

多重荧光 PCR 快速检测食源性致病菌的研究进展

刘占鳌*, 裴艳琴, 叶 华

(西安医学高等专科学校, 西安 710309)

摘 要: 食源性疾病多由食源性致病菌引发, 威胁个人健康及全球食品安全, 而传统细菌分离、培养与鉴定由于需时较长, 尤其是有的细菌难以培养, 难以适应食源性疾病预防控制的需要, 因此寻找有效、可靠的食源性致病菌高通量检测方法对于确保食品安全具有重要意义。近年来, 食源性致病菌的核酸检测技术具有简便、耗时短、特异性强、灵敏度高等优点, 已被广泛应用于食源性致病菌的检测, 本文在总结食源性致病菌知识的基础上, 着重对多重荧光 PCR 技术原理及在食源性致病菌检测的应用进展进行综述, 以期控制由食源性致病菌引发的食品安全隐患提供理论参考。

关键词: 食源性致病菌; 多重荧光 PCR; 快速检测

Research progress on rapid detection of foodborne pathogens by multiplex fluorescent PCR

LIU Zhan-Ao*, PEI Yan-Qin, YE Hua

(Xi'an Medical College, Xi'an 710309, China)

ABSTRACT: Foodborne diseases are mostly caused by foodborne pathogens, threatening personal health and global food safety. However, due to the long time needed for the separation, culture and identification of traditional bacterial pathogens, some bacterial pathogens are difficult to be cultivated, which is difficult to adapt to the needs of foodborne disease prevention and control. Therefore, it is of great significance to find an effective and reliable high-throughput detection method for foodborne pathogenic bacteria to ensure food safety. In recent years, the nucleic acid detection technology for foodborne pathogenic bacteria has been widely applied in the detection of foodborne pathogenic bacteria due to its advantages of simplicity, short time consuming, strong specificity and high sensitivity. On the basis of summarizing the knowledge of foodborne pathogens, this paper focused on the principle of multiplex fluorescent PCR technology and the application progress in the detection of foodborne pathogens, so as to provide a theoretical reference for the control of food safety hazards caused by foodborne pathogens.

KEY WORDS: foodborne pathogens; multiplex fluorescence PCR; rapid detection

1 引 言

食品安全关乎人民健康与基本社会生产活动的正常开展, 并且随着社会经济水平的发展, 人们对食品的质量要求越来越高^[1]。近年来, 由生物性因素引起的食品

安全事件发生率不断上升, 其中食源性疾病较为明显, 食源性疾病通常是由食源性致病菌而引起, 目前已有报道的食源性致病菌种类接近 300 种^[2]。根据 WHO 2015 年发布的《全球食源性疾病负担的估算报告》^[3], 全球食源性疾病患病人数以亿计, 其中腹泻病占比全球食源性疾病的

*通讯作者: 刘占鳌, 副教授, 主要研究方向为全科医生和高职教育的教学与科研工作。E-mail: y28980@163.com

*Corresponding author: LIU Zhan-Ao, Associate Professor, Xi'an Medical College, No.105, Xian Road, Huyi District, Xi'an 710309, China. E-mail: y28980@163.com

半以上。随着全球性食品贸易增长、加工方式变化、饮食习惯不同,新食源性致病菌的出现及细菌耐药性对食源性致病菌的监测防控提出了更为严峻的挑战。在我国,《国家食品安全监督抽检实施细则》和根据此标准制定的各省市县级食品抽检细则规定,食源性致病菌是食品检测的主要对象^[4]。常规病原微生物的检测方法主要依据 GB 4789、GB 8538 等标准,以分离培养、生理生化特征等方面为主^[5-7]。虽是较为可靠与准确的技术,但对生长、检测环境要求严格,且耗时、耗力,难以达到快速检测目的。目前,检测技术已由培养水平向分子水平方向发展,尤其以高效特异性强、快速、低成本为优势的分子生物学检测技术为主,包括常规 PCR、多重 PCR、荧光实时 PCR 技术等^[8,9]。因此本文主要就多重荧光 PCR 技术在食源性致病菌快速检测中的应用进展加以总结综述,以期为进一步建立快速、灵敏的致病菌检测方法提供参考。

2 食源性致病菌概述

2.1 分类

在食源性疾病中,病原微生物是其主要诱因,而细菌又占微生物病原的 44%^[10],细菌分为革兰阳性与阴性菌,以阴性菌居多。常见的食源性致病菌主要有志贺氏菌、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、溶血性链球菌、副溶血弧菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、炭疽杆菌、鼻疽杆菌、结核菌、布氏杆菌、猪丹毒杆菌等^[11],其中以大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌污染造成的食品安全事件较为常见^[12]。

2.2 危害性

食源性致病菌常伴随着被污染的食物进入人体,而食物污染可以出现在食物链的任意一个环节,人体感染后可导致肠道传染病的发生及食物中毒以及畜禽传染病的流行。据统计,在世界各国的细菌性食物中毒事件中,沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首,多由动物性食品引起,特别是肉类、鱼类、禽肉类、乳类、蛋及其制品^[13],以急性肠胃炎为主,潜伏期一般为 4~48 h,前期症状有恶心、头疼,全身乏力和发冷等,主要症状有呕吐、腹泻、腹痛,据估计,沙门氏菌每年在全世界范围内导致上万人感染、死亡^[14]。近几年,在我国也有关于某品牌餐饮检出致病菌的新闻报道,大多以大肠杆菌为主^[15],根据其致病机制不同,分为肠产毒性、肠致病性、肠侵袭性、肠出血性大肠杆菌,主要通过受污染的食品摄入,在日本曾发生一起大肠杆菌 O157: H7 引起的食物中毒,约 9000 多人中毒^[16,17],目前,沙门菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157: H7 是我国进出口冻肉产品的主要检测项目^[18]。因此,在食品工业中,切断致病菌在加工、运输、销售各个环节的传播途径,避免病原微生物感染,提高食源性致病菌检测能力,是今后应着

重研究分析的方向。

3 常规 PCR 技术特点

传统的细菌培养法检测主要靠形态学、生化反应和血清学凝集等实验手段,检测周期长,操作繁琐,易受主观判断影响。然而食源性致病菌检测技术的关键是要有较高的敏感度、较强的专一性以及尽可能短的分析时间^[19,20],其中,分子生物学检测技术作为一种核酸体外特异性扩增技术,基于致病菌中特有的核酸序列对其进行检测用于特定 DNA 片段放大^[21,22],其中以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)应用最为广泛,PCR 反应对于特异性目的片段的扩增相比于选择性培养、单克隆挑选等方法降低了假阳性概率,在灵敏度方面,大多数 PCR 体系对致病菌检出限可达到 $10\sim 10^4$ CFU/mL,而传统方法检出限约为 10^4 CFU/mL^[23]。常规 PCR 原理为通过检测特定目标 DNA 序列来检测食品中存在的单一细菌病原体,但也存在局限性,比如受到 PCR 抑制剂的影响而产生假阴性,无法区分食源性微生物是否为活体等^[24]。

4 多重荧光 PCR 技术概述

4.1 技术原理及特点

基于常规 PCR 技术,随之衍生出多种分子生物学方法,比如多重 PCR、实时荧光定量 PCR、数字微滴 PCR 等。

多重荧光 PCR 是近几年发展起来的一种快速检测技术,该技术在荧光定量 PCR 的基础上,利用两对或两对以上的引物以及荧光标记探针,实现在同一个反应体系中对多个目标序列同时进行检测,通过荧光信号积累实时监测整个 PCR 过程,拓宽了实时荧光 PCR 的应用范围,也克服了常规 PCR 的不足^[25-28]。它是多重 PCR 技术与实时荧光定量 PCR 的结合,其中,多重 PCR(multiplex PCR)技术又称多重引物 PCR 技术或复合 PCR 技术,Chamberlian 于 1988 年首次提出^[29],在同一反应体系中同时加入多对引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应,可同时检测多个目标菌,具有高效、高产、低成本、速度快等优点,有较好的可操作性^[13,30-32];实时荧光定量 PCR 技术是在反应体系中加入荧光基团,借助荧光信号累积对整个进程进行实时监测,最终根据标准曲线对未知模板浓度定量分析,实现了定性与定量同步分析,被认为是 PCR 诊断技术进步的一次跨越式的飞跃^[33-35]。总之,多重荧光 PCR 最主要优势是对待检测样本起始 PCR 反应模板进行准确定量,并处于全封闭的检测条件,具有高通量、高灵敏度、无污染、快速特异等特点,可缩短检测周期、减少成本和提高效率,广泛应用于生物学、临床医学等领域^[36-38]。

4.2 食源性致病菌检测应用

多重荧光 PCR 技术在实际应用中主要用于多种病原菌或者病原体不同血清型的检测,在科研领域已得到反复验证,比如董睿等^[4]以沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌为检测对象,验证多重荧光 PCR 在实际食品致病菌检测中的应用,设计引物和探针,并同时以对应致病菌国标方法为对照,结果显示此方法阳性、阴性、空白样品对照结果准确,与国标一致;刘秀峰等^[39]以阪崎杆菌 16S-23SrDNA 保守区、金黄色葡萄球菌耐热核酸酶(*nuc*)基因序列和蜡样芽胞杆菌 *cerA* 特异基因设计合成引物和探针,用国标法、多重荧光 PCR 方法同时对 194 份婴幼儿食品进行检测,结果完全一致,并在 8 h 内完成。近年来基于实时荧光定量 PCR 的多重检测在肉类、水产品及其乳制品等应用发展迅速,Zhang 等^[40]利用多重荧光 PCR 检测出了乳制品中的金黄色葡萄球菌,检测限可低至 3×10^2 CFU/g;索原杰^[41]构建了基于活菌染料 PMA 的三重实时荧光定量 PCR 方法同时检测牛奶中的金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌,并开展乳酸菌对致病菌生长抑制的研究。李金峰^[42]采用改良分子信标探针,建立了一种同时测沙门菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157:H73 种致病菌的多重荧光 PCR 法,结果表明此检测体系可正确地检出所有阳性基因,未出现假阴性。

此外,秦丽等^[43]利用多重荧光 PCR 技术快速检测奶粉中的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌,分别以其 3 个特性基因为靶基因,选择特异性引物,以参照菌种为对象,验证引物特异性;同时荧光定量 PCR 技术应用于大肠杆菌检测的文献也较多,其中李睿等^[44]针对大肠杆菌 O157,设计特异性的探针,开发多重荧光 PCR 检验技术,可对大批量食品样本进行快速筛选。

目前我国布病疫情呈全国流行态势,北方地区尤为严重,布鲁氏菌病(简称布病)是一种人畜共患传染病,人感染后症状为发热、关节痛、疲乏无力,重者难以治愈,布病是由革兰阴性兼性胞内寄生的布鲁氏菌属引起,目前实验室对布鲁氏菌的鉴定主要依靠表型检测,但耗时长、存在感染风险^[45];为此刘志国等^[46]依据布鲁氏菌部分特异性基因,应用多重 Taq-Man 荧光 PCR 技术检测布鲁氏菌,结果显示该方法的单重和多重荧光 PCR 最低检测下限均约为 10^2 copy/ μ L($13 \sim 24$ fg/ μ L),是常规 PCR 灵敏度的 100 倍。

虽然目前已经有大量文献研究该技术,但实际应用较少,原因在于利用该技术检测过程中影响因素多及要求较严,包括核酸模板的提取、引物探针的设计、多重 PCR 反应体系的构建、质量体系监控等,造成灵敏度及稳定性降低,结果出现偏差^[47,48]。鉴于此,关于多重荧光 PCR 与其他先进技术结合的研究也成为领域内的研究重点,比如,Jannine 等^[49]设计了 HANDS(Homo-Tag Assisted Non-Dimer

System)系统,有效减少多重 PCR 技术产生的引物二聚体,同时兰全学等^[50]首次结合 HANDS 系统构建了同时检测 4 种致病菌的多重荧光 PCR 方法,结果表明该方法特异性强、灵敏度高;将多重荧光 PCR 技术与流式液相芯片技术相结合,通过研究关键技术建立相应的病原体高通量检测体系并加以应用,对实现致病菌高通量共检具有重要的意义^[51-54];此外,利用免疫磁珠分离技术分离、富集食源性致病菌^[55-57],再与多重实时荧光定量 PCR 结合,可实现无需预增菌高通量实时检测多种食源性致病菌^[58,59]。另外,为了保证检测结果精确无误,需要对检测过程进行内标监控,索标等^[58]采用来源于人类腺病毒基因的一段序列设计 IAC,评估其检测特异性、扩增效率及与目的致病菌基因组 DNA 的抗干扰扩增能力,开发出一个可用于多重实时荧光 PCR 检测的扩增内标,避免出现假阴性结果。

5 结论及展望

食品安全问题关系到国计民生,是一个全球公共安全问题,随着社会发展,食源性致病菌检测技术也在不断的发展和创新,未来必然会提出更高要求。多重 PCR 通过运用多对引物检测目的基因,成倍提升检测效率;荧光 PCR 则通过监测探针或染料在 PCR 扩增时的荧光信号变化大幅提高结果准确性;多重荧光 PCR 结合上述 2 种方法优点,通过运用多条探针检测目的基因,提升检测效率和准确性,是目前研究的最深入最成熟的检测技术^[60,61]。但成本消耗较大,在一定程度上限制了其在实际生产中的应用,而构建特异性强的多重实时荧光定量 PCR 检测方法更是目前的研究热点及发展趋势^[52]。目前,对于食品中的致病菌检测来说,依靠单一的手段已不能满足现阶段的检测要求,多种技术的联用可大大提高检测的灵敏度。总之,食源性致病菌的检测技术将逐步向灵敏度更高、特异性更强、通量更高、重复性更好、简易、经济的方向发展,亟需为我国开展食源性疾病的预防、诊断、治疗提供可靠的检测手段,从而为公共卫生及食品工业的健康快速发展做出贡献。

参考文献

- [1] 李翠萍. PCR 技术在食源性细菌检测中的应用进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 8(8): 42-44.
- [2] Li CP. Application progress of PCR technology in food-borne bacteria detection [J]. Chin Urban Rural Ind Hyg, 2020, 8(8): 42-44.
- [3] 赵彤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(4): 7-9.
- [4] Zhao T. Detection Status of foodborne pathogenic bacteria and food microbial risk assessment [J]. China Health Stand Manag, 2019, 10(4): 7-9.
- [5] World Health Organization. ZH Food safety: Home page [Z]. 2014.
- [6] 董睿, 孙端方. 多重荧光 PCR 方法检测食品中致病菌的实用研究[J].

- 现代食品, 2018, (14): 86–87.
- Dong R, Sun DF. Multiple real-time PCR method for pathogenic detection in food [J]. Mod Food, 2018, (14): 86–87.
- [5] 何欣荣. 食品安全与食源性疾病控制研究进展[J]. 安徽预防医学杂志, 2002, 8(6): 384–387.
- He XR. Research progress on food safety and foodborne disease control [J]. Anhui J Prev Med, 2002, 8(6): 384–387.
- [6] 骆业巧. 包装饮用纯净水微生物污染情况分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 360–363.
- Luo YQ. Analysis of the microbial contaminations of packaged drinking purified water [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(1): 360–363.
- [7] 李凡, 许恒毅, 李福来. 多重 PCR 技术在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(21): 372–375.
- Li F, Xu HY, Li FL. Application of multiplex PCR in detection of foodborne pathogens [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(21): 372–375.
- [8] Zhang H, Zhang Y, Lin Y, *et al.* Ultrasensitive detection and rapid identification of multiple foodborne pathogens with the naked eyes [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 71(12): 186–193.
- [9] 吴林洪. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, (22): 336–337.
- Wu LH. Research progress in rapid detection technology of food-borne pathogens [J]. Food Sci, 2012, (22): 336–337.
- [10] Suaifan GARY, Alhagail S, Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 90: 230–237.
- [11] 孙程. 氨基功能化磁性纳米粒子富集结合多重 PCR 检测食源性致病菌[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Sun C. Amino-functionalized magnetic nanoparticles enrichment combined with multiple PCR detection of foodborne pathogens [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [12] Xu YG, Cui LC, Tian CY, *et al.* A multiplex ploymerase chain reaction coupled with high performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens [J]. Food Control, 2012, 25(2): 778.
- [13] 王如景. 三种食源性致病菌多重 PCR 快速检测方法的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- Wang RJ. Study on multiplex PCR for rapid detection of three food-borne bacterial pathogens [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2012.
- [14] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 882–889.
- [15] 麦国通, 区子阳, 何瑜, 等. 2010–2016 年佛山市某区市售食品中致病菌污染状况分析[J]. 华南预防医学, 2017, (4): 389–390.
- Mai GT, Qu ZY, He Y, *et al.* Analysis of pathogenic bacteria contamination in foods sold in a certain district of Foshan from 2010 to 2016 [J]. South China J Prev Med, 2017, (4): 389–390.
- [16] 杨娟. 复方中药筛选及其对不同源大肠杆菌的体外抑菌效果探索[D]. 昆明: 西南林业大学, 2018.
- Yang J. Screening of compound traditional Chinese medicine and its in vitro bacteriostatic effect on different origin *Escherichia coli* [D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2018.
- [17] Hiroshi N, Kouichi K, Hiroyuki M, *et al.* Subtyping of shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan [J]. Fems Immunol Med Microbiol, 2002, 34(4): 289–297.
- [18] 李金峰, 赵芳, 赵俊龙, 等. 肉食品中 3 种食源性致病菌多重荧光 PCR 检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(8): 990–991.
- Li JF, Zhao F, Zhao JL, *et al.* Detection of multiple fluorescence PCR of three foodborne pathogens in meat food [J]. Chin J Public Health, 2009, 25(8): 990–991.
- [19] 陆宇, 朱莉贞, 段连山, 等. mRNA 作为结核分支杆菌活菌检测标志的可行性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(7): 419–423.
- Lu Y, Zhu LZ, Duan LA, *et al.* Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Tuberculosis Respirat Dis, 2003, 26(7): 419–423.
- [20] 钟丽琪, 郭亚辉, 曹进, 等. 食源性致病菌检测技术的研究概述[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4387–4393.
- Zhong LQ, Guo YH, Cao J, *et al.* Review on the detection technology of foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4387–4393.
- [21] Turner KM. Efficacy of chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection in foods [J]. J Food Protect, 2000, 63(4): 539–541.
- [22] Kanki M, Sakata J, Taguchi M, *et al.* Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths [J]. Food Microbiol, 2009, 26(1): 1–3.
- [23] 孙吉浩. PCR 技术在食源性微生物检测中的应用与发展研究[J]. 生物化工, 2016, 2(2): 280–281.
- Sun JH. Application and development of PCR in the detection of food-borne microorganism [J]. Biochem Ind, 2016, 2(2): 280–281.
- [24] 邓紫筠. 多重 PCR 检测技术在食品微生物检测中的应用[J]. 生物技术世界, 2013, (1): 69–70.
- Deng ZY. Application of multiple PCR detection in food microbial detection [J]. Biotech World, 2013, (1): 69–70.
- [25] 张若楠, 于雷, 王钊, 等. 多重荧光定量 PCR 在动物检测中的应用[J]. 山东畜牧兽医, 2020, 273(4): 77–80.
- Zhang RN, Yu L, Wang Z, *et al.* Application of multiple fluorescence quantitative PCR in animal detection [J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2020, 273(4): 77–80.
- [26] 周慧, 支竹伟, 刘涵, 等. 多重实时荧光定量 PCR 检测猪肉中的特定腐败菌[J]. 粮食与食品工业, 2014, 21(3): 86.
- Zhou H, Zhi ZW, Liu H, *et al.* Detection of specific spoilage bacteria in meat PCR multiple real-time fluorescence quantification [J]. Cereal Food Ind, 2014, 21(3): 86.
- [27] Chambercian JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via mutiplex DNA amplification [J]. Nucl Acids Res, 1988, (16): 1141–1156.
- [28] 刘志国. 实时多重荧光 PCR 快速鉴别布鲁菌方法的建立[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2010.
- Liu ZG. Establishment of real-time multiple fluorescence PCR rapid identification of *Brucella* [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [29] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucl Acids Res, 1988, 16(23): 11141–11156.
- [30] 唐廷廷, 韩国全, 王利娜, 等. 分子生物学技术在食源性致病菌检测中

- 的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3497–3502.
- Tang TT, Han GQ, Wang LN, *et al.* Research progress of molecular biology technology in detection of foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(9): 3497–3502.
- [31] 申孟, 杨宏苗, 刘杨, 等. 食源性致病菌快速检测研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, (1): 23–25.
- Shen M, Yang HM, Liu Y, *et al.* Rapid detection technology of food borne pathogen [J]. Cereals Oils, 2020, (1): 23–25.
- [32] 张飞燕, 赵玲, 金洁, 等. 多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 111–116.
- Zhang FY, Zhao L, Jin J, *et al.* Application of multiple PCR technique in pathogen detection in experimental animals [J]. Chin J Comparat Med, 2018, 28(10): 111–116.
- [33] Distéfano AL, Alonso A, Martin F, *et al.* Human cytomegalovirus: Detection of congenital and perinatal infection in Argentina [J]. BMC Pediatr, 2004, 23: 4–11.
- [34] Mosquera MM, Ory FD, Moreno M, *et al.* Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and Parvovirus B19 by using multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 111–116.
- [35] Boriskin YS, Fuller K, Powles RL, *et al.* Early detection of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription PCR for CM V spliced late gene UL21.5: a two site evaluation [J]. J Clin Virol, 2002, 24(122): 13–23.
- [36] Narayanan J, Mansel WG. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 with multiplex real-time PCR assays [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 3169–3171.
- [37] Hubschen JM, Kremer JR, Landtsheer SD, *et al.* A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus [J]. J Virol Methods, 2008, 149: 246–250.
- [38] Celli J, De-Chastellier C, Pizarro CJ, *et al.* *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum [J]. J Exp Med, 2003, 198(4): 545–556.
- [39] 刘秀峰, 强华, 潘珍瑜, 等. 多重荧光 PCR 检测婴幼儿食品中常见病原菌[J]. 海峡预防医学杂志, 2013, 19(5): 15–17.
- Liu XF, Qiang H, Pan ZY, *et al.* Establishment of a multiple real-time PCR method for detection of pathogens in infant food [J]. Strait J Prev Med, 2013, 19(5): 15–17.
- [40] Zhang Z, Liu W, Xu H, *et al.* Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. J Dairy Ence, 2015, 98(3): 1625–1633.
- [41] 索原杰. 多重实时荧光 PCR 致病菌检测方法的构建及其在牛奶中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- Suo YJ. Construction of multiple real-time fluorescence PCR pathogen detection method and its application in milk [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [42] 李金峰. 三种食源性致病菌的多重实时 PCR 检测研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- Li JF. The Study on multiple real-time PCR detection of three foodborne pathogens [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [43] 秦丽, 周巍, 张明, 等. 乳粉中常见致病菌的多重荧光 PCR 检测[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2014, 38(5): 513–517.
- Qin L, Zhou W, Zhang M, *et al.* Detection of multiple fluorescent PCR of common pathogens in milk powder [J]. J Hebei Normal Univ (Nat Sci Ed), 2014, 38(5): 513–517.
- [44] 李睿, 刘晓红, 王芳, 等. 检测食品中大肠杆菌 O157 的多重荧光 PCR 方法的建立[J]. 中国酿造, 2010, (4): 160–163.
- Li R, Liu XH, Wang F, *et al.* Development of multiplex real-time PCR system for detection of *Escherichia coli* O157 in food [J]. China Brew, 2010, (4): 160–163.
- [45] 张利, 崔步云, 莫内. 荧光定量 PCR 方法应用于布氏菌检测研究概述[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(5): 347–350.
- Zhang L, Cui BY, Mo N. Application of fluorescence quantitative PCR method in the detection of *Brucella* [J]. Chin J Endemiol, 2012, 31(5): 347–350.
- [46] 刘志国, 罗成旺, 张利, 等. 多重荧光定量 PCR 方法鉴定布鲁氏菌属及牛羊种布鲁氏菌研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(9): 869–874.
- Liu ZG, Luo CW, Zhang L, *et al.* Multiplex fluorescence quantitative PCR detection on *Brucella* spp., *Brucella abortus*, and *Brucella melitensis* [J]. Chin J Zoonoses, 2012, 28(9): 869–874.
- [47] 肖性龙. 多重荧光 PCR 与液相芯片高通量病原体检测体系的建立与应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- Xiao XL. Establishment and application of multiple fluorescence PCR and high-throughput pathogen detection system of liquid chip [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [48] Hodgson J, Zuckerman M, Smith M. Development of a novel internal control for a real-time PCR for HSV DNA types 1 and 2 [J]. J Clin Virol, 2007, 38: 217–220.
- [49] Jannine B, Susan S, Jane T, *et al.* The elimination of primer-dimer accumulation in PCR [J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(16): 3235–3241.
- [50] 兰全学, 林霖, 陈国培, 等. 多重荧光 PCR 结合 HANDS 系统快速检测 4 种食源性致病菌[J]. 现代预防医学, 2012, (10): 2516–2520.
- Lan QX, Lin L, Chen GP, *et al.* Rapid detection on four foodborne pathogens using HANDS system combined with multiplex real-time PCR [J]. Mod Prev Med, 2012, (10): 2516–2520.
- [51] Han X, Wang H, Chen H, *et al.* Development and primary application of a fluorescent liquid bead array for the simultaneous identification of multiple genetically modified maize [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 11(49): 360–366.
- [52] 陈纬. 液相芯片技术的原理与应用进展[J]. 成都医学院学报, 2008, 9(3): 225–231.
- Chen W. The Principle and application advance of suspension array technology [J]. J Chengdu Med Coll, 2008, 9(3): 225–231.
- [53] 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, (6): 735–740.
- Jin YJ, Chen YJ, Gan LP, *et al.* Application of a suspension array technology and the multiplex PCR for rapid detection of four common food-borne pathogens [J]. J Trop Med, 2015, (6): 735–740.
- [54] 闻一鸣, 李志清, 童吉宇, 等. 免疫磁珠富集技术联合选择性培养基快速检测单增斯特菌[J]. 生物工程学报, 2013, (5): 672–680.
- Wen YM, Li ZQ, Tong JY, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by immunomagnetic separation combined with selective medium [J]. Chin J Biotechnol, 2013, (5): 672–680.
- [55] 胡金强, 雷俊婷, 詹丽娟, 等. 免疫学技术在食源性微生物检测中的应用综述[J]. 郑州轻工业学院(自然科学版), 2014, 29(3): 7.

- Hu JQ, Lei JT, Zhan LJ, *et al.* Application of immunological techniques in foodborne microbial detection [J]. J Zhengzhou Univ Light Ind (Nat Sci Ed), 2014, 29(3): 7.
- [56] Liu XX, Tu JM. Immunomagnetic beads separation techniques and its application progress in detection of food borne pathogens [J]. Chin J Antibiot, 2014, 12: 956–960.
- [57] Guy RA, Tremblay D, Beausoleil L, *et al.* Quantification of *E. coli* O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection [J]. J Microbiol Methods, 2014, 99: 44–53.
- [58] 索标, 滕要辉, 艾志录, 等. 食源性致病菌多重实时荧光 PCR 检测扩增内标的构建及评价[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(8): 148–151.
- Suo B, Teng YH, Ai ZL, *et al.* Construction and evaluation of an internal amplification control for multiplex realtime PCR detection of foodborne pathogens [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(8): 148–151.
- [59] Burggraf S, Olgemoller B. Simple technique for internal control of real-time amplification assays [J]. Clin Chem, 2004, 50(5): 819–825.
- [60] 吉尚志, 杨宇, 王静, 等. 多重荧光定量 PCR 检测鼠感染 3 种病原体的方法[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(6): 531–534.
- Ji SZ, Yang Y, Wang J, *et al.* A method for quantitative PCR detection of three pathogens in mice with multiple fluorescence [J]. Chin J Vector Biol Control, 2011, 22(6): 531–534.
- [61] 陈筱婷, 柯振华. 羊乳制品中动植物源性成分多重 RT-PCR 方法研究[J]. 食品研究与开发, 2017, (15): 156–162.
- Chen XT, Ke ZH. Research on multiplex RT-PCR detection method of animal and plant derived ingredients in goat milk [J]. Food Res Dev, 2017, (15): 156–162.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

刘占鳌, 副教授, 主要研究方向为全科医生和高职教育。
E-mail: y28980@163.com

“生物毒素研究”专题征稿函

随着社会经济的发展, 人民越来越关注食品的安全问题。在日常生活中, 食物中毒事件时有发生。在食品安全事件中, 生物毒素中毒事件占一定比例。生物毒素是生物体内所产生的有毒代谢产物, 包括微生物毒素、植物毒素、动物毒素和海洋毒素。生物毒素不仅对消费者的健康造成危害, 还会对养殖业、种植业、畜牧水产业等行业造成巨大的经济损失。因此, 关注食品中生物毒素的安全, 是一项具有重大经济意义和科学意义的事情。

鉴于此, 本刊特别策划“生物毒素研究”专题。专题将围绕生物毒素的产生与调控机制、生物毒素的快速检测与筛查技术、生物毒素的脱毒方法与机制、生物毒素的毒理研究与风险评估、生物毒素的标准物质研发、生物毒素型药物的开发研究等问题展开讨论, 计划在 2021 年 3~4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2021 年 1 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**生物毒素研究**):

网站: www.chinafoodj.com(备注投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 生物毒素研究”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **生物毒素研究**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部