

PCR 技术检测空肠弯曲菌的研究进展

陈 金, 毕水莲*

(广东药学院食品科学学院, 中山 528458)

摘 要: 空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是一种人畜共患病病原菌, 可以使人 and 动物引发多种疾病。目前, 检测 *C. jejuni* 采用的国标方法是传统的培养法, 但 *C. jejuni* 培养条件苛刻, 且培养法存在操作繁琐、特异性不强、费时等缺点。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)以其快速、准确、灵敏度高、特异性强的特点, 现已广泛应用于 *C. jejuni* 的检测, 并成为目前快速检测临床与食品中 *C. jejuni* 最常用的方法。本文综述了近年来利用 PCR 技术, 包括常规 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、实时荧光定量 PCR、PCR-酶联免疫吸附法、最大几率数-PCR、PCR-限制性片段长度多态性、PCR-变性高效液相色谱、PCR-变性梯度凝胶电泳和磁捕获-荧光 PCR 方法检测 *C. jejuni* 的研究进展, 并针对这些 PCR 技术的原理、检测效果、优点和缺点等方面进行了分析比较, 为有效控制和预防该菌引起的疾病提供重要信息。

关键词: 空肠弯曲菌; 聚合酶链反应; 食源性致病菌; 人畜共患病

Advances in detection of *Campylobacter jejuni* by polymerase chain reaction technology

CHEN Jin, BI Shui-Lian*

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

ABSTRACT: As a zoonotic pathogen, *Campylobacter jejuni* could cause lots of diseases of human and animal. At present, plate-culture method is used to detect *C. jejuni* as the national standard. But the cultivation conditions of *C. jejuni* are very strict, and the plate-culture method has the disadvantages such as complicated operation, specificity, and time consuming. Polymerase chain reaction, which is excellent for the rapid, accurate, high sensitivity and specificity, has been widely used in the detection of *C. jejuni*, and become the most common method for the rapid detection of *C. jejuni* in clinical and food samples. The recent research progress was summarized in this paper and the principle, effect and characteristics among conventional PCR, multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR, PCR-ELISA, MPN (most probable number)-PCR, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR-DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography), PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and IMC-FPCR (immunomagnetic capture fluorescent PCR) were also compared and analyzed for providing important information for the effective prevention and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31401596)、广东省自然科学基金资助项目(S2013040013491)、广东省科技计划项目(2014A040401087)、广东省医学科研基金资助项目(B2014205)、广东省大学生创新创业训练计划项目(201410573030)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401596), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2013040013491), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A040401087), Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (B2014205), and the Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Guangdong Province (201410573030)

*通讯作者: 毕水莲, 副教授, 主要研究方向为食品质量安全及检测技术研究。E-mail: bishuilian@163.com

*Corresponding author: BI Shui-Lian, Associate Professor, School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China. E-mail: bishuilian@163.com

control of diseases caused by *C. jejuni*.

KEY WORDS: *Campylobacter jejuni*; polymerase chain reaction; food-borne pathogenic bacteria; zoonoses

1 引言

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是一种人畜共患病原菌,可以引起人和动物发生多种疾病^[1-3]。并且 *C. jejuni* 也是一种食源性致病菌,被认为是引起全世界人类细菌性腹泻的主要原因^[4-7]。建立快速、特异的检测 *C. jejuni* 的方法,对控制和预防该菌引起的疾病具有重要意义。目前,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是最常用的快速检测临床与食品中 *C. jejuni* 的方法^[8]。本文就近年来国内外临床和食品中在检测 *C. jejuni* 采用的各种 PCR 技术的研究进展进行综述。

2 空肠弯曲菌 PCR 检测方法研究现状

2.1 常规 PCR 方法

常规 PCR 方法是所有由 PCR 技术衍生的其它检测方法的基础。Dedieu 等^[9]采用 *omp50* 基因作为种特异性靶基因建立了一种 PCR 检测 *C. jejuni* 的方法,此外,还报道了一种以马尿酸盐试验和 *omp50* 检测法联合检测弯曲杆菌属的新方法。Bi 等^[10]采用基于 *cdt* 基因开发的 PCR 检测试剂盒检测鸡肉和鸭肉中 *C. jejuni*,与培养法相比,操作更加简便、快速,检出率大大提高。徐义刚等^[11]针对 *gyrA* 基因设计了一对双启动寡核苷酸引物(DPO),建立了 *C. jejuni* 的 DPO-PCR 检测方法,该方法的退火温度范围宽,在 48~68 °C 退火温度范围内均可高效扩增靶基因片段,检测限为 1.2×10^2 cfu/mL,检测结果与国标法(GB/T 4789.9-2008)检测结果完全一致。

2.2 多重 PCR (multiplex PCR)方法

多重 PCR,又称多重引物 PCR 或复合 PCR,它是指在一个 PCR 反应体系中包括两对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 方法。目前已报道的多重 PCR 反应中,最多可同时扩增出 12 条带,主要用于多种病原微生物的同时检测与鉴定^[12]。Kabir 等^[13]分别以 *cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 基因建立了同时检测 *C. jejuni*、*C. coli* 和 *C. fetus* 的多重 PCR 方法,用该方法对分离自腹泻病人的 325 株弯曲菌进行检测,并与基于 *hipO* 基因的 PCR 检测和 16S rRNA 基因测序结果进行对比,结果表明,以 *cdtC* 基因为靶基因比 *cdtA* 和 *cdtB* 建立的鉴定 *C. jejuni*、*C. coli* 和 *C. fetus* 的多重 PCR 方法更加准确和可靠。盖文燕等^[14]分别以 16S rRNA、*hipO* 和 16S-23S rRNA 基因为靶序列设计特异性引物,建立多重 PCR 方法检测 37 株 *C. jejuni* 和 *C. coli*,同时采用 ingene CAM nested PCR 检测试剂盒进行检测验证,并对结果进

行比较分析。结果表明两种方法检测结果的符合率为 100%,二者与国标 GB/T 4789.9—2008 方法的符合率达 97%以上。该多重 PCR 方法具有较好的特异性,灵敏度可达 0.81 pg/ μ L 的 *C. jejuni* DNA, 0.93 pg/ μ L 的 *C. coli* DNA。Platts-Mills^[15]采用双重 PCR 法检测婴儿粪便样本中 *C. jejuni* 和 *C. coli*,并与酶联免疫法、传统生化培养法进行对比,结果酶联免疫法检测灵敏度和特异性分别为 8.7%、98.0%,培养法的灵敏度和特异性分别为 8.5%、97.6%。PCR 法及酶联免疫法分离样本中 *C. jejuni*、*C. coli* 的阳性率均显著高于培养法。Harrington 等^[16]采用国际新型 BD MAX 仪器进行基于 *tuf* 基因多重实时 PCR 检测 *C. jejuni*、*C. coli*,集粪便样本、提取基因组 DNA 到报告结果一体化程序处理,与培养法相比,具有超高的灵敏度和特异性。

2.3 巢式 PCR (nested-PCR)方法

巢式 PCR 可细分为完全巢式 PCR 和半巢式 PCR (seminested-PCR),前者是指使用 1 对引物对目标片段进行扩增后,在这对引物之间再设计 1 对引物对第 1 对引物的扩增产物进行二次扩增。后者是在第 1 对引物之间加 1 条引物,利用两对(3 条)引物先后进行扩增。通过巢式 PCR 可从极微量的模板中获得高浓度和高纯度的靶基因片段,克服因第 1 对引物扩增产量低和目标基因含量低而造成的假阴性,大大提高 PCR 方法的灵敏度(通常比常规 PCR 灵敏度高 100 倍以上)^[17]。Bang 等^[18]分别针对 16S rRNA 和 *hipO* 基因设计引物,建立可快速检测环境样品中 *C. jejuni* 和 *C. coli* 的巢式 PCR 方法,该方法的检测灵敏度可达 2~3 cfu/mL。高正琴等^[19]根据 GenBank 数据库 *C. jejuni* 的 *flaA* 基因设计两对引物,两对引物扩增的片段大小分别为 1719 bp 和 640 bp,对 120 份临床样品提取 DNA 后进行巢式 PCR 扩增,结果与传统的细菌分离培养法的结果完全一致,特异性好,最低检测限为 10 cfu,整个检测过程可在 8 h 内完成,可用于临床样本的批量检测和实验动物中 *C. jejuni* 的检测。

2.4 实时荧光定量 PCR (real-time PCR)方法

实时荧光定量 PCR 是指在反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。实时荧光定量 PCR 所使用的荧光物质可分为两种:荧光探针和荧光染料。荧光探针一般采用双标记,5'端用荧光报告基团标记,3'端用荧光淬灭基团标记,当两基团离的比较近时,检测不到荧光,距离较远时,则能检测到荧光。常用的荧光探针有 Taqman 探针、分子信标、双杂交探针等。荧光染料中最常用的是 SYBR Green,它是一种仅与双链 DNA 进行特异结

合的染料^[20]。实时荧光定量 PCR 结合了 PCR 技术的核酸扩增高效性, 探针技术的高特异性, 光谱技术的高敏感性和高精确定量等多种优点, 且荧光定量 PCR 仪操作完全封闭, 仪器直接读数, 结果判断更客观真实, 已广泛应用于多种致病菌的快速检测^[21]。王大勇等^[22]根据 *C. jejuni* 的 VS1 基因序列设计引物, 建立了一种环境水体中 *C. jejuni* 的荧光定量 PCR 准确快速方法。该反应体系在 $2.66 \times 10^9 \sim 2.66 \times 10^0$ copies/ μL 拷贝数模板量的线性范围内, 所获得回归方程线性关系较好($r^2=0.998$), 对 *C. jejuni* 纯培养物检测限为 46 cfu/mL, 实际水样检测结果与常规生化鉴定结果一致, 从采用膜吸附-洗脱法浓缩富集菌体到检测整个过程可在 4 h 内完成。高瑞娟等^[23]根据 *C. jejuni* 的 *hipO* 基因和沙门氏菌的 *invA* 基因分别设计合成引物和 TaqMan 探针, 分别使用 FAM、JOE 作为探针报告基团, TAMRA 作为探针淬灭基团, 建立了一种适用于检测食品中 *C. jejuni* 和沙门氏菌的双重实时荧光定量 PCR 方法。该方法对 *C. jejuni* 的检测限可达 10 cfu/mL, 沙门氏菌的检测限达 230 cfu/mL。Vencia 等^[24]使用一种实时定量 PCR 试剂盒检测水果、蔬菜制品及乳制品中 *C. jejuni*、*C. coli* 和 *C. lari*, 结果表明, 该法可作为官方快速检测 *C. jejuni*、*C. coli* 和 *C. lari* 阳性样本及潜在污染源的备选方法。Hao 等^[25]分别以 VS1 基因、23S rDNA 基因设计 3'端带有小沟结合物(minor groove binder, MGB)的 TaqMan 探针, 建立多重实时荧光定量 PCR 法, 该方法既可准确、特异的检测 *C. jejuni*, 又可同时鉴定大环内酯类抗生素的耐药突变。

2.5 PCR-酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

PCR-ELISA 方法是将 PCR 方法与免疫学方法结合起来的一种技术, 主要是使用 ELISA 方法检测 PCR 扩增产物来代替电泳检测, 由于 PCR-ELISA 方法的多级放大作用, 其敏感性大大提高, 同时由于不使用电泳方法检测 PCR 产物, 从而避免了可能通过 EB 染色对人体造成的伤害。Sails 等^[26]应用 PCR-ELISA 方法检测环境水样品中经过富集培养后的 *C. jejuni* 和 *C. coli*, 结果显示, 该方法可以检测出亚致死性损伤的和“活的非可培养”状态的弯曲菌, 少数样品使用 PCR-ELISA 方法检测为阳性, 而用传统培养方法结果为阴性。且检测时间比传统培养方法可缩短 2~3 d。史艳宇等^[27]针对 *C. jejuni* 的 16S rRNA 基因设计特异性引物和探针, 核酸探针 5'端标记生物素, 建立 PCR-ELISA 方法检测牛奶与鸡肉中 *C. jejuni*, 其检出率与 API 生化鉴定结果一致, 灵敏度比 PCR 法高 10 倍。唐梦君等^[28]针对 *gyrA* 基因设计 *C. jejuni* 特异性引物和探针, 将生物素和地高辛分别标记上游引物 5'端和核酸探针 3'端, 建立 PCR-ELISA 检测方法。该方法对 *C. jejuni* 的基因组 DNA 检测阈值为 2 fg, 对模拟泄殖腔样本的检测限为 50 cfu/mL。对 100 份临床样品进行检测, PCR 和 PCR-ELISA 方法阳性检出率分别

为 60%和 69%。

2.6 最大几率数 (most probable number, MPN)-PCR 方法

MPN-PCR 方法是将 PCR 技术与最大几率数相结合的一种技术。Tang 等^[29]利用 MPN-PCR 法检测鸡肉及其副产品中的弯曲菌, 结果显示生鸡肉和鸡肉副产品中弯曲菌的污染量在 3~4600 MPN/g 之间, *C. jejuni* 的数量显著高于 *C. coli*, 鸡肝和鸡胗部位的弯曲菌的污染率比其它部位更高, 在 $10^3 \sim 10^4$ MPN/g 之间。Henry 等^[30]也应用 MPN-PCR 法对澳大利亚江口和废水中的弯曲菌进行监测, 准确率达 94%。MPN-PCR 法是目前公认的最有发展前景的定量检测技术之一, 与传统的 MPN 方法相比, 该方法简化了实验室操作流程, 操作更加简便快捷, 且更节省材料^[31]。

2.7 PCR-限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法

PCR-RFLP 技术的基本原理是用 PCR 扩增目的 DNA, 扩增产物再用特异性内切酶消化切割成不同大小片段, 通过凝胶电泳分辨。因不同等位基因的限制性酶切位点分布不同, 产生不同长度的 DNA 片段条带。此项技术大大提高了目的 DNA 的含量和相对特异性, 而且方法简便, 可用于细菌的分型和鉴定^[32]。目前欧洲弯曲菌网络 Campynet 推荐其网络实验室成员使用基于 *flaA* 基因的标准化 PCR-RFLP 分型方法, 这样便可通过网络将世界各地获得弯曲菌数据进行比对, 从而能更好地了解各个基因型的区域分布和流行趋势。Kamei 等^[33]建立了以 *cdt* 基因为靶基因的 PCR-RFLP 方法检测和鉴定 *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. helveticus* 和 *C. upsaliensis*。结果表明, 除 *C. hyointestinalis* 检测灵敏度为 88%以外, 其它弯曲菌灵敏度和特异性均为 100%。

2.8 PCR-变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)方法

PCR-DHPLC 是一种快速检测 PCR 扩增产物的新技术。该技术对基因突变、小片段插入或缺失等 DNA 序列变异的检测具有快速、准确、灵敏、经济、自动化和高通量的特点^[34]。徐君怡等^[35]应用多重 PCR 结合变性高效液相色谱技术建立食品中 *C. jejuni* 的快速检测方法。该 PCR-DHPLC 方法的检测灵敏度在 DNA 水平上达到 10 pg/ μL , 在人工模拟污染样品起始污染浓度为 1.5 cfu/mL。

2.9 PCR-变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法

PCR-DGGE 技术于 1993 年首次应用于分子微生物学研究领域, 近几年, 开始逐步应用于发酵食品的微生物研究、食源性致病微生物的快速检测和分型^[36, 37]。毕水莲等^[38]和 Vashin 等^[39]先后使用 PCR-DGGE 技术分别对市售生

鲜鸡、鸭肉和禽粪便样本进行 *C. jejuni* 和 *C. coli* 的同时检测和分型。相比于培养方法, 可以大大缩短检测时间, 提高 *C. jejuni* 和 *C. coli* 的检出率。

2.10 磁捕获-荧光 PCR (immunomagnetic capture fluorescent PCR, IMC-FPCR) 方法

IMC-FPCR 方法是将免疫磁珠分离与荧光 PCR 技术结合的一种方法。应用该方法检测样品中 *C. jejuni*, 可以大大提高检出率和灵敏度, 且该方法不需要增菌培养, 因此可以解决“活的非可培养状态”的 *C. jejuni* 的检测难题。罗开健^[40]发明了一种 *C. jejuni* 和沙门氏菌的磁捕获-双重实时荧光 PCR 检测的方法, 该方法利用抗血清和磁性微珠制备 *C. jejuni* 和沙门氏菌免疫磁珠, 利用免疫磁珠直接捕获检样中目的菌, 然后利用设计的 *C. jejuni* 和沙门氏菌的特异性引物和探针, 通过一次实时荧光 PCR 扩增来判断样品是否被 *C. jejuni* 和沙门氏菌污染。该方法可在 1 d 内完成所有检测过程。Cao 等^[41]将 PCR 与免疫磁分离技术结合, 建立了一种快速、可靠、特异的检测鸡粪便样本中

C. jejuni 的方法, 在没有预增菌的情况下, 可在 3 h 内完成检测, 检测最低限为 10 cfu/ μ L。Suh SH 等^[42]开发了一种基于核酸适配体的磁捕获荧光 PCR 方法检测 *C. jejuni*, 与相类似的 IMC-FPCR 方法相比, 其灵敏度和捕获效率更高, 表明核酸适配体是采用荧光 PCR 检测时比免疫磁珠抗体更好的选择。

3 空肠弯曲菌 PCR 检测方法的对比

PCR 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法, 由高温变性、低温退火复性及适温延伸反应组成一个周期, 循环进行, 使目的 DNA 得以迅速扩增。与传统培养法分离鉴定 *C. jejuni* 相比, 具有特异性强、灵敏度高、操作简便、省时等优点, 但美中不足的是, PCR 方法只能用于 *C. jejuni* 的鉴定, 如需从临床或食品中获取 *C. jejuni* 菌株, 仍然要依赖培养法进行分离。由常规 PCR 衍生的其它 PCR 技术检测 *C. jejuni* 除具有 PCR 技术的共性以外, 均有其各自的优缺点, 见表 1。

表 1 各种 PCR 方法检测 *C. jejuni* 的原理、效果及特点对比
Table 1 The principle, effect and characteristics of detection of *C. jejuni* by PCR technology

PCR 方法	原理	优点	缺点
multiplex PCR	采用 2 对以上特异性引物进行聚合酶链扩增	可同时检测多种弯曲菌或包含 <i>C. jejuni</i> 在内的其它致病菌	检测 <i>C. jejuni</i> 的准确性和特异性可能受到影响
nested-PCR	采用 2 对以上引物进行套式聚合酶链扩增	扩增倍数提高, 从而灵敏度提高; 降低了非特异性反应连续放大进行的可能性, 特异性更强, 准确性更高	交叉污染的几率增大
real-time PCR	使用荧光探针或荧光染料标记	检测时间缩短, 灵敏度和特异性均提高, 可定量检测 <i>C. jejuni</i>	仪器(荧光定量 PCR 仪)昂贵, 检测成本高, 荧光探针保存时间较短
PCR-ELISA	PCR 与 ELISA 技术结合	灵敏度、特异性、准确度均有所提高, 可定量检测, 对仪器高求较低	容易产生污染引起假阳性, 灵敏度及特异性不及荧光探针检测, 且操作繁琐
MPN-PCR	PCR 与 MPN 技术结合	可定量检测样品中 <i>C. jejuni</i> 活菌体, 不需特殊仪器	操作繁琐, 耗时长
PCR-RFLP	PCR 与 RFLP 技术结合	简便, 特异性提高, 可用于多种弯曲菌的同时鉴定	检测成本较高
PCR-DHPLC	PCR 与 DHPLC 技术结合	PCR 产物不需纯化, 更加快速、准确、灵敏, 检出率大大提高, 可自动化、高通量检测	仪器(高效液相色谱)昂贵, 成本较高
PCR-DGGE	PCR 与 DGGE 技术结合	对标本的纯度要求低, 可实现 <i>C. jejuni</i> 的同时检测及分型	需要特殊电泳仪器(变性梯度凝胶电泳仪), 对操作人员经验要求较高
IMC-FPCR	免疫磁珠分离与荧光 PCR 技术结合	无需增菌培养, 耗时短, 检出率和灵敏度显著提高, 可定量检测	对于大体积样本中微量 <i>C. jejuni</i> 的检测灵敏度略有降低

4 结论与展望

作为最常用的分子生物学技术之一的 PCR 技术以其简便、快速、特异性强、灵敏度高等众多优点一直被政府检测机构、医院、科研院所、企业等高度重视,并飞速发展。近年来 PCR 技术已广泛应用于 *C. jejuni* 的检测,可选用的保守靶基因也日益增多,主要有 16S rRNA^[43,44]、23S rRNA 基因、甲硫氨酸氨肽酶基因 *mapA*^[45,46]、载铁体转运相关脂蛋白基因 *ceuE*^[46]、鞭毛蛋白基因 *flaA* 或 *flaB*、外膜纤维结合蛋白基因 *cadF*^[47,48]、马尿酸酶基因 *hipO*^[48,49]、细胞扩张毒素基因 *cdtA*、*cdtB* 或 *cdtC*^[49,50]、外膜蛋白基因 *omp50*^[51]、细菌延展因子基因 *tuf* 等。随着 PCR 技术的迅猛发展,新的检测方法的不断涌现,国际公认的快速检测 *C. jejuni* 的标准方法有望就此产生。

参考文献

- [1] Morley L, McNally A, Paszkiewicz K, et al. Gene loss and lineage specific restriction-modification systems associated with niche differentiation in the *Campylobacter jejuni* Sequence Type 403 clonal complex [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(11): 3641–3647.
- [2] Fitzgerald C. *Campylobacter* [J]. Clin Lab Med, 2015, 35(2): 289–298.
- [3] Lugert R, Gross U, Zautner AE. *Campylobacter jejuni*: components for adherence to and invasion of eukaryotic cells [J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2015, 128(3–4): 90–97.
- [4] Colles FM, Maiden MC. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects [J]. Microbiology, 2012, 158(Pt 11): 2695–2709.
- [5] Epps SV, Harvey RB, Hume ME, et al. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs [J]. Int J Environ Res Public Health, 2013, 10(12): 6292–6304.
- [6] Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors [J]. Food Microbiol, 2015, 48: 99–108.
- [7] Platts-Mills JA, Kosek M. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries [J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(5): 444–450.
- [8] Gharst G, Oyarzabal OA, Hussain SK. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods [J]. J Microbiol Methods, 2013, 95(1): 84–92.
- [9] Dedieu L, Pages JM, Bolla JM. Use of the *omp50* gene for identification of *Campylobacter* species by PCR [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2301–2305.
- [10] Bi SL, Shi L, Yan H, et al. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples [J]. Ann Microbiol, 2013, 63(1): 179–185.
- [11] 徐义刚, 李丹丹, 刘忠梅, 等. 基于 DPO 引物的空肠弯曲菌 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(4): 293–296. Xu YG, Li DD, Liu ZM, et al. Development and preliminary application of DPO-based PCR method for detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Chin J Prev Vet Med, 2014, 36(4): 293–296.
- [12] Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis [J]. Clin Lab Med, 2015, 35(2): 461–486.
- [13] Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan [J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(1): 19–27.
- [14] 盖文燕, 王君玮, 王娟, 等. 多重 PCR 鉴定动物源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 119–123. Gai WY, Wang JW, Wang J, et al. A multiplex PCR assay for animal origin *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(2): 119–123.
- [15] Platts-Mills JA, Liu J, Gratz J, et al. *Campylobacter* detection and significance in stool by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing country settings [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4): 1074–1080.
- [16] Harrington SM, Buchan BW, Doern C, et al. Multi-center evaluation of the BD MAX™ Enteric Bacterial Panel PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* and *C. coli*), and *Shiga* toxin 1 and 2 genes [J]. J Clin Microbiol, 2015, doi: 10.1128/JCM.03480–14.
- [17] Jalouli M, Jalouli J, Ibrahim SO, et al. Comparison between single PCR and nested PCR in detection of human papilloma viruses in paraffin-embedded OSCC and fresh oral mucosa [J]. In Vivo, 2015, 29(1): 65–70.
- [18] Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, et al. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples [J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(5): 359–369.
- [19] 高正琴, 张强, 刑进, 等. 空肠弯曲菌套式 PCR 快速检测方法的建立与初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(12): 727–730. Gao ZQ, Zhang Q, Xing J, et al. Establishment and application of nested polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Chin J Comparative Med, 2006, 16(12): 727–730.
- [20] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data [J]. Neurosci Lett, 2003, 339(1): 62–66.
- [21] Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(7): 731–754.
- [22] 王大勇, 方振东, 谢朝新, 等. 环境水体中空肠弯曲杆菌荧光定量 PCR 快速检测方法的研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(8): 685–691. Wang DY, Fang ZD, Xie CX, et al. Research of a method for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in environmental water using quantitative PCR [J]. Immunol J, 2013, 29(8): 685–691.
- [23] 高瑞娟, 张凯, 吕嘉敏, 等. 空肠弯曲菌和沙门菌双重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2014, 35(10): 10–13. Gao RJ, Zhang K, Lü JM, et al. Duplex real-time PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* [J]. Prog Vet Med, 2014, 35(10): 10–13.
- [24] Vencia W, Nogarol C, Bianchi D M, et al. Validation according to ISO 16140: 2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 177(2): 78–80.
- [25] Hao HH, Liu J, Kuang XH, et al. Identification of *Campylobacter jejuni*

- and determination of point mutations associated with macrolide resistance using a multiplex TaqMan MGB real-time PCR [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, doi: 10.1111/jam.12793.
- [26] Sails AD, Bolton FJ, Fox AJ. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1319–1324.
- [27] 史艳宇, 刘金华, 薛力刚, 等. PCR-ELISA 法检测食品中空肠弯曲菌[J]. *食品科学*, 2013, 34(10): 246–249.
Shi YY, Liu JH, Xue LG, *et al*. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in foods by PCR-ELISA [J]. *Food Sci*, 2013, 34(10): 246–249.
- [28] 唐梦君, 周生, 张小燕, 等. 空肠弯曲杆菌 PCR-ELISA 检测方法的建立[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(3): 340–345.
Tang MJ, Zhou S, Zhang XY, *et al*. Development of a PCR-ELISA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* [J]. *J Jilin Agr Univ*, 2013, 35(3): 340–345.
- [29] Tang JYH, Ghazali FM, Sakha AA, *et al*. MPN-PCR enumeration of *Campylobacter* spp. in raw chicken meats and by-products[J]. *Front Agric China*, 2010, 4(4): 501–506.
- [30] Henry R, Schang C, Chandrasena GI, *et al*. Environmental monitoring of waterborne *Campylobacter*: evaluation of the Australian standard and a hybrid extraction-free MPN-PCR method [J]. *Front Microbiol*, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00074.
- [31] Sharma S, Radl V, Hai B, *et al*. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(3): 445–452.
- [32] Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, *et al*. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping [J]. *Parasitology*, 2014, 141(4): 453–461.
- [33] Kamei K, Asakura M, Somroop S, *et al*. A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis* [J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(Pt 5): 659–666.
- [34] Kodama CS, Cuadros-Orellana S, Bandeira CH, *et al*. Use of PCR-DHPLC with fluorescence detection for the characterization of the bacterial diversity during cassava (*Manihot esculenta* Crantz) fermentation [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 1304–1313.
- [35] 徐君怡, 曹际娟, 刘淑艳, 等. 变性高效液相色谱检测空肠弯曲菌[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(9): 854–858.
Xu JY, Cao JJ, Liu SY, *et al*. Detection of *Campylobacter jejuni* with denaturing high-performance liquid chromatography [J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(9): 854–858.
- [36] 孟赫诚, 毕水莲, 闫鹤, 等. 禽肉中弯曲菌的分离、PFGE 和 DGGE 基因分型研究[J]. *华南理工大学学报*, 2012, 40(5): 149–154.
Meng HC, Bi SL, Yan H, *et al*. Isolation of *Campylobacter* strains in poultry products and genotyping identification of strains by means of PFGE and DGGE [J]. *J S China Univ Technol (Nat Sci Edit)*, 2012, 40(5): 149–154.
- [37] Yano S, Amano E, Katou A, *et al*. Intestinal carriage and excretion of *Campylobacter jejuni* in chickens exposed at different ages [J]. *J Food Prot*, 2014, 77(7): 1184–1187.
- [38] 毕水莲, 陈妙瑞, 张志刚, 等. Fla-DGGE 法对食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检测和分型[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(10): 1148–1152.
Bi SL, Chen MR, Zhang ZG, *et al*. Detection and genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in food samples by Fla-DGGE [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2010, 26(10): 1148–1152.
- [39] Vashin I, Stoyanchev T, Iliev M, *et al*. Application of polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis assay of the flagellin gene for direct detection and subtyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in avian faecal samples [J]. *Bul J of Vet Med*, 2012, 15(1): 22–29.
- [40] 罗开健, 高瑞娟. 空肠弯曲杆菌和沙门氏菌的磁捕获-双重实时荧光 PCR 检测方法: 中国, CN103952487A [P]. 2014.07.30
Luo KJ, Gao RJ. Immunomagnetic capture- duplex fluorescent PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella*: China, CN103952487A [P]. 2014.07.30
- [41] Cao C, Høgberg J, Wolff A, *et al*. Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation-PCR [J]. *Food control*, 2012, 24(1): 23–28.
- [42] Suh SH, Dwivedi HP, Jaykus LA. Development and evaluation of aptamer magnetic capture assay in conjunction with real-time PCR for detection of *Campylobacter jejuni* [J]. *Food Sci Technol*, 2014, 56(2): 256–260.
- [43] Oporto B, Hurtado A. Emerging thermotolerant *Campylobacter* species in healthy ruminants and swine [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2011, 8(7): 807–813.
- [44] Ivanova M, Singh R, Dharmasena M, *et al*. Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR [J]. *Poult Sci*, 2014, 93(6): 1587–1597.
- [45] de Boer RF, Ott A, Güren P, *et al*. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(1): 253–259.
- [46] Rodgers JD, Lawes JR, Vidal AB, *et al*. Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 159(3–4): 390–396.
- [47] Ghosh R, Uppal B, Aggarwal P, *et al*. A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of *campylobacter* gastroenteritis in children [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2014, 44(1): 42–48.
- [48] Sarkar SR, Ray NC, Hossain MA, *et al*. Multiplex polymerase chain reaction for detection of *Campylobacter* from stool specimen [J]. *Mymensingh Med J*, 2014, 23(3): 449–455.
- [49] Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, *et al*. Isolation and characterization of *campylobacter* strains from diarrheal patients in central and suburban Bangkok, Thailand [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2015, 68(3): 209–215.
- [50] Shiramaru S, Asakura M, Inoue H, *et al*. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method [J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(7): 857–862.
- [51] Dedieu L, Pagès JM, Bolla JM. Use of the omp50 gene for identification of *Campylobacter* species by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 2301–2305.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈 金, 学士, 主要研究方向为食品检测。
E-mail: cj2012_2016bb@163.com



毕水莲, 副教授, 主要研究方向为食品质量安全及检测技术研究。
E-mail: bishuilian@163.com

“食品化学与营养”专题征稿函

食品中成分相当复杂, 有些成分是动、植物体内原有的; 有些是在加工过程、储藏期间新产生的; 有些是人为添加的; 有些是原料生产、加工或储藏期间所污染的; 还有的是包装材料带来的。食品营养是指人体从食品中所能获得的满足自身生理需要的必要的生物学过程, 而食品营养学是研究食物、营养与人体生长发育和健康的关系以及提高食品营养价值的措施。食品化学就是从化学的角度和分子水平上研究食品中化学成分的结构、理化性质、营养作用、安全性及可享受性, 以及各种成分在食品生产、食品加工和储藏期间的变化及其对食品营养性、享受性和安全性影响的科学, 为改善食品品质、开发食品新资源、革新食品加工工艺和储运技术、科学调整膳食结构、改进食品包装、加强食品质量与安全控制及提高食品原料加工和综合利用水平奠定理论基础。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品化学与营养”专题, 由西南大学食品科学学院副院长, 西南大学“食品科学与工程”一级学科博士学位授权点、重庆市重点一级学科“食品科学与工程”和重庆市“食品科学与安全优秀教学团队”的带头人, 重庆市营养学会的副理事长, 重庆市营养学会营养与保健食品专业委员会的主任委员, 重庆市食品安全促进会专家委员会主任委员, 重庆市营养师协会副会长, 国家食品药品监督管理局保健食品审评专家 **阚建全 教授** 担任专题主编, 围绕 **食品中的营养成分、微量及添加成分、生理活性成分及以上各成分在食品加工、储藏过程中的次生物质的分离与分析, 食品加工、储藏和运销过程对食品化学成分的影响, 营养与膳食平衡、能量平衡、疾病防治的关系, 食品的营养素强化与功能性食品等方面**或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2015 年 12 月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及专题主编 **阚建全 教授** 特邀请您和您的团队为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2015 年 11 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

谢谢您的参与与支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部