

核酸技术在食源性致病菌检测中的研究进展

高雯暄^{1,2}, 甘芝霖², 陈爱亮¹, 徐贞贞¹, 孙爱东², 李 会^{1*}

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081;

2. 北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系, 林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 食源性致病菌是威胁食品安全的重要因素之一, 常见的种类主要包括致病性大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、弯曲杆菌等。全方位、准确地实现对致病微生物的检测是保证食品安全的关键。传统的培养法和其他检测技术如免疫学检测、生物传感器等技术不同程度地存在针对目标单一、效率低、灵敏度差等问题。核酸技术具有特异性强、高通量、分析角度全面等特点, 近几年来得到迅速的发展。本文主要介绍了利用 PCR 技术、等温扩增技术、第二、三代测序技术以及其他核酸技术对食源性致病菌检测的研究进展, 并提出核酸技术在食源性致病菌检测方面的研究前景。旨在归纳已具备商业应用价值的核酸技术在食源性致病菌检测上的研究进展, 并分析各技术的优势和不足, 同时展望核酸检测技术的发展趋势。

关键词: 食源性致病菌; 核酸技术; PCR 技术; 测序技术; 食品安全

Research progresses of nucleic acid technologies in the testing of food-borne pathogens

GAO Wen-Xuan^{1,2}, GAN Zhi-Lin², CHEN Ai-Liang¹, XU Zhen-Zhen¹, SUN Ai-Dong², LI Hui^{1*}

(1. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; 2. *Department of Food Science and Engineering, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China*)

ABSTRACT: Foodborne pathogens are one of the most important factors in threatening the food safety. Major foodborne pathogens include the pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* and *Campylobacter coli*, etc. Comprehensive and accurate detection of pathogenic microorganisms is the key to ensure the food safety. Traditional detection methods of colonies incubation, and other detection technologies such as immunological detection and biosensor have disadvantages including single target, poor efficiency and low sensitivity to some extent. Nucleic acid technologies are characterized by strong specificity and high throughput with multi-perspectives, which have developed rapidly in recent years. This paper mainly introduced the detection of food-borne pathogenic bacteria by PCR, isothermal amplification, high-throughput sequencing(HTS), single-molecule sequencing technology and other nucleic acid technologies, and proposed the perspectives on the application of these technologies in the future. The aim was to summarize the research progress of nucleic acid technology with commercial application value in pathogenic bacteria detection, analyze the advantages and

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901798)

Fund: Supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (31901798)

*通讯作者: 李会, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: lihui05@caas.cn

*Corresponding author: LI Hui, Ph.D, Assistant Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.12, Zhongguancun South Road, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: lihui05@caas.cn

disadvantages of them, and provide the perspectives of their development in the future.

KEY WORDS: foodborne pathogens; nucleic acid technology; PCR; sequencing technique; food safety

1 引言

食源性致病菌指能够引发人体呕吐、腹泻等患病状态的一群微生物,是造成食源性疾病的主要因素。据统计,我国微生物污染引起的食物中毒事件约占事件总数的 50%,常见食源性致病菌有沙门氏菌、肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、空肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)等^[1,2]。在食品生产中,传统杀菌工艺并不能保证全部加工食品达到商业无菌状态,因此食源性致病菌的检测尤为重要^[3-8]。传统检测和鉴定方法(如分离培养法、形态观察法、生化鉴定法、血清分型法等)操作烦琐、分辨力差,不能实现有效地监测和预警作用,因此需要能快速检测食源性致病菌的新型技术^[9-11]。核酸技术可以实现对致病菌的快速检出,同时,基因型的研究,可以更好地认知微生物间、物种与功能基因间的相互作用机制,

对防止食源性疾病的爆发和食源性致病菌的传播具有重要意义^[12-15]。表 1 列举了近年来利用核酸技术对常见的食源性致病菌,包括大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌(*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria*)等的检测研究。本文综述了核酸技术在食源性致病菌快速检测中的应用,并总结归纳其优缺点,为核酸技术更好地应用于微生物检测提供参考。

2 PCR 技术

PCR 技术通过设计引物或探针,可以实现对目标致病菌的特异 DNA 或 RNA 序列的检测^[9]。主流 PCR 检测技术包括普通 PCR 技术、mPCR、qPCR 以及 ddPCR。PCR 技术具备较高的准确性及敏感性,已广泛应用于食源性致病菌的检测中^[1,8,9]。

表 1 利用核酸技术对食源性致病菌检测的研究汇总
Table 1 Research summary on testing of food-borne pathogens by nucleic acid technologies

目标致病菌	技术方法	食品基质	检测限	参考文献	
<i>E. coli</i>	多重 PCR 技术 (multiplex polymerase chain reaction, mPCR)	缓冲蛋白胨水	0.187 μg/mL	[16]	
	mPCR+簇状规则间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)	牛肉加工厂	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[17]	
	mPCR+SSEL [*]	生菜表面		[18]	
	多重不对称 PCR	生猪肉、鲜牛奶		[19]	
	微滴式数字 PCR 技术 (droplet digital PCR, ddPCR)	水厂水		[20]	
	ddPCR	菠菜叶、牛奶、苹果汁	2 CFU/mL	[21]	
	环介导等温扩增 (loop mediated isothermal amplification, LAMP)	PBS			
	纳米孔单分子测序技术 (oxford nanopore technologies, ONT)		10 ² ~10 ³ CFU/mL	[22]	
		LAMP 微流控芯片	牛奶	100 CFU/mL	[23]
			LB 肉汤培养基	10 CFU/mL	[24]
溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)	虾匀浆	2.5 × 10 ² CFU/g	[25]	
副溶血弧菌 (<i>Vibrio Parahemolyticus</i>)	mPCR	缓冲蛋白胨水	0.158 μg/mL	[16]	
	多重不对称 PCR	生猪肉、鲜牛奶	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[19]	
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	LAMP/ddPCR	果汁	1.5×10 ² ~1.5×10 ⁵ CFU/mL	[26]	
	RPA	瓶(桶)装水	36 CFU/mL	[27]	

续表 1

目标致病菌	技术方法	食品基质	检测限	参考文献
<i>Salmonella</i>	mPCR	缓冲蛋白胨水	0.0202 µg/mL	[16]
		熟肉匀浆	10 ³ CFU/mL	[28]
		猪肉、牛奶香肠		
	多重不对称 PCR	生菜表面	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[18]
		生猪肉、鲜牛奶		[19]
	实时定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qPCR)	果蔬	100 CFU/mL	[29]
	核酸序列扩增 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)	牛肉, 猪肉和牛奶	0.7 CFU/mL	[30]
LAMP 微流控芯片		100 CFU/mL	[23]	
叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)+qPCR	牛奶	10 ² ~10 ³ CFU/mL	[31]	
<i>S. aureus</i>	mPCR	缓冲蛋白胨水	2.30 µg/mL	[16]
		熟肉匀浆	10 ³ CFU/mL	[28]
		猪肉、牛奶香肠		
	多重不对称 PCR	生菜表面	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[18]
		生猪肉、鲜牛奶		[19]
	PMA+qPCR		10 ² ~10 ³ CFU/mL	[31]
	LAMP	牛奶	10 CFU/mL	[32]
LAMP 微流控芯片		100 CFU/mL	[23]	
<i>Listeria</i>	mPCR	缓冲蛋白胨水	1.05 µg/mL	[16]
		熟肉匀浆	10 ³ CFU/mL	[28]
		生菜表面	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[18]
	生猪肉、鲜牛奶	[19]		
	qPCR		1.58×10 ³ 、 1.43×10 ³ CFU/mL	[33]
	PMA+qPCR	营养肉汤、牛奶	10 ² ~10 ³ CFU/mL	[31]
	DNA 微阵列技术	牛奶	10 ⁸ CFU / mL	[34]
志贺氏菌(<i>Shigella castellani</i>)	mPCR	熟肉匀浆 猪肉、牛奶香肠	10 ³ CFU/mL	[28,35]
多重不对称 PCR	生猪肉、鲜牛奶	10 ⁴ ~10 ⁵ CFU/mL	[19]	
停乳链球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	单分子实时测序技术 (single-molecule real time sequencing, SMRT)	人、鱼类		[36]
<i>C. coli</i>	SMRT			[37]

注: *选择性共增殖技术: 同时富集肠道沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157: H7 和单核增生李斯特菌的选择性富集肉汤。

2.1 mPCR

mPCR 技术通过设计几组特异性引物, 可同时扩增出多个核酸片段, 同时测定多种致病菌, 实现较高的通量^[9]。寡聚核苷酸引物的选择和设计对 mPCR 的发展非常重要, 刘骆强等^[16]运用 mPCR 技术对 5 种常见食源性致病菌进行优化, 发现在最佳退火温度为 59 °C 时引物特异性较好。杨国兴等^[28]建立了沙门氏菌、*S. aureus*、李斯特菌、志贺氏菌 4 种致病菌的 mPCR 检测方法, 通过优化反应体系, 使得熟肉匀浆中的 4 种致病菌的检出限为 10^3 CFU/mL。然而 mPCR 技术存在扩增效率不均衡、凝胶电泳图像分辨率低等问题。刘忠梅等^[35]把 *S. aureus fem A* 基因、沙门氏菌 *inv A* 基因、志贺氏菌 *ipa H* 基因作为靶基因, 设计了 3 对特异性引物与通用引物连接, 构建了靶序列富集多重 PCR (Tem-PCR) 长引物, 将沙门氏菌、*S. aureus* 和志贺氏菌的检出限维持在 10^3 CFU/mL 水平, 并利用该技术弥补了传统 mPCR 引物在体系中扩增效率不均衡的缺陷。瞿洋等^[18]采用选择性共增殖菌技术提高增殖效果, 利用 mPCR 技术检测生菜中 4 种常见致病菌, 其检出限范围为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL, 该策略可减少非目的菌的干扰, 保证了检测的准确度。Jiang 等^[17]联合 mPCR 技术和 CRISPR 技术筛分小型牛肉加工厂中的 115 株 *E. coli* 分离株, 以 *stx1*、*stx2*、*eae* 毒力基因作为靶序列, 筛选出 13 株阳性分离株, 并全部鉴定出其血清型。王小强等^[19]将所设计的引物上游或下游 5' 端引入一段外源共有序列, 经多重不对称 PCR 技术使 *S. aureus*、沙门氏菌、副溶血弧菌、单核增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、志贺氏菌、EHEC O157:H7、小肠结肠炎耶尔森菌的单链 DNA 靶序列由芯片上固定的特异性寡核苷酸探针捕获, 通过芯片扫描、分析荧光信号实现对 7 种食源性致病菌可视化检测, 弥补了传统 mPCR 琼脂糖凝胶电泳的低分辨率的缺陷, 并可使基因组 DNA 的检测灵敏度低至 0.1~1 pg。mPCR 可测范围广泛, 适用场合多, 检测效率高。但引物的设计要求高, PCR 反应体系的配制、DNA 模板的数量、循环温度和 Taq DNA 聚合酶的活性等因素均会影响实验误差, 因此 mPCR 还有一定的发展空间^[1,9]。

2.2 qPCR

qPCR 常用于致病菌的相对定量检测, 与普通 PCR 相比, 它不需要内标物和琼脂糖凝胶电泳来检测 PCR 产物, 通过实时显示荧光强度进而报告基因监测情况, 并通过计算样品 *Ct* 值, 利用荧光浓度的 log 值与 *Ct* 值呈线性关系的原理进而做到定量^[38]。SYBR Green I 染料法属于 qPCR 最早的一类检测方法, 具有比较完善的检测技术: 通过生成 DNA 熔解曲线, 将特异引物与其他产物(如引物二聚体)区分开, 通过计算扩增产物的 *Tm* 值评判引物设计的好坏^[1]。相较于 SYBR Green I 染料法, Taqman 探针法通过设计特异性探针与特定的 DNA 序列杂交, 实现荧光定量, 避免了在

实际运用中出现引物二聚体以及错误识别扩增子的现象发生, 是一种更为精确的检测方法, 但使用成本相对较高^[1]。此外, 分子信标技术在检测沙门氏菌应用较为成熟, 2004 年 Hu 和 Arvind^[29]首次利用分子信标技术检测新鲜果蔬中的沙门氏菌, 其检出限为 100 CFU/g。Suzuki 等^[33]利用 SYBR Green I 和 TaqMan 2 种方法定量检测营养肉汤和牛奶中 *L. monocytogenes*, 检出限为 1.58×10^3 CFU/mL 及 1.43×10^3 CFU/mL。Figueiredo 等^[39]对 Taqman 探针法和平板计数 (plate count, PC) 2 种方法对真空包装熟肉样品中乳酸菌—肠系膜白化菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 和魏氏菌 (*Weissella viridescens*) 进行检测进行了比较研究, 并建立了不同温度下储存过程中的生长曲线模型, 实验得出 2 种方法所得的结果基本一致: *L. mesenteroides* 和 *W. viridescens* 的生长数据分别为 3.11~4.18 lg CFU/g 和 2.90~3.67 log₁₀ CFU/g。Dreier 等^[40]将干酪食品中 4 种常见检测菌: 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、嗜酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 和戊酸片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 的管家基因 (housekeeping genes) 作为目标序列, 利用 Species Primer 管道工具进行自动化的高通量筛选以及特异性引物设计, 并在硅胶和菌种纯培养中分别对引物 DNA 进行 qPCR 筛分评估, 该策略测定效率为 92%~100%, 排他性较好。对于 qPCR 技术, 最大的问题是无法区分死、活细菌, 实际上该弊端可以通过联合化学方法解决。索原杰^[31]采用 PMA 的 DNA 染料与三重 qPCR 联合的方法, 以 *nuc*、*hlyA* 及 *orgC* 为靶基因, 测定牛奶中 *S. aureus*、*L. monocytogenes* 和沙门氏菌 3 种活菌数, 检出限为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL。此外, 逆转录实时荧光定量 PCR (reverse transcription-qPCR, RT-qPCR) 是以 RNA 为模板, 利用反转录 PCR 技术 (RT-PCR) 得到 cDNA 文库, 最后采用 qPCR 进行定量分析的方法^[41]。邹享珍等^[42]采用 RT-qPCR 技术检测肺炎克雷伯氏菌的 *rcsA* 和 23sRNA 基因, 其最低检测浓度为 10^2 CFU/mL, 检测灵敏度和特异性为 98.9%、97.9%。RT-qPCR 是国际认可的用来检测 RNA 病毒的方法, 但该方法实验结果容易出现假阳性, 引物设计区域易发生突变; 并且相对于分子分型方法(如 CRISPR 序列检测技术), 它的检测效率较低^[43,44]。

qPCR 自动化程度、检测灵敏度和特异性高, 但富集效率对 qPCR 的灵敏性和准确性很重要, 并且抑制剂的存在和目标基因的变异也会给实验带来误差^[38]。尽管大量的研究通过优化反应体系可提高 qPCR 技术扩增的准确性, 但不可能完全消除二聚体的产生; 并且, 引物、探针的良好保存也是保证准确性的关键。

2.3 ddPCR

ddPCR 是根据阳性微滴比例统计出样品中靶序列的

拷贝数或浓度, 实现无需制作标准曲线的绝对定量检测的方法。ddPCR 技术减少了污染物对扩增效率的影响, 并降低了细菌检测浓度, 通过直接在微滴中包裹单个细胞对 *P. Aeruginosa* 多个毒力因子直接检测^[26,45]。马薇等^[20]以大肠菌群的 *lacZ* 基因为靶基因, 建立最佳反应体系(引物和探针浓度分别为 0.2 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$), 当 DNA 浓度范围为 $3.95\sim 7.80\times 10^4$ copies/20 μL 时, 方法的线性关系良好($r^2=0.99$)。He 等^[21]利用该方法检测常见食品基质中产志贺毒素大肠杆菌(Shiga-toxin producing *E. coli*, STEC), 其检出限低至 2 CFU/mL。ddPCR 技术可以检测到活菌数, 但可检测的靶基因种数有限。与普通 PCR 和 qPCR 技术相比, ddPCR 具有更低的检出限, 对 PCR 抑制剂的敏感度较低, 检测时间更短, 且准确性和灵敏性更佳^[46,47]。ddPCR 技术与直接 PCR 联合定量体系中的拷贝数, 可以省略传统 qPCR 的富集步骤。目前 ddPCR 已经广泛应用于生物医药中 DNA 的绝对定量检测, 但是在食源性微生物的检测上还不够系统全面, 有待深入研究。

3 等温扩增技术

等温扩增技术具有较低的经济效益, 对技术人员的要求较低, 方便快捷。其原理是依据致病菌或病毒的保守序列设计精细的引物-探针组, 在恒温下对目的基因片段进行特异性快速检测^[25,48]。

3.1 NASBA

NASBA 技术是由 RNA 逆转录所形成的 cDNA, 在恒温条件下(41 $^{\circ}\text{C}$)转录出多个反义 RNA 进行复制循环的方法。反应需要 2 个特异引物(分别在 5'和 3'端识别 RNA), 以及 3 种关键酶[禽成髓细胞瘤病毒(avian myelocytomatosis virus, AMV)逆转录酶, RNase H 和 T7 DNA 依赖性 RNA 聚合酶]。NASBA 技术主要应用于 RNA 逆转录扩增, 但在检测 DNA 双链时, 所需温度高达 95 $^{\circ}\text{C}$ ^[48]。传统的 NASBA 技术需要凝胶电泳, 但在染色能力上 RNA 不如 DNA 高效^[1,9,48]。近年来 NASBA 广泛应用荧光可视化技术, 通过修饰引物可以提高识别 RNA 的敏感性, 以减少引物二聚体的产生, 并防止假阳性的产生。巢式 NASBA 技术的应用可提高引物识别的稳定性, 与普通 PCR 相比具有高度特异性^[49]。Zhai 等^[30]建立了一种利用 NASBA 技术检测食品中沙门氏菌的方法, 该团队利用 *xcd* 基因设计特异性引物, 并用分子信标技术对沙门氏菌的 mRNA 进行逆转录, 最终利用该方法实现对 48 株沙门氏菌和 18 株非沙门氏菌菌株的检测, 其中沙门氏菌检出限低至 0.7 CFU/mL, 该方法可大大提升检测的灵敏度, 实现实时检测。此外, NASBA 可通过 RNase 降解死亡细胞的目标 mRNA, 检测活细胞; 利用 RNase-free DNase 对样本进行前处理, 或者采取 NASBA 技术与基因芯片、ddPCR 技术联合检测致病菌的策略, 可以大大提高

检测效率和检测灵敏度, 降低环境污染^[1,30]。

3.2 LAMP

LAMP 技术利用链置换和循环扩增的方法, 将 Bst DNA 聚合酶作用于目标基因的特定区, 恒温下(60~65 $^{\circ}\text{C}$)扩增子为带有多个环状 DNA 以及不同大小的茎环 DNA。该技术最早在 2000 年研发出, 已应用于致病菌检测^[1]。Maruyama 等^[50]首次利用 LAMP 技术检测 EHEC O157:H7 中的 *stxa2* 基因。杜琳等^[32]采用传统 LAMP 技术检测牛奶中的 *S. aureus*, 灵敏度为 10 CFU/mL, 特异性良好且与其他菌种无交叉反应; 同时, 对 50 个乳腺炎乳样进行检测, 阳性检出率为 28%, 耗时 3 h。目前, 市面上的 LAMP 试剂盒可用于检测李斯特菌、沙门氏菌、*C.coli* 和 STEC 等; 为解决 LAMP 技术检测假阳性高, 无法区分死活细菌这一弊端, 研发出多重、反转录、实时和原位 LAMP 技术等衍生技术^[1,51]。为避免交叉污染, LAMP 可与微流控技术联用, 扩大应用范围。2017 年改进的凝胶 LAMP 微流控技术可以从血清样本中检测 *E. coli*、副溶血性弧菌和沙门氏菌等, 且非荧光钙锰络合物的加入可进一步降低其检出限^[6]。

3.3 RPA

RPA 技术采取 DNA 复制和酶促双链解链/引物退火方法, 在扩增体系中引入解旋酶进一步降低反应体系的温度^[48]。该技术扩增条件温和(37 $^{\circ}\text{C}$), 反应时间快速(5~20 min), 属于新型等温扩增。Dong 等^[25]针对 *V. alginolyticus* 病原菌株在水生生物致病性强这一特征, 针对该菌株的毒力基因 *toxR*, 设计引物探针组, 采用 RPA 和侧向量油尺方法(recombinase polymerase amplification and lateral flow dipsticks, RPA-LFD), 可视化地实时观察虾匀浆样品中病原菌检测情况, 用于 RPA 反应的引物-探针组可以特异性识别 *V. alginolyticus*, 该方法精确率高达 100%。RPA 可以通过优化技术预防与其他菌种或病毒发生交叉污染的风险。陈雨等^[52]建立一种检测鱼类病毒性出血败血症病毒实时荧光 RT-RPA 恒温的方法, 该方法检出限为 1.83×10^3 PFU/mL, RT-RPA 方法灵敏性比实时 qPCR 方法低一个数量级。但是, RPA 技术检测时间只需要 20 min, 温度更低(39 $^{\circ}\text{C}$)。

4 测序技术

4.1 HTS

HTS 技术是将数千至数十亿个 DNA 片段固定化, 进行单独扩增、荧光可视化获得目的菌种基因组的技术。该技术具有极高通量, 可快速检测基质中所有菌种^[53]。食品生产中常见杀菌工艺的频繁操作, 有可能造成食物基质中优势菌种进化, 如发生基因的水平转移, 因此食品基质中生物多样性鉴定很有必要^[14]。然而, 传统富集方法无法区分致病性和非致病性菌种, 采取 HTS 技术可以检测菌属的生物多样性^[54,55]。传统的溯源和检测方法需要对整条食物

链进行基质筛分、菌落分离和培养、检测鉴别, 所耗时间长且操作复杂, 然而宏基因组可以很好地解决此问题^[14]。HTS 技术可以完成宏基因组测序, 通过无筛选地检测基质中的微生物, 探讨群落的演变过程。HTS 技术应用于 DNA 条形码, 在改善食品质量和安全检测上具有一定的突破。目前许多国家陆续利用 HTS 技术去探究致病源头, 采用数字 PCR 技术定量后续靶序列, 可以应用于检测食品基质中致病微生物^[47]。

Mcinnis 等^[56]利用 HTS 技术分析生山羊奶和能够分泌人类溶菌酶的转基因羊奶这 2 种食品基质的菌群多样性差异, 定量微生物生态分析 (quantitative insights into microbial ecology, QIIME) 发现只有在泌乳后期, 溶菌酶才对放线菌和硬毛菌稍有影响。因此, HTS 可以作为转基因产品风险评估的一种方式。与传统克隆文库测序技术相比, HTS 技术不需要筛选菌种, 也具备较好的排他性。Bartsch 等^[47]利用 HTS 技术和 RT-dPCR 技术检测冷冻草莓中以及爆发肠胃炎的患者体内的诺如病毒, 显示的平均病毒量较低, ddPCR 检测核酸序列结果为 185 copies/25 g, 这与 RT-qPCR 结果 (257 copies/25 g) 相近。并且 RT-dPCR 技术还可以解决传统富集方法在保藏过程中因致病微生物失活而造成无法检测到致病微生物的问题, 但这种方法只能检测到少量 146 bp 序列, 因此该方法灵敏度需要提高; 此外, 高灵敏选择性培养基和富集靶基因拷贝数可以提高检出率^[48]。HTS 技术还可以检测食物交叉污染, 因此有必要研究菌株的遗传多样性。为在一次测序过程中处理更多的 DNA 样品, 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 作为全基因组序列中常见的多态位点, 可作为分子分型的遗传标记对致病菌基因组进行详尽的分析^[54-55]。Bartsch 等^[47]对 3 株患者的以及 7 株食品基质的分离株进行基因组测序, 发现 HTS 技术并不能很好地区分人体分离株的 SNP。因此, HTS 在食品基质中的应用更有效, 而已经爆发食源性疾病的分离株则需要更精密的技术检测。

HTS 技术不仅可以追溯产品腐败变质来源, 在发酵工业中也可以通过研究微生物的 rRNA (原核 16S、真核 18S) 的相关数据变化, 预测发酵菌种群落的演变过程, 从而提出改善食品风味以及优化生产工艺的新方案^[57]58]。HTS 技术具有同时检测多种菌种的能力, 但因发展时间较短, 目前检测基因所属菌种的多样性能力有限^[14,47,59]。值得关注的是, 从 HTS 技术开始, 全基因组 (whole genome sequencing, WGS) 逐步进入项目创新及食品安全检测、菌种鉴定新角度的研究视野, 进而保证食品来源的可追溯性, 从而发现污染源^[53-55]。

4.2 单分子测序技术

随着大数据时代的到来, 逐渐出现以 SMRT 和 ONT 为代表的第三代测序技术, 这类核酸测序技术具备了快

速、高效的特点, 研究表明读长越长细菌的分型越准确, 有望实现对食源性致病菌的非靶向、快速鉴定^[60,61]。

4.2.1 SMRT

SMRT 是 PacBio 公司发明的新型 DNA 测序技术, 该技术采用边合成边测序手段^[62]。近年来 SMRT 在基因组测序和 *de novo* 组装中已有广泛的应用, 可以进行商业化研究。SMRT 常应用于研究微生物菌群 WGS 和微生物的多样性^[63], 以及更加深入认识尚不清楚的菌种/株。SMRT 还可以应用于测定 16S rRNA 检出生奶、超高温灭菌奶和婴儿配方食品中的细菌污染物, 进而提出控制乳制品安全新的预防策略^[64]。Koh 等^[36]采用 SMRT 获得了 *S. dysgalactiae* 中的 β 溶血性 SDSE (*S. dysgalactiae* sub *equisimilis*) (导致人上行性蜂窝织炎), 以及 α 溶血性 SDS (*S. dysgalactiae* sub *dysgalactia*) 两种亚种 (动物病原体) 的 WGS, 并确定了其毒力因子; 同时发现在得出的 4 种分离株中, 其中 3 组是从人血中分离而来的, 具有人畜共患的风险; 并且发现在鱼中分离出的 SDS 具有与人的 SDSE 聚合的风险, 因此提出在宰杀和处理鱼时有可能发生交叉感染。Ghatak 等^[37]对 *C. coli* YH502 菌株进行全基因组测序, 该研究发现: *C. coli* 包含多种毒力因子, 具有 β -内酰胺类, 氟喹诺酮类和氨基糖苷类抗菌剂的耐药性 (antimicrobial resistance, AMR); *C. coli* 存有可移动元件 (mobile genetic elements, MGEs), 可能发生基因的水平性转移; 通过 PathogenFinder 工具评估 *C. coli* 成为致病菌的可能性达 80.5%。

SMRT 可以联合遗传标记 (如 SNP 分子分型), 提高食品基质中菌种鉴别范围, 进而对发酵微生物环境进行合理地组合^[65]。马慧敏^[66]利用 SMRT 对羊奶粉中所有污染微生物进行全面评估, 共鉴定出 10 个细菌门以及 249 个细菌种, 其检出细菌的种类大大高于 ddPCR 技术。同时, SMRT 可以用于检测食品基质及其发酵过程中细菌种群的演替动态, 探索地理位置对细菌群落的结构差异的影响^[67]。由 SMRT 所获得的 WGS 还可以预测食品基质中抑制致病菌的益生菌的生理机制, 找到具有协同竞争作用的其他益生菌, 以提高食品的稳定性和防止致病菌的大量滋生^[65]。SMRT 测序过程无需扩增, 这使得从头组装的空缺更少, 从而弥补前述几种传统的边合成边测序的技术面对高 GC 含量的序列扩增效率不高的缺陷。同时该技术克服了回文序列、茎环结构等复杂结构所带来的测序困难的难题。

目前阻碍 SMRT 测序发展的最大问题是其错误率较高^[68,69]。传统的 SMRT 在测定微生物多样性时, 参与的菌种过多会降低准确率。而 DNA 修饰使得检测核酸序列更加准确, 有利于发现新的致病菌^[61,69]。据统计, 细菌中 93% 的基因组存有甲基化。DNA 甲基化具有参与调控基因表达, 维持基因的遗传和保护自身基因组的稳定等作用, 例如 DNA 腺嘌呤甲基化常参与毒力因子的表达^[62,70]。目前甲基

化在宏基因组分型上有一定的应用, HTS 技术进行宏基因组分析时需要与参照基因组序列进行对比, 有序列组装困难, 并且区分同源序列非常接近的菌种困难的弊端, 而探索 MGEs 的甲基化多样性, 有望对序列高度相近菌种进行准确分型^[61]。SMRT 可直接对自然状态下甲基化碱基进行测序, 利用大多数甲基转移酶具有高度专一性且识别位点不唯一的特点可以进一步降低检测成本, 并实现宏基因组分级^[62]。Beaulaurier 等^[61]对小鼠和人类肠道中微生物基因组进行分类, 将甲基化配置元件装配到目标基因上, SMRT 测序结果发现不同的物种体现出不同的甲基化组, 而未甲基化的片段可以发现新的菌种[肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)], 不仅提了高分辨率, 还可实现更加准确的序列组装。但是, 甲基化程度较低时, SMRT 应用于宏基因组分型的稳定性会受影响。

4.2.2 ONT

2012 年牛津纳米孔测序公司发布 MinION 测序平台, 在 2014 年研发的 MinION 测序仪价格便宜、实现了测序仪的便携化, 并配备 USB 接口, 测序速度快; 但每个样品的运营成本相对较高, 目前该技术已经实现商业化, 并在国内推广应用^[70]。ONT 采用“边解链边测序”的方法。其核心是核酸外切酶与 α -溶血素纳米孔的耦合作用, 当单链 DNA 模板通过纳米孔时, 外切酶会“捕捉”到 DNA 分子并将碱基剪切下来依次单个通过纳米孔, 碱基序列以电信号的形式记录下来^[62,69]。

相较于 SMRT, ONT 具有更长的测序片段, 但 DNA 提取、长读测序、组装算法和表观遗传修饰检测等方面均会影响基因组组装的有效性和分辨能力^[71,72]。Kai 等^[22]利用 MinION 测序与直接 PCR 联用, 发现细胞壁形态显著影响检测效率和测序数据, 若采用 bead-beating 使细胞破裂, 可将检出限降至为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL, 准确率达 65%~80%。Kilianski 等^[73]利用 ONT 对 3 种同源性达 98% 的牛痘病毒进行区分, 结果显示 ONT 具备通过扩增子测序区分菌株的能力, 但每个碱基的错误率约为 30%。Moss 等^[74]结合长读组装和短读错误校正的方法, 在基因组装箱中分别组装并获得 12 种混合菌封闭的细菌基因组, 发现 ONT 组装效果要明显优于短读组装。该方法虽然降低了检测序列的准确性, 但提高了组装的连续性。此外, Xia 等^[75]利用 ONT 对市政污水中 *E. coli*, 不仅能够快速鉴定、检测耐抗生素 (antibiotic resistance genes, ARG) 的群体, 且还能同时系统发育跟踪, 量化耐多种抗生素 (multiple antibiotic resistant, MAR) 菌株的耐药基因, 以解决与致病菌有关的潜在健康风险。

ONT 用于致病菌分子分型具有可以替代 Illumina 测序的潜力^[54]。ONT 开发的长读测序平台提供了另一种测定 WGS 方法, 这种方法可满足工业界快速检测沙门氏菌和血清型分类的需求^[54]。Xu 等^[54]使用 ONT 测序仪对有 34

种血清型的 38 株沙门氏菌菌株进行 2 h 的测序, 结果显示在测序 30 min、45 min、1 h 和 2 h 后生成的 WGS 数据均与 Illumina hiseq x10 检测的数据预测结果相符; 且单位时间内 ONT 测序效率比 Illumina 测序更高, 并且有更长的读长(5.7~14.7Kbp, Illumina 为 36 bp)。Satou 等^[76]利用 ONT 对 8 株幽门螺旋杆菌进行 *de novo* 拼装, 获得完整的 contigs; 该团队利用 ONT 直接识别甲基化碱基, 以及甲基化的毒力基因。Rand 等^[77]采用 MinION 技术, 构建隐马尔可夫模型(hidden Markov model, HMM)和层次化的狄利克雷过程(hierarchical dirichlet process, HDP)组成的模型(完整的称为 HMM-HDP), 以及具有 CC(A/T)GG 和 GATC 序列的胞嘧啶甲基化 5-mC 和腺嘌呤甲基化 6-mA 图谱, 通过单链上正确的甲基化调用比例来测量准确性, 实现了对实际甲基化水平的量化。

随着 WGS 在食品污染源追踪应用普及, 基因组数据与血清型检测的结合可以为致病菌找到对应的毒力因子, 并预判该致病菌可能造成疾病的严重性^[54]。Schmidt 等^[78]对具有 AMR 的 *E. coli* 后进行基于 MinION 和 Illumina 平台的测序, 发现 MinION 测序仪可正确识别未经培养富集的病原体, 并发现 51 种抗性基因(Illumina 测序检测到 55 种)。Saroj 等^[79]对益生菌凝结芽孢杆菌菌株的 16S rRNA 序列进行测序, 发现 ONT 的覆盖率达 99%, 全基因组比对发现相互间分别有 96%、99% 序列相同; 同时发现该菌株基因组中没有移动元件和毒力因子, 但具有稳定的 CRISPR 系统, 缺少对基因组稳定性有害的噬菌体序列, 这可以抵抗外源 DNA 的干扰, 保证基因表达和遗传的稳定性。值得注意的是, ONT 还可以快速检测亚种重组过程中保持基因稳定性的 pPCP1 质粒多聚体, 而传统 Illumina 数据汇编能力只能检测到 pPCP1 单体形式, 这种特性使得 ONT 在未来研究中对基因组的检测更加全面^[80]。

在近年研究中, ONT 显示出广阔的应用前景: ONT 具有读长很长(约几十甚至上百 kb)、起始 DNA 在测序过程中不被破坏、测序成本低、样本处理简单、无需 DNA 聚合酶或者连接酶、可实时读取、直接读取甲基化的胞嘧啶等特点。与 SMRT 相似, ONT 单碱基错误率高, 不同于二代核酸技术的偏向性错误, ONT 为随机错误, 可以通过提高测序深度, 增加目标基因的重复数提高碱基准确率^[63,69]。在 *de novo* 测序过程中需要一定的覆盖深度(50-60x)以保证足够的覆盖率, 而 ONT 可达近 100% 的覆盖率, 从而可以减少在组装过程中的误差^[81]。

5 其他核酸技术的发展

5.1 DNA 微阵列技术

微阵列技术是在涂有多达百种寡核苷酸探针(25~80 bp)的基因芯片或玻璃载片上, 通过基因标记目标病原

微生物产生核酸片段, 获得可视化荧光信号的高通量检测技术。其中, 荧光强度与每个标记核酸片段的浓度成正比^[1,82-84]。Bang 等^[34]建立 DNA 微阵列检测牛奶中 *L. monocytogenes* 的方法, 结果显示 16 株 *L. monocytogenes* 阳性信号为 98%~100%, 检出限约为 8 log CFU/mL, 菌种分型结果较好。该方法可以同时鉴定多种食源性致病菌, 研究基质中菌种的生长表达情况, 在致病菌检测自动化具有潜力^[1,34]。

5.2 微流控芯片技术

微流体指用设备中的微尺寸通道移动纳升和皮升体积液体的技术, 是一种便携式诊断工具, 可用于病原体检测研究。由于食品样品通常是复杂的, 并且可能包含痕量致病微生物, 因此在样品插入微流控芯片之前, 需先从食品基质中提取并浓缩相关 DNA, 如使用磁性颗粒对在食品基质分布不均的菌种进行纯化等^[82]。鞠鹤鹏等^[23]将微流控芯片技术与 LAMP 联用, 将引物冻干后固定到微流控芯片上, 制成 LAMP 微流控芯片, 实现了对沙门氏菌、*E. coli* O157、*S. aureus* 3 种食源性致病菌的同时监测, 其检出限为 100 CFU/mL。朱福琳等^[24]设计一种进行表面修饰的四面体的微流控芯片, 用于检测 EHEC O157:H7, 在普通光学显微镜下实现了 EHEC O157:H7 的检测, 其检出限低至 10 CFU/mL, 耗时小于 2 h。因该技术流速可控, 因此可与其他方法联合应用在测序的过程中, 以改变目的基因测序的环境, 优化出样品使用少、分析速度快、数据可视化等的检测工艺。

6 结 论

在微生物检测领域, 常见的 PCR 检测技术, 引物设计要求高, 建立方便、实用的 PCR 分子检测试剂盒, 则可极大地提高检测结果的可靠性和实用性^[85]。ddPCR 技术相较于 qPCR 技术而言, 对 PCR 抑制剂敏感度较低, 且可以通过稀释检测样品的浓度适当减少体外复制错配的产生; 然而目前 ddPCR 设备及试剂和耗材比较高昂, 且主要依赖于进口^[47]。等温扩增技术可以检测食源性致病菌及其毒素, 且可以区分死细胞和活细胞; 该技术主要对致病菌 RNA 进行检测, 并且引入多种与基因表达及复制的酶, 因此体系温度要求更低。但是, 利用等温扩增技术所得的数据不够明确, 这可以通过与其他测序或分型法联用加以弥补。HTS 技术与传统克隆文库测序技术相比, 在检测上通量更大, 读数更全面, 并且无需筛选菌种; 但是, HTS 技术鉴别菌种的能力不如 qPCR, 并且随着测序深度增加, 测序价格也更加高昂。HTS 技术使测定致病菌全基因组的概念进入到食品安全检测的视野, 在食品风险评估中具有广泛的应用。单分子测序技术测序长度很长, 可以减少在组装过程中的误差, 可以应用于菌种全基因组发展, 通过系统发

育树寻找序列同源性, 不仅有利于发现新的菌种, 也可以追溯其基因表达机制。其他检测技术如 DNA 微阵列技术和微流控芯片技术, 虽然市面上已有相关检测仪器, 但其精确度还待考量, 且运用时不能脱离其他传统技术单独检测。随着科技的快速发展, 相关技术软件的开发在与时俱进, 在检测致病菌的研究时需要关注 WGS 在食品领域的应用, 整个研究趋势是向着构建全球生态网络的方向发展, 其目的是为了划分引发食源性致病菌的关键菌种, 快速发现可追溯性污染源。在致病菌快速检测上, 常见核酸技术都具有检测生物多样性的能力, 有利于依据食品体系进行相应的生产技术调整和制定致病菌防控措施。

纵观整个致病菌检测技术发展过程, 人们已经不局限于对已发生的食源性疾病进行补救, 或是循规蹈矩的按照标准获得致病菌检测数目; 而是对所测菌种提前预测其致病的可能性, 是否可能引发人畜共患疾病; 或是在食品生产过程中, 利用致病菌的 WGS 精确寻找感染源, 并对菌株产毒素能力进行评估, 利用系统发育树分析其进化进程。真正做到对食源性致病菌的过去、现在、未来全过程进行分析。

参考文献

- [1] Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, *et al.* Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations [J]. *Front Microbiol*, 2015, 5: 770.
- [2] 佚名. 国家卫生计生委办公厅关于 2015 年全国食物中毒事件情况的通报[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(3): 290-391.
Anonymous. Notification of food poisoning incidents in 2015 issued by the general office of the National health and family planning commission [J]. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28(3): 290-391.
- [3] Priyanka B, Patil RK, Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens [J]. *Indian J Med Res*, 2016, 144(3): 327.
- [4] Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2005, 2(2): 155-129.
- [5] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 1338-1339.
- [6] Váradi L, Váradi L, Luo JL, *et al.* Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(16): 4818-4812.
- [7] Smulders FJM, Greer GG. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 44(3): 149-169.
- [8] 白亚龙, 索玉娟, 周昌艳. 食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展[J]. *食品与机械*, 2017, 33(12): 191-196.
Bai YL, Suo YJ, Zhou CY. A review of the development in pretreatment methods for PCR detection of food-borne pathogens [J]. *Food Mach*, 2017, 33(12): 191-196.
- [9] 孙晶. 核酸法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*, 2017, 8(9): 3409-3413.

- Sun J. Research progress of nucleic acid-based methods for detecting foodborne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(9): 3409–3413.
- [10] Lüth S, Kleta S, Dahouk SA. Whole genome sequencing as a typing tool for foodborne pathogens like *Listeria monocytogenes*—The way towards global harmonisation and data exchange [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2018, 73: 67–75.
- [11] Zhou WY, Li XH, Osmundson T, *et al.* WGS analysis of ST9–MRSA–XII isolates from live pigs in China provides insights into transmission among porcine, human and bovine hosts [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2018, 73(10): 2652–2661.
- [12] Doumith M, Buchrieser C, Buchrieser P, *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8): 3819–3822.
- [13] Wang SY, Weller D, Falardeau J, *et al.* Food safety trends: From globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2016, 57: 188–198.
- [14] Jagadeesan B, Gerner-smidt P, Allard MW, *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice [J]. *Food Microbiol*, 2019, 79: 96–115.
- [15] Ruppitsch W, Prager R, Halbedel S, *et al.* Ongoing outbreak of invasive *Listeriosis*, Germany, 2012 to 2015 [J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(50).
- [16] 刘骆强, 姚艳玲, 管佳丽, 等. 5 种食源性致病菌 PCR 检测方法的建立 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(5): 1330–1335.
- Liu LQ, Yao YL, Guan JL, *et al.* Establishment of PCR method for detecting 5 kinds of food-borne pathogenic bacteria [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(5): 1330–1335.
- [17] Jiang Y, Yin S, Dudley EG, *et al.* Diversity of CRISPR loci and virulence genes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from various sources [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 204: 41–46.
- [18] 瞿洋, 索玉娟, 徐斐, 等. SSEL 结合多重 PCR 同时快速检测生菜中 4 种食源性致病菌 [J]. *上海农业学报*, 2017, 33(4): 121–126.
- Qu Y, Suo YJ, Xu F, *et al.* Simultaneous and rapid detection of 4 foodborne pathogens in lettuce by SSEL combined with multiplex PCR [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2017, 33(4): 121–126.
- [19] 王小强, 袁军, 韩锐郡, 等. 通用多重不对称 PCR 结合寡核苷酸芯片检测 7 种食源性致病菌 [J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 290–295.
- Wang XQ, Yuan J, Han RJ, *et al.* An oligonucleotide microarray coupled with universal primer-multiplex asymmetric PCR for detection of seven foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2017, 38(8): 290–295.
- [20] 马薇, 孔义军, 吴伟健, 等. 水中大肠菌群微滴数字 PCR 定量检测方法的建立 [J]. *环境保护科学*, 2019, 45(1): 58–66.
- Ma W, Kong YJ, Wu JW, *et al.* The Establishment of quantitative detection of total coliforms in water based on ddPCR technology [J]. *Environ Prot Sci*, 2019, 45(1): 58–66.
- [21] He L, Simpson DJ, Gänzle MG. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in food by droplet digital PCR to detect simultaneous virulence factors in a single genome [J]. *Food Microbiol*, 2020, 90: 103466.
- [22] Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, *et al.* Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(3): 548–557.
- [23] 鞠鹤鹏, 戴菁, 谢逸欣, 等. LAMP 微流控芯片快速检测三种食源性致病菌 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2018, 36(3): 309–313.
- Ju HP, Dai J, Xie YX, *et al.* Quick detection of three food-borne pathogens by LAMP micro fluidic chip [J]. *J Prev Med Chin People's Liber Army*, 2018, 36(3): 309–313.
- [24] 朱福琳, 卞晓军, 田润, 等. 基于 DNA 四面体的微流控芯片用于致病性大肠杆菌的检测 [J]. *分析化学*, 2020, 48(4): 473–483.
- Zhu FL, Bian XJ, Tian R, *et al.* A Tetrahedral DNA nanostructures-based microfluidic platform for detection of pathogenic *Escherichia Coli* O157 : H7 [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(4): 473–483.
- [25] Dong Y, Zhao PP, Chen L, *et al.* Fast, simple and highly specific molecular detection of *Vibrio alginolyticus* pathogenic strains using a visualized isothermal amplification method [J]. *BMC Veter Resf*, 2020, 16(1): 76.
- [26] 李羽翡, 祖新, 李羽翠, 等. 铜绿假单胞菌 LAMP 快速检测方法建立及微滴数字 PCR 验证 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 267–272, 293.
- Li YF, Zu X, Li YC, *et al.* Establishment of LAMP Rapid Detection Method for *Pseudomonas aeruginosa* and verification of droplet digital PCR [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(11): 267–272, 293.
- [27] 刘辉, 张娟, 张燕, 等. 重组酶聚合酶快速扩增法测定瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 6915–6920.
- Liu H, Zhang J, Zhang Y, *et al.* Establishment of a recombinase polymerase amplification technology to detect *Pseudomonas aeruginosa* in bottled (or barreled) water [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(19): 6915–6920.
- [28] 杨国兴, 杨立新, 李伟昊. 多重 PCR 检测 4 种常见食源性致病菌 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 6289–6295.
- Yang GX, Yang LX, Li WH. Detection of four common foodborne pathogens by multiplex PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(18): 6289–6295.
- [29] Hu LS, Arvind BA. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 95(2): 177–87.
- [30] Zhai LG, Liu HX, Chen QM, *et al.* Development of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for the rapid detection of *Salmonella spp.* from food [J]. *Braz J Microbiol*, 2019, 50(1): 255–261.
- [31] 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. Development of multiplex real-time PCR for pathogen detection and its application in milk [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [32] 杜琳, 冯小慧, 张三粉, 等. 生鲜乳中金黄色葡萄球菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41(2): 54–57.
- Du L, Feng XH, Zhang SF, *et al.* Establishment of LAMP assay for detecting *Staphylococcus aureus* in fresh milk [J]. *Prog Veter Med*, 2020, 41(2): 54–57.
- [33] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics [J]. *Nat Rev Genetics*, 2008, 9(6): 465–76.
- [34] Bang J, Beuchat LR, Song H, *et al.* Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 161(2): 134–141.
- [35] 刘忠梅, 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.* Development of target-enriched multiplex PCR assay for simultaneous detection of three foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2016, 37(4): 186–190.
- [36] Koh TH, Binte NAR, Sessions OM. Comparative genomic analysis of

- Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection [J]. *Pathology*, 2020, 52(2): 262–266.
- [37] Ghatak S, He YP, Reed S, *et al.* Whole genome sequencing and analysis of *Campylobacter coli* YH502 from retail chicken reveals a plasmid-borne type VI secretion system [J]. *Genomics Data*, 2017, 11: 128–131.
- [38] Postollec F, Falentin H, Pavan S, *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology [J]. *Food Microbiol*, 2011, 28(5): 848–861.
- [39] Figueiredo MW, Angelo LD, de Aragão GMF, *et al.* A mathematical modeling approach to the quantification of lactic acid bacteria in vacuum-packaged samples of cooked meat: Combining the TaqMan-based quantitative PCR method with the plate-count method [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 318: 108466.
- [40] Dreier M, Berthoud H, Shani N, *et al.* Species primer: A bioinformatics pipeline dedicated to the design of qPCR primers for the quantification of bacterial species [J]. *Peer J*, 2020, 8: e8544.
- [41] 罗廷荣, 莫扬, 吴文德, 等. RT-PCR 技术检测猪瘟病毒的应用研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2004, (4): 68–70.
- Luo TR, Mo Y, Wu WD, *et al.* An applied studies on diagnosis of hog cholera by reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. *Chin J Prev Veter Med*, 2004, (4): 68–70.
- [42] 邹享珍, 蔡淑英, 刘妙娥, 等. 三重 qPCR 法快速检测肺炎克雷伯菌的方法建立与应用[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(6): 993–997.
- Zhou XZ, Cai SY, Liu ME, *et al.* Establishment and application of triple qPCR method for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2017, 21(6): 993–997.
- [43] 李振昊, 高小玲, 杨小娟, 等. 新型冠状病毒核酸检测分析[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(10): 1313–1315.
- Li ZH, Gao XL, Yang XJ, *et al.* Nucleic acid detection analysis of COVID-19 [J]. *Lab Med Clin*, 2020, 17(10): 1313–1315.
- [44] Broughton JP, Deng XD, Yu GX, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870–874.
- [45] McMahon TC, Blais BW, Wong A, *et al.* Multiplexed single intact cell droplet digital PCR (MuSiC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in food enrichment cultures [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 332.
- [46] Yang J, Zhang NN, Lv J, *et al.* Comparing the performance of conventional PCR, RTq-PCR, and droplet digital PCR assays in detection of *Shigella* [J]. *Mol Cell Probe*, 2020, 51: 101531.
- [47] Bartsch C, Höper D, Mäde D, *et al.* Analysis of frozen strawberries involved in a large norovirus gastroenteritis outbreak using next generation sequencing and digital PCR [J]. *Food Microbiol*, 2018, 76: 390–395.
- [48] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 196–211.
- [49] Abdolhazadeh A, Dolgosheina EV, Unrau PJ. RNA detection with high specificity and sensitivity using nested fluorogenic *Mango* NASBA [J]. *RNA*, 2019, 25(12): 1806–1813.
- [50] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. *Appl Environ Microb*, 2003, 69(8): 5023–5028.
- [51] 魏楨元. 环介导等温扩增技术在食源性沙门氏菌检测中的应用研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(3): 80–85.
- Wei ZY. Research progress on application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Salmonella* in food [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2020, 48(3): 80–85.
- [52] 陈雨, 郑晓聪, 温智清, 等. 病毒性出血败血症病毒实时荧光 RT-RPA 恒温检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2020, (4): 1–8.
- Chen Y, Zheng XC, Wen ZQ, *et al.* Development of a RT-RPA assay for rapid detection of viral hemorrhagic septicemia virus [J]. *Chin Veter Sci*, 2020, (4): 1–8.
- [53] 梁雅静, 何晓青, 金一, 等. 二代测序技术(HTS)结合遗传统计模型在微生物分子生态学中的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50(2): 207–214.
- Liang YJ, He XQ, Jin Y, *et al.* Progress in next generation sequencing (NGS) combined with genetic statistical model in microbial molecular ecology [J]. *Chin Sci: Life Sci*, 2020, 50(2): 207–214.
- [54] Xu F, Ge CT, Luo H, *et al.* Evaluation of real-time nanopore sequencing for *Salmonella* serotype prediction [J]. *Food Microbiol*, 2020, 89: 103452.
- [55] Mayo B, Rachid CTCC, Alegria A, *et al.* Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology [J]. *Curr Genomics*, 2014, 15: 293–309.
- [56] Mcinnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, *et al.* Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity [J]. *Food Microbiol*, 2015, 46: 121–131.
- [57] Eren AM, Maignien L, Sul WJ, *et al.* Oligotyping: Differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data [J]. *Methods Ecol Evol*, 2013, 4(12): 1111–1119.
- [58] Parente E, Cocolin L, de Filippis F, *et al.* Food Microbionet: A database for the visualisation and exploration of food bacterial communities based on network analysis [J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 219: 28–37.
- [59] Li Y, Zhang S, Li J, *et al.* Application of digital PCR and next generation sequencing in the etiology investigation of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Microbiol*, 2019, 84: 103233.
- [60] 丁陈君, 陈方, 陈云伟, 等. 纳米孔测序技术发展态势分析[J]. *生物产业技术*, 2017, (5): 5–10.
- Ding CJ, Chen F, Chen YW, *et al.* Analysis on development trend of nanopore sequencing technology [J]. *Biotechnol Bus*, 2017, (5): 5–10.
- [61] Beaulaurier J, Zhu SJ, Deikus G, *et al.* Metagenomic binning and association of plasmids with bacterial host genomes using DNA methylation [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(1): 61–69.
- [62] 马丽娜, 杨进波, 丁逸菲, 等. 三代测序技术及其应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(8): 2246–2256.
- Ma LN, Yang JB, Ding YF, *et al.* Research progress on three generations sequencing technology and its application [J]. *China Anim Husb Veter Med*, 2019, 46(8): 2246–2256.
- [63] 韩迎亚, 杨乔乔, 王倩楠, 等. 单分子实时测序技术在环境微生物研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 3140–3147.
- Han YY, YanG QQ, Wang QN, *et al.* Application of single molecule real time sequencing in environmental microorganisms research [J]. *Microbiol China*, 2019, 46(11): 3140–3147.
- [64] Zhu QL, Liu S, Gao P, *et al.* High-throughput sequencing technology and its application [J]. *J Northeast Agric Univ (Eng Ed)*, 2014, 21(3): 84–96.
- [65] Eisenbach L, Janßen D, Ehrmann MA, *et al.* Comparative genomics of *Lactobacillus curvatus* enables prediction of traits relating to adaptation

- and strategies of assertiveness in sausage fermentation [J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 286: 37–47.
- [66] 马慧敏. 利用 PacBio SMRT 测序技术对羊奶粉中污染微生物的评估 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
Ma HM. Evaluation of the bacterial contamination in goat milk powder using PacBio SMRT sequencing technology [D]. Inner Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [67] Gesudu Q, Zheng Y, Xi XX, *et al*. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(10): 7852–7863.
- [68] Chul SS, Hwan AD, Jin KS, *et al*. Advantages of single-molecule real-time sequencing in high-GC content genomes [J]. *PLoS one*, 2013, 8(7): e68824.
- [69] 曹晨霞, 韩琬, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用 [J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269–2276.
Cao CX, Han W, Zhang HP. Application of third generation sequencing technology to microbial research [J]. *Microbiol China*, 2016, 43(10): 2269–2276.
- [70] Low DA, Casadesús J. Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(2): 106–12.
- [71] Karlsson E, Larkeryd A, Sjödin A, *et al*. Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing [J]. *Sci Rep-UK*, 2015, 5(1): 11996.
- [72] Cali DS, Kim JS, Ghose S, *et al*. Nanopore sequencing technology and tools for genome assembly: Computational analysis of the current state, bottlenecks and future directions [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1542–1559.
- [73] Kilianski A, Haas JL, Corriveau EJ, *et al*. Bacterial and viral identification and differentiation by amplicon sequencing on the MinION nanopore sequencer [J]. *Giga Sci*, 2015, 4(1): 12.
- [74] Moss EL, Maghini DG, Bhatt AS. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 701–707.
- [75] Xia Y, Li AD, Deng Y, *et al*. Minion nanopore sequencing enables correlation between resistome phenotype and genotype of coliform bacteria in municipal sewage [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2105.
- [76] Satou K., Shiroma A., Teruya K., *et al*. Complete genome sequences of eight *Helicobacter pylori* strains with different virulence factor genotypes and methylation profiles, isolated from patients with diverse gastrointestinal diseases on Okinawa island, Japan, determined using PacBio single-molecule real-time technology [J]. *Genome Announc*. 2014, 2(2): e00286-14.
- [77] Rand AC, Jain M, Eizenga JM, *et al*. Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 411–413.
- [78] Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, *et al*. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2016, 72(1): 104–114.
- [79] Saroj DB, Gupta AK. Genome based safety assessment for *Bacillus coagulans* strain LBSC (DSM 17654) for probiotic application [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 318: 108523.
- [80] Gargis AS, Cherney B, Conley AB, *et al*. Rapid detection of genetic engineering, structural variation, and antimicrobial resistance markers in bacterial biothreat pathogens by nanopore sequencing [J]. *Sci Rep-UK*, 2019, 9(1): 13501.
- [81] Lu HY, Giordano F, Ning ZM. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly [J]. *Genom Proteom Bioinf*, 2016, 14(5): 265–279.
- [82] Wang Y, Salazar JK. Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices [J]. *Compr Rev Food Sci Food F*, 2016, 15(1): 183–205.
- [83] Li YY, Liu D, Cao BY, *et al*. Development of a serotype-specific DNA microarray for identification of some *Shigella* and pathogenic *Escherichia coli* strains [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(12): 4376–83.
- [84] Koyuncu S, Andersson G, Vos P, *et al*. DNA microarray for tracing Salmonella in the feed chain [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145: S18–S22.
- [85] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. PCR 技术检测食源性致病菌的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2007, (5): 970–972.
Xu XK, Wu QP, Zhang JM, *et al*. Review of foodborne pathogenic bacteria detected by PCR [J]. *Microbiol China*, 2007, (5): 970–972.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



高雯暄, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: Wenxuan_Gao@126.com



李 会, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: lihui05@caas.cn