

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20230922001

叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应-高通量测序 技术鉴定冷链食品中多种病原菌

柯振华*

[福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(福州), 福州 350000]

摘 要: 目的 应用叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应-高通量测序技术鉴定冷链食品中多种病原菌, 构建病原菌分子进化树。**方法** 以冷链食品中的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌 5 种病原菌作为研究对象, 应用叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应技术作为冷链食品中病原菌检测初筛手段, 应用微生物培养法以及生化鉴定仪器法进行方法比对与结果验证, 运用高通量测序以及分子进化树构建作为冷链食品中所分离病原菌的种属地位确证方法。**结果** 叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应技术成功扩增了冷链食品中生活状态病原菌的特征性核酸片段, 排除了死亡细菌以及阴性对照菌的干扰, 病原菌检出限可达到 1×10^3 CFU/mL, 一次反应可检测 42 份试样, 可以在 18 h 内完成检测工作。在冷链食品中病原菌抽样检测调查中, 随机采集的 751 份冷链食品, 共检出 62 株病原菌, 病原菌总体检出率为 8.3% (62/751)。通过后续的 16S rRNA 测序以及葡萄球菌属、弧菌属以及李斯特菌属分子进化树的构建, 成功溯源了金黄色葡萄球菌的污染来源并完成病原菌种属定位。**结论** 本方法特异性好、灵敏度高、检测通量高, 为冷链食品及相关食品中病原菌的精确检测与溯源分析提供新的思路与方法。

关键词: 叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应技术; 高通量测序; 分子进化树; 冷链食品; 病原菌

Identification of multiple pathogens in cold chain foods by propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction-high throughput sequencing technology

KE Zhen-Hua *

[National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350000, China]

ABSTRACT: Objective To identify a variety of pathogenic bacteria in cold chain food by using propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction-high throughput sequencing technology, and to construct molecular evolutionary tree of pathogenic bacteria. **Methods** The 5 kinds of pathogens in cold chain food, including *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*, were taken as the research objects, and the propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction technology was used as the primary screening method for the detection of pathogens in cold chain food. Microbial

基金项目: 福建省科技计划项目(2021Y0058)

Fund: Supported by the Fujian Science and Technology Program (2021Y0058)

*通信作者: 柯振华, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品分子生物学检验。E-mail: iibio@163.com

*Corresponding author: KE Zhen-Hua, Master, Senior Engineer, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350000, China. E-mail: iibio@163.com

culture method and biochemical identification instrument method were used to compare the methods and verify the results. High-throughput sequencing and molecular evolutionary tree construction were used to confirm the species status of the isolated pathogens in cold chain food. **Results** The characteristic nucleic acid fragments of living pathogens in cold chain foods were successfully amplified by propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction technology, eliminated the interference of dead bacteria and negative control bacteria. The limit of detection of pathogenic bacteria could reach 1×10^3 CFU/mL, 42 samples could be detected in one reaction, and the detection work could be completed within 18 h. In the sampling investigation of pathogens in cold chain food, 62 strains of pathogens were detected in 751 samples randomly collected, and the overall detection rate was 8.3% (62/751). Through subsequent 16S rRNA sequencing and the construction of molecular evolutionary trees of *Staphylococcus*, *Vibrio* and *Listeria*, the contamination sources of *Staphylococcus aureus* were successfully traced and the pathogenic bacteria species were located. **Conclusion** This method has good specificity, high sensitivity and high throughput, and provides a new idea and method for accurate detection and traceability analysis of pathogens in cold chain foods and related foods.

KEY WORDS: propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction technology; high throughput sequencing; molecular phylogenetic tree; cold chain food; pathogens

0 引言

冷链食品一般指在低温工艺下生产加工并通过冷链贮存、运输、销售、配送的食品^[1-3]。近几年来,冷链食品如酸奶、冷鲜肉、速冻水产品等需求不断提升,由于产业发展以及配套管理体系的缺位,因冷链食品加工、运输、保存不当引起的食源性病原体污染导致的公共卫生事件在国内有较多的报道^[4-5]。

食源性病原菌是食品安全主要的安全隐患,可能导致食源性疾病与群体食物中毒事件集中爆发^[6-10]。其中沙门氏菌是最常见的食源性病原菌,主要存在于畜禽肉、蛋及蛋制品、乳制品中,可引起人类食物中毒或败血症等。金黄色葡萄球菌有高度的耐盐性,其所致人类疾病有侵袭性和毒素性。蜡样芽胞杆菌广泛存在于自然环境中,容易引发食物中毒,感染后症状包括腹泻和呕吐等。副溶血性弧菌主要存在于海产品以及含盐分较高的腌制食品中,易引发胃肠炎等暴发流行。单核细胞增生李斯特氏菌是一种能引起人畜共患病的病原菌,可使人和动物患脑膜炎、败血症,可导致孕妇流产等,死亡率较高^[11-15]。

国内目前对于病原菌的检测鉴定主要还是依赖于传统的微生物培养检测方法,耗时长、流程复杂、对人员经验要求高,难以满足病原菌快速检测时效要求^[11-13]。同时,微生物培养法无法对病原菌进行溯源与聚类分析,急需开发能够精确溯源定位病原菌的检测方法。

基于核酸的分子生物学检测方法,如定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR),能够精准地分析样本中微生物的种类和丰度^[16-18],但是难以区

分微生物的存活状态。叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)是一种能与 DNA 结合的光反应染料,不具有细胞膜渗透性,无法穿透活细胞完整的细胞膜,只能选择性地穿透死细胞受损的细胞膜。进入细胞后,PMA 会与 DNA 发生共价交联,进而阻碍死细胞中目标 DNA 的 PCR 扩增,而活细胞的 PCR 扩增不受影响。基于 PMA 的这一特性,柯振华^[19]将 PMA 与 qPCR 技术相结合应用于活细菌的筛选。但该研究仅仅是关于活菌的筛选,未涉及多种病原菌的鉴定以及病原菌分子进化树的构建。此外冷链食品由于低温保存更有利于微生物生存,相对于预包装食品等具有较高的食品安全风险,因此鉴定冷链食品病原菌并构建分子进化树对于相关检测部门的监测工作具有重要意义。

本研究基于分子生物学的荧光 qPCR 技术和基因测序技术^[20-26],将 PMA-qPCR、高通量测序以及生物进化树构建等技术相结合,应用于冷链食品中病原菌的快速检测鉴定。首先利用 PMA-qPCR 作为冷链食品中病原菌初步筛查手段,后通过方法比对验证检验结果,进一步对阳性菌株的 16S rRNA 序列进行高通量测序分析,比较不同物种细菌或者同物种不同菌株遗传多样性,并通过绘制生物进化树的方式鉴定菌株间的进化距离以及亲缘关系,从基因本质上精确定位病原菌种属,为微生物检验检测研究提供了一种全新的菌株种属鉴定思路与方法,为病原菌快速检测与精准鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 标准菌株

沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)等标准菌株均来自于福建省产品质量检验研究院菌种保藏室,采用磁珠法冻存,具体菌株编号与信息见表 1。

1.1.2 样品采集

冷链食品样品随机采集自食品加工厂、超市及农贸市场等,用无菌袋封装后置于冷藏保温箱中,运输至实验室开展病原菌检测研究工作。

1.1.3 试剂

脑心浸出液肉汤(干粉)(北京陆桥技术股份有限公司); TaqProbe PCR-Multiplex Mix 预混液、qPCR 用引物探针、柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 丙二醇甲醚醋酸酯(propylene glycol methyl ether acetate, PMA)(分析纯,上海睿铂赛生物科技有限公司); Tris-HCl、氯化钠、乙二醇四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)。

1.2 仪器与设备

ABI 7500 实时荧光 PCR 检测系统(美国应用生物系统公司); Mini spin 小型离心机(德国艾本德股份公司); BioVanguard 生物安全柜(美国贝克公司); VITEK 自动生化药敏分析系统(法国生物梅里埃公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂配制

自配 DNA 高温提取裂解液(1 L, pH 8.0), 具体配方为: 1 mol/L Tris-HCl 25.0 mL; 5 mol/L 氯化钠 5.0 mL; 0.5 mol/L EDTA 25.0 mL; 20% SDS 25.0 mL, ddH₂O 定容到 1.0 L。

脑心浸出液肉汤培养基(1 L): 脑心浸粉 22.5 g; 葡萄糖 5.5 g; 蛋白胨 13.5 g; 氯化钠 3.0 g; 磷酸氢二钠 4.5 g; 氯化锂 1.5 g; 丙酮酸钠 1.0 g。

1.3.2 冷链食品样品预处理

冷链食品中的冷鲜样品无需解冻, 冷冻样品需置于 4℃冰箱解冻 12 h。样品解冻后, 在生物安全实验室内无菌操作称取检样 25 g, 置于 225 mL 通用型培养基中, 制备成均匀的样品与培养基比例为 1:10 的混悬液, 培养 12 h。

1.3.3 预增菌菌液的 PMA 处理

取 1 mL 预增菌后的菌液置于离心管中, 加入 10 μg/mL

PMA(终质量浓度), 避光孵育 10 min, 曝光处理 20 min(光照强度 40 W), 经 PMA 处理后提取 DNA。

1.3.4 高温裂解法提取菌液 DNA

在应用 PMA 完成预增菌液的处理后, 取 1.0 mL 菌液加入离心管中, 高速离心(10000 r/min, 5 min), 弃上清, 收集菌液沉淀。之后, 每管加入 200 μL 配制好的 DNA 提取裂解液, 振荡器充分振荡混匀后置于金属浴中 100℃孵育 5 min。冷却, 高速离心(10000 r/min, 5 min)收集上清液作为后续 PCR 反应的模板 DNA。

1.3.5 引物与探针的设计与合成

本研究依据目标病原菌如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的保守基因序列设计引物和不同荧光标记的探针, 具体引物探针信息见表 2。

1.3.6 实时荧光 PCR 反应体系与反应参数

PCR 反应体系: 总体积 50 μL, PCR 预混液 25 μL, 上游与下游引物各 2 μL, 荧光标记探针 1.0 μL, 模板 DNA 3.0 μL, 无菌水补足 PCR 反应体系体积至 50 μL。

实时荧光 PCR 反应参数: 94℃ 5 min, 94℃ 15 s, 59℃ 1.5 min, 45 个循环。

1.3.7 PMA-qPCR 检测目标病原菌的灵敏度

经涂布平板检验, 取菌液浓度梯度为 10⁷ CFU/mL 的菌液, 逐级稀释, 最终制备成菌液浓度分别为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 CFU/mL 梯度的稀释菌液, 采用 PMA-qPCR 进行检测。

1.3.8 PMA-qPCR 方法的抗干扰性与特异性

将目标病原菌如沙门氏菌等与其他类型菌株混合培养, 开展 PMA-qPCR 检测, 评价本研究方法的特异性与灵敏度。

1.3.9 食品样品的 PMA-qPCR 检测分析

针对不同类型的冷链食品, 本研究总共采集了 751 份样品, 采用本研究所开发的 PMA-qPCR 方法开展检测工作。

1.3.10 金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌溯源分析以及分子进化树的构建

将冷链食品等食品中分离得到的金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌等野生菌株分离纯化后进行高通量测序, 将测序后的基因序列进行整理分析。

表 1 标准菌株列表
Table 1 List of standard strains

序号	标准菌株名称	标准菌株编号	标准菌株来源
1	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923	美国模式生物保藏中心
2	副溶血性弧菌	ATCC 17802	美国模式生物保藏中心
3	沙门氏菌	CGMCC 1.1174	中国微生物菌种保存中心
4	大肠埃希氏菌	ATCC11229	美国模式生物保藏中心
5	蜡样芽胞杆菌	ATCC 14579	美国模式生物保藏中心
6	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC 19115	美国模式生物保藏中心

表 2 引物和探针序列
Table 2 Sequences of primers and probes

病原菌	目标基因	序列方向(5'-3')	荧光标记探针
金黄色葡萄球菌	<i>gltS</i>	TTCTTCACGACTAAATAAACGCTCA GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT Probe:CAGAACACAATGTTTCCGATGCAACGT	5'FAM 3'BHQ
沙门氏菌	<i>fimY</i>	GCGGCGTTGGAGAGTGATA AGCAATGGAAAAAGCAGGATG Probe:CATTTCCTTAAACGGCGGTGTCTTTCCCT	5'ROX 3'TAMRA
副溶血性弧菌	<i>toxS</i>	GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT CATTCGCGTGGCAAACATC Probe:CGCACAAGGCTCGACGGCTGA CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT	5'HEX 3'BHQ
单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Dans</i>	CGCGACCGAAGCCAACTA Probe:ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG CAGAACAACCAGAAATTTATGAAAGAGT	5'FAM 3'TAMRA
蜡样芽胞杆菌	<i>Cls</i>	ATCATCTACAACACCACTCGGTTT Probe:CAGCGCGTATCGGTCTCACTCGG	5'ROX 3'BHQ

注: FAM (carboxyfluorescein, 羧基荧光素); BHQ (black hole quencher, 黑洞淬灭剂); ROX (passive reference dye, 惰性参比染料); TAMRA (carboxytetramethylrhodamine, 羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯); HEX (azide, 叠氮化物)。

通过基因测序获得病原菌野生菌株 16S rRNA 序列, 其余用于构建菌株分子进化树的葡萄球菌属、弧菌属、李斯特氏菌属的 16S rRNA 序列均检索自美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information,

NCBI), 具体序列信息见表 3~表 5。
通过 BioEdit 软件对所需分析的基因序列进行处理, 利用 Clustal W 软件对基因序列进行整合比对与分析, 利用 MEGA X 软件构建分子生物进化树。

表 3 分子进化树构建所用葡萄球菌属菌株序列信息
Table 3 Sequence informations on *Staphylococcus* strains used in molecular tree construction

序号	基因序列数据库编号及株系	来源	中文名称
1	NR_036902.1 <i>Staphylococcus cohnii</i> strain GH 137 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	科氏葡萄球菌
2	NR_036907.1 <i>Staphylococcus xylosus</i> strain KL 162 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	木糖葡萄球菌
3	NR_028667.1 <i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>Succinus</i> strain AMG-D1 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	琥珀葡萄球菌
4	NR_037046.1 <i>Staphylococcus ureilyticus</i> strain CK27 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	溶尿葡萄球菌
5	NR_025922.1 <i>Staphylococcus warneri</i> strain AW 25 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	沃氏葡萄球菌
6	NR_113345.1 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain JCM 2416 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	溶血葡萄球菌
7	NR_113957.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	表皮葡萄球菌
8	NR_181843.1 <i>Staphylococcus taiwanensis</i> strain NTUH-S172 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	台湾葡萄球菌
9	NR_027519.1 <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain MAW 8436 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	头状葡萄球菌
10	NR_113405.1 <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> strain JCM 1768 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	解糖葡萄球菌
11	NR_043146.1 <i>Staphylococcus simiae</i> CCM 7213 51256 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	金猿葡萄球菌
12	NR_181247.1 <i>Staphylococcus borealis</i> strain 51-48 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	北极葡萄球菌
13	NR_037007.2 <i>Staphylococcus aureus</i> strain S33 R 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	金黄色葡萄球菌

表 4 分子进化树构建所用弧菌属菌株序列信息
Table 4 Sequence information of *Vibrio* strains used in molecular phylogenetic tree construction

序号	基因序列数据库编号及株系	来源	中文名称
1	NR_114630.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain ATCC 17802 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	副溶血弧菌
2	NR_179908.1 <i>Vibrio ouci</i> strain BEI176 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	海大弧菌
3	NR_148264.1 <i>Vibrio crosai</i> strain CAIM 1437 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	克罗赛弧菌
4	NR_113791.1 <i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109 strain NBRC 15644 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	塔氏弧菌
5	NR_146051.1 <i>Vibrio europaeus</i> strain PP-638 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	欧洲弧菌
6	NR_025575.1 <i>Vibrio fortis</i> strain CAIM 629 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	富氏弧菌
7	NR_025779.1 <i>Vibrio ezuræ</i> strain HDS1-1 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	埃祖拉弧菌
8	NR_113789.1 <i>Vibrio pelagius</i> strain NBRC 15639 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	佩拉吉乌斯弧菌
9	NR_135208.1 <i>Vibrio bivalvicida</i> strain 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	双戎弧菌
10	NR_147758.1 <i>Vibrio galathea</i> strain S2757 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	加拉特弧菌

表 5 分子进化树构建所用李斯特氏菌属菌株序列信息
Table 5 Sequence information of *Listeria* strains used in molecular phylogenetic tree construction

序号	基因序列数据库编号及株系	来源	中文名称
1	NR_044823.1 <i>Listeria monocytogenes</i> strain NCTC 10357 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	单核细胞增生李斯特菌
2	NR_116352.1 <i>Listeria marthii</i> strain NR 9579 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	马氏李斯特菌
3	NR_181107.1 <i>Listeria portnoyi</i> strain FSL L7-1582 16S ribosomal RNA, 完整序列	NCBI	波特诺伊李斯特菌
4	NR_117201.1 <i>Listeria weihenstephanensis</i> strain WS 4560 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	魏登施泰李斯特菌
5	NR_181105.1 <i>Listeria rustica</i> strain FSL W9-0585 16S ribosomal RNA, 完整序列	NCBI	乡村李斯特菌
6	NR_180317.1 <i>Listeria costaricensis</i> strain CLIP 2016/00682 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	肋骨李斯特菌
7	NR_178560.1 <i>Listeria grandensis</i> strain FSL F6-0971 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	大李斯特菌
8	NR_178728.1 <i>Listeria booriae</i> strain FSL A5-0281 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	布里亚李斯特菌
9	NR_180224.1 <i>Listeria thailandensis</i> strain CLIP 2015/00305 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	泰国李斯特菌
10	NR_178839.1 <i>Listeria goaensis</i> strain ILCC801 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	山羊李斯特菌
11	NR_180944.1 <i>Listeria valentina</i> strain CLIP 2019/00642 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	瓦伦蒂娜李斯特菌
12	NR_181103.1 <i>Listeria immobilis</i> strain FSL L7-1519 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	固定李斯特菌
13	NR_125645.1 <i>Listeria floridensis</i> strain FSL S10-1187 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	佛罗里达李斯特菌
14	NR_178729.1 <i>Listeria newyorkensis</i> strain FSL M6-0635 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	纽约李斯特菌
15	NR_125646.1 <i>Listeria aquatica</i> strain FSL S10-1188 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	水生李斯特菌
16	NR_043518.1 <i>Listeria seeligeri</i> strain ATCC 35967 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	西利坚李斯特菌
17	NR_118231.1 <i>Listeria innocua</i> strain ATCC 33090 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	英诺克李斯特菌
18	NR_036808.1 <i>Listeria ivanovii</i> strain CLIP 12510 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	伊氏李斯特菌
19	NR_074998.2 <i>Listeria welshimeri</i> strain SLCC 5334 16S ribosomal RNA, 完整序列	NCBI	威尔逊李斯特菌
20	NR_043519.1 <i>Listeria welshimeri</i> strain ATCC 35897 16S ribosomal RNA, 部分序列	NCBI	威尔逊李斯特菌

2 结果与分析

2.1 通用型预增菌培养基研制结果与分析

为了加快检测速度, 节约试剂成本、耗材成本以及人工成本, 建立通用型培养基可以加快预增菌步骤, 避免烦琐的操作, 节约大量时间成本和试剂成本。

本研究病原菌菌株包括革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌, 每种菌株最适培养基条件都不同, 而且不同菌株生长时会相互作用, 为了研制一种适合于多种病原菌的预增菌培养基, 需要摸索合适类型与合适浓度的促进剂和抑制剂去平衡菌株生长环境。将病原菌标准菌株接种于研发的通用型预增菌培养基中, 36℃培养 12 h 后, 取样涂布病原菌选择性培养基, 培养后计数, 菌液浓度均可达到 10⁷ CFU/mL。以沙门氏菌为例, 预增菌液稀释十万倍涂布平板后的检测结果达到 113 个, 通过计算可以得到菌落数量为 1.1×10⁷ CFU/mL, 其他菌株的结果也可以达到这个数量级, 结果见图 1。

2.2 5 种病原菌实时荧光 PCR 反应结果

为进一步分析筛选的 5 种病原菌的引物探针特异性与灵敏度, 分别对 5 种病原菌进行 PMA-qPCR 检测分析。通过 qPCR 实验结果证明, 本研究设计合成的引物探针组合均只对特定的阳性靶标菌有良好的扩增, 对空白对照以及阴性对照菌株均无扩增, 充分说明所设计合成的引物探针组合特异性良好, 可以用于金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌与蜡样芽胞杆菌的 qPCR 快速检测(图 2~图 6)。

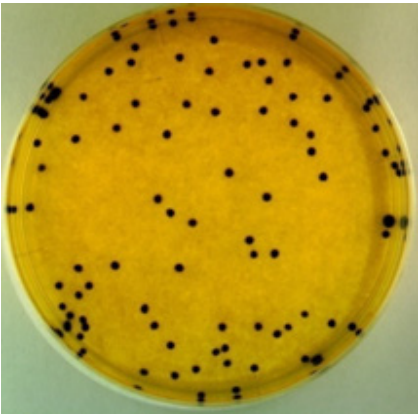


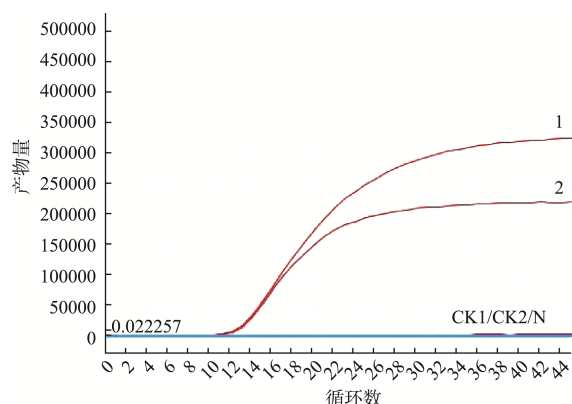
图 1 沙门氏菌平板计数结果
Fig.1 *Salmonella* plate count results

2.3 目标菌 PMA-qPCR 方法检出限

通过将多种菌液稀释检测, 最终确定金黄色葡萄球菌等 5 种病原菌的检出限可达到 1×10³ CFU/mL。

2.4 食品中多种病原菌的检测结果

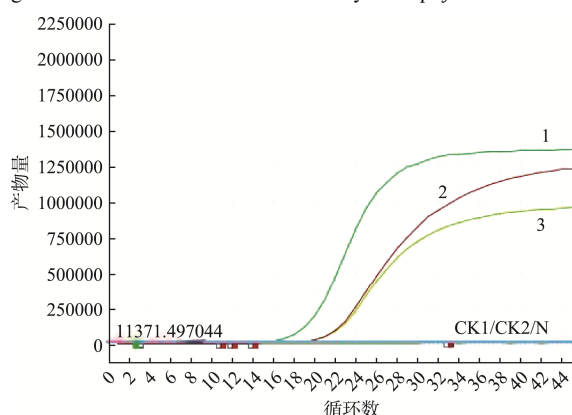
为了验证研究方法的适用性与可操作性, 掌握食品特别是冷链食品中病原菌的污染情况, 本研究共从超市以及农贸市场等随机抽取了 9 大类共 751 份样品开展多种病原菌检验工作, 检验数据见表 6。751 份样品中共检出食源性病原菌 62 份, 病原菌总体检出率为 8.3% (62/751)。按照病原菌检出率由高到低排序为: 蜡样芽胞杆菌 4%、金黄色葡萄球菌 2%、副溶血性弧菌 1%、单核细胞增生李斯特氏



注: 1: 金黄色葡萄球菌(菌株编号: ATCC 25923); 2: 金黄色葡萄球菌(菌株编号: CGMCC 1.0089); CK1: 空白对照; CK2: 扩增试剂空白对照; N: 阴性对照表皮葡萄球菌(菌株编号: ATCC 12228)。

图 2 金黄色葡萄球菌实时荧光 PCR 扩增结果图

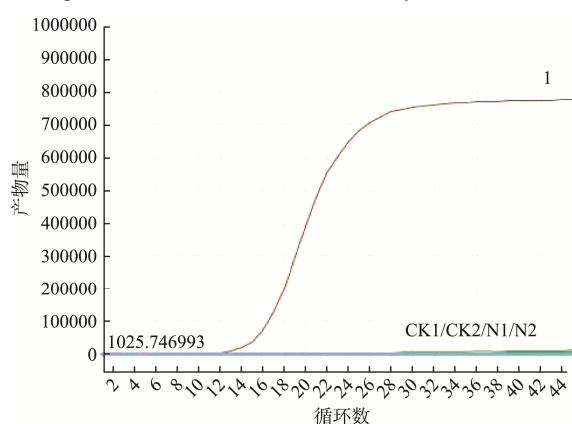
Fig.2 Real-time fluorescence PCR assay of *Staphylococcus aureus*



注: 1: 鼠伤寒沙门氏菌(菌株编号: CGMCC 1.1174); 2: 伤寒沙门氏菌(菌株编号: FSCC215009); 3: 甲型副伤寒沙门氏菌(菌株编号: FSCC215005); CK1: 空白对照; CK2: 扩增试剂空白对照; N: 阴性对照大肠埃希氏菌(菌株编号: ATCC11229)。

图 3 沙门氏菌实时荧光 PCR 扩增结果

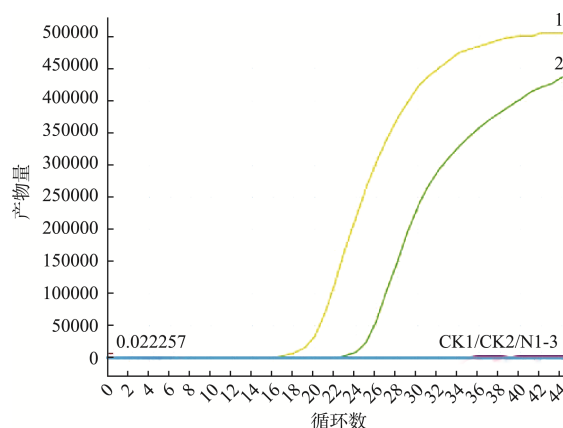
Fig.3 Real-time fluorescence PCR assay of *Salmonella*



注: 1: 副溶血性弧菌(菌株编号: ATCC17802); CK1: 空白对照; CK2: 扩增试剂空白对照; N1: 阴性对照创伤弧菌(菌株编号: ATCC27562); N2: 阴性对照溶藻弧菌(菌株编号: ATCC33787)。

图 4 副溶血性弧菌实时荧光 PCR 扩增图

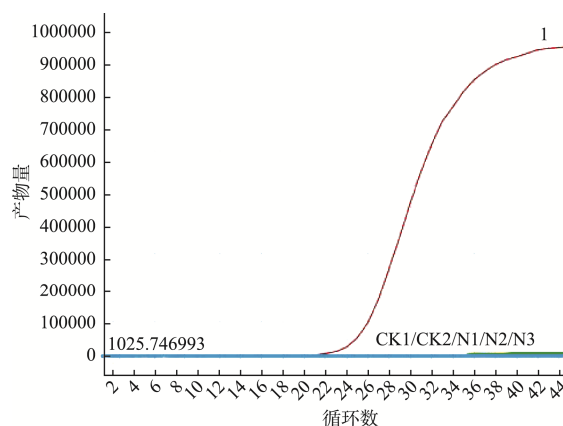
Fig.4 Real-time fluorescence PCR assay of *Vibrio parahaemolyticus*



注: 1: 单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株(菌株编号: ATCC 19115); 2: 单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株(菌株编号: CMCC 54002); CK1:空白对照; CK2: 扩增试剂空白对照; N1: 阴性对照斯氏李斯特菌(菌株编号: ATCC 35967); N2: 阴性对照伊氏李斯特菌(菌株编号: ATCC 19119); N3: 阴性对照英诺克李斯特菌(菌株编号: ATCC 33090)。

图 5 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光 PCR 扩增图

Fig.5 Real-time fluorescence PCR assay of *Listeria monocytogenes*



注: 1: 蜡样芽胞杆菌标准菌株(菌株编号: ATCC 14579); CK1: 空白对照; CK2: 扩增试剂空白对照; N1: 阴性对照苏云金芽胞杆菌(菌株编号: ATCC 10792); N2: 阴性对照蕈状芽胞杆菌(菌株编号: ATCC 13124); N3: 阴性对照蕈状芽胞杆菌(菌株编号: CICC 21473)。

图 6 蜡样芽胞杆菌实时荧光 PCR 扩增图

Fig.6 Real-time fluorescence PCR assay of *Bacillus cereus*

菌 1%、沙门氏菌 1%。通过数据分析与比较, 蔬菜、肉类、蛋类、真空包装熟食、奶制品、快餐原料中病原菌的检出率较高, 需要重点加以关注。

2.5 方法比对实验结果

本研究将 3 种病原菌检测方法, 包括 PMA-PCR 法、传统的微生物培养法以及自动生化鉴定仪器法进行方法比对, 具体结果见表 7。对于采用 PMA-PCR 检出病原菌的样本以及阴性样本同时用微生物培养法以及自动生化鉴定法进行方法比对, 比对结果完全一致, 充分说明本研究方法准确稳定。

表 6 不同类别冷链食品中病原菌阳性数与阳性率						
Table 6 Positive number and positive rate of pathogenic bacteria in different categories of cold chain food						
样品类型	样品数(份) (阳性率/%)	蜡样芽胞杆菌 (阳性率/%)	副溶血性弧菌 (阳性率/%)	金黄色葡萄球菌 (阳性率/%)	单核细胞增生李斯特氏菌 (阳性率/%)	沙门氏菌 (阳性率/%)
蔬菜	58 (12)	7 (12)	0	0	0	0
肉类	75 (16)	4 (5)	0	5 (7)	2 (3)	1 (1)
蛋类	13 (15)	0	0	1 (8)	0	1 (8)
海鲜水产	121 (5)	0	6 (5)	0	0	0
速冻食品	293 (4)	13 (4)	0	0	0	0
真空包装熟食	35 (11)	0	3 (9)	0	1 (3)	0
冰淇淋	32 (6)	0	0	1 (3)	0	1 (3)
奶制品	36 (17)	3 (8)	0	1 (3)	1 (3)	1 (3)
快餐原料	104 (10)	4 (4)	1 (1)	5 (5)	0	0
合计	751 (8.3)	31(4)	10 (1)	13 (2)	4 (1)	4 (1)

表 7 方法比对实验结果			
Table 7 Method comparison test results			
病原菌类型	PMA-qPCR 法	微生物法	自动生化鉴定仪器法
检出(+)			
金黄色葡萄球菌	阳性(+)	金黄色葡萄球菌在 BP 平板上的菌落呈圆形, 表面光滑、凸起、湿润, 灰黑色或黑色, 有光泽, 常有浅色的边缘, 周围绕有不透明圈; 金黄色葡萄球菌显色平板的菌落形态为紫红色、圆形、光滑湿润。	阳性(+) (金黄色葡萄球菌, 96%可能性)
检出(+)			
沙门氏菌	阳性(+)	沙门氏菌在沙门氏菌显色平板上呈现紫红色; 在 HE 琼脂菌落为蓝绿色, 中心为黑色。	阳性(+) (沙门氏菌, 97%可能性)
检出(+)			
蜡样芽胞杆菌	阳性(+)	蜡样芽胞杆菌在甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP)上菌落呈 粉红色, 周围有白色的沉淀环, 菌落呈圆形, 蜡状, 边缘不整齐。	阳性(+) (蜡样芽胞杆菌, 95%可能性)
检出(+)			
副溶血性弧菌	阳性(+)	副溶血性弧菌在 TCBS 培养基上菌落呈圆形, 翠绿色, 边缘整齐、湿润、半透明; 在弧菌显色培养基上菌落为中心点紫红色, 边缘白色。	阳性(+) (副溶血性弧菌, 94%可能性)
检出(+)			
单核细胞增生李斯特氏菌	阳性(+)	单核细胞增生李斯特氏菌在 PALCAM 琼脂平板为灰绿色菌落, 周围有一黑色外环; 在李斯特氏菌显色平板为蓝色菌落, 菌落周围有一不透明环。	阳性(+) (单核细胞增生李斯特氏菌, 99%可能性)
未检出病原菌的 阴性样本	阴性(-)	未检出(-)	阴性(-)

2.6 冷链食品中所分离金黄色葡萄球菌野生菌株分子进化树构建与溯源分析

本研究从超市中随机抽取速冻肉制品中分离到一株金黄色葡萄球菌, 通过对该菌进行分离培养、生化鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析获得该菌较为详尽的信息, 为了溯源分析该菌株污染途径, 前往检出该菌株的肉类生产企业 A, 按照生产工艺流程对于企业 A 生产加工的关键几个节点进行了抽样调查, 之后回到实验室后进行检测分析, 在企业 A 原料车间以及生产线多点(自编号分别为 YS-NL-5, YS-NL-6,

YS-NL-13, YS-NL-14, YS-NL-17, YS-NL-20, YS-NL-43, YS-NL-44)都检测出金黄色葡萄球菌, 阳性菌株均测序, 测序结果用于构建生物进化树比较菌株之间的亲缘关系。

同期, 本研究在水产市场中随机抽取的冷鲜双壳贝类水产品中检测出金黄色葡萄球菌, 通过对检出金黄色葡萄球菌的水产品冷链运输环节进行采样, 发现自编号为 YS-6, YS-12, YS-27, YS-28, YS-41 的试样也检测出金黄色葡萄球菌, 阳性菌株均测序, 测序结果用于构建生物进化树比较菌株之间的亲缘关系, 具体结果见图 7。

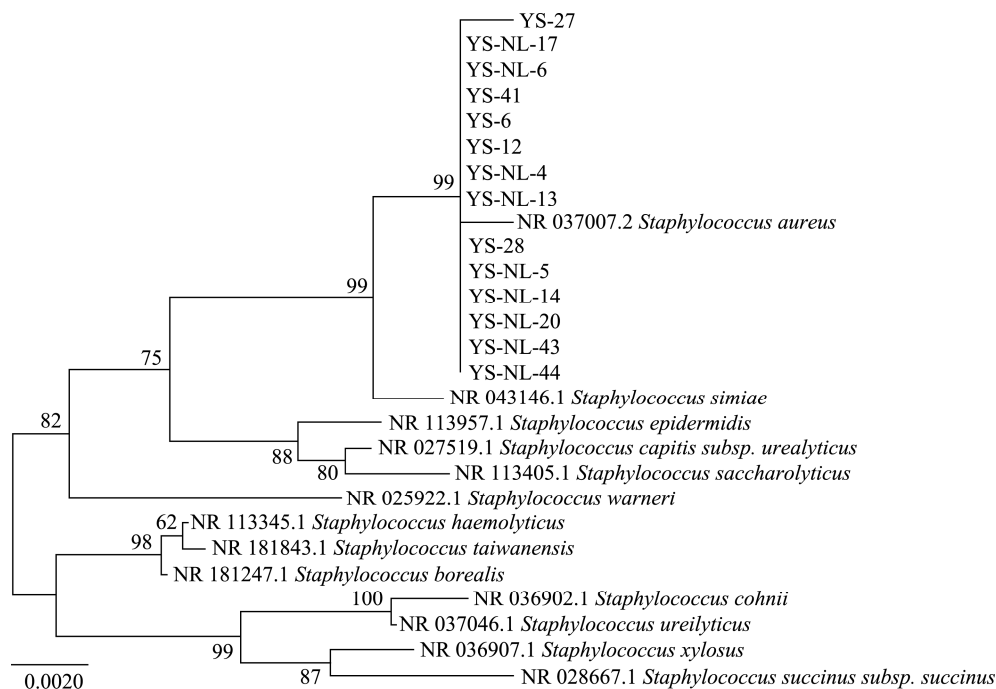


图 7 葡萄球菌属分子生物进化树

Fig.7 Phylogenetic tree analysis of *Staphylococcus* spp.

通过构建金黄色葡萄球菌分子进化树可以看出,所有菌株根据在进化树中的分布主要分为 4 大分支,本研究分离得到的自编号为 YS 以及 YS-NL 共 14 株金黄色葡萄球菌野生菌株与 NR 037007.2 *Staphylococcus aureus* 聚类到一支,均为金黄色葡萄球菌,与 NR 043146.1 *Staphylococcus simiae* (金猿葡萄球菌)集中分布一支。葡萄球菌属中的 NR 113957.1 *Staphylococcus epidermidis* (表皮葡萄球菌)、NR 027519.1 *Staphylococcus capitis* (头状葡萄球菌)与 NR 113405.1 *Staphylococcus saccharolyticus* (解糖葡萄球菌)集中分布一支。NR 181247.1 *Staphylococcus borealis* (北极葡萄球菌)、NR 113345.1 *Staphylococcus haemolyticus* (溶血葡萄球菌)、NR 181843.1 *Staphylococcus taiwanensis* (台湾葡萄球菌)集中分布一支。NR 036902.1 *Staphylococcus cohnii* (科氏葡萄球菌)、NR 036907.1 *Staphylococcus xylosus* (木糖葡萄球菌)、NR 028667.1 *Staphylococcus succinus* (琥珀葡萄球菌)与 NR 037046.1 *Staphylococcus ureilyticus* (溶尿葡萄球菌)集中分布一支。

通过葡萄球菌属分子生物进化树构建,可以清晰看到各菌株之间的亲缘关系,并成功溯源所分离金黄色葡萄球菌野生菌株的种属分类与地位。本研究分离的金黄色葡萄球菌与 NCBI 编号为 NR 037007.2 *Staphylococcus aureus* 各菌株之间的同源性达到 99%,充分说明金黄色葡萄球菌 16S rRNA 基因序列高度保守,适合作为葡萄球菌属特别是金黄色葡萄球菌的种属鉴定关键基因。另外,研究通过检出金黄色葡萄球菌的食品样品为分析源头追溯样品生产加工流程,通过前往食品加工企业按生产工艺进行多点采样溯源分析,最终发现

冷链食品中金黄色葡萄球菌污染主要集中于生产企业原料车间以及加工后的冷链食品储运环节,在这两个环节金黄色葡萄球菌检出率较高,这充分暴露出相关生产企业在原料验收方面把关不足,将带菌的原料带入车间,通过简单的消杀无法彻底清除金黄色葡萄球菌污染。此外,当冷链食品如速冻肉制品生产加工完成后,在成品库抽样时发现企业未能有效控制冷库或者冰柜温度,不能满足产品标签明示储存温度(如 -18°C)储存要求,且在产品到超市或者农贸市场的储存运输环节中缺乏相应控制或者管理程序,导致金黄色葡萄球菌在储运环节大量繁殖,从而带来较高的食品安全风险。

综上,本研究对冷链食品中分离得到的金黄色葡萄球菌开展溯源分析,通过对企业原料车间、生产加工车间以及产品储运过程开展多点多批次的抽样调查分析,发现在原料验收与控制、食品储存与运输过程受金黄色葡萄球菌污染的机会较高,建议企业在原料验收环节加强微生物检测,同时在产品储运过程中建议购置实时监测温控装置,保证低温储运条件。本研究通过溯源分析找出污染来源,为冷链食品行业敲响警钟,帮助企业找到关键控制点,加强原料的验收把关,改进工艺,加强过程管理监控,提升最终产品质量,保障消费者食品安全。

2.7 冷链食品中副溶血性弧菌野生菌株分子进化树的构建

本研究将水产品中分离所得的副溶血性弧菌野生菌株进行测序分析,并将测序结果用于构建副溶血性弧菌分子进化树,具体结果见图 8。

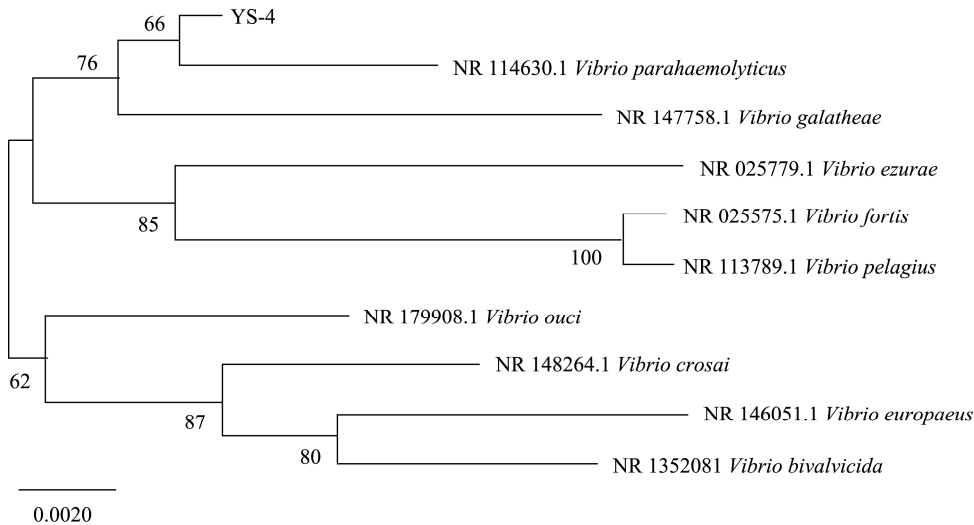


图 8 弧菌属分子生物进化树分析
Fig.8 Phylogenetic tree analysis of *Vibrio* spp.

通过进化树分析可以看出,所有菌株根据在进化树中的分布主要分为三大分支,本研究分离的副溶血性弧菌 YS-4 与 NCBI 中编号为 NR 114630.1 *Vibrio parahaemolyticus* (副溶血性弧菌)聚类到一支,与 NR 147758.1 *Vibrio galathea* (加拉特弧菌)集中分布一支。NR 025575.1 *Vibrio fortis* (富氏弧菌)、NR 113789.1 *Vibrio pelagius* (佩拉吉乌斯弧菌)聚类到一支,与 NR 025779.1 *Vibrio ezurae* (埃祖拉弧菌)集中分布一支。NR 146051.1 *Vibrio europaeus* (欧洲弧菌)与 NR 135208.1 *Vibrio bivalvicida* (双戎弧菌)聚类到一支,与 NR 148264.1 *Vibrio crosai* (克罗赛弧菌)、NR 179908.1 *Vibrio*

ouci (海大弧菌)集中分布一支。

2.8 冷链食品中所分离单核细胞增生李斯特氏菌野生菌株分子进化树构建与溯源分析

本研究将从冷鲜肉制品中分离得到的疑似单核细胞增生李斯特氏菌(自编号为 YS-NL-24, YS-NL-25, YS-42),通过对上述 3 株菌进行分离培养、生化鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析获得该菌较为详尽的信息,为了溯源分析该菌污染途径,本研究进一步将测序结果用于构建李斯特菌属生物进化树比较菌株之间的亲缘关系,具体结果见图 9。

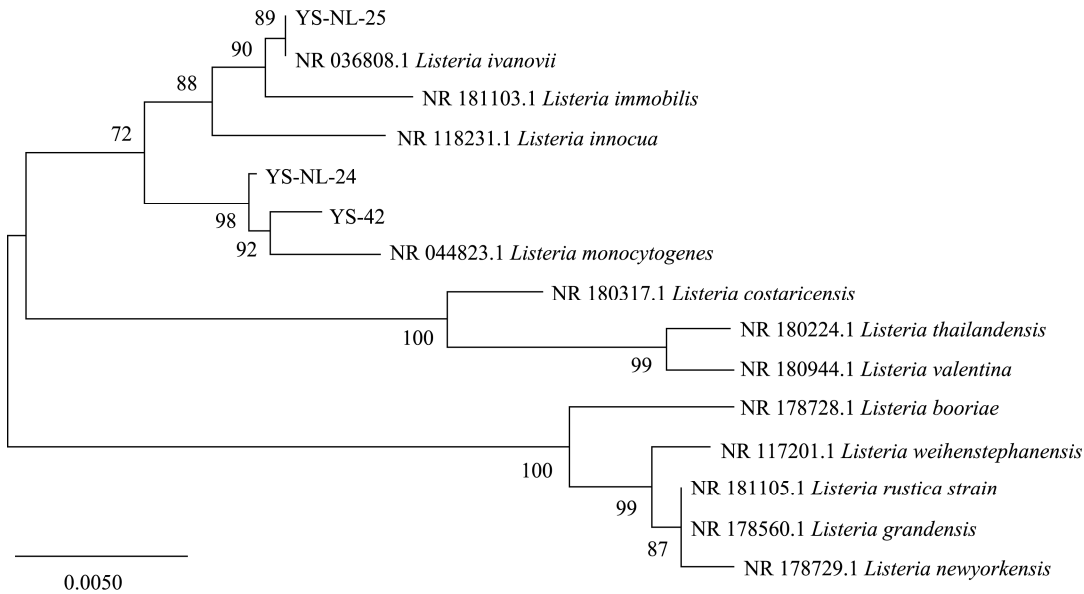


图 9 李斯特菌属分子生物进化树分析
Fig.9 Phylogenetic tree analysis of *Listeria* spp.

通过进化树分析可以看出,所有菌株根据在进化树中的分布主要分为 3 大分支,本研究分离的单核细胞增生李斯特氏菌野生菌株 YS-NL-24、YS-42 与 NCBI 中编号为 NR 044823.1 *Listeria monocytogenes*(单核细胞增生李斯特菌)聚类到一支,亲缘关系达到 98%。本研究从冷链样品中分离得到的 YS-NL-25 与 NR 118231.1 *Listeria innocua*(英诺克李斯特菌)聚类到一支,亲缘关系达到 90%,与 NR 036808.1 *Listeria ivanovii*(伊氏李斯特菌)、NR 181103.1 *Listeria immobilis*(固定李斯特菌)集中分布一支。NR 180224.1 *Listeria thailandensis*(泰国李斯特菌)与 NR 180944.1 *Listeria valentina*(瓦伦蒂娜李斯特菌)聚类到一支,与 NR 180317.1 *Listeria costaricensis*(肋骨李斯特菌)集中分布一支。NR 181105.1 *Listeria rustica*(乡村李斯特菌)与 NR 178560.1 *Listeria grandensis*(大李斯特菌)聚类到一支,与 NR 178729.1 *Listeria newyorkensis*(纽约李斯特菌)、NR 117201.1 *Listeria weihenstephanensis*(魏登施泰李斯特菌)、NR 178728.1 *Listeria booriae*(布里亚李斯特菌)集中分布一支。

值得特别注意的是 YS-NL-25 菌株经过微生物培养鉴定,初步鉴定为单核细胞增生李斯特氏菌,但后续通过进一步 qPCR 分析以及测序构建进化树,发现其属于英诺克李斯特氏菌。传统的微生物培养方法对于人员经验以及培养过程的监控要求非常高,且同一种属内基因重组较为常见,单从菌落形态以及颜色等区分不同病原菌非常容易带来假阳性结果,而通过基因测序的手段可以得到菌株最本质的遗传信息,结果更为准确可靠。

3 结 论

目前国内对于金黄色葡萄球菌等病原菌从分离、培养到鉴定一般需要 5~8 d 时间^[27-30]。本研究将 PCR 与 PMA 鉴定技术相结合,可在 18 h 内完成 5 种病原菌的高通量检测。其中高温裂解法提取 DNA 的方式所得 DNA 的质量可以满足后续 PCR 实验的要求,与其他 DNA 提取方法如试剂盒法相比,节约了大量的人力成本和时间耗材成本。

金黄色葡萄球菌是常见的食源性病原菌,其产生的肠毒素容易导致人群食物中毒^[31-36],本研究从农贸市场售卖的食品中分离得到了金黄色葡萄球菌,通过工厂以及冷链运输的抽样溯源分析又得到了多株金黄色葡萄球菌,通过构建生物进化树完成该菌的溯源分析工作,探究不同地区的金黄色葡萄球菌的进化与遗传演化关系,初步揭示了金黄色葡萄球菌在冷链食品加工,运输以及储运中的遗传进化规律,研究成果对于提升食品质量,守护食品安全等具有重要意义。

本研究未来将继续扩大采样范围以及采样数量,并将方法进一步应用于不同种类病原菌如沙门氏菌等的筛查

检测以及溯源分析中。研究方法可进一步扩展应用于面食制品、乳制品、肉制品等相关食品中病原菌的筛查检测,可进一步转化为试剂盒用于病原菌的快筛快检,具有较高的经济价值和推广价值。

参考文献

- [1] 张丽. 供应链视角下的后疫情时期食品安全风险管理[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 53-55, 170.
ZHANG L. Food safety risk management in the post-epidemic period from the perspective of supply chain [J]. Food Mach, 2020, 36(12): 53-55, 170.
- [2] 李学鹏, 励建荣, 李婷婷, 等. 冷杀菌技术在水产品贮藏与加工中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 173-179.
LI XP, LI JR, LI TT, et al. Application of cold sterilization technology in storage and processing of aquatic products [J]. Food Res Dev, 2011, 32(6): 173-179.
- [3] 李晓燕, 孟庆瑶, 赵宜范, 等. 生鲜食品冷链过程中消毒杀菌技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 414-418.
LI XY, MENG QY, ZHAO YF, et al. Research progress of disinfection and sterilization technology in cold chain process of fresh food [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(11): 414-418.
- [4] LIANG N, DONG J, LUO L, et al. Detection of viable Salmonella in lettuce by propidium monoazide real-time PCR [J]. J Food Sci, 2011, 76(4): M234-M237.
- [5] 陈茵茵, 周露, 丁清龙, 等. 2017 年广州市网络订餐食品卫生情况调查[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2935-2940.
CHEN YY, ZHOU L, DING QL, et al. A survey on food hygiene of online food ordering in Guangzhou [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 2935-2940.
- [6] 刘驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769-2788.
LIU C, LI JB, RUI JP, et al. Application of 16S rRNA gene in microbial ecology [J]. Acta Ecol Sin, 2015, 35(9): 2769-2788.
- [7] 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. Research progress on detection and analysis technology of foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Res Dev, 2013, 34(18): 110-115.
- [8] 姜侃, 张东雷, 金燕飞, 等. 四种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2011, 40(6): 761-764.
JIANG K, ZHANG DL, JIN YF, et al. Establishment of multiplex PCR detection methods for four foodborne pathogens [J]. Health Res, 2011, 40(6): 761-764.
- [9] 程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 5 种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 97-103.

- CHENG XY, LIU QH, HUANG J. Establishment of multiplex PCR detection methods for five foodborne pathogens [J]. Adv Fishery Sci, 2012, 33(2): 97–103.
- [10] JADHAV S, BHAVE M, PALOMBO EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes* [J]. J Microbiol Methods, 2012, 88(3): 327–341.
- [11] 李薇薇, 郭云昌, 占利, 等. 2017 年中国即食食品中单核细胞增生李斯特菌的分子流行病学特征 [J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(2): 175–180.
- LI WW, GUO YC, ZHAN L, *et al.* Molecular epidemiological characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in China in 2017 [J]. Chin J Prev Med, 2020, 54(2): 175–180.
- [12] 周威, 胡梁斌, 李红波, 等. 食物中食源性病原菌检测技术研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(9): 213–216.
- ZHOU W, HU LB, LI HB, *et al.* Research progress on detection technology of foodborne pathogens in food [J]. Food Res Dev, 2017, 38(9): 213–216.
- [13] 吴睿铭, 孙雨彤, 陆博涵, 等. 中国上海即食牛肉制品微生物污染情况的随机研究 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 296–305.
- WU RM, SUN YT, LU BH, *et al.* Random study on microbial contamination of ready-to-eat beef products in Shanghai, China [J]. Mod Food Sect Technol, 2017, 33(8): 296–305.
- [14] 刘明, 曹梦思, 彭雪菲, 等. 重大活动中食源性疾病的食品安全风险评估分级研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 657–665.
- LIU M, CAO MS, PENG XF, *et al.* Food safety risk assessment and grading of foodborne diseases in major events [J]. Chin J Food Hyg, 2021, 33(6): 657–665.
- [15] 谢卫红, 杨超波, 朱郁筱. 食品安全网络舆情的重复感染 SIR 模型研究 [J]. 系统工程学报, 2022, 37(2): 145–160.
- XIE WH, YANG CB, ZHU YX. Research on SIR model of repeated infection in food safety network public opinion [J]. J Systems Eng, 2022, 37(2): 145–160.
- [16] 於颖, 王文静, 陆晔. PMA-qPCR 定量检测畜禽肉类中沙门菌活菌的研究 [J]. 检验医学, 2015, 30(5): 500–506.
- YU Y, WANG WJ, LU Y. Quantitative detection of *Salmonella* viability in livestock and poultry meat by PMA-qPCR [J]. Lab Med, 2015, 30(5): 500–506.
- [17] 姚艳玲, 周宇东, 刘路强, 等. 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 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4258–4264.
- YAO YL, ZHOU YD, LIU LQ, *et al.* Rapid detection of five pathogenic bacteria in food by synchronous bacterial enrichment combined with real-time fluorescent polymerase chain reaction [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(13): 4258–4264.
- [18] 黄韵, 余以刚, 黄秀丽, 等. 单增李斯特菌非可培养状态的诱导与 PMA-qPCR 检测 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 137–140.
- HUANG Y, YU YG, HUANG XL, *et al.* Induction of non-cultureable state of *Listeria monocytogenes* and detection by PMA-qPCR [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(1): 137–140.
- [19] 柯振华. 餐饮食品中 6 病原菌叠氮丙啶-定量聚合酶链反应检测方法开发与检验数据分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 6855–6861.
- KE ZH. Development and analysis of detection method and analysis of quantitative polymerase chain reaction for 6 pathogenic bacteria in catering food [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(19): 6855–6861.
- [20] LI H, XIN H, LI SF. A multiplex PMA-qPCR assay with IAC for simultaneous detection of viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(24): 14249.
- [21] 朱健铭, 姜如金, 吴康乐, 等. 肺炎克雷伯菌单基因分子进化分析及多位点序列分型与基因组系统学研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(12): 2861–2864.
- ZHU JM, JIANG RJ, WU KL, *et al.* Molecular evolutionary analysis of single gene of *Klebsiella pneumoniae*, multi-locus sequence typing and genomic systematics [J]. Chin J Hospit Infectol, 2014, 24(12): 2861–2864.
- [22] RINN JL, CHANG HY. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81: 145–166.
- [23] PYDE AN, RAO PN, JAIN A, *et al.* Identification and characterization of foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* strain Pyde1 and Pyde2 using 16S rRNA gene sequencing [J]. J Pharm Res, 2013, 6(7): 736–741.
- [24] 鞠雯. 持续强化进口冷链食品风险防范 [J]. 中国质量监管, 2022, (2): 20.
- JU W. Strengthen the risk prevention of continuously imported cold chain food [J]. Chin Qual Superv, 2022, (2): 20.
- [25] ACETO M, MUSSO D, CALÀ E, *et al.* Role of lanthanides in the traceability of the milk production Chain [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(20): 4200–4208.
- [26] TECHANE-BOSONA GG. Food traceability as an integral part of logistics management in food and agricultural supply chain [J]. Food Control, 2013, 33(1): 32–48.
- [27] 贾欣. 食品安全检测中微生物检测技术的运用分析 [J]. 食品安全导刊, 2022, (15): 161–163.
- JIA X. Analysis on the application of microbial detection technology in food safety testing [J]. China Food Safety Magaz, 2022, (15): 161–163.
- [28] 刘驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用 [J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769–2788.
- LIU C, LI JB, RUI JP, *et al.* Application of 16S rRNA gene in microbial

- ecology [J]. *Acta Ecol Sin*, 2015, 35(9): 2769–2788.
- [29] 李霞, 高谦. 16S rRNA 基因序列分析在临床微生物学中的应用[J]. *微生物与感染*, 2006, 1(3): 184–186.
- LI X, GAO Q. Application of 16S rRNA gene sequence analysis in clinical microbiology [J]. *Microbiol Infect*, 2006, 1(3): 184–186.
- [30] 王友令, 袁小远, 孟凯, 等. 山东地区 10 株 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 和 NA 基因的遗传演化分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(4): 35–39.
- WANG YL, YUAN XY, MENG K, *et al*. Genetic evolution analysis of HA and NA genes of 10 H9N2 subtype avian influenza viruses in Shandong Province [J]. *Chin J Zoonot Infect Dis*, 2018, 26(4): 35–39.
- [31] 李伟华, 邵小艳. 食品安全检测中的微生物检测技术及其发展趋势[J]. *中国食品工业*, 2021, (14): 62–63.
- LI WH, SHAO XY. Microbial detection technology and its development trend in food safety testing [J]. *China Food Ind*, 2021, (14): 62–63.
- [32] 冯家望, 吴小伦, 黄云君. 食品中单核增生性李斯特菌的 PCR 快速检测研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(3): 234–237.
- FENG JW, WU XL, HUANG YJ. PCR rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Chin J Food Hyg*, 2005, 17(3): 234–237.
- [33] 遇晓杰, 薛成玉, 吕琦. 食品中 5 种致病菌多重 PCR 快速检测技术的建立与应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 9(21): 398–401.
- YU XJ, XUE CY, LV Q. Establishment and application of multiplex PCR rapid detection technology for five pathogenic bacteria in food [J]. *Chin J Food Hyg*, 2009, 9(21): 398–401.
- [34] HARRIS K. From a database of genomes to a forest of evolutionary trees [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(9): 1306–1307.
- [35] PEREZ-LOSADA M, ARENAS M, GALAN JC, *et al*. High-throughput sequencing (HTS) for the analysis of viral populations [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 80: 104208.
- [36] LU Y, YANG L, MENG J, *et al*. Microevolution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical, acute hepatopancreatic necrosis disease infecting shrimps, and aquatic production in China [J]. *Microbes Environ*, 2020, 35(2): ME19095.
- (责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



柯振华, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品分子生物学检验。
E-mail: iibio@163.com