

数字 PCR 在食源性致病微生物检测中的应用研究进展

杨纯佳, 张娟, 周臣清, 霍丽斯, 崔海萍, 王力清*

(广东产品质量监督检验研究院, 国家食品质量监督检验中心(广东), 佛山 528300)

摘要: 大多数食源性疾病由食源性致病微生物引发, 研究和建立食源性致病微生物的快速有效检测方法对于食品安全风险监控及保障人们的身体健康具有重要意义。相对于传统 PCR, 数字 PCR 具有较好的准确度和重现性, 可实现绝对定量分析, 为快速准确地进行食品安全检测提供了一种崭新的技术平台。本文主要介绍了数字 PCR 中微滴式数字 PCR 和芯片式数字 PCR 的基本原理、种类、应用及其研究进展, 深入探讨了数字 PCR 技术在沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、阴沟杆菌和金黄色葡萄球菌等食源性致病微生物检测中的应用。数字 PCR 技术目前在转基因成分和动物源性成分定量检测中都得到了较好的应用, 在食源性致病微生物中的应用技术还有待更好的发展。

关键词: 数字 PCR; 微滴式数字 PCR; 芯片式数字 PCR; 食源性致病微生物

Research progress on the application of digital PCR in detection of foodborne pathogenic microorganisms

YANG Chun-Jia, ZHANG Juan, ZHOU Chen-Qing, HUO Li-Si, CUI Hai-Ping, WANG Li-Qing*

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, China National Quality Supervision and Testing Center for Foods (Guangdong), Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Foodborne diseases are mostly caused by foodborne pathogens, so it is very important to establish effective detection methods of foodborne pathogenic microorganisms for food safety risk monitoring and people's health ensuring. Compared with the traditional PCR, digital PCR has good accuracy and reproducibility, which has provided a new platform for rapid detection of food safety. This article mainly summarized the basic principles, varieties, application and research progress of digital PCR technology including droplet digital PCR and chip digital PCR. The applications of digital PCR technology in detection of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* and other foodborne pathogenic microorganisms were also discussed in depth. The technology digital PCR has gotten good applications in quantitative detection of genetically modified organisms and animal derived ingredients, but was remained to be better in the application of foodborne pathogenic microorganisms.

KEY WORDS: digital PCR; droplet digital PCR; chip digital PCR; foodborne pathogenic microorganisms

基金项目: 广东省科技计划科研项目(2016A040403071)

Fund: Supported by Science and Technology Project of Guangdong Province (2016A040403071)

*通讯作者: 王力清, 教授级工程师, 主要研究方向为食品检验技术。E-mail: sdwlq@21cn.com

*Corresponding author: WANG Li-Qing, Professor Senior Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China E-mail: sdwlq@21cn.com

1 引言

民以食为天, 食以安为先, 食品安全问题持续发生, 不仅扰乱了市场秩序, 更对人体造成了不同程度的危害。食品安全问题得到了全世界的普遍关注。根据世界卫生组织估计, 全世界每年的食源性疾病患者中, 70%都是由致病微生物引起的^[1]。食源性致病微生物中的大肠埃希氏杆菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌和阪崎肠杆菌等是影响食品质量与安全的主要因素之一^[2]。通常从食品原料到加工, 再到流通储藏等环节都可能感染食源性致病菌, 涉及的案例有日本及中国的毒牛奶事件, 德国的毒草莓、毒黄瓜以及中国的福寿螺事件等^[3]。常规微生物检测需要比较繁复的增菌、分离、生物学鉴定等多个步骤。相较于常规微生物检测方法的耗时长、实验操作繁复、特异性差和检出限高等问题, PCR 技术更快速、灵敏、特异性强, 弥补了常规检测方法的缺陷^[4-6]。

生禽肉及禽肉产品是人畜共患的细菌病原体传播的显著来源, 因而人畜共患病原体的灵敏检测是一个重要的食品安全问题。应用 PCR 法检测食品中致病微生物, 首先要富集细菌细胞, 经离心、沉淀、过滤等方法从样品中提取微生物细胞, 然后裂解细胞, 释放细胞中的 DNA, 再根据微生物所特有的特异性序列来设计引物, 扩增细胞靶特异性的 DNA 序列, 最后用电泳法或特异性核酸探针检测^[7]。常用的 PCR 方法有普通 PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR 和数字 PCR 等。本文就数字 PCR 在食源性致病微生物检测中的研究进展进行综述。

2 数字 PCR 技术概述

数字 PCR(digital PCR, dPCR)是近年来迅速发展起来的一种定量分析技术。1992 年, Sykes 等^[8]报道了基于样品稀释和泊松分布数据处理的巢式 PCR 定量技术, 并提出了数字 PCR 的构想。与传统定量 PCR 技术不同, 数字 PCR 不依赖扩增曲线的 C_t (循环阈值)进行定量, 不受扩增效率影响, 也不必采用内参基因和标准曲线, 具有较好的准确度和重现性, 得以实现绝对定量分析^[9]。相关文献表明, 数字 PCR 技术与荧光定量 PCR 相比, 数字 PCR 对核酸含量较低的样品检测准确率和灵敏度都高于荧光定量 PCR^[10-14]。

目前数字 PCR 技术可以分为微滴式 dPCR(droplet dPCR, ddPCR)和芯片式 dPCR(chip dPCR, cdPCR)两种。微滴式数字 PCR 系统在传统的 PCR 扩增前对样品进行微滴化处理, 即将含有核酸分子的反应体系分成成千上万个纳升级的微滴, 其中每个微滴或不含待检核酸靶分子, 或者含有一个至数个待检核酸靶分子。经 PCR 扩增后, 逐个对每个微滴进行检测, 有荧光信号微滴判读为 1, 没有荧光信号微滴判读为 0, 根据泊松分布原理及阳性微滴的个

数与比例即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度^[15,16]。ddPCR 方法与实时荧光 PCR(qPCR)方法相比, 不需要标准曲线, 下限可调至单拷贝, 阳性微滴计算准确且直接^[17-20]。

cdPCR 系统是反应液通过微流控等技术被均匀导入芯片上的反应仓或通孔中进行 PCR 反应, 然后通过类似于基因芯片的方法扫描每个反应仓或者通孔的荧光信号, 进而计算目的序列的含量^[21]。朱强远等^[22]构建了一种可进行核酸单分子扩增和绝对定量的新型数字 PCR 微流控芯片。结果表明, 该数字 PCR 微流控芯片具有低成本、高灵敏度、用时少、节省试剂以及操作简单等优点。

3 dPCR 在食源性致病微生物检测中的应用

3.1 dPCR 检测食品中沙门氏菌

沙门氏菌病是指由各种类型沙门氏菌所引起的对人类、家畜以及野生禽兽不同感染形式的总称。感染沙门氏菌的人或带菌者的粪便污染食品, 可使摄入的人发生食物中毒。据统计在世界各国细菌性食物的中毒种类中, 沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首。我国内陆地区也以沙门氏菌为首位。沙门氏菌主要污染肉类食品, 鱼、禽、奶、蛋类食品也可受此菌污染。因此, 定量检测食品中沙门氏菌成为了各国的关注热点^[23,24]。

王静等^[25]用 SD-PMA-ddPCR(脱氧胆酸钠-叠氮溴化丙锭-微滴式数字 PCR, sodium deoxycholate-propidium monoazide-droplet dPCR)建立了沙门氏菌的定量检测方法, 即将叠氮溴化丙锭与 ddPCR 技术相结合建立的一种沙门氏菌活菌检测方法。该方法的检出限为 8.0 copy/20 μ L。检测人工污染鸡肉样品, 最低可检出 10^2 CFU/mL 的沙门氏菌。SD-PMA-ddPCR 检测过程快速、高效、简便, 并成功检测出鸡肉等样品中沙门氏菌的含量。Rothrock 等^[26]用 ddPCR 对商业家禽处理水样进行沙门氏菌检测, 通过与传统定量方法相比较, ddPCR 具有灵敏度高和特异性强等优点。dPCR 在检测食品中沙门氏菌中表现出较好的发展空间, 可进一步应用于其他样品的检测。

3.2 ddPCR 定量检测大肠杆菌 O157: H7

肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)是能引起人的出血性腹泻和肠炎的一群大肠埃希氏菌。致病性大肠杆菌中以大肠杆菌 O157:H7 对人致病性最强, 它像一般的致病菌一样会产生细菌毒素, 可引起出血性结肠炎, 严重可发展成溶血性尿毒综合征和血小板减少性紫癜, 严重者可致死^[27]。大肠杆菌 O157:H7 是一种以食物为主要传播途径的致病菌, 牛、羊、猪等家畜是其重要宿主。1982 年美国首次报道了由大肠杆菌 O157:H7 引发的出血性肠炎。紧随其后加拿大、日本、英国等国也接连报道了大肠杆菌 O157:H7 的爆发^[28-30]。我国江苏、安徽省也曾经在 1999 年爆发大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻, 超过

2 万例患者,死亡 177 例,共流行了 7 个月之久^[27]。因此,建立特异性强且灵敏度高的检测方法尤为重要。

董莲华等^[31]以大肠杆菌 O157: H7 的 *rfbE* 基因为靶基因,建立了可准确定量的 ddPCR 方法。研究发现 ddPCR 反应中的最佳探针浓度为 300 nmol/L。大肠杆菌 O157:H7 基因组 DNA 浓度范围为 $4\sim 1.25\times 10^5$ copy/20 μ L ddPCR 反应液时,ddPCR 方法线性相关系数为 0.999。当 DNA 浓度为 760~88400 copy/20 μ L 时,该方法的精密度最好(RSD<5%)。该研究方法的定量限为 4 copy/20 μ L,检出限为 3 copy/20 μ L。结果表明,建立的 ddPCR 有较好的特异性,实验对 13 份猪肉、牛肉和鸡肉样品进行检测,检测结果与定量 PCR 方法检出结果一致。Bian 等^[32]采用 ddPCR 对大肠杆菌 O157:H7 进行检测,同时与实时荧光定量 PCR 方法进行比较,ddPCR 具有很高的灵敏度。该方法的最低检测下限为 10 CFU/mL。与定量 PCR 方法对比,dPCR 具有灵敏度高、特异性好及检出限低等特征。

3.3 dPCR 定量检测单核细胞增生李斯特氏菌

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)简称单增李斯特菌,是一种人畜共患病的病原菌。它能引起人畜的李氏菌的病,感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多。李斯特氏菌广泛存在于自然界中,其主要传播源系动物性食品,另外蔬菜、水果、奶及奶制品等也可作为其传播源。易感染人群有孕妇、老人、新生儿等。食源性李斯特氏菌发病率虽然不高,但死亡率有时可达 20%~50%^[33]。该菌在 4 $^{\circ}$ C 的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一,因此,在食品卫生微生物检验中必须加以重视^[34]。

王静等^[35]用 SD-PMA-ddPCR 建立了单核细胞增生李斯特氏菌的定量检测方法,利用脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SD)对受损细胞预处理,然后使叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)进入受损细胞与 DNA 发生共价交联,提取细菌基因组 DNA 进行 ddPCR 检测。SD-PMA-ddPCR 的灵敏度为 2.0 copy/20 μ L,方法精密度和稳定性良好。Rothrock 等^[26]用 ddPCR 对商业家禽处理水样进行单核细胞增生李斯特氏菌检测,结果显示,ddPCR 具有灵敏度高、特异性强等优点。Bian 等^[32]采用 ddPCR 对单核细胞增生李斯特氏菌进行检测,研究结果表明该方法的最低检测下限为 10 CFU/mL。SD-PMA-ddPCR 方法精密度和稳定性良好,在食源性致病微生物检测中有很大的发展空间。

3.4 dPCR 定量检测阴沟肠杆菌

1980 年黄色阴沟肠杆菌更名为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)。阪崎肠杆菌(又称阪崎氏肠杆菌)是肠杆菌科的一种。阪崎肠杆菌能引起严重的新生儿脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症,死亡率高达 50%以上。

禹思宇等^[36]用 dPCR 建立了阴沟肠杆菌的定量检测方法,通过与 qPCR 方法对比,结果表明,该方法检测阴沟肠杆菌的最低拷贝数为 8.9 copy/ μ L,并且具有重复性好、灵敏度高、特异型好等优点。该方法可在短时间对大量样品进行检测,可在食品安全风险监测起重大作用。

3.5 dPCR 定量检测金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是人畜共患病致病菌中的一种,主要分布在水、空气以及人和动物排泄物中。食用受污染的食品会引起食物中毒,严重者会引发肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等,甚至引起败血症、脓毒症等全身性感染^[37-39]。据美国疾病控制中心报告,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒居第二位,占细菌性食物中毒的 33%,在加拿大高达 45%,而我国每年发生的此类中毒事件也不在少数^[40-42]。

Kelley 等^[43]用 ddPCR 对金黄色葡萄球菌进行定量检测,使用磁珠搅拌提取法。通过 qPCR 和 ddPCR 对金黄色葡萄球菌蛋白基因 SA0140(SA)和耐甲氧西林(MECA)进行检测。该研究同时对 397 个样本进行检测,qPCR 和 ddPCR 检测结果一致,但 ddPCR 的灵敏度和特异性高于 qPCR。金黄色葡萄球菌的定量检测方法已经相当成熟,微生物检测法也能较快地定量检测,成本低,所以 dPCR 在食品中金黄色葡萄球菌检测方面的相对优势较小,也较难得以广泛应用。

4 结语与展望

dPCR 虽然是近年刚出现的一种新技术,但其凭借较好的准确度、重现性、绝对定量等优势在食品安全检测中应用广泛,但同时也存在一些亟待完善的问题:(1)dPCR 分析的样品通量较低,每块芯片都是针对单一样本的分析;(2)由于微滴式和芯片数字 PCR 仪器成本高昂,导致其技术在常规检测中未能得到广泛的应用;(3)dPCR 的检测灵敏度和准确率均高于荧光 PCR,但其检测的稳定性和精密度却略低于荧光 PCR 法。

目前 PCR 在转基因成分、动物源性成分和食源性致病微生物的定量检测中都得到了较好的应用,但在食源性致病微生物方面还有待更好的发展。随着该技术的广泛应用,一方面带来检测效率的提高,极大地提高食品安全卫生的检测水平;另一方面为食品安全的风险预警提供一种简易快捷的检测手段,从而保障人民的健康生活。

参考文献

- [1] Groundwater PW, Todd A, Worsley A J, et al. The technology and techniques used in the detection of pathogenic bacteria [J]. Pharm J, 2009, 283(7569): 281-282.
- [2] 方平. PCR 技术在食源性致病微生物快速检测中的应用[J]. 学术论坛, 2006, CFI(11): 44-46.

- Fang P. Application of PCR in rapid detection of some food-borne pathogenic microorganisms [J]. Acad Forum, 2006, CFI(11): 44–46.
- [3] 陈玉婷, 程楠, 徐文涛. 食源性致病微生物的检测新技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3405–3413
- Chen YM, Cheng N, Xu WT. Novel technologies for foodborne pathogenic microorganism detection [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3405–3413.
- [4] 栗建永, 赵琢, 贾晓川, 等. 食源性致病菌检测分析技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(18): 110–115.
- Li JY, Zhao Z, Jia XC, *et al.* Advance on detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Res Dev, 2013, 34(18): 110–115.
- [5] 张然, 董海强, 张廷文. 食源性微生物 PCR 检测技术研究进展及标准化讨论[J]. 山东轻工业学院学报, 2010, 24(4): 8–12.
- Zhang R, Dong HQ, Zhang TW. Development and standardization discussion of PCR detection for foodbornemicro-organis [J]. J Shandong Inst Light Ind, 2010, 24(4): 8–12.
- [6] 陈爱亮. 食源性病原微生物快速检测技术应用现状与发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 173–186.
- Chen AL. Technology application status and development trend of rapid detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(1): 173–186.
- [7] 曾庆梅, 张冬冬. 食品微生物安全检测技术[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 632–637.
- Zeng QM, Zhang DD. Bacterial detection methods in foods [J]. Food Sci, 2007, 28(10): 632–637.
- [8] Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. Biotechniques, 1992, 13(3): 444.
- [9] 林彩琴, 姚波. 数字 PCR 技术进展[J]. 化学进展, 2014, 24(12): 2415–2423.
- Lin CQ, Yao B. Recent advance in digital PCR [J]. Prog Chem, 2014, 24(12): 2415–2423.
- [10] 杨冬燕, 杨永存, 李浩, 等. 数字 PCR 与荧光 PCR 方法鉴别餐厨废弃植物油的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(19): 3221–3230.
- Yang DY, Yang YC, Li H, *et al.* Comparison of digital PCR and fluorescent PCR for detecting kitchen-waste vegetable oil [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(19): 3221–3230.
- [11] Kim TG, Jeong SY, Cho KS. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(13): 6105–6113.
- [12] Hindon BJ, Ness KD, Masquelier DA, *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604–8610.
- [13] Phillip B, Stephanie CT, John FR, *et al.* Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue [J]. Clin Chem, 2013, 59(6): 991–994.
- [14] Christopher MH, John RC, Hilary AB, *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1003–1005.
- [15] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 微滴数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J]. 食品科学, 2016, 37(08): 187–191.
- Miao L, Zhang XP, Chen J, *et al.* Qualitative analysis of bovine and porcine ingredients in meat products by droplet digital PCR [J]. Food Sci, 2016, 37(08): 187–191.
- [16] Massanellam, Singhania A, Bellakova BN, *et al.* Differential gene expression in HIV-infected individuals following ART [J]. Antiviral Res, 2013, 100(2): 420–428.
- [17] 王珊, 李志娟, 苗丽. 微滴式数字 PCR 与实时荧光 PCR 检测羊肉制品中羊源和猪源性成分方法的比较[J]. 肉类工业, 2015, 411(7): 38–41.
- Wang S, Li ZJ, Miao L. Comparison of microsphere digital PCR and real-time fluorescence PCR for detection mutton-derived and porcine-derived ingredients in mutton products [J]. Meat Ind, 2015, 411(7): 38–41.
- [18] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1003–1005.
- [19] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. Anal Chem, 2011, 83(17): 6474–6484.
- [20] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, *et al.* Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 1003–1011.
- [21] 詹成, 燕丽, 王琳, 等. 数字 PCR 技术的发展和应[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786–789.
- Zhan C, Yang L, Wang L, *et al.* The development and application of digital PCR [J]. Fudan J (Med Ed), 2015, 42(6): 786–789.
- [22] 朱强远, 杨文秀, 高一博, 等. 一种可绝对定量核酸的数字 PCR 微流控芯片[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3): 545–550.
- Zhu QY, Yang WX, Gao YB, *et al.* Microfluidic digital chip for absolute quantification of nucleic acid amplification [J]. Chem J Chin Univ, 2013, 34(3): 545–550.
- [23] 李小玲, 刘斌, 但现龙, 等. 沙门氏菌内标 PCR 快速检测试剂盒的研制与应用[J]. 中国农业科学, 2011, 44(16): 3395–3402.
- Li XL, Liu B, Dan XL, *et al.* Development and application of an IAC-PCR kit for the rapid detection of *Salmonella* spp [J]. Sci Agric Sin, 2011, 44(16): 3395–3402.
- [24] 钟伟军, 赵明秋, 邓中平, 等. 荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 220–224.
- Zhong WJ, Zhao MQ, Deng ZP, *et al.* Establishment and preliminary application of real-time PCR method for detection of *Salmonella* in food [J]. Chin J Prev Vet Med, 2008, 30(3): 220–224.
- [25] 王静, 张慧敏, 魏玮, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 67–71.
- Wang J, Zhang HM, Wei W, *et al.* Detection of *Salmonella* cells based on SD-PMA-ddPCR [J]. Sic Technol Food Ind, 2016, 37(10): 67–71.
- [26] Rothrock MJ, Hiatt KL, Kiepper BH, *et al.* Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR [J]. Sci Res, 2013, 3: 403–411.
- [27] 巢强国, 杨学明, 葛宇, 等. PCR 法检测食品中大肠杆菌 O157:H7[J]. 食品科学, 2010, 31(08): 212–215.
- Chao QG, Yang XM, Ge Y, *et al.* Rapid PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in foods [J]. Food Sci, 2010, 31(08): 212–215.
- [28] 胡慧, 陈雅君, 段志刚, 等. 大肠杆菌 O157:H7 特异基因的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 278–282.
- Hu H, Chen YJ, Duan ZG, *et al.* Real-time PCR detection of specific gene in *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food Sci, 2011, 32(12): 278–282.

- [29] Fach P, Perelle S, Grout J, *et al.* Comparison of different PCR tests for detecting shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 55(2): 389–392.
- [30] Scotter S, Aldridge M. Validation of a method for the detection of *E. coli* O157:H7 in foods [J]. *Food Control*, 2000, 11(2): 85–95.
- [31] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 大肠杆菌 O157: H7 微滴式数字 PCR 定量方法的建立[J]. *分析化学*, 2013, 43(3): 319–324.
Dong LH, Zhang L, Jiang J, *et al.* Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 43(3): 319–324.
- [32] Bian XJ, Jing FX, Gang L. A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74(15): 770–777.
- [33] 段霞, 赖卫华, 张莉莉. 单核细胞增生李斯特氏菌检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(15): 281–284.
Duan X, Lai WH, Zhang LL. Research progress on detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Food Sci*, 2009, 30(15): 281–284.
- [34] 徐伟, 李素芳, 刘军. PCR 技术检测单核细胞增生李斯特氏菌研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008, 01(024): 95–99.
Xu W, Li SF, Liu J. The development of *Listeria monocytogenes* assay by PCR [J]. *Biotechnol Bull*, 2008, 01(024): 95–99.
- [35] 王静, 刘玉敏, 李春喜, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. *微生物学通报*, 2016, 10, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150746.
Wang J, Liu YM, Li CX, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* cells in food based on SD-PMA-ddPCR [J]. *Microbiol china*, 2016, 10, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150746.
- [36] 禹思宇, 唐连飞, 陈雪琴, 等. 检测阴沟肠杆菌的数字 PCR 定量方法建立[J]. *牧与兽医*, 2016, 48(3): 1–4.
Yu SY, Tang LF, Chen XQ, *et al.* Establishment of the digital PCR assay for detection of *Enterobacter cloacae* [J]. *Anim Husb Vet Med*, 2016, 48(3): 1–4.
- [37] 李丹丹, 徐义刚, 邱索平, 等. 金黄色葡萄球菌 DPO-PCR 快速检测方法的建立与应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(4): 419–423.
Li DD, Xu YG, Qiu SP, *et al.* A DPO-PCR Method for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(4): 419–423.
- [38] 索玉娟, 于宏伟, 凌巍, 等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J]. *中国食品学报*, 2008, 8(3): 88–93.
- Suo YJ, Yu HE, Ling W, *et al.* Analysis on the contamination of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2008, 8(3): 88–93.
- [39] Rail VL, Vieira FP, Rail R, *et al.* PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 132(3–4): 408–413.
- [40] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(1): 84–89.
Xu XK, Wu QP, Zhang JM, *et al.* Studies on detection of *Staphylococcus aureus* in foods by multiplex PCR [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2011, 30(1): 84–89.
- [41] 杨洋, 张伟, 袁耀武, 等. PCR 检测乳品中金黄色葡萄球菌[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 990–996.
Yang Y, Zhang W, Yuan YW, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay [J]. *Sci Agric Sin*, 2006, 39(5): 990–996.
- [42] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(1): 3–9.
Liu XM. Studies on the techniques for the monitoring and controlling foodborne illness [J]. *Chin J Food Hyg*, 2004, 16(1): 3–9.
- [43] Kelley KS, Cosman A, Belgrader P, *et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay [J]. *Am Soc Microbiol*, 2013, 51(7): 2033–2039.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



杨纯佳, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量检验。
E-mail: 237611106@qq.com

王力清, 教授级工程师, 主要研究方向为食品检验技术。
E-mail: sdwlq@21cn.com