文章编号:1008-1534(2024)02-0133-08

4 种常见食源性病原菌多重 PCR 检测技术研究

王 珊,王雁伟,高辉明,艾鹏飞

(河北科技大学食品与生物学院,河北石家庄 050018)

摘 要:为了解决常规方法检测食源性病原菌存在操作繁琐、周期长的问题,基于 4 种常见食源性病原菌特异基因序列扩增提出了一种快速、高效的多重 PCR(multiplex polymerase chain reaction,MPCR)检测方法。根据单增李斯特菌 *iap* 基因、蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因、产志贺毒素大肠埃希氏菌 *stx* Ⅰ 基因、肠炎沙门氏菌 *invA* 基因的特异序列分别设计引物后建立 MPCR 反应体系,测试其特异性、敏感性和可行性,并与国标培养法进行比较。结果表明:MPCR 扩增出 4 个目标基因的特异性条带大小依次为 371、221、432、171 bp;在 58 ℃的退火温度下,MPCR 扩增表现出良好的特异性,无非特异性扩增,4 种病原菌最低检出限达到 10^2 CFU/mL;MPCR 方法和国标培养法对多种食源性病原菌感染的牛奶样品的检测结果完全一致,检测周期由原来的 5～7 d 缩减到 8～9 h。所建立的 MPCR 技术作为一种快速、高效的检测方法,可为食品安全生产提供保障。

关键词:食品检验学;多重 PCR(MPCR);单增李斯特菌;蜡样芽孢杆菌;产志贺毒素大肠埃希氏菌;肠炎沙门氏菌

中图分类号:TS207.4 **文献标识码**:A **DOI**:10.7535/hbgykj.2024yx02007

Study on multiple PCR detection techniques for four common foodborne pathogens

WANG Shan, WANG Yanwei, GAO Huiming, AI Pengfei

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: The method of efficient multiplex polymerase chain reaction (MPCR) was constructed based on the amplification of specific gene sequences of four common food borne pathogens in order to solve the problems of those traditional detection methods involving cumbersome operations and time consuming. The MPCR method was established using the designed primers according to the specific sequences of *iap* gene in *Listeria monocytogenes*, *gyrB* gene in *Bacillus cereus*, *stx* Ⅰ gene in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *invA* gene in *Salmonella enteritidis*, respectively. The specificity, the sensitivity and the feasibility of MPCR were analyzed, and it was compared with the national standard culture method. The results show that the specific bands of four target genes amplified by MPCR were 371, 221, 432 and 171 bp, respectively. Under the annealing temperature of 58 ℃, the MPCR presented strong specificity without non-specific amplification, and the lowest detection limit

收稿日期:2023-3-21;修回日期:2023-06-10;责任编辑:王海云

基金项目:河北省科技计划"奶业振兴重大技术创新专项"(19227137D);河北省大中学生科技创新专项(22E50074D)

第一作者简介:王 珊(1998—),女,河北廊坊人,硕士研究生,主要从事病原微生物检测方面的研究。

通信作者:艾鹏飞教授。E-mail: apf2002@sina.com

王珊,王雁伟,高辉明,等. 4 种常见食源性病原菌多重 PCR 检测技术研究[J]. 河北工业科技,2024,41(2):133-140.

WANG Shan, WANG Yanwei, GAO Huiming, et al. Study on multiple PCR detection techniques for four common foodborne pathogens[J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2024, 41(2): 133-140.

(LOD) of four pathogenic bacteria reached up to 10^2 CFU/mL. The two detecting results of the MPCR and the standard culture method were identical, and the detection period of MPCR was reduced to 8～9 h from that of traditional methods for 5～7 d. The constructed MPCR, as a rapid and efficient detecting method for food products in practice, provided guarantees for food safety.

Keywords: food inspection; multiplex PCR (MPCR); *Listeria monocytogenes*; *Bacillus cereus*; Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; *Salmonella enteritidis*

食品安全一直受到病原菌的威胁，由食源性病原菌引起的疾病呈上升趋势[1]。据统计，2021 年中国爆发食源性疾病事件 5 493 起，累计发病 32 334 人、死亡 117 人[2]。单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌是 4 种常见的食源性病原菌。其中：单增李斯特菌引起的李斯特菌病被认为是世界范围内主要的食源性疾病之一，致死率可达 20%～30%[3]；蜡样芽孢杆菌有很强的耐逆性，甚至在加热的条件下也不会死亡[4]，严重时可导致肝性脑病、急性肝脏衰竭等疾病[5]；产志贺毒素大肠埃希氏菌易侵染肉类、蔬菜、生鲜奶等食品，误食后对人体造成严重伤害[6]；肠炎沙门氏菌是位于引起食物中毒事件全球榜首的病原菌[7-8]。因此，为了有效预防和控制食源性疾病的发生，亟需建立起快速高效的食源性病原菌检测体系。

目前的食源性病原菌检测采用传统的微生物培养检测方法，存在过程繁琐、周期长、成本高、通量小等缺点[9-12]。基于特异性片段扩增的 PCR 检测法具有操作简单、用时少、通量高等优点[13]。多重 PCR 检测可以实现在同一 PCR 反应体系中同时对多种病原菌分析，可极大缩短检测时间，提高检测效率[14-16]。姜华等[17]利用多重 PCR 方法实现了婴幼儿奶粉中 3 种食源性致病菌的检测；SHI 等[18]利用多重 PCR 技术成功检测出牛奶中的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单核细胞增生李斯特菌。但是截至目前，对单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌等 4 种食源性病原菌的多重 PCR 检测方法的研究鲜见报道。

本文根据上述 4 种病原菌的特异基因设计引物，构建多重 PCR 体系，并验证其实用性，以期实现一次性检测 4 种食源性致病菌，为食品安全提供更加快速高效的检测技术。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌 种

实验菌株见表 1，分别购自中国医学细菌保藏中心、中国工业微生物菌种保藏中心、美国标准菌种收藏所，保藏于河北科技大学食品与生物学院遗传工程实验室。

表 1 实验菌株

Tab. 1 Strains for experiments

序号	菌株名称	菌株编号	来 源
1	单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)	CMCC 54001	中国医学细菌保藏中心
2	蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)	CICC 21290	中国工业微生物菌种保藏中心
3	产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)	CICC 10670	中国工业微生物菌种保藏中心
4	肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)	CICC 21482	中国工业微生物菌种保藏中心
5	金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	CICC 21600	中国工业微生物菌种保藏中心
6	空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)	ATCC 33291	美国标准菌种收藏所
7	表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)	CMCC 26069	中国医学细菌保藏中心
8	副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)	CICC 21617	中国工业微生物菌种保藏中心
9	阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)	ATCC 51024	美国标准菌种收藏所
10	苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)	CICC 22945	中国工业微生物菌种保藏中心
11	枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)	CICC 10002	中国工业微生物菌种保藏中心
12	福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)	CICC 10865	中国工业微生物菌种保藏中心
13	痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)	CMCC 51335	中国医学细菌保藏中心
14	铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)	CICC 21636	中国工业微生物菌种保藏中心
15	荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)	CICC 21624	中国工业微生物菌种保藏中心
16	藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)	ATCC 9341	美国标准菌种收藏所
17	蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)	CICC 21473	中国工业微生物菌种保藏中心
18	粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)	CICC 23658	中国工业微生物菌种保藏中心
19	弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)	ATCC 43864	美国标准菌种收藏所
20	无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)	ATCC13813	美国标准菌种收藏所

1.1.2　试　剂

2×Rapid Taq Master Mix，南京诺赞维生物科技有限公司提供；50×TAE Buffer，上海宇牧博生物科技有限公司提供；琼脂凝胶提取试剂盒，Omega 公司提供；pTOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒，艾德莱生物科技有限公司提供；细菌基因组 DNA 提取试剂盒、D2000 Plus DNA Marker、50 bp DNA Ladder、大肠杆菌 DH5α，均由天根生化科技有限公司提供；琼脂糖、琼脂粉、蛋白胨、酵母粉及其他国产分析纯试剂，均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；双蒸水（ddH_2O），实验室自制。

1.2　仪器与设备

Veriti 型 PCR 热循环仪，美国 ABI 公司提供；DYY-6D 型电泳仪，北京六一生物科技有限公司提供；Gel Doc XR 凝胶成像系统，美国 Bio-Rad 公司提供；UV-1700 型紫外分光光度计，上海元析仪器有限公司提供；QL-901 型旋涡混合仪，海门其林贝尔仪器制造有限公司提供；DS-11 型超微量核酸测量仪，美国 DeNovix 公司提供。

1.3　实验方法

1.3.1　实验准备

将表 1 中的菌株划线接种在 LB 固体培养基上，置于 37 ℃培养箱中培养过夜。用接种环挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中摇床过夜培养，培养温度为 37 ℃，转速为 180 r/min。取 2 mL 菌悬液于 2 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 2 min，弃上清液提取菌体 DNA 作为 PCR 模板。菌体 DNA 的提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行，采用超微量分光光度计进行 DNA 浓度和纯度测定后，用超纯水稀释至 100 ng/μL，−20 ℃保存备用。

在 GenBank 数据库中搜寻单增李斯特菌 *iap* 基因、蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因、产志贺毒素大肠埃希氏菌 *stx* Ⅰ 基因和肠炎沙门氏菌 *invA* 基因的序列，通过 BLAST 软件同源比对分析靶基因的特异性序列后，应用生物信息学软件 Primer 5.0 设计扩增产物长度不同的 4 对引物，委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。引物序列及扩增产物长度见表 2。

表 2　靶基因的引物序列

Tab.2　Primers designed for target gene

菌　株	靶基因	引物序列（5'−3'）	扩增长度/bp
单增李斯特菌	*iap*（NC_003210.1）	F：GCACTTGAATTGCTGTTATTG R：CAAACTGCTAACACAGCTACT	371
蜡样芽孢杆菌	*gyrB*（NC_011725.1）	F：GCCCTGGTATGTATATTGGATCTAC R：GGTCATAATAACTTCTACAGCAGGA	221
产志贺毒素大肠埃希氏菌	*stx* Ⅰ（NC_004913.3）	F：CAGTTGATGTCAGAGGGATAGA R：CAGCAGTCATTACATAAGAACG	432
肠炎沙门氏菌	*invA*（NC_003197.2）	F：GACGATAACAGCATCGTATTGTT R：CTCTTCATGCGTTACCCAGAA	171

1.3.2 单重 PCR 体系建立

用表 2 中的引物分别对 4 种病原菌进行单重 PCR 扩增。PCR 反应体系（20 μL）：2×Rapid Taq Master Mix 10 μL，上、下游引物（10 μmol/L）各 0.8 μL、模板 DNA（100 ng/μL）0.5 μL，ddH_2O 补足至 20 μL。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 15 s，58 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 25 s，32 个循环；72 ℃延伸 5 min。PCR 产物经 3%（质量分数，下同）琼脂糖凝胶对电泳后，在凝胶成像仪下观察并拍照。采用 Omega 胶回收试剂盒进行目的条带回收，回收的片段连接到 pTOPO-Blunt 载体上，并转入到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，37 ℃过夜培养，选取阳性克隆寄送擎科生物科技有限公司（北京）测序，比对分析 PCR 扩增的序列。

1.3.3　PCR 引物特异性检测

单增李斯特菌引物特异性鉴定方法：分别以单增李斯特菌 DNA、单增李斯特菌和 19 种非目标菌株的 DNA、19 种非目标菌株 DNA 以及 ddH_2O 为模板，采用单增李斯特菌 *iap* 基因引物进行 PCR 扩增，反应体系与程序同 1.3.2 项，扩增产物经 3%琼脂糖凝胶电泳分析。同样的方法分别对蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌的引物特异性进行鉴定。

1.3.4　多重 PCR 退火温度优化

用设计的引物进行多重 PCR 退火温度优化试验。反应体系：2×Rapid Taq Master Mix 10 μL，10 μmol/L 上、下游引物各 0.8 μL，细菌 DNA 各 0.5 μL，ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 15 s，退火 20 s，梯度设置退火温度，分别为 50、52、54、56、58、60 ℃，72 ℃延伸 25 s，32 个循环；72 ℃再延伸 5 min。PCR 扩增产物经 3%琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系

统观察，4 条目的条带都清晰明亮时的温度为最佳退火温度。

1.3.5 多重 PCR 引物浓度优化

当多对引物进行多重 PCR 扩增时，由于引物间彼此干扰会出现条带亮度不一的现象。引物浓度过低时目标条带暗淡，引物浓度过高时目标条带过于明亮而弥散，故对多重 PCR 引物浓度优化实验中的引物用量进行优化。反应体系：2× Rapid Taq Master Mix 10 μL、10 μmol/L 引物的用量按照表 3 进行正交试验设计，细菌 DNA 各 0.5 μL，ddH_2O 补足至 20 μL。多重 PCR 反应程序同 1.3.4 项。PCR 扩增产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系统观察结果，以确定反应体系中的最佳引物浓度。

表 3 引物浓度优化的 4 因素 3 水平正交试验设计

Tab. 3 Orthogonal experiment of four factors and three levels for optimization of primer concentration

组合号	引物的加入量/μL			
	iap	*gyrB*	*stx I*	*invA*
1	0.6	0.6	0.6	0.6
2	0.6	0.8	0.8	0.6
3	0.6	1.0	1.0	1.0
4	0.8	0.6	0.8	1.0
5	0.8	0.8	1.0	0.6
6	0.8	1.0	0.6	0.8
7	1.0	0.6	1.0	0.8
8	1.0	0.8	0.6	1.0
9	1.0	1.0	0.8	0.6

1.3.6 多重 PCR 灵敏度分析

经过夜培养的 4 种菌液采用平板计数法计数，单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌的浓度依次为 2.3×10^7、2.6×10^7、4.2×10^7 和 3.7×10^7 CFU/mL，对其进行连续的 10 倍梯度稀释，直至每种菌液都建立 8 个梯度浓度（$10^0\sim10^7$ CFU/mL），提取各稀释梯度菌液的 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增试验。扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳后，依据电泳图谱来分析多重 PCR 扩增灵敏度，确定最低检出限。

1.3.7 多重 PCR 应用可行性评估

从市场上购买伊利纯牛奶、安慕希酸奶、开菲尔酸奶、娃哈哈 AD 钙奶，分别采用国标微生物培养法检测均无细菌污染。基于 1.3.6 项多重 PCR 最低检出限的结果，采用梯度稀释的单增李斯特菌（10^3 CFU/mL）、蜡样芽孢杆菌（10^3 CFU/mL）、产志贺毒素大肠埃希氏菌（10^2 CFU/mL）和肠炎沙门氏菌（10^3 CFU/mL）的菌液各取 0.5 mL 分别加到 8 mL 上述 4 种奶制品中，提取 DNA 进行多重 PCR 检测。实验重复 3 次，以评估其稳定性。

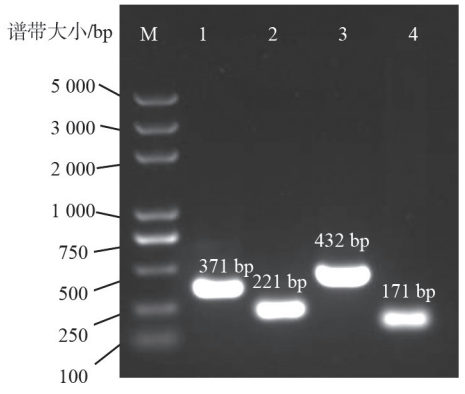
1.3.8 多重 PCR 检测方法与国标法比较

中国食品中致病菌检测的经典方法是“国标法”[19]。为了验证多重 PCR 检测方法的准确性，利用多重 PCR 检测方法和《食品安全国家标准 食品微生物学检验》[20-23] 分别对不同的人工接种牛奶样品（样品中各种致病菌浓度为 10^2 CFU/mL）进行检测。

2 结果与分析

2.1 单重 PCR 检测结果分析

采用表 2 中靶基因的引物分别对各自的目标菌进行单重 PCR 检测试验，结果见图 1，每一对引物都扩增出 1 条清晰明亮的谱带，大小分别为 371、221、432、171 bp。扩增的条带经纯化回收、重组克隆、测序和比对分析，结果发现扩增的片段与 GenBank 数据库中序列完全一致，表明针对靶基因序列设计的引物是正确可靠的，可用于后续的多重 PCR 检测实验。



注：M 为 D2000 Plus DNA Marker；1～4 分别代表单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌。

图 1 目标菌的 PCR 扩增

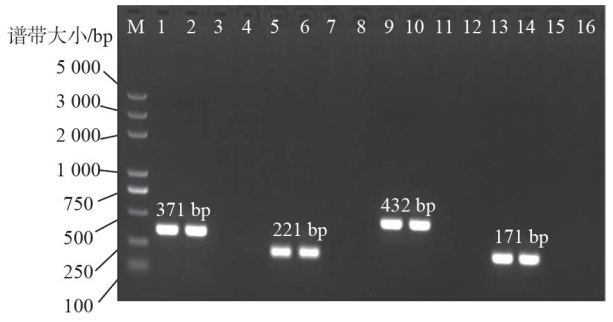
Fig. 1 PCR amplification for genomes of target bacteria

2.2 引物特异性检测结果分析

采用表 1 中的引物分别对 4 种目标菌、目标菌和 19 种非目标菌的混合液、19 种非目标菌的混合液、ddH_2O 进行 PCR 扩增，扩增产物经 3% 凝胶电泳，结果如图 2 所示，添加有目标菌 DNA 的 PCR 反应中均能扩增出目的条带（泳道 1、2、5、6、9、10、13、14），大小分别为 371、221、432、171 bp，而对非目标菌和 ddH_2O 都没有扩增出任何条带，说明设计的 4 对引物只对目标菌的靶基因序列具有特异性扩增，可以用于目标菌的 PCR 检测。

2.3 多重 PCR 退火温度的优化结果分析

在多重 PCR 反应中，由于不同引物的长度存在差异和彼此间易出现互补错配，因此退火温度的设

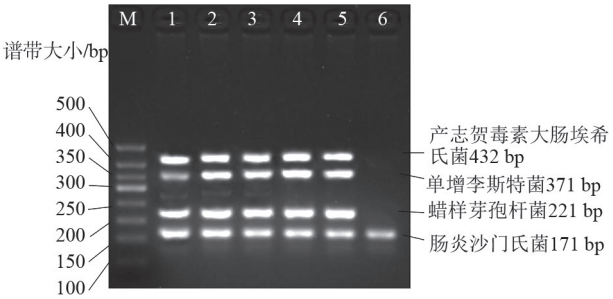


注：M 为 D2000 Plus DNA Marker；1～4 分别代表单增李斯特菌、单增李斯特菌＋19 种非目标菌、19 种非目标菌、ddH_2O；5～8 分别代表蜡样芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌＋19 种非目标菌、19 种非目标菌、ddH_2O；9～12 分别代表产志贺毒素大肠埃希氏菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌＋19 种非目标菌、19 种非目标菌、ddH_2O；13～16 分别代表肠炎沙门氏菌、肠炎沙门氏菌＋19 种非目标菌、19 种非目标菌、ddH_2O。

图 2　引物特异性检测

Fig. 2　Specific testing of the primers

定尤为重要，退火温度过高抑制引物与模板链的结合导致扩增效率降低，退火温度过低引起引物错配而产生非特异性扩增[24]。不同温度下的多重 PCR 扩增结果如图 3 所示，当退火温度较低时（50、52、54 ℃）扩增出的单增李斯特菌目的条带模糊不清（泳道 1）或产生非特异性条带（泳道 1、2、3）；退火温度过高时（60 ℃）只有沙门氏菌扩增出条带，其他 3 种致病菌都没有扩增出目的条带（泳道 6）；退火温度为 56 或 58 ℃时，4 种病原菌都扩增出清晰明亮的特异性条带，且没有出现非特异性扩增（泳道 4、5）。考虑到 PCR 检测时较高的温度更能保证靶标基因序列扩增的特异性，选取 58 ℃的退火温度用于后续的多重 PCR 扩增。



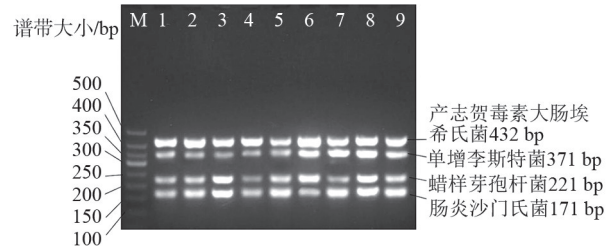
注：M 为 50 bp DNA Ladder；1～6 分别代表退火温度 50、52、54、56、58、60 ℃。

图 3　不同退火温度的多重 PCR 扩增结果

Fig. 3　Multiplex PCR amplification at different annealing temperatures

2.4　多重 PCR 引物浓度的优化结果分析

在多重 PCR 反应体系中，由于不同引物彼此间的相互干扰导致与模板链结合的难易程度存在差异，因此需要对各引物的浓度进行优化[25]。不同引物浓度正交试验设计[$L_9(3^4)$]（见表 3）的结果如图 4 所示，9 种组合都能特异性地扩增出目的条带，没有非特异性扩增现象的出现，说明本试验中设计的引物不仅与靶基因序列互补结合能力强，且彼此间干扰程度低，适用于多重 PCR 扩增。基于综合分析，表 3 组合号 8 中扩增出来的 4 条特异性条带都清晰明亮，相较与其他组合效果最优。因此，在 20 μL 的多重 PCR 反应体系中，4 种原始浓度均为 10 μmol/L 的引物最佳用量组合：单增李斯特菌 *iap* 基因、蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因、产志贺毒素大肠埃希氏菌 *stx* Ⅰ基因、肠炎沙门氏菌 *invA* 基因的引物添加量依次为 1.0、0.8、0.6、1.0 μL。



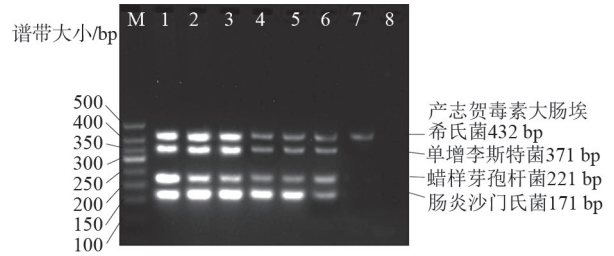
注：M 为 50 bp DNA Ladder；1～9 分别为表 3 中的组合号 1～9。

图 4　不同引物浓度的多重 PCR 扩增结果

Fig. 4　Multiplex PCR amplification for different primer concentrations

2.5　多重 PCR 灵敏度结果分析

8 个梯度浓度（10^0～10^7 CFU/mL）的 4 种病原菌多重 PCR 扩增结果如图 5 所示，检测灵敏度不完全一样，单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌、肠炎沙门氏菌的最低检出限依次为 2.3×10^2、2.6×10^2、4.2×10^1、3.7×10^2 CFU/mL。



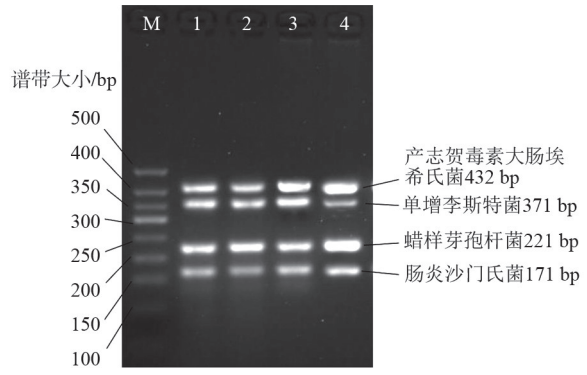
注：M 为 50 bp DNA Ladder；1～8 为菌液浓度分别为 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1、10^0 CFU/mL。

图 5　不同浓度梯度下多重 PCR 扩增结果

Fig. 5　Multiplex PCR amplification results under different concentration gradients

2.6　多重 PCR 检测可行性分析

采用建立的多重 PCR 技术对含有最低检出限浓度的 4 种致病菌的不同乳品进行检测，结果如图 6 所示，4 种样品均能扩增出 4 条大小与预期完全一致的特异性条带，没有出现非特异性条带，且单增李斯特



注：M 为 50 bp DNA Ladder；1～4 分别为人工接种的伊利纯牛奶、安慕希酸奶、开菲尔酸奶、娃哈哈 AD 钙奶。

图 6 多重 PCR 对人工接种乳品的检测结果

Fig. 6 Multiplex PCR detection of artificially inoculated dairy products

菌(10^3 CFU/mL)、蜡样芽孢杆菌(10^3 CFU/mL)、产志贺毒素大肠埃希氏菌(10^2 CFU/mL)和肠炎沙门氏菌(10^3 CFU/mL)均能检出，说明建立的多重 PCR 检测技术具有较好的特异性。3 次重复实验的结果完全一致，表明该体系具有良好的稳定性。可见，建立的多重 PCR 检测体系在乳品生产实践中对单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌等 4 种常见的病原菌进行安全检测是完全可行的。

2.7 多重 PCR 检测方法与国标法比较结果分析

采用建立的多重 PCR 检测方法和 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验》[20]、GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》[21]、GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》[22]、GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》[23]中菌株分离培养法分别对 8 份染菌的牛奶样品进行检测，结果如表 4 所示。由表可知，多重 PCR 检测方法和菌株分离培养法检测的结果完全一致，2 种方法的符合率为 100%。采用传统的菌株分离培养法，检测周期一般需要 5～7 d，而本文建立的多重 PCR 检测方法的检测周期仅需 8～9 h，极大地提高了检测效率。

表 4 多重 PCR 检测方法和菌株培养法检测染菌牛奶样品的结果比较

Tab. 4 Detection results of contaminated milks using MPCR and strain culture

添加的目标菌	菌液浓度/(CFU/mL)	四重 PCR 检测				国标法检测			
		LM	BC	SE	EC	LM	BC	SE	EC
LM	100	+	−	−	−	+	−	−	−
BC	100	−	+	−	−	−	+	−	−
SE	100	−	−	+	−	−	−	+	−
EC	100	−	−	−	+	−	−	−	+
LM+BC+SE	100	+	+	+	−	+	+	+	−
LM+SE+EC	100	+	−	+	+	+	−	+	+
LM+BC+EC	100	+	+	−	+	+	+	−	+
LM+BC+SE+EC	100	+	+	+	+	+	+	+	+

注：LM、BC、SE、EC 分别表示单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、肠炎沙门氏菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌；“+”表示检测结果为阳性，“−”表示检测结果为阴性。

3 讨 论

基于靶基因特异性引物的多重 PCR 扩增可以实现对食源性致病菌的安全检测。GERMINI 等[26]建立的三重 PCR 方法实现了对食品中大肠杆菌 O157：H7、鼠伤寒沙门氏菌和单增李斯特菌等 3 种致病菌的检测；胡冰雪等[27]成功构建了荧光假单胞菌、沙门氏菌和单增李斯特菌三重 PCR 检测技术体系。本文建立的食品生产实践中常见的单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌等 4 种病原菌的多重 PCR 检测方法，实现了在一个反应体系中同时扩增出 4 条标记目标菌遗传物质靶基因序列的特异性片段，相较于传统的微生物分离培养法和单重 PCR 检测方法极大地缩短了检测时间，提高了检测效率。此外，在建立四重 PCR 检测方法时，通过对每一种目标病原菌和 19 种非目标菌的特异性验证实验，证明了建立的多重 PCR 扩增体系具有良好的特异性。

最低检出限浓度是评价多重 PCR 检测方法的重要指标之一，理论上越低越好。在冯可等[15]建立的四重 PCR 检测方法中，致病菌最低检出限为 10^5 CFU/mL；李聪等[28]建立的四重 PCR 检测体系中检测限为 10^3 CFU/mL。本文建立的 4 种致病菌多重 PCR 检测体系的最低检出限可达到 10^2 CFU/mL。相较于前人建立的四重 PCR 检测方法表现出更高的灵敏度，这在一定程度上说明本文设计的特异性引物与靶基因序列具有良好的匹配性。此外，通过对人工接种病原菌的乳制品多重 PCR 检测以及与国标菌株分离培养法检测结果的比较，说明本文建立的多重 PCR 方法用于乳品中病

原菌检测是完全可行的，且检测周期由国标法的 5～7 d 缩减到 8～9 h。

4 结　语

本研究建立的多重 PCR 检测方法通过一次实验同时检测出 4 种食源性致病菌，为快速、高效检测乳品中常见病原菌提供了切实可行的技术手段，具体结论如下。

1）针对 4 种食源性致病菌的特异基因设计扩增片段大小不同、退火温度相似的特异引物，建立单重 PCR 检测体系并进行引物特异性验证，设计的 4 对引物只对目标菌的靶基因序列具有特异性扩增。

2）通过对多重 PCR 检测体系进行退火温度、引物浓度进行优化，发现：最佳退火温度为 58 ℃，单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌、肠炎沙门氏菌特异性引物最佳浓度依次为 0.5、0.4、0.3、0.5 μmol/L。在最优检测体系下，4 种病原菌最低检测限达到 10^2 CFU/mL。

3）分别采用建立的多重 PCR 检测体系和国标菌株分离培养法对多种食源性病原菌感染的牛奶样品进行检测，检测结果一致，且多重 PCR 检测体系的检测周期为 8～9 h，比国标法 5～7 d 的检测周期大大缩减。这表明建立的多重 PCR 检测体系完全适用于生产实践中对乳品安全的快速检测。

在乳品安全检测中，相较于传统的微生物分离培养法检测，多重 PCR 检测方法具有灵敏度高、耗时短、成本低等优势。但在多重 PCR 检测体系中，由于多对引物混在一起易造成假阳性扩增，故为了避免对检测结果的误判，需要对扩增的条带进行测序分析。当然，为了进一步提高检测效率，在建立的四重 PCR 检测方法的基础上进一步建立五重及其以上的多重 PCR 检测方法是后续研究的方向。

参考文献/References：

[1] ABDELHASEIB M U，SINGH A K，BHUNIA A K. Simultaneous detection of *Salmonella enterica*，*Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in food using a light scattering sensor [J]. Journal of Applied Microbiology，2019，126（5）：1496-1507.

[2] 李红秋，贾华云，赵帅，等. 2021 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，2022，34(4)：816-821.
LI Hongqiu，JIA Huayun，ZHAO Shuai，et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in Chinese Mainland in 2021 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene，2022，34(4)：816-821.

[3] 刘慧，曾祥权，谢文东，等. 食源性单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. 现代食品科技，2021，37(6)：333-344.
LIU Hui，ZENG Xiangquan，XIE Wendong，et al. Advances on detection techniques for foodborne *Listeria monocytogenes*[J]. Modern Food Science & Technology，2021，37(6)：333-344.

[4] 赵月明，任国谱. 乳制品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国乳品工业，2014，42(4)：46-49.
ZHAO Yueming，REN Guopu. Research improvement of *Bacillus cereus* in dairy products[J]. China Dairy Industry，2014，42(4)：46-49.

[5] 崔一芳，郑敏，丁双阳，等. 蜡样芽孢杆菌致吐毒素的毒性作用与生物合成研究进展[J]. 中国农业科学，2021，54(12)：2666-2674.
CUI Yifang，ZHENG Min，DING Shuangyang，et al. Advances of biosynthesis and toxicity of cereulide produced by emetic *Bacillus cereus*[J]. Scientia Agricultura Sinica，2021，54(12)：2666-2674.

[6] 杨焕蝶. 五种常见食源性病原微生物核酸标准样品的研究[D]. 济南：山东师范大学，2021.
YANG Huandie. Research on Nucleic Acid Reference Materials of Five Common Food-borne Pathogenie Microorganisms[D]. Jinan：Shandong Normal University，2021.

[7] WU Youxue，WU Meijiao，LIU Cheng，et al. Colloidal gold immunochromatographic test strips for broad-spectrum detection of *Salmonella*[J]. Food Control，2021，126：108052.

[8] YANG Tan，WU Bin，YUE Xianglin，et al. Rapid detection of *Salmonella* in milk with a nuclear magnetic resonance biosensor based on a streptavidin-biotin system and a polyamidoamine-dendrimer-targeted gadolinium probe[J]. Journal of Dairy Science，2021，104(2)：1494-1503.

[9] 李玉品. 食品微生物检验技术质量控制探究[J]. 现代食品，2021，27(2)：108-110.
LI Yupin. Exploring the quality control of food microbiological testing techniques[J]. Modern Food，2021，27(2)：108-110.

[10] TAO Jing，LIU Wanwan，DING Wei，et al. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens[J]. Journal of Food Science，2020，85(3)：744-754.

[11] JUNG J S，HAMACHER C，GROSS B，et al. Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures[J]. Journal of Clinical Microbiology，2016，54(11)：2820-2824.

[12] NYBAKKEN E J，OPPEGAARD O，GILHUUS M，et al. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry，refining the database for improved identification[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease，2021，99(1)：115207.

[13] KIM S Y，KIM M J，JUNG S K，et al. Development of a fast real-time PCR assay based on TaqMan probe for identification of edible rice grasshopper（*Oxya chinensis*）in processed food products[J]. Food Research International，2019，116：441-446.

[14] WANG Zhihao，ZUO Jiakun，GONG Jiansen，et al. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry [J]. AMB Express，2019，9(1)：185.

[15] 冯可，胡文忠，姜爱丽，等. 多重 PCR 法检测鲜切哈密瓜中 3 种食源性致病菌[J]. 食品科学，2017，38(6)：295-302.

FENG Ke, HU Wenzhong, JIANG Aili, et al. Establishment of multiplex PCR detection method for three foodborne pathogens on fresh-cut cantaloupe[J]. Food Science, 2017, 38(6): 295-302.

[16] LI Fan, LI Fulai, CHEN Baoqing, et al. Sextuplex PCR combined with immunomagnetic separation and PMA treatment for rapid detection and specific identification of viable *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovars *Paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella Enteritidis* in raw meat[J]. Food Contral, 2016, 73, Part B: 587-594.

[17] 姜华,焦阳,李远宏,等. 多重PCR检测婴幼儿配方奶粉中3种食源性致病菌[J]. 食品工业科技,2018,39(14):213-218.
JIANG Hua, JIAO Yang, LI Yuanhong, et al. Multiplex PCR for the detection of three foodborne pathogens in powdered infant formula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(14): 213-218.

[18] SHI Xiuquan, YU Liang, LIN Cui, et al. Biotin exposure-based immunomagnetic separation coupled with sodium dodecyl sulfate, propidium monoazide, and multiplex real-time PCR for rapid detection of viable *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(6): 6588-6597.

[19] 林玉双,蓝福胜,廖燕萍,等. 实时荧光PCR法和国标法检测乳粉中单增李斯特菌的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(24):9425-9429.
LIN Yushuang, LAN Fusheng, LIAO Yanping, et al. Comparative study for detection of *Listeria monocytogenes* by real-time fluorescent polymerase chain reaction and national standard method in milk powder[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9425-9429.

[20] GB 4789.30—2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].

[21] GB 4789.14—2014,食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验[S].

[22] GB 4789.4—2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].

[23] GB 4789.6—2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验[S].

[24] 杨梦婕,任佳,李洋,等. GeXP多重聚合酶链式反应法检测5种常见食源性致病菌[J]. 中国食品卫生杂志,2020,32(4):386-390.
YANG Mengjie, REN Jia, LI Yang, et al. Detection of 5 kinds of common foodborne pathogens by GeXP multiplex polymerase chain reaction[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(4): 386-390.

[25] 王如景,王羽,李英军,等. 双正交优化多重PCR检测食源性致病菌的研究[J]. 食品科技,2012,37(8):308-313.
WANG Rujing, WANG Yu, LI Yingjun, et al. Double orthogonal design to optimize multiplex PCR reaction system for detection of food-borne bacterial pathogens[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(8): 308-313.

[26] GERMINI A, MASOLA A, CARNEVALI P, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli O157 : H7*, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR[J]. Food Control, 2009, 20(8): 733-738.

[27] 胡冰雪,舒沿沿,潘道东,等. 荧光假单胞菌、沙门氏菌和单增李斯特菌多重PCR检测方法的建立[J]. 食品科学,2016,37(20):209-214.
HU Bingxue, SHU Yanyan, PAN Daodong, et al. A multiplex PCR method for simultaneous detection of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science, 2016, 37(20): 209-214.

[28] 李聪,刘健慧,李志辉,等. 4种食源性致病菌的多重PCR快速检测方法研究[J]. 食品研究与开发,2019,40(21):164-169.
LI Cong, LIU Jianhui, LI Zhihui, et al. Study on multiplex PCR of rapid detection method for four foodborne pathogens[J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 164-169.