针技术鉴定[J]. *浙江预防医学*, 2014, 26(6): 646–648.
Zhao J, Rong JQ, Ye JL, *et al.* Identification of pathogenic *Escherichia coli* toxin gene by Allglo probe technique [J]. *Zhejiang Pre Med*, 2014, 26(6): 646–648.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



唐廷廷, 硕士, 主要研究方向为食源性微生物检测。

E-mail: 15123421889@163.com



韩国全, 副研究员, 主要研究方向为微生物与食品安全, 农产品加工与品质控制。

E-mail: hans_980306@sicau.edu.cn