

核酸交联剂在食源致病菌活菌检测中应用的研究进展

黄楚楚, 张志鸿, 余 双, 孙马钰, 魏 华, 许恒毅*

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘 要: 近年来, 由食源致病菌引起的食品安全问题越来越受到人们的重视, 如何快速准确检测食品中是否存在食源致病菌是食品安全研究的热点问题。基于 PCR 检测食源致病菌的方法因快速且特异性强而被广泛应用, 然而普通的 PCR 检测方法难以消除死菌残留 DNA 导致的假阳性结果, 因而无法对致病菌进行准确检测。核酸交联剂是一种含有两个或两个以上烷基化官能团的烷基化试剂, 目前, 在食源致病菌检测中应用的核酸交联剂主要为 EMA 和 PMA。核酸交联剂通过一定方式的诱导可选择性的透过死菌的细胞膜并与 DNA 产生共价交联, 从而强有力的抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增, 达到鉴别死菌和活菌的效果。本文就核酸交联剂在食源致病菌活菌检测中应用的研究进展进行了综述, 以期能为相关研究者开发食源致病菌活菌检测方法提供参考。

关键词: 食源致病菌; PCR 技术; 核酸交联剂

Application of nucleic acid cross-linking agent on detecting viable foodborne pathogens

HUANG Chu-Chu, ZHANG Zhi-Hong, YU Shuang, SUN Ma-Yu, WEI Hua, XU Heng-Yi*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: In recent years, food safety issues cause more and more people's attention by foodborne pathogens, and how to quickly and accurately detect the foodborne pathogens in food is a hot issue in food safety research. The methods based on PCR to detect foodborne pathogenic bacteria are widely used for its rapid and strong specificity, however, it is difficult to eliminate false positive results for regular PCR due to the interference of DNA from dead bacteria, and thus it is inability for accurate detection of viable bacteria. Nucleic acid cross-linking agent is a kind of alkylating agent containing two or more than two alkylation functional groups. At present, ethidium bromide monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA) are the most widely used nucleic acid cross-linking agent in the detection of viable foodborne pathogens. The nucleic acid cross-linking agent could selectively penetrate through dead bacteria cell membranes and covalent cross-link their DNA, thus eliminate false signal from the PCR amplification of dead bacteria. This paper reviewed the application of nucleic acid cross-linking agent in the detection of viable foodborne pathogens, with an aim to provide references for researchers to develop viable pathogen detection methods.

基金项目: 江西省青年科学家(井冈之星)培养对象项目(20142BCB23004)

Fund: Supported by Training Plan for the Young Scientist (Jinggang Star) of Jiangxi Province (20142BCB23004)

*通讯作者: 许恒毅, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: kidyxu@163.com

*Corresponding author: XU Heng-Yi, Ph.D, Associate Professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: kidyxu@163.com

KEY WORDS: foodborne bacteria; PCR technique; nucleic acid cross-linking agent

1 引言

近年来食品安全事故频发, 国民对食品安全的关注度也日益提升。食源致病菌是威胁食品安全和人类健康的主要来源之一。食源性致病菌主要包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲杆菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌等^[1]。引起的中毒症状多为呕吐、腹泻, 有些会导致败血症、脑膜炎等。由于其代谢特征不同, 引起的致病率随季节、地域和食品种类有关。在我国由沙门氏菌引起的细菌性疾病最为常见, 致病率占 70%以上, 且主要集中在肉、蛋、奶等畜产品中。据统计, 我国细菌性食源疾病的发病率为 0.0716 次/人·年, 以 2006 年人口普查总人数 131448 万人计算, 每年因食源致病菌致病的患者达到 9411.7 万人次, 其中 26.3%(2475.3 万人次)的患者曾就诊, 3.6%(335.7 万人次)的患者因病住院, 8530 例死亡^[2,3]。因此, 建立食源致病菌的快速准确检测方法对控制因食源致病菌引起的食源疾病是十分必要的。

食源致病菌的传统检测方法包括分离培养、生化鉴定、形态观察、血清学分析等, 存在操作繁琐、特异性较差、灵敏度不高等缺陷^[4-6]。具有快速、灵敏和特异性高等优点的 PCR 检测技术近年来逐渐普及, 然而, 普通 PCR 无法消除死菌 DNA 扩增的信号, 易造成假阳性结果^[7,8]。因此, 发展快速准确检测食源致病菌活菌的方法在食品安全检测领域至关重要。本文介绍了 PCR 检测过程中假阳性结果产生的原因, 综述了核酸交联剂与 PCR 技术结合应用于食源致病菌活菌检测的研究进展, 以期能为相关研究者开发更为准确检测食源致病菌活菌的方法提供一定的参考。

2 PCR 检测食源致病菌时假阳性结果产生的主要原因

假阳性是指检测阴性样品得到阳性结果, 造成假阳性结果的原因较多, 主要包括气溶胶污染、检测样品间交叉污染、PCR 试剂及 PCR 扩增产物的污染和样品中死菌 DNA 的残留等^[9,10]。气溶胶主要由空气与液体面接触摩擦所形成的, 在实验操作时, 反应管较为剧烈地摇动和枪头的污染等均可造成气溶胶污染, 从而使 PCR 检测出现假阳性结果^[11]。气溶胶污染目前还没有特别有效的解决途径, 样品间的交叉污染、PCR 试剂及扩增产物的污染则可通过实验操作及实验室管理的进一步规范化来防止, 而死菌中残留的 DNA 是造成 PCR 检测活菌时出现假阳性结果的主要原因^[12]。利用 PCR 技术对食源致病菌进行检测主要是利

用致病菌的特异性基因序列设计引物, 并以致病菌基因组作模板进行扩增, 特异性的扩增信号能指示致病菌的存在^[13,14]。然而, 研究者发现死菌的基因组作模板也能获得特异性的扩增信号, 而死菌并不引起食源性疾, 从而对活的可培养的致病菌的准确检测造成干扰, 形成假阳性结果^[15]。因此, 如何消除样本中死菌残留的 DNA 是利用 PCR 技术快速准确检测食源致病菌活菌过程中亟待解决的问题。

3 叠氮溴化乙锭/叠氮溴化丙锭的结构及交联 DNA 的原理介绍

核酸交联剂, 即含有两个或者两个以上烷基化官能团的烷基化试剂, 包括叠氮溴化乙锭(EMA)、叠氮溴化丙锭(PMA)、吡咯里西啶类生物碱、苯醌吡啶等^[16,17]。目前, 在食源致病菌检测中应用的核酸交联剂主要为 EMA 和 PMA^[18,19]。该交联剂能在光激活条件下选择性透过死菌的细胞膜并与 DNA 交联, 交联的方式主要有 3 种, 分别是双螺旋间交联、DNA 链间交联和 DNA 链内交联。三种方式皆能对 DNA 造成极大的损伤, 导致核酸复制或转录的终止^[20], 即在 PCR 检测过程中, EMA/PMA 可以选择性地穿透死菌细胞膜^[21,22]。一旦其进入细胞, EMA/PMA 与 DNA 共价交联, 强有力地抑制了死菌 DNA 的扩增。

4 EMA/PMA 在食源致病菌检测中的应用

由于 EMA/PMA 能选择性消除死菌 DNA 的扩增信号, 近年来逐渐被用于食源致病菌活菌中的快速检测。Wang 等^[23]运用 EMA 结合荧光定量 PCR 技术检测碎牛肉中的 *Escherichia coli* O157: H7 活菌, 结果得出 EMA 可有效阻止 *E. coli* O157: H7 死菌中 DNA 的扩增。此方法的建立可应用于碎牛肉、肉制品和其他食品中 *E. coli* O157: H7 活菌的快速检测。Martin 等^[24]建立了一种 PMA 结合荧光定量 PCR 的方法来快速检测熟火腿中是否含有活的沙门氏菌。Nocker 等^[25]运用 PMA 结合 PCR 技术对微生态中的活菌进行检测, 并运用变性梯度凝胶电泳分析 PCR 扩增产物, 结果显示没有经过 PMA 处理的样品都出现四条显性条带, 相反经过 PMA 处理的四组不同的样品有效地抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增。表 1 总结了部分文献报道中 EMA/PMA 浓度、曝光时间及菌悬液浓度的使用情况。

4.1 样品处理时 EMA/PMA 浓度的优化

核酸交联剂如今被广泛应用于消除微生物死菌中 DNA 的扩增信号, 而消除效果取决于 EMA/PMA 适当浓度的选择^[35]。研究报道表明, 不同浓度的 EMA/PMA 结合

PCR 技术检测食源致病菌的结果显著不同, 为了对样品处理时 EMA/PMA 的使用浓度进一步优化, 研究者在实验方案中通过设计一系列浓度梯度来确定最佳使用浓度。祝儒刚等^[36]和伦镜盛等^[37]发现当 EMA 浓度 ≤ 2 mg/mL 时, EMA 对副溶血弧菌活菌中 DNA 的 PCR 扩增没有明显抑制作用, 当继续增加 EMA 浓度 >2 mg/mL 时, 其抑制效果没有明显的提高, 而 EMA 浓度达到 4 mg/mL 时, EMA 对活菌的 PCR 扩增有显著的抑制作用。Bae 等^[19]运用 PMA 结合 PCR 技术对 *E. coli* ATCC8739 的死、活菌检测的研究得出, 当 PMA 浓度小于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, PMA 基本不会抑制死细胞中 DNA 的扩增; 当 PMA 浓度大于 3 $\mu\text{g/mL}$ 时, PMA 能较为有效地结合死菌中残留的 DNA 来抑制 PCR 的扩增, 从而消除检测过程中死菌残留 DNA 的影响; 当 PMA 的浓度过高(>50 $\mu\text{g/mL}$)时, 能透过部分活菌的细胞膜与 DNA 进行共价交联, 从而抑制活菌中 DNA 的 PCR 扩增, 起不到区别死、活菌的效果。因此, 在使用 EMA/PMA 处理样品时, 要慎重选择其浓度。

4.2 曝光时间对检测结果的影响

由于核酸交联剂要通过一定方式的诱导才能产生活性体, 该活性体与靶目标的 DNA 产生共价交联, 从而抑制死菌中 DNA 的 PCR 扩增, 达到鉴别死、活菌的效果^[38]。诱导方式可以是光、化学试剂和酶等。因此, 在 EMA/PMA 结合 PCR 技术的检测中, 通常 EMA/PMA 在进入死菌细胞后需进行光照处理, 光照后, EMA/PMA 所带的光敏性叠氮基团可转化为具有高活性的氮宾自由基, 并与其结合位点附近的任意碳氢化合物反应形成稳定的共价碳氮键, 即形成氮烯中间物^[39], 致使 DNA 分子被永久修饰(图 1), 最后抑制 DNA 的 PCR 扩增, 达到消除假阳性的效果。除此之外, 在提取 DNA 时, 活菌的细胞膜易被破坏, 释放出 DNA 与残留的 EMA/PMA 进行共价交联造成假阴性结果^[29]。光照处理能促进过量的 EMA/PMA 与水分子发生反应, 生成复杂且无活性的羟胺, 从而钝化残留于菌液中的 EMA/PMA^[40]。因此, 优化菌悬液的曝光时间, 对死、活菌检测中消除假阳性结果至关重要。

表 1 已报道 EMA/PMA 用于检测食源致病菌采用的条件
Table 1 EMA/PMA in the condition of testing a variety of food source pathogenic bacteria

细菌名称	EMA 浓度	PMA 浓度	曝光时间(min)	菌悬液浓度(cfu/mL)	参考文献
<i>E. coli</i> ATCC 25922	NA*	100 $\mu\text{mol/L}$	5	4.8×10^8	[26]
<i>Listeria monocytogenes</i>	240 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	5	1.0×10^8	[27]
<i>Campylobacter</i>	NA	10 $\mu\text{g/mL}$	1	1.0×10^2	[28]
<i>Legionella pneumophila</i>	2.5 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1	1.8×10^5	[29]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	40 $\mu\text{g/mL}$	NA	15	1.35×10^7	[30]
<i>E. coli</i> O157:H7	NA	5 $\mu\text{g/mL}$	5	1.0×10^2	[31]
<i>Salmonella</i>	NA	100 $\mu\text{mol/L}$	5	1.0×10^6	[32]
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 $\mu\text{g/mL}$	NA	5	1.0×10^8	[33]
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	3 $\mu\text{g/mL}$	5	5×10^8	[34]

*NA::not available

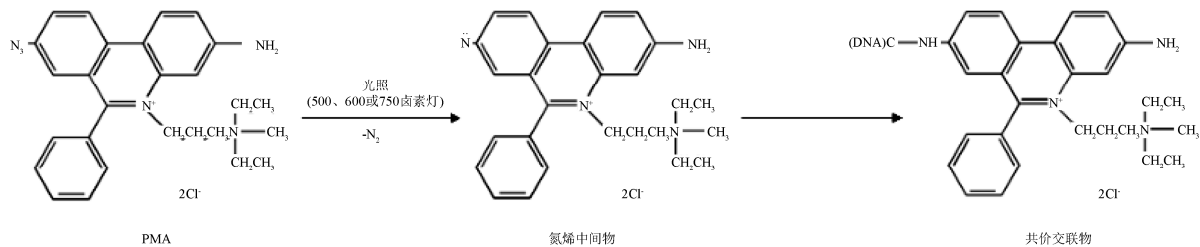


图 1 PMA 与 DNA 共价交联示意图
Fig. 1 PMA and DNA covalent cross-linking

曝光时间的选择与卤素灯、菌悬液的浓度、菌悬液中 EMA/PMA 的浓度以及实验中其他因素有关,并非一个定值^[41]。罗剑飞等^[42]通过用 500 W 的卤素灯以不同曝光时间对死细胞悬浮液进行处理,使 PMA 与 DNA 共价交联,得出超过 3 min 可以有效抑制 *E. coli* ATCC8739 死菌 DNA 的 PCR 扩增。Josefsen 等^[28]和 Nocker 等^[43]则分别采用 650 W 卤素灯曝光 2 min 和 750 W 卤素灯曝光 1 min,均能有效抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增,消除假阳性的结果。

4.3 菌悬液浓度对核酸交联剂处理样品效果的影响

研究发现核酸交联剂在与 DNA 进行光照处理时,菌悬液的不同浊度可能会对交联效果产生一定的影响。为了确定菌悬液浓度是否对核酸交联试剂的效果产生影响,实验通常需要设计一系列的菌悬液浓度来进行验证。Gedalinga 等^[44]将未经 EMA/PMA 处理的热致死细胞悬浮液设为对照组,实验组则在 500 μ L 浊度为 0、1、5、10、50、100 NTU 的热致死细胞悬浮液的中分别加入 PMA,使得悬菌液中 PMA 的终质量浓度为 3 μ g/mL;实验组和对照组中的菌悬液同时进行 3 min 光照后,结果发现当菌悬液浊度增大时,光的透过性减弱,其 PMA 与 DNA 分子交联的能力也就随之降低。颜成英等^[45]利用 EMA 结合 PCR 检测肠炎沙门氏菌活菌的灵敏度检测结果显示,EMA-PCR 方法检测限与单一 PCR 方法一样均为 27.5 cfu/mL。因此,在 EMA/PMA 处理时,浊度的控制有利于假阳性结果的消除。

5 展 望

食源性致病菌活菌的检测中死菌的存在是检测方法开发的一大障碍^[46],尽管可以利用死菌的 RNA 容易降解这一特点提取致病菌的 RNA 做后续研究能有效消除死菌的影响,然而,这一方法操作比较繁琐,而且需要高质量的 RNA,因此方法并没有得到普及^[47]。目前应用最为广泛的为先采用核酸交联剂处理样品再提取致病菌的 DNA,但是 EMA 已被证明可穿透几个细菌种类的完整细胞膜,造成的假阴性结果^[48,49],而且具有一定的毒性,因此不能很好的适用于食源致病菌活菌的检测。然而,研究发现 PMA 对死菌有更好的选择性,通过对其使用条件的不断优化,确定各种致病菌的最佳处理条件,从而开发针对不同致病菌的快速准确检测方法^[50,51]。此外,PMA 与一对扩增内标结合成功地应用于 PCR 技术对致病菌的检测,可以同时消除假阳性和假阴性的结果,检测结果快速准确^[52-54]。未来类似的方法也将得到更多的开发,核酸交联剂结合 PCR 的方法也将扩展到其他微生物的检测、诊断等相关领域,具有更大的利用及推广价值。

参考文献

- [1] Kim J, Marshall MR, Wei CI. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(11): 2839–2845.
- [2] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅, 等. 我国细菌性食源性疾病疾病负担的初步研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(2): 132–136.
- [3] Mao XD, Hu JF, Liu XM, *et al.* Epidemiological burden of bacterial foodborne diseases in China-Preliminary study [J]. *China J Food Hyg*, 2011, 23(2): 132–136.
- [3] 李少彤, 栾玉明, 蒋卓勤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估的研究进展[J]. *现代预防医学*, 2006, 33(9): 1556–1557.
- [4] Li ST, Luan XM, Jiang ZQ. Foodborne pathogenic bacteria detection status and research progress of food microbiological risk assessment [J]. *Mod Prev Med*, 2006, 33(9): 1556–1557.
- [4] 张志鸿, 许恒毅, 魏华. 基于 PCR 方法检测蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 22(34): 335–342.
- [5] Zhang ZH, Xu HY, Wei H. Research progress in detection of *Bacillus cereus* based on PCR Method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 22(34): 335–342.
- [5] Moore MD, Goulter RM, Jaykus LA. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments [J]. *Ann Rev Food Sci T*, 2015, 6: 411–433.
- [6] Mandal PK, Biswas AK, Choi K, *et al.* Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview [J]. *Am J Food Technol*, 2011, 6(2): 87–102.
- [7] Chen J, Tang J, Liu J, *et al.* Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens [J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 112(4): 823–830.
- [8] Malorny B, Tassios PT, Peter Rådström, *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 83(1): 39–48.
- [9] Lo YMD, Mehal WZ, Fleming KA. False-positive results and the polymerase chain reaction [J]. *Lancet*, 1988, 332(8612): 679.
- [10] Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR [J]. *Nature*, 1989, 339: 237–238.
- [11] Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy [J]. *Eur J Clin Microbiol*, 2004, 23(4): 289–299.
- [12] Blachere FM, Lindsley WG, Pearce TA, *et al.* Measurement of airborne influenza virus in a hospital emergency department [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(4): 438–440.
- [13] Yeni F, Acar S, Polat ÖG, *et al.* Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce [J]. *Food Control*, 2014, 40: 359–367.
- [14] Wolffs P, Norling B, Rådström P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells [J]. *J Microbiol Meth*, 2005, 60(3): 315–323.
- [15] Xihong Z, Chii-Wann L, Jun W, *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(3): 297–312.
- [16] Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise?[J]. *Nutr Rev*, 2010, 68(5): 257–269.
- [17] Rajski SR, Williams RM. DNA cross-linking agents as antitumor drugs [J]. *Chem Rev*, 1998, 98(8): 2723–2796.
- [18] Tourlousse DM, Ahmad F, Stedtfeld RD, *et al.* A polymer microfluidic

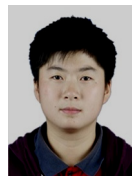
[1] Kim J, Marshall MR, Wei CI. Antibacterial activity of some essential oil

- chip for quantitative detection of multiple water-and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification [J]. Biomed Microdevices, 2012, 14(4): 769–778.
- [19] Bae S, Wuertz S. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(9): 2940–2944.
- [20] 翁小成, 翁立伟, 白明慧, 等. 可诱导核酸交联剂的研究进展[J]. 化学进展, 2007, 19(12): 2000–2005.
- WENG XC, Weng LW, Bai MH, *et al.* Studies of inducible DNA cross-linking agents [J]. Prog Chem, 2007, 19(12): 2000–2005.
- [21] Shi H, Xu W, Trinh Q, *et al.* Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR [J]. Food Control, 2012, 27(1): 81–86.
- [22] Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3): 1997–2004.
- [23] Wang L, Li Y, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR [J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(5): 1719–1728.
- [24] Martin B, Raurich S, Garriga M, *et al.* Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham [J]. Food Anal Meth, 2013, 6(2): 683–690.
- [25] Nocker A, Sossa-Fernandez P, Mark D, *et al.* Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5111–5117.
- [26] Taskin B, Gozen AG, Duran M. Selective quantification of viable *Escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 77(13): 4329–4335.
- [27] Pan Y, Breidt F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73(24): 8028–8031.
- [28] Josefsen MH, Lofstrom C, Hansen TB, *et al.* Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 76(15): 5097–5104.
- [29] Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre JM. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 75(11): 3502–3512.
- [30] Wang L, Zhong Q, Li Y. Ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state [J]. Energy Procedia, 2012, 17(2012): 1858–1863.
- [31] Wang L, Li P, Yang Y, *et al.* Development of an immuno magnetic separation-propidium monoazide-polymerase chain reaction assay with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk [J]. Int Dairy J, 2014, 34(2): 280–286.
- [32] Yang Y, Wan C, Xu H, *et al.* Development of a multiplexed PCR assay combined with propidium monoazide treatment for rapid and accurate detection and identification of three viable *Salmonella enterica* serovars [J]. Food Control, 2012, 28(2): 456–462.
- [33] Taskin B, Schlitt-Dittrich F, Yoshida SI. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae* [J]. Anal Biochem, 2011, 418(1): 37–43.
- [34] 胡惠秩, 满朝新, 董鑫悦, 等. PMA-LAMP 方法检测灭菌乳中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 12(33): 300–308.
- Hu HZ, Man CX, Dong XY, *et al.* Detecting of viable by loop-mediated isothermal amplification coupling with propidium monoazide in dairy products [J]. Food Sci Technol Ind, 2012, 12(33): 300–308.
- [35] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. J Microbiol Meth, 2006, 67(2): 310–320.
- [36] 祝儒刚, 吕淑霞, 刘月萍, 等. 基于 DNA 染料 EMA 的 PCR 技术检测鉴别副溶血性弧菌死活细胞[J]. 食品与发酵工业, 2011, 36(7): 144–149.
- Zhu RG, Lv SX, Liu YP, *et al.* Discrimination of viable and dead cell of by PCR based on DNA binding dye of EMA [J]. Food Ferment Ind, 2011, 36(7): 144–149.
- [37] 伦镜盛, 夏常艳, 罗鹏, 等. 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测技术的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 952–956.
- Lun JS, Xia CY, Luo P, *et al.* Establishment of EMA-PCR detection method of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiol, 2011, 38(6): 952–956.
- [38] Qin T, Tian Z, Ren H, *et al.* Application of EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of *Legionella* in different water systems [J]. World J Microbiol Biot, 2012, 28(5): 1881–1890.
- [39] Hamza IA, Jurzik L, Überla K, *et al.* Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples [J]. Int J Hyg Environ Heal, 2011, 214(6): 424–436.
- [40] Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification [J]. J Microbiol Meth, 2012, 91(2): 276–289.
- [41] Yáñez MA, Nocker A, Soria-Soria E, *et al.* Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR [J]. J Microbiol Meth, 2011, 85(2): 124–130.
- [42] 罗剑飞, 林炜铁, 郭勇. PMA 与 PCR 结合的细菌活细胞检测方法[J]. 华南理工大学学报, 2010, 38(9): 142–146.
- Luo JF, Lin WT, Guo Y. Detection of viable bacterium cells based on propidium monoazide in combination with PCR [J]. J South China Univ Technol, 2010, 38(9): 142–146.
- [43] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. J Microbiol Meth, 2006, 67(2): 310–320.
- [44] Gedalanga PB, O Lson BH. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82(3): 587–596.
- [45] 颜成英, 汤晓艳, 王敏, 等. 肠炎沙门氏菌 EMA-PCR 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 90–93.
- Yan CY, Tang XY, Wang M, *et al.* Detection of viable cells of *Salmonella enteritidis* by EMA-PCR [J]. Food Sci, 2014, 35(6): 90–93.
- [46] Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, *et al.* Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk

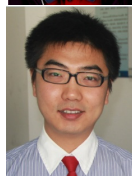
- assessment[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(15): 5097–5104.
- [47] Lucore LA, Cullison MA, Jaykus LA. Immobilization with metal hydroxides as a means to concentrate food-borne bacteria for detection by cultural and molecular methods [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5):1769–1776.
- [48] Chang B, Taguri T, Sugiyama K, *et al.* Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells [J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(2): 119–123.
- [49] Bae S, Wuertz S. Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(4): 922–932.
- [50] Slimani S, Robyns A, Jarraud S, *et al.* Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR [J]. J Microbiol Meth, 2012, 88(2): 319–321.
- [51] Yang Y, Xu F, Xu H, *et al.* Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products [J]. Food Microbiol, 2013, 34(2): 418–424.
- [52] Zhang Z, Wang L, Xu H, *et al.* Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control [J]. Food Control, 2014, 35(1): 401–406.
- [53] Liang N, Dong J, Luo L, *et al.* Detection of Viable *Salmonella* in Lettuce by Propidium Monoazide Real-Time PCR [J]. J Food Sci, 2011, 76(4): M234–M237.
- [54] Wang L, Li P, Zhang Z, *et al.* Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process [J]. Food Control, 2014, 36(1): 119–125.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



黄楚楚, 学士, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: hcc307084835.@163.com



许恒毅, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: kidyxu@163.com