

# 同步增菌结合实时荧光聚合酶链式反应快速检测食品中 5 种致病菌

姚艳玲\*, 周宇东, 刘骆强, 管佳丽, 谢琳  
(嘉兴市食品药品与产品质量检验检测院, 嘉兴 314050)

**摘要: 目的** 实现食品中 5 种致病菌的同步增菌, 并结合实时荧光聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)技术, 建立快速检测的方法体系。**方法** 比较金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、副溶血性弧菌和鼠伤寒沙门氏菌 5 种目标菌分别在营养肉汤和缓冲蛋白胨水中的生长曲线; 优化 DNA 模板提取的方法; 采用实时荧光 PCR 技术及熔解曲线分析, 建立 5 种致病菌的快速检测方法。**结果** 缓冲蛋白胨水可以作为 5 种目标菌的同步增菌液, 增菌 3 h 后 5 种目标菌能被检出, 最低检出的 DNA 浓度范围为  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$  ng/ $\mu$ L。经熔解曲线分析, 5 种目标菌的平均特征熔解温度( $T_m$ )值范围为 79.51~87.39 $^{\circ}$ C。**结论** 本研究建立的 5 种致病菌快速检测方法, 检测总时间大约为 6 h, 且方法灵敏度和特异性均能满足检测要求。

**关键词:** 同步增菌; 食源性致病菌; 实时荧光聚合酶链式反应; 熔解曲线

## Rapid detection of 5 kinds of foodborne pathogens by real-time polymerase chain reaction with simultaneous enrichment

YAO Yan-Ling\*, ZHOU Yu-Dong, LIU Luo-Qiang, GUAN Jia-Li, XIE Lin  
(Jiaxing Institute for Food, Drug and Product Quality Control, Jiaxing 314050, China)

**ABSTRACT: Objective** To realize the simultaneous enrichment of 5 kinds of pathogenic bacteria in food, and establish a rapid detection method system by combining real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technology. **Methods** The growth curves of 5 kinds of target bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth and buffer peptone water were compared; the method of DNA template extraction was optimized; real-time fluorescent PCR and melting curve was used to analyze, a rapid detection method for 5 kinds of pathogenic bacteria was established. **Results** Buffer peptone water could be used as the simultaneous enrichment solution for 5 kinds of target bacteria. After enrichment for 3 hours, 5 kinds of target bacteria can be detected. The lowest detected DNA concentration range was  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  ng/ $\mu$ L. According to the melting curve analysis, the average characteristic melting temperature ( $T_m$ ) of 5 kinds of target bacteria ranged from 79.51 to 87.39 $^{\circ}$ C. **Conclusion** The rapid detection method for 5 kinds of pathogenic bacteria is established in this study, the total detection time is about 6 hours, and the sensitivity and specificity of the methods can meet the detection requirements.

**KEY WORDS:** simultaneous enrichment; foodborne pathogens; real-time polymerase chain reaction; melting curve

基金项目: 浙江省市场监督管理局科技项目(20210150)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of Zhejiang Provincial Administration for Market Regulation (20210150)

\*通信作者: 姚艳玲, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物及分子生物检测。E-mail: yyljx573@163.com

\*Corresponding author: YAO Yan-Ling, Master, Senior Engineer, Jiaxing Institute for Food, Drug and Product Quality Control, No.39, Qinyi Road, Changshui District, Jiaxing 314050, China. E-mail: yyljx573@163.com

## 0 引言

食源性致病菌通过食品加工和流通进入食品中, 并汲取营养而存活、生长, 甚至有些能通过代谢分泌有毒物质, 直接或间接导致疾病。在我国, 食品安全风险监测和风险评估也逐步成为我国食品安全管理工作及研究的热点内容。根据近几年我国各地食源性疾病统计数据进行分析, 我国食源性疾病暴发的主要因素为微生物性因素<sup>[1-5]</sup>。为了监管食品生产、保障饮食安全, 对食源性致病菌的检测显得至关重要。目前, 检测方法主要依赖常规培养法, 该方法需要配制多种不同的增菌液, 且增菌时间大都需要 18~24 h。增菌后, 再进行可疑菌的分离、纯化、生化鉴定、血清学分型等步骤, 整个检验流程繁冗复杂, 不能应对快速检测的需求。

随着聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的快速发展, 食源性致病菌开辟了快速检测的新方向。有学者应用 PCR 对致病菌进行多重检测<sup>[6-8]</sup>, 采用膜芯片结合 PCR 检验食品中的致病菌<sup>[9]</sup>, 利用毛细管电泳技术结合 PCR 技术检测致病菌<sup>[10-11]</sup>, 采用微滴式数字 PCR 检测食品中致泻大肠埃希氏菌<sup>[12]</sup>, 应用靶序列富集多重 PCR 与变性高效液相色谱技术相结合的方法建立多种食源性致病菌的快速检测方法<sup>[13-15]</sup>。在不断研究 PCR 检测技术的基础上, 为了能有效富集目标菌, 减少增菌时间, 富集目标菌的研究也随之增多, 如采用磁珠分离富集目标菌<sup>[16-21]</sup>, 分子富集法从复杂样本中检测病原微生物<sup>[22]</sup>, 滤膜法富集目标致病菌<sup>[23-25]</sup>等。上述研究在提高食源性致病菌检测效率方面有了提升, 但是对于检验设备及富集设施条件要求较高, 不利于日常大批量样本的筛查。同时, 在已有报道中, 有关于食源性致病菌生长曲线方面的研究还鲜有报道。

因此, 本研究拟针对 5 种食源性致病菌开展生长曲线研究, 探究最短增菌时间, 同时采用实时荧光 PCR 技术结

合熔解曲线分析, 建立 5 种致病菌的快速检测方法, 为微生物快速检测提供方法参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂及样本来源

微生物培养试剂: 缓冲蛋白胨水、营养肉汤(北京陆桥技术股份有限公司); 实时荧光 PCR 试剂: TB Green Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)[宝生物工程(大连)有限公司]; 致病菌鉴定琼脂平板: 沙门氏菌显色平板、大肠埃希氏菌 O157 显色平板、弧菌显色平板、李斯特菌显色平板、金黄色葡萄球菌显色平板(上海科玛嘉微生物技术有限公司)。

实验用的牛肉样品为真空包装产品, 且经验证为商业无菌样本, 采购自流通领域超市。

#### 1.1.2 菌种来源及引物

实验选用标准菌株有: 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) (ATCC14028)、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) (ATCC35150)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC25923)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) (ATCC17802)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) (ATCC19115)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) (ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC27853)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) (ATCC11778)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*) (CMCC 49027)、阪崎肠杆菌(*Cronobacter*) (ATCC51329), 其中变形杆菌采购自中国医学微生物菌种保藏中心(China Medical Microbial Culture Collection Center, CMCC), 其余菌株均采购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。本研究采用的 5 种目标菌, 引物序列参考 SN/T 1689—2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》, 见表 1, 合成公司为生工生物工程(上海)股份有限公司。

表 1 目标菌及其引物序列  
Table 1 Target bacteria and their primer sequences

目标菌	靶基因	引物序列	扩增片段大小/bp
鼠伤寒沙门氏菌	<i>invA</i>	ST-F: 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' ST-R: 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'	284
大肠埃希氏菌 O157:H7	<i>rfbE</i>	O157-F: 5'-ATT GCG CTG AAG CCT TTG-3' O157-R: 5'-CGA GTA CAT TGG CAT CGT G-3'	132
金黄色葡萄球菌	<i>femA</i>	SA-F:5'-AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG-3' SA-R:5'-GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG-3'	274
副溶血性弧菌	<i>t1h</i>	VP-F: 5'-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3' VP-R: 5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC-3'	499
单核细胞增生李斯特氏菌	<i>prfA</i>	LM-F:5'-GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC-3' LM-R:5'-GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG-3'	450

### 1.1.3 仪器设备

Binder 720 培养箱(德国 Binder 公司); SQL810C 立式压力蒸汽灭菌器(重庆雅马拓科技有限公司); Legend Micro 21R 离心机、Nanodrop one 超微量分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; MK 10 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); Roche LightCycler 480II 实时荧光定量 PCR[罗氏诊断产品(上海)有限公司]。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 生长曲线实验

在缓冲蛋白胨水和营养肉汤中分别接种经 24 h 活化后的 5 种目标致病菌, 制成单菌培养液, 然后吸取 5 mL 加至预先制备好的 45 mL 无菌缓冲蛋白胨水中, 制成  $10^{-1}$  稀释液, 以此类推, 直至  $10^{-8}$ 。对各稀释液进行首次平板计数后, 同时放置于  $36^{\circ}\text{C}$  下培养, 然后每隔 1 h 再次进行平板计数。采用 Excel 2003 版软件, 以培养时间为 X 轴, 平板计数的菌落总数对数值为 Y 轴, 分别绘制 5 种目标菌的生长曲线。

### 1.2.2 增菌液中 DNA 模板提取

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入 1 mL 增菌液, 离心 10 min, 速度设置 12000 r/min, 移去上清液, 然后加入 1 mL 无菌去离子水, 旋涡混匀后, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 随后加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水, 放入  $100^{\circ}\text{C}$  条件下温浴 10 min, 然后离心 10 min, 速度设置 12000 r/min, 所得上清液即为 DNA 溶液, 并测定其的浓度值和纯度值。

### 1.2.3 实时荧光 PCR 扩增及熔解曲线分析

反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 按说明书配制反应体系, 包括 TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) ( $2\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , 样本 DNA 为 2  $\mu\text{L}$ , 无菌去离子水 7.2  $\mu\text{L}$ 。

设置 PCR 程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 选取不同退火温度进行比较实验, 随后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 共 40 个循环。PCR 扩增产物熔解程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  5 s,  $62^{\circ}\text{C}$  1 min; 以  $0.11^{\circ}\text{C/s}$  的熔解速率升温至  $95^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$  冷却 30 s。熔解峰图谱由检测软件 LightCycler 480 SW 1.5.1 导出, 5 种目标菌的特征  $T_m$  值以 24 次测定值的平均值表示, 采用 Excel 2003 版软件计算并提供其标准偏差。

### 1.2.4 灵敏度实验

取 5 种目标致病菌的 DNA 溶液, 分别用无菌去离子水稀释至 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 然后采用 10 倍稀释的方法将 DNA 溶液进行梯度稀释, 分别制成一组 10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  ng/ $\mu\text{L}$  系列的 DNA 溶液, 进行灵敏度实验, 测得其对应的循环阈值(cycle threshold, Ct)和  $T_m$  值。

### 1.2.5 特异性实验

在经验证为商业无菌的牛肉样品中接种 1.1.2 中的所有菌株, 加入 225 mL 缓冲蛋白胨水, 制成含有食品样品的混菌液, 在  $36^{\circ}\text{C}$  下进行培养, 采用实验建立的检测方法进

行特异性实验, 考察 5 种目标菌引物的特异性。

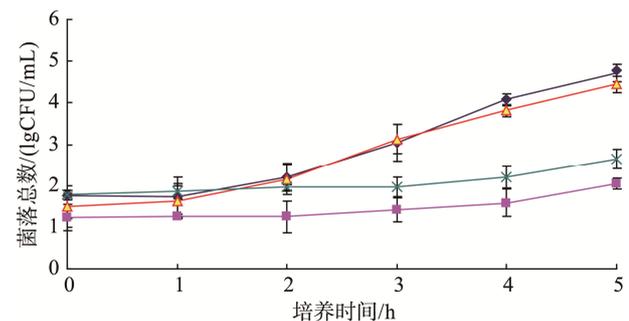
## 1.3 数据处理

本研究数据统计及制表均使用 Excel 2003 版软件完成。生长曲线在 Excel 2003 版软件中采用图表中折线图的方式体现。熔解曲线图谱由检测软件 LightCycler 480 SW 1.5.1 导出。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线的建立

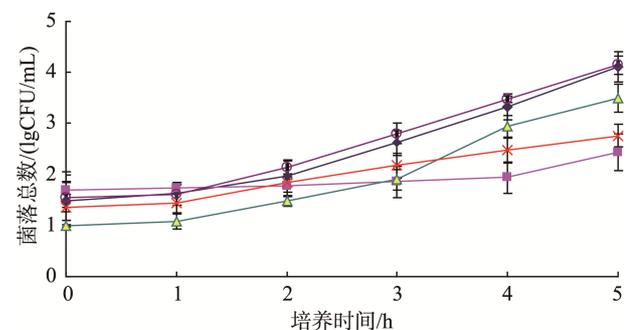
实验采用的缓冲蛋白胨水和营养肉汤都属于非选择性培养液, 适用于大部分细菌的培养及活化。实验比较了两种培养液对 5 种目标菌的增菌效果, 以期缩短培养时间, 并达到 5 种目标菌同步增菌的效果。同时, 经平板计数后, 从各稀释梯度中选取首次平板计数为两位数的数据进行统计分析, 计算标准偏差值, 模拟食品样品中菌落数在低水平时的生长曲线, 结果见图 1、2。



注: ◆ 为鼠伤寒沙门氏菌; △ 为大肠埃希氏菌 O157:H7; × 为单核细胞增生李斯特氏菌; ■ 为金黄色葡萄球菌。

图 1 4 种目标菌在营养肉汤中的生长曲线

Fig.1 Growth curves of 4 kinds of bacteria in nutritional broth



注: ○ 为副溶血性弧菌; ◆ 为鼠伤寒沙门氏菌; × 为单核细胞增生李斯特氏菌; ■ 为金黄色葡萄球菌; △ 为大肠埃希氏菌 O157:H7。

图 2 5 种目标菌在缓冲蛋白胨水中的生长曲线

Fig.2 Growth curves of 5 kinds of bacteria in buffered peptone water

从图 1、2 可知, 在营养肉汤中, 鼠伤寒沙门氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 能较好地生长, 但是金黄色葡萄球菌

和单核细胞增生李斯特氏菌生长较为缓慢, 而副溶血性弧菌在营养肉汤中则不能生长, 无法绘制生长曲线。这也证实了副溶血性弧菌为嗜盐菌, 对盐含量有一定要求, 营养肉汤中盐含量较低, 该菌的生长被抑制。在缓冲蛋白胨水中 5 种目标菌均能良好生长, 金黄色葡萄球菌相对生长速度缓慢, 前 3 h 一直处于延滞期, 但是在培养 3 h 后生长加速。因此, 本研究选用缓冲蛋白胨水作为 5 种目标菌的同步增菌液, 且后续实验均从培养 3 h 后开始考察。

## 2.2 DNA 模板的提取

采用直接裂解法提取 DNA, 在预实验中, 培养液离心后弃去上清液, 菌体中加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水直接裂解后提取 DNA 溶液, 此时测得 DNA 溶液的  $A_{260}/A_{280}$  值基本在 1.4~1.5 之间,  $A_{260}/A_{230}$  值基本在 0.4~0.5 之间, 说明培养液中的蛋白质等其他成分对 DNA 提取存在干扰。为了降低干扰, 在提取 DNA 过程中, 首次离心后弃去上清液, 然后加入 1 mL 无菌去离子水, 旋涡混匀形成悬浊液, 清洗菌体 1 次, 以 12000 r/min 速度离心 10 min, 弃上清液, 去除附着在菌体上的干扰物质, 再加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水, 放入 100 $^{\circ}\text{C}$  条件下温浴 10 min, 以 12000 r/min 速度离心 10 min 后收集上层液体, 待测。

将 5 种目标菌接种到缓冲蛋白胨水中进行同步培养, 根据 2.1 结果分别选取在 0、3、4、5、6 h 时, 按预实验优化后的方法提取混菌液的 DNA, 测得其  $A_{260}/A_{280}$  值能达到 1.9~2.2 之间,  $A_{260}/A_{230}$  值在 1.6~2.1 之间, 具体结果见表 2。因此, 在提取过程中采用去离子水清洗菌体后, DNA 溶液的纯度能有效提高。

## 2.3 实时荧光 PCR 参数优化及熔解曲线分析

由于 5 种目标菌的适宜退火温度不一样, 本研究比较

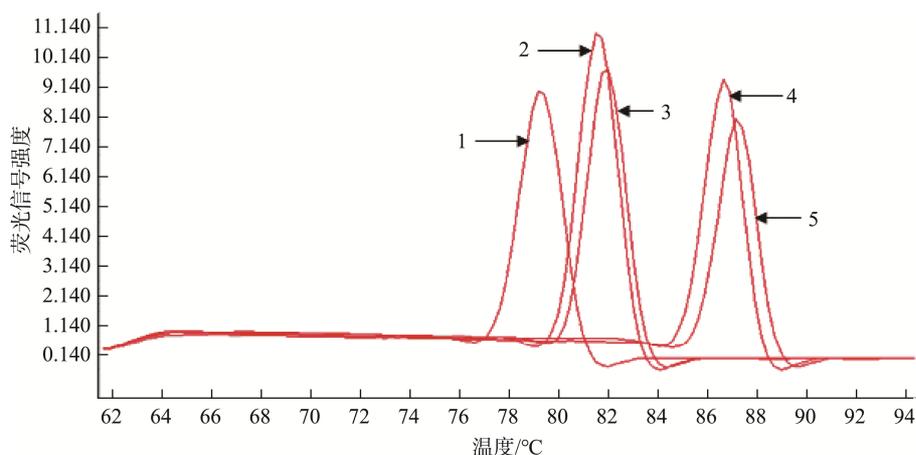
了 58、60、62 和 64 $^{\circ}\text{C}$  4 种退火温度下的扩增效果, 并结合熔解曲线进行分析。结果显示, 退火温度在 60 $^{\circ}\text{C}$  时 5 种目标菌都能有效扩增, 经熔解曲线分析, 基本没有出现非特异性扩增, 此时的熔解峰见图 3。

表 2 缓冲蛋白胨水混菌液在不同培养时间下测得的 DNA 溶液浓度及纯度

Table 2 Concentration and the purity of bacteria DNA in BPW in different time

培养时间/h	DNA 质量浓度/(ng/ $\mu\text{L}$ )	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
0	4.1	1.95	1.67
3	50.3	2.10	1.74
4	179.4	2.06	1.75
5	211.1	2.12	2.06
6	324.9	2.12	2.09

将 2.2 中培养 6 h 的 5 种目标菌 DNA 溶液按 1、2、5、10、20、50、100、200 倍进行稀释, 每个梯度进行 3 次平行实验, 即每种目标菌得到 24 个  $T_m$  值, 分别计算熔解峰的平均  $T_m$  值和标准偏差, 结果见表 3。5 种目标菌的  $T_m$  值与各平均值的最大标准偏差为: 金黄色葡萄球菌 0.27 $^{\circ}\text{C}$ 、单核细胞增生李斯特氏菌 0.25 $^{\circ}\text{C}$ 、大肠埃希氏菌 O157:H7 0.25 $^{\circ}\text{C}$ 、副溶血性弧菌 0.15 $^{\circ}\text{C}$ 、鼠伤寒沙门氏菌 0.16 $^{\circ}\text{C}$ 。在有效扩增的前提下, 5 种目标菌根据各自特征  $T_m$  值进行定性分析。因此, 本研究设置退火温度 60 $^{\circ}\text{C}$ , 在相同的扩增条件下, 可实现 5 种目标菌的同步检测。



注: 1. 金黄色葡萄球菌; 2. 单核细胞增生李斯特氏菌; 3. 大肠埃希氏菌 O157:H7; 4. 副溶血性弧菌; 5. 鼠伤寒沙门氏菌。

图 3 5 种目标菌的熔解曲线峰

Fig.3 Melting curves of 5 kinds of bacteria

表 3 5 种致病菌的平均 Tm 值及标准偏差(n=24)

Table 3 Average Tm values and the standard deviation of 5 kinds of bacteria (n=24)

食源性致病菌	Tm/°C	标准偏差/°C
金黄色葡萄球菌	79.51	0.115
单核细胞增生李斯特氏菌	81.96	0.111
大肠埃希氏菌 O157:H7	82.42	0.115
副溶血性弧菌	87.03	0.077
鼠伤寒沙门氏菌	87.39	0.095

## 2.4 灵敏度实验

按 1.2.4 配制 5 种目标菌的 DNA 系列稀释液, 按 1.2.3 参数条件, 退火温度为 60°C 进行实验, 每个浓度做 3 次平行。5 种目标菌的 Tm 值均在偏差范围内, 且灵敏度较好, 其中金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌的最低检测 DNA 质量浓度达到  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 大肠埃希氏菌 O157:H7、副溶血性弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的最低检测 DNA 质量浓度能达到  $10^{-4}$  ng/ $\mu$ L, 具体结果见表 4。

表 4 5 种目标菌的最低检测 DNA 浓度、Ct 值和 Tm 值(n=3)

Table 4 Lowest DNA concentrations, Ct values and Tm values of 5 kinds of bacteria (n=3)

食源性致病菌	DNA 质量浓度 (ng/ $\mu$ L)	Ct	Tm/°C
金黄色葡萄球菌	$10^{-3}$	31.85	79.58
		31.11	79.59
		31.19	79.59
单核细胞增生李斯特氏菌	$10^{-3}$	32.78	82.01
		32.38	82.09
		32.77	82.10
大肠埃希氏菌 O157:H7	$10^{-4}$	32.78	82.54
		31.67	82.47
		33.52	82.55
副溶血性弧菌	$10^{-4}$	32.70	87.06
		31.84	87.06
		31.88	87.06
鼠伤寒沙门氏菌	$10^{-4}$	32.17	87.38
		30.95	87.38
		31.43	87.38

## 2.5 特异性实验

称取 25 g 牛肉, 加入 225 mL 缓冲蛋白胨水, 以接种环轻触经活化的菌苔, 接种 1.2.1 所有已知菌种, 然后进行

增菌, 分别在 0、3、4、5、6 h 提取混菌液的 DNA, 其  $A_{260}/A_{280}$  值的范围为 1.7~2.2, 满足 PCR 检测要求。对 5 种目标菌的引物进行特异性实验, 除了目标菌以外, 其余添加的已知菌种均未检出, 5 种目标菌的引物均具有良好的特异性, 检出 Ct 值的结果见表 5。

表 5 5 种目标菌在样品中不同增菌时间下的 Ct 值  
Table 5 Ct values of 5 kinds of bacteria in food in different enrichment time

食源性致病菌	Ct				
	0 h	3 h	4 h	5 h	6 h
金黄色葡萄球菌	>35.00	31.49	30.86	30.53	30.00
单核细胞增生李斯特氏菌	>35.00	33.78	33.23	33.13	31.19
大肠杆菌 O157:H7	>35.00	33.47	30.68	28.99	23.53
副溶血性弧菌	>35.00	30.57	28.32	24.55	24.03
鼠伤寒沙门氏菌	>35.00	32.97	31.59	29.68	25.44

由表 5 可知, 培养 3 h 后 5 种目标菌均能有效扩增, 且 3 h 后检出的 Ct 值均小于 35, 扩增效果理想。此时, 5 种目标菌的特征 Tm 值分别为金黄色葡萄球菌 79.36~79.76°C、单核增生李斯特氏菌 81.83~82.16°C、大肠埃希氏菌 O157:H7 82.32~82.55°C、副溶血性弧菌 87.02~87.18°C、鼠伤寒沙门氏菌 87.23~87.41°C, 最大偏差范围符合 2.3 结果。随着培养时间的延长, 样本中各种菌的生长竞争更为复杂, 但从测得 Ct 值的变化趋势可知, 随着培养时间的增加, Ct 值逐渐减小, 说明该方法使用效果较好, 且培养时间达到 3 h 后即可检出目标菌。

## 3 结论

食源性致病菌的富集培养基可以分为非选择性和选择性培养基, 其中非选择性的预富集肉汤和营养肉汤被广泛使用<sup>[26]</sup>。另有研究者通过观察生长曲线, 发现肠杆菌科的迟缓期较短, 生长期生长较快<sup>[27]</sup>。本研究采用了营养肉汤和缓冲蛋白胨水两种非选择性培养基进行实验分析, 考察的是 5 种目标菌的同步培养情况。研究结果与上述文献相似, 非选择性培养基缓冲蛋白胨水能作为 5 种目标菌的共增菌液, 实现同步增菌, 且在快速生长期的 3 h 后能被检出, 为微生物快速检测提供参考。另外, 本研究采用染料嵌合荧光 PCR 技术, 结合熔解曲线分析, 建立了食品中 5 种致病菌快速检测方法, 通过优化 PCR 扩增体系, 5 种目标菌能有效扩增, 结合熔解曲线分析, 利用特征 Tm 值进行定性分析。该方法弥补了染料嵌合荧光 PCR 技术不能识别非特异性扩增的缺陷, 有效降低假阳性概率, 提高定性检测的准确性。与致病菌常规培养法相比, 该方法检测时长大约需

要 6 h, 引物特异性和方法灵敏度等均能满足要求。

本研究利用溶解曲线分析, 无需合成荧光标记探针, 在大批量样本筛查时能降低检测成本。目前国内外对于溶解曲线分析方法也有一定的研究<sup>[28-32]</sup>, 但是对于多重检测的研究还较少。本研究建立的方法虽然能实现 5 种目标菌的同步检测, 但由于方法中溶解峰的分离度不够高, 部分特征 Tm 值较接近, 不能实现多重反应。但是, 随着 PCR 技术的不断发展, 特别是高分辨率溶解曲线分析方法的应用, 采用溶解曲线分析方法实现多重检测还有广阔的发展空间, 有待进一步的开发与利用。

## 参考文献

- [1] 李红秋, 郭云昌, 宋壮志, 等. 2019 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 650-656.  
LI HQ, GUO YC, SONG ZZ, *et al.* Analysis of foodborne disease outbreaks in China in 2019 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2021, 33(6): 650-656.
- [2] 王佳慧, 李楠, 陶婉婷, 等. 2014-2019 年媒体报道食源性疾病事件分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(2): 181-185.  
WANG JH, LI N, TAO WT, *et al.* Epidemiological characteristics of foodborne disease events reported by the media from 2014 to 2019 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2021, 33(2): 181-185.
- [3] 刁文丽, 王凯琳, 宋蕴奇, 等. 2014-2019 年辽宁省食源性疾病流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(4): 451-455.  
DIAO WL, WANG KL, SONG YQ, *et al.* Epidemiological characteristics of foodborne diseases between 2014 and 2019 in Liaoning Province [J]. *Chin J Food Hyg*, 2021, 33(4): 451-455.
- [4] 吴阳博, 马晓晨, 王超, 等. 2017—2019 年北京市食源性疾病暴发事件流行病学特征分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(5): 336-340.  
WU YB, MA XC, WANG C, *et al.* Epidemiological features of foodborne disease outbreaks in Beijing, 2017—2019 [J]. *Chin J Prev Med*, 2021, 22(5): 336-340.
- [5] 万蓉, 赵江, 万青青, 等. 2011-2019 年云南省食物中毒流行特征分析及预防措施探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(4): 1620-1624.  
WAN R, ZHAO J, WAN QQ, *et al.* Epidemiological characteristics and preventive measures of food poisoning in Yunnan Province from 2011 to 2019 [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1620-1624.
- [6] 李丁玲, 任敬, 马晓燕, 等. 多重 PCR 检测食源性致病菌的研究[J]. 食品工业, 2012, 33(10): 159-163.  
LI DL, REN J, MA XY, *et al.* Study on detection of food-borne pathogenic bacteria by multiplex PCR [J]. *Food Ind*, 2012, 33(10): 159-163.
- [7] SHUAI W, ERIC BD, RAMACHANDRAN C, *et al.* Development of a multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. *J Food Saf*, 2019, 39: e12558.
- [8] DAMKERNG B, WANNAKARN S, SUDSAI T. Taqman® probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods [J]. *LWT Food Sci Technol*, 2021, 147: 111696.
- [9] 杨丹妮, 刘旻虹, 张晓金, 等. PCR-膜芯片技术快速筛查非预包装即食食品中食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 560-568.
- [10] YANG DN, LIU MH, ZHANG XJ, *et al.* Rapid screening of food-borne pathogens in non-prepackaged ready-to-eat foods by PCR-membrane chip technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 560-568.
- [11] HE SY, HUANG YZ, MA YW, *et al.* Detection of four foodborne pathogens based on magnetic separation multiplex PCR and capillary electrophoresis [J]. *Biotechnol J*, 2022, 17(1): 2100335.
- [12] WU YJ, CHEN Y, ZHU CX, *et al.* Multiplex PCR-capillary electrophoresis-SSCP used to identify foodborne pathogens [J]. *Eurp Food Res Technol*, 2009, 228(4): 511-518.
- [13] TANIS CM, BURTON WB, ALEX W, *et al.* Multiplexed single intact sell droplet digital PCR (MuSIC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in food enrichment cultures [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 332.
- [14] 杨福江, 王玉平, 吴永宁, 等. 聚合酶链式反应-变性高效液相色谱法检测 5 种食源性致病菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(5): 389-392.  
YANG FJ, WANG YP, WU YN, *et al.* Detection of five foodborne bacterial pathogens by using PCR-DHPLC [J]. *Chin J Food Hyg*, 2010, 22(5): 389-392.
- [15] 晚观生, 刘晓玉, 郑秋月, 等. 多重 PCR-DHPLC 快速检测食品中产志贺毒素大肠杆菌[J]. 工业微生物, 2016, 46(30): 42-46.  
WAN GS, LIU XY, ZHENG QY, *et al.* Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by multiplex PCR and DHPLC [J]. *Ind Microbiol*, 2016, 46(30): 42-46.
- [16] 刘志梅, 曾繁华, 罗佳, 等. 靶序列富集多重 PCR 结合 DHPLC 同时检测 5 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2275-2282.  
LIU ZM, ZENG FH, LUO J, *et al.* Target enriched multiplex PCR coupled with denaturing high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of 5 foodborne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(6): 2275-2282.
- [17] 胡雨欣, 郑舒, 何早, 等. 免疫磁纳米粒子对肠炎沙门氏菌的富集分离[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 162-167.  
HU YX, ZHENG S, HE Z, *et al.* Enrichment and Isolation of *Salmonella enteritidis* by immune magnetic nanoparticles [J]. *Food Sci*, 2016, 37(13): 162-167.
- [18] 吴俊, 陆利霞, 刘元建, 等. 基于裸磁珠的金黄色葡萄球菌富集优化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 186-192.  
WU J, LU LX, LIU YJ, *et al.* Study on optimization of enrichment of *Staphylococcus aureus* by bare magnetic particles [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(2): 186-192.
- [19] MIN CL, JI YP, KISANG P, *et al.* An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation [J]. *Food Control*, 2017, 73(1): 1541-1547.
- [20] ALESSANDRA C, MATILDE C, MARCELLO T. A rapid enzyme-linked immunomagnetic electrochemical (ELIME) assay for the detection of *Escherichia coli* O26 in raw milk [J]. *Food Anal Method*, 2020, 13: 1366-1370.
- [21] SUHYUN K, JEIL L, BONHAN K, *et al.* Floating magnetic membrane for rapid enrichment of pathogenic bacteria [J]. *Biochip J*, 2021, 15: 61-68.
- [22] JI YP, MIN CL, KISANG P, *et al.* Detection of *E. coli* O157:H7 in food using automated immunomagnetic separation combined with real-time

- PCR [J]. *Processes*, 2020, 8: 908.
- [22] PATRICK M, MARTIN W, PETER R. Molecular enrichment for qualitative molecular pathogen detection in food [J]. *Food Anal Method*, 2018, 11: 1251–1256.
- [23] JIN HK, SE WO. Optimization of bacterial concentration by filtration for rapid detection of foodborne *Escherichia coli* O157:H7 using real-time PCR without microbial culture enrichment [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(11): 3241–3245.
- [24] SEUNG HG, JIN HK, SE WO. How to rapidly and sensitively detect for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cabbage using filtration, DNA concentration, and real-time PCR after short-term enrichment [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 132: 109840.
- [25] 朱海华, 章建军, 尹红娜, 等. 一种快速富集生乳中沙门氏菌的方法 [J]. *食品科技*, 2018, 43(2): 302–306.  
ZHU HH, ZHANG JJ, YIN HN, *et al.* A rapid method for enrichment of *Salmonella* in raw milk [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(2): 302–306.
- [26] SANNA T, MIKA T, HEIKKI O. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella* [J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 369–377.
- [27] 李新, 焦连亭, 康淑荷, 等. 细菌在血培养仪上生长曲线的特点分析 [J]. *江西医学检验*, 2003, 21(4): 229–232.  
LI X, JIAO LT, KANG SH, *et al.* The characteristic analysis of bacterial growth curve of blood culture system [J]. *Jiangxi J Med Lab Sci*, 2003, 21(4): 229–232.
- [28] 岳苑, 周梦诗, 徐娟, 等. 高分辨率溶解曲线法检测饮用水中两种假单胞菌 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(6): 484–488.  
YUE Y, ZHOU MS, XU J, *et al.* High-resolution melting curve method for the detection of two *Pseudomonas* spp. in drinking water [J]. *Chin J Zoonoses*, 2021, 37(6): 484–488.
- [29] BABAK P, AFSHIN AB, ALI K, *et al.* Differentiation of *stx1A* gene for detection of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and *Shigella dysenteriae* type 1 in food samples using high resolution melting curve analysis [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(7): 3665–3672.
- [30] HE PY, ZHU GY, LUO JY, *et al.* Development and application of a one-tube multiplex real-time PCR with melting curve analysis for simultaneous detection of five foodborne pathogens in food samples [J]. *J Food Saf*, 2017, 37(2): 1–7.
- [31] BUNDIDAMORN D, SUPAWASIT W, TREVANICH S, *et al.* A new single-tube platform of melting temperature curve analysis based on multiplex real-time PCR using EvaGreen for simultaneous screening detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Food Control*, 2018, 94(1): 195–204.
- [32] 岳苑, 周梦诗, 徐娟, 等. 基于高分辨率溶解曲线分析鉴别食品中的 3 种李斯特氏菌 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(6): 285–290.  
YUE Y, ZHOU MS, XU J, *et al.* Identification of 3 kinds of *Listeria* species in foods based on high resolution melting curve analysis [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(6): 285–290.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

## 作者简介



姚艳玲, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物及分子生物检测。  
E-mail: yyljx573@163.com