

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241017003

引用格式: 范宏伟, 朱应飞, 翟平平, 等. 多重聚合酶链式反应-毛细管电泳技术检测5种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 180-186.

FAN HW, ZHU YF, ZHAI PP, *et al.* Detection of 5 kinds of foodborne pathogens by multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 180-186. (in Chinese with English abstract).

# 多重聚合酶链式反应-毛细管电泳技术检测 5种食源性致病菌

范宏伟\*, 朱应飞, 翟平平, 占忠旭, 唐小叶, 蔡玉霞

(江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院, 南昌 330200)

**摘要: 目的** 利用多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)-毛细管电泳技术, 构建一种快速检测沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的方法。

**方法** 针对5种食源性致病菌, 选择保守性较好的致病基因设计特异性多重PCR引物, 利用毛细管电泳成像分析多重PCR产物。通过对PCR及电泳条件进行优化, 建立5种食源性致病菌的多重PCR-毛细管电泳检测方法, 并对其特异性、灵敏度进行研究。**结果** 5对引物特异性良好, 均未出现非特异性扩增, 多重PCR最佳引物浓度为0.2 μmol/L, 最佳退火温度为56.0 °C, 毛细管电泳最佳分离模式为AM900, 灵敏度较高, 检测灵敏度可达到 $5 \times 10^{-3}$  ng/μL。**结论** 本研究建立的多重PCR-毛细管电泳方法用于检测5种食源性致病菌, 操作简便、特异性和灵敏度高, 在食源性致病菌检验中具有较好的实用价值。

**关键词:** 多重聚合酶链式反应; 毛细管电泳; 食源性致病菌; 检测方法

## Detection of 5 kinds of foodborne pathogens by multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis technology

FAN Hong-Wei\*, ZHU Ying-Fei, ZHAI Ping-Ping, ZHAN Zhong-Xu,  
TANG Xiao-Ye, CAI Yu-Xia

(Food Inspection and Testing Institute of Jiangxi General Institute for Testing and Certification, Nanchang 330200, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a rapid method for detecting *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio parahaemolyticus* using multiplex polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis technology. **Methods** Specific multiplex PCR primers were designed using conserved pathogenic genes of 5 kinds of foodborne pathogens, and the products were analyzed using capillary electrophoresis imaging. By optimizing the PCR reaction and electrophoresis conditions, a multiplex PCR capillary electrophoresis detection method was established. The specificity and sensitivity were studied as well. **Results** The specificity of the 5 pairs of primers was acceptable and no non-specific amplification occurred. The optimal primer

收稿日期: 2024-10-17

基金项目: 江西省市场监督管理局科技计划项目(GSJK202317)

第一作者/\*通信作者: 范宏伟(1989—), 男, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: hovyfan@qq.com

concentration for multiplex PCR reaction was 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , and the optimal annealing temperature was 56.0  $^{\circ}\text{C}$ . The optimal separation mode for capillary electrophoresis was AM900. The method had a high sensitivity, and the detection sensitivity could reach  $5 \times 10^{-3}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$ . **Conclusion** The multiplex PCR capillary electrophoresis method for detecting 5 kinds of foodborne pathogens established in this study is simple for operation with high specificity and sensitivity, and can be very practical in detection of foodborne pathogens.

**KEY WORDS:** multiplex polymerase chain reaction; capillary electrophoresis; foodborne pathogens; detection method

## 0 引言

目前共发现超过 200 种食源性疾病, 这些疾病对人类造成了难以估量的危害<sup>[1]</sup>。食源性致病菌是引起食源性疾病的重要因素之一, 其潜在的食品安全隐患不容忽视。在食源性致病菌检测方法中, 传统培养检测方法具有便于操作、成本较低及可分离单菌落用于后续实验等优点, 仍是主流检验方法<sup>[2]</sup>。然而, 传统培养方法也存在实验周期过长、分辨力及灵敏度低、部分菌株难分离导致假阴性等问题<sup>[3-6]</sup>。

多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术速度快、灵敏度高, 适用人工无法培养或者培养难度较大的微生物检测<sup>[7]</sup>。多重 PCR 是 PCR 的一种变体, 可以利用多对引物在同一反应中扩增多个目标序列, 不仅提升了检测效率, 同时还可以为实验室节省大量成本<sup>[8-9]</sup>。随着生物技术的快速发展, 多重 PCR 已广泛应用于病原微生物检测, 并取得了比较好的成效<sup>[10-13]</sup>。优化多重 PCR 的反应条件, 如引物浓度、退火温度等, 对实验非常重要, 条件优化不足会导致包括灵敏度、特异性差, 以及某些特定靶标的优先扩增等问题<sup>[14]</sup>。另外, 多重 PCR 中存在多对引物容易形成引物二聚体, 或者增加获得非特异性扩增产物的可能, 因此引物设计也是关键步骤<sup>[15]</sup>。

由于多重 PCR 技术依赖于凝胶电泳成像, 普通的琼脂糖凝胶电泳在 DNA 条带的分辨率以及灵敏度上, 都受到了比较大的限制, 很大程度上影响了多重 PCR 高通量检测的实现<sup>[16]</sup>。毛细管电泳是使用毛细管作为分离通道, 依据样品中各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的电泳分离技术<sup>[17]</sup>, 可以使多重 PCR 产物的电泳分离, 与高效液相色谱处于同一水平, 具有快速、自动分析多个样本、准确定量和提升可重复性等优势<sup>[18-19]</sup>。本研究利用多重 PCR 结合毛细管电泳技术, 以沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌共 5 种我国常见的食源性致病菌作为目标菌种, 建立一种快速准确的多重 PCR-毛细管电泳检测方法, 以提升食源性致病菌的检测效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

标准菌株共 10 株: 鼠伤寒沙门氏菌(菌种编号:

ATCC14028)、大肠埃希氏菌 O157:H7 (菌种编号: NCTC12900)、单核细胞增生李斯特氏菌(菌种编号: ATCC19115)、金黄色葡萄球菌(菌种编号: ATCC6538)、副溶血性弧菌(菌种编号: ATCC17802)、奇异变形杆菌(菌种编号: CMCC49005)、大肠埃希氏菌(菌种编号: ATCC25922)、英诺克李斯特氏菌(菌种编号: ATCC33090)、表皮葡萄球菌(菌种编号: CMCC26069)、创伤弧菌(菌种编号: ATCC27562)。

野生株共 25 株, 均分离自食品样品: 沙门氏菌 19 株(菌种编号: Sal01-Sal19)、大肠埃希氏菌 O157:H7 2 株(菌种编号: O15701-O15702)、单核细胞增生李斯特氏菌 2 株(菌种编号: LM01-02)、金黄色葡萄球菌 1 株(菌种编号: SA01)、副溶血性弧菌 1 株(菌种编号: VP01)(江西省检验检测认证总院食品检测检测研究院)。

2 $\times$ PCR Mix、细菌全基因提取试剂盒(宝日医生物技术有限公司); QIAxcel DNA、高分辨率试剂盒(德国凯杰公司)。

### 1.2 仪器与设备

Scandrop 超微量核酸蛋白分析仪(德国耶拿公司); C1000touch PCR 仪(美国伯乐生物公司); QIAxcel Advanced 全自动核酸蛋白分析仪、QIAxcel ScreenGel Version 2.1 分析软件(德国凯杰公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 引物设计与合成

基于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)收录的沙门氏菌 *invA* 基因(登录号 NC\_003197.2)、大肠埃希氏菌 O157:H7 *rfbE* 基因(登录号 AE005174.2)、单核细胞增生李斯特氏菌 *prfA* 基因(登录号 NC\_003210.1)、金黄色葡萄球菌 *atl* 基因(登录号 KC834397.1)、副溶血性弧菌 *TDH* 基因(登录号 NC\_004605.1), 使用 Primer Premier 5 软件设计 5 对多重 PCR 引物(表 1), 并使用 Oligo 6 软件进行引物分析。委托上海生工进行引物合成, 分别使用无酶水稀释至 100  $\mu\text{mol/L}$  后, 将 10 种引物溶液等比例混合, 获得各引物浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物预混液。

#### 1.3.2 核酸提取

按照细菌全基因提取试剂盒操作说明进行 DNA 提取, 使用核酸蛋白分析仪对提取 DNA 的浓度和纯度进行测试后, 将核酸置于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

表 1 多重 PCR 引物信息  
Table 1 Primer information of multiple PCR

目标菌	引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
沙门氏菌	Sal- <i>invA</i> -F	ATGCGATTAAGGCGACAG	335
	Sal- <i>invA</i> -R	CAGGTGTTGTGAGCGTAA	
大肠埃希氏菌 O157:H7	O157- <i>rfbE</i> -F	CGGTCCTAGTTAGAATTGAGA	302
	O157- <i>rfbE</i> -R	TGAAGGTGGAATGTTGTC	
单核细胞增生李斯特氏菌	LM- <i>prfA</i> -F	CTGGTATTGGCGGTTACA	291
	LM- <i>prfA</i> -R	CGGTCGGAATATGCGTTA	
金黄色葡萄球菌	SA- <i>atl</i> -F	GTAAGTGGACAGATGCTAAC	274
	SA- <i>atl</i> -R	TTCGCTAATTGAGAAGTACC	
副溶血性弧菌	VP- <i>TDH</i> -F	GGATGACCGAAGTAGACAA	261
	VP- <i>TDH</i> -R	CACGACAGTTACGACAGT	

### 1.3.3 单一及多重 PCR 检测

以 5 种目标菌基因组 DNA 为模板, 分别利用 5 对特异性引物对模板进行单一 PCR 扩增检测; 以 5 种目标菌基因组 DNA 等比例混合液为模板, 利用引物预混液(10  $\mu\text{mol/L}$ )对模板进行多重 PCR 检测。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  模板 DNA, 1  $\mu\text{L}$  引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ PCR Mix, 无酶水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 反应 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。产物通过毛细管凝胶电泳, 采用 3.5 kV 电压进行分离, 并利用 QIAxcel ScreenGel Version 2.1 软件生成电泳图和峰形图。

### 1.3.4 多重 PCR 反应条件优化

对多重 PCR 反应的引物浓度和退火温度以这 2 个关键参数进行测试, 在 25  $\mu\text{L}$  多重 PCR 体系中加入 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2.00  $\mu\text{L}$  的 10  $\mu\text{mol/L}$  引物预混液, 从而研究 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8  $\mu\text{mol/L}$  共 6 个不同引物浓度对反应的影响; 采用温度梯度 PCR, 对 50.0、50.7、52.0、53.9、56.3、58.3、59.4、60.0  $^{\circ}\text{C}$  共 8 个退火温度进行测试。每个参数重复 3 次实验, 数据利用 QIAxcel ScreenGel Version 2.1 软件, 通过比较已知 DNA 浓度 marker (DNA 分子量标准)与目标 DNA 条带的峰面积, 计算出目标扩增产物的浓度, 从而确定最佳多重 PCR 及毛细管凝胶电泳的反应条件。

### 1.3.5 毛细管电泳参数优化

对毛细管电泳的分离电压参数进行测试, 采用表 2 中 5 种不同的电泳模式, 研究毛细管电泳条件对成像的影响。

### 1.3.6 灵敏度实验

分别将提取的沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌 5 种标准菌株的 DNA 溶液用无酶水稀释至 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$  的质量浓度, 等比例混合后, 获得单组份为 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  的 DNA 模板预混液, 再按 10 倍梯度稀释 6 次至  $5\times 10^{-5}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 最终

获得  $5\sim 5\times 10^{-5}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$  共计 6 个梯度浓度的 DNA 溶液作为模板进行灵敏度测试, 实验重复 3 次。

表 2 毛细管电泳模式  
Table 2 Capillary electrophoresis mode

模式	吸取电压/kV	吸取时间/s	分离电压/kV	分离时间/s
AM900	2.0	20	3.5	900
AM420	5.0	10	5.0	420
AM320	5.0	10	6.0	320
AL420	8.0	20	5.0	420
AH420	2.0	20	5.0	420

### 1.3.7 特异性实验

将提取的奇异变形杆菌、大肠埃希氏菌、英诺克李斯特氏菌、表皮葡萄球菌和创伤弧菌共计 5 株非目标标准菌株、5 种目标菌共计 25 株野生株的 DNA 作为模板, 采用 5 种目标菌的标准菌株作为阳性对照, 无酶水作为阴性对照, 对方法的特异性进行评估。

## 1.4 数据处理

采用 QIAxcel ScreenGel 分析软件对 DNA 图谱进行数据采集和数据分析, 条件优化及灵敏度实验重复 3 次, 实验数据以“平均数 $\pm$ 标准偏差”表示。采用 Excel 2021 进行表格绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 单一及多重 PCR 检测结果

单一及多重 PCR 产物的毛细管凝胶电泳结果见图 1。结果表明, 沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌分别在 335、302、291、274、261 bp 左右均出现扩增条带, 5 对引物之间未出现交叉反应, 均在图谱中对应位置有明显清晰

的扩增条带, 引物之间无交叉反应, 无其他扩增条带。本研究中设计的条带长度最小差异为 11 bp, 结果表明本研究使用的毛细管电泳技术的分辨率可以满足需求。

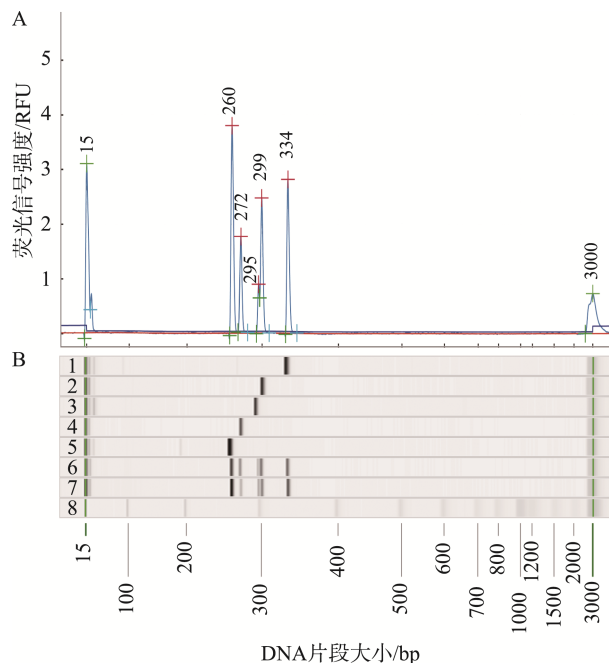
### 2.2 多重 PCR 反应条件优化结果

不同引物浓度进行多重 PCR 扩增均能够获取清晰的 DNA 条带。从表 3 可以看出, 通过计算条带的 DNA 浓度, 5 种扩增产物均在引物浓度为 0.2 μmol/L 时达到最高浓度。因此, 本研究在后续实验中选择 0.2 μmol/L 的引物浓度。

不同退火温度的多重 PCR 扩增结果如表 4 所示, 退火温度在 50.0~56.3 °C 之间时, 5 种 PCR 产物均能够获得清晰的 DNA 条带, 且在 56.3 °C 时, 扩增效率最优。但当退火温度大于等于 58.3 °C 时, 多重 PCR 扩增无法获得 293 bp 长度的产物。因此, 考虑到引物本身所需的退火温度以及避免引物二聚体的形成, 本研究的 PCR 反应体系中选择退火温度为 56.0 °C。

### 2.3 毛细管电泳参数优化结果

5 种毛细管电泳分离模式的结果如图 2 所示, AM900 模式下, 扩增产物均能产生清晰的电泳条带, 分离效果最佳, 而其他 4 种分离模式的电泳图谱均出现不同程度的拖带、分离不佳的情况, 且 293 bp 和 300 bp 的产物均无法在这 4 种模式下分离, 因此, 选取 AM900 作为本研究的毛细管电泳参数。



注: A. 泳道6的峰形图; B. 从上往下依次为沙门氏菌(1)、大肠埃希氏菌O157:H7 (2)、单核细胞增生李斯特氏菌(3)、金黄色葡萄球菌(4)、副溶血性弧菌(5)、5种标准菌株混合(6和7)、size marker (DNA分子量标准)(8)。

图1 单一及多重PCR检测

Fig.1 PCR and multiplex PCR testing

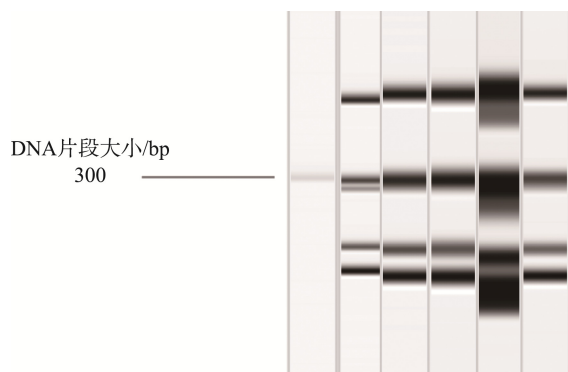
表 3 采用不同引物浓度扩增后的产物质量浓度(ng/μL)  
Table 3 Mass concentration of amplified products using different primer concentrations (ng/μL)

产物 DNA 片段 大小/bp	引物浓度					
	0.2 μmol/L	0.3 μmol/L	0.4 μmol/L	0.5 μmol/L	0.6 μmol/L	0.8 μmol/L
263	12.52±0.78	10.13±1.85	11.4±0.93	7.54±0.67	9.05±0.66	8.92±1.10
273	7.04±0.28	2.08±0.22	3.23±0.46	2.62±0.13	3.16±0.25	3.91±0.40
293	3.62±0.50	0.28±0.13	0.63±0.25	0.37±0.33	0.97±0.28	1.25±0.11
300	7.84±1.36	2.98±0.26	3.80±0.49	2.67±0.25	4.06±0.21	4.66±0.47
335	10.61±0.85	4.71±0.74	8.58±1.59	5.00±0.44	5.59±0.67	5.86±0.79

表 4 采用不同退火温度扩增后的产物质量浓度(ng/μL)  
Table 4 Mass concentration of amplified products using different annealing temperatures (ng/μL)

产物 DNA 片段 大小/bp	退火温度							
	50.0 °C	50.7 °C	52.0 °C	53.9 °C	56.3 °C	58.3 °C	59.8 °C	60.0 °C
263	6.83±0.62	6.76±0.61	6.80±0.41	6.32±0.89	8.00±0.71	6.68±0.19	9.17±1.73	6.71±0.78
273	1.41±0.17	1.53±0.18	1.72±0.15	1.95±0.17	2.90±0.29	2.63±0.29	2.89±0.33	2.91±0.41
293	1.22±0.10	1.35±0.15	1.21±0.14	0.63±0.71	0.83±0.61	-	-	-
300	2.01±0.15	1.93±0.37	2.54±0.14	2.39±0.37	3.68±0.16	3.06±0.09	2.95±0.50	4.01±0.29
335	3.70±0.25	3.74±0.19	3.43±0.30	4.61±0.41	6.85±1.40	4.33±0.51	4.96±0.54	6.43±0.62

注: -表示在毛细管电泳对应位置未出现 PCR 扩增产物条带, 表 5 同。



注: 从左往右依次为size marker (DNA分子量标准)、AM900、AM420、AM320、AL420和AH420分离模式的毛细管电泳图谱。

图2 多重PCR产物在不同电泳参数下的凝胶电泳图谱

Fig.2 Gel electrophoresis image of multiplex PCR products using different electrophoresis parameters

## 2.4 灵敏度实验结果

灵敏度检测结果如表 5 所示, 6 个梯度模板质量浓度在  $5\sim 5\times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 的浓度范围内进行多重 PCR 扩增, 均能稳定获得清晰可分辨的产物条带, 而在模板质量浓度小于等于  $5\times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L 时, 无法有效扩增出部分或全部目标产物条带。因此, 该多重 PCR-毛细管电泳方法的检测灵敏度为  $5\times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L。

## 2.5 特异性实验结果

特异性实验结果见表 6, 25 株目标野生菌株和 5 株阴性对照菌株均在目标位置扩增出有效条带, 且未出现非特异性条带, 5 株非目标菌株和阴性对照均未出现扩增产物条带, 无交叉反应, 实验结果表明本方法具有较好的特异性。

表 5 灵敏度测试中的产物质量浓度 (ng/ $\mu$ L)

Table 5 Product mass concentration in sensitivity testing (ng/ $\mu$ L)

产物 DNA 片段 大小/bp	模板质量浓度					
	5 ng/ $\mu$ L	$5\times 10^{-1}$ ng/ $\mu$ L	$5\times 10^{-2}$ ng/ $\mu$ L	$5\times 10^{-3}$ ng/ $\mu$ L	$5\times 10^{-4}$ ng/ $\mu$ L	$5\times 10^{-5}$ ng/ $\mu$ L
263	5.73 $\pm$ 0.33	3.37 $\pm$ 0.38	2.04 $\pm$ 0.52	1.34 $\pm$ 0.27	0.60 $\pm$ 0.15	-
273	2.70 $\pm$ 0.29	1.57 $\pm$ 0.10	0.92 $\pm$ 0.18	0.50 $\pm$ 0.31	-	-
293	1.58 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.14	0.81 $\pm$ 0.28	0.26 $\pm$ 0.26	-	-
300	3.52 $\pm$ 0.56	2.34 $\pm$ 0.17	2.30 $\pm$ 0.67	1.28 $\pm$ 0.23	0.55 $\pm$ 0.25	-
335	6.06 $\pm$ 0.91	4.11 $\pm$ 0.26	2.98 $\pm$ 0.19	1.13 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.38	-

表 6 特异性实验结果

Table 6 Specificity testing results

菌种名称	野生菌株数	标准菌株数	特异性扩增菌株数/总实验菌株数
沙门氏菌	19	1	20/20
大肠埃希氏菌 O157:H7	2	1	3/3
单核细胞增生李斯特氏菌	2	1	3/3
金黄色葡萄球菌	1	1	2/2
副溶血性弧菌	1	1	2/2
奇异变形杆菌	-	1	0/1
大肠埃希氏菌	-	1	0/1
非目标菌	-	1	0/1
表皮葡萄球菌	-	1	0/1
创伤弧菌	-	1	0/1

注: -表示无此项。

## 3 讨论与结论

食源性致病菌的传统培养检测方法主要利用其在培养基上生长并形成可见菌落的能力, 并通过菌落特征及单菌落生化特征等方式进一步进行鉴定<sup>[20]</sup>。然而部分致病菌在食品生产过程中, 由于干燥、低温、pH 变化、高渗等外

界不利因素影响, 进入了活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态, 即无法在常规培养条件下快速增殖, 使用传统培养方法进行检测时, 易导致假阴性结果<sup>[21-22]</sup>。许多研究表明<sup>[23-26]</sup>, 作为一种独特的生存策略, 大部分食源性致病菌都能够进入 VBNC 状态, 尤其是非产芽孢的细菌, 这对传统培养检测方法提出了挑战。目前, 2024 年 8 月实

施的 GB 4789.4—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》中, 已经增加了对乳粉中由于干燥因素而进入 VBNC 状态的沙门氏菌进行复苏的步骤, 从而使其恢复可培养性。然而食品基质复杂、工艺多变, 难以全方面解决各种因素导致的 VBNC 假阴性问题<sup>[27]</sup>。

利用多重 PCR-毛细管电泳等分子生物学技术, 对不同样品基质和不同致病菌进行快速检测, 包括 VBNC 的检测, 都有一定的研究和应用。REZA 等<sup>[28]</sup>同时采用多重 PCR 方法和传统培养方法对城市配水管网获取的 36 个水样进行了 4 种大肠菌群的检测, 研究发现传统培养方法无法从这些水样中分离出大肠菌群, 而多重 PCR 共检出 4 个阳性水样, 说明在检测受消毒剂影响而进入 VBNC 状态的大肠菌群时, 多重 PCR 方法有明显优势。LEI 等<sup>[29]</sup>采用多重 PCR 方法和传统方法同时检测了肉制品、水产品 and 即食食品中的 6 种食源性致病菌, 结果表明多重 PCR 方法的整体阳性率要高于传统培养方法(60.1%对 34.5%,  $n=278$ ), 其中副溶血性弧菌的阳性率远远高于传统培养方法(71.0%对 20.7%,  $n=145$ ), 表明多重 PCR 在部分食源性致病菌的检测上准确率和灵敏度更高。ZHANG 等<sup>[30]</sup>构建了一种多重 PCR-毛细管电泳检测方法, 可以快速检测 5 类致泻大肠埃希氏菌的 9 个目标致病基因, 并验证了该方法的毛细管电泳可以轻松分辨条带长度差异最小仅为 14 bp 的 DNA 产物, 灵敏度可达  $5 \times 10^3$  copies。本研究中设计的条带长度最小差异为 11 bp, 经验证该电泳技术也能很好的进行分辨, 灵敏度经换算约为  $1 \times 10^3$  copies, 与 ZHANG 等<sup>[30]</sup>的研究结果相印证, 说明毛细管电泳方法相对琼脂糖电泳方法, 更为灵敏和稳定, 更加适合多重 PCR 产物的分析。

多重 PCR-毛细管电泳的检测方法还可以结合一些其他技术, 进一步提升检测效率。HE 等<sup>[31]</sup>利用磁性纳米碳点(magnetic nano carbon dots, Mag-Cds)技术结合多重 PCR-毛细管电泳, 构建了一种同时检测 4 种食源性致病菌的方法, 利用 Mag-Cds 捕获样品中的菌体, 将多重 PCR-毛细管电泳的灵敏度提升至  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  ng/ $\mu$ L。NDRAHA 等<sup>[32]</sup>采用免疫磁珠进行 DNA 提取纯化后, 再使用多重 PCR-毛细管电泳对 3 种食源性致病菌进行检测, 其检测沙门氏菌时的检出限可达  $7.3 \times 10^1$  CFU/g。

本研究建立了一种可同时对沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌进行检测的多重 PCR-毛细管电泳检测方法。该方法经优化后, 最佳引物浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, 最佳退火温度为 56.0  $^{\circ}$ C, 检测灵敏度可达  $5 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 且特异性良好, 可以满足日常检测需求。该方法耗时短、操作简便, 可为实验室节省大量时间和人力成本, 还可以通过结合如 Mag-Cds 等技术提升检测效率, 在食源性致病菌检测中有较好的应用前景。

## 参考文献

- [1] MEAD PS, SLUTSKER L, DIETZ V, *et al.* Food-related illness and death in the United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5(5): 607–625.
- [2] ALADHADH M. A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(5): 1111.
- [3] FODDAI ACG, GRANT IR. Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4281–4288.
- [4] LAW WF, AB MN, CHAN KG, *et al.* Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 770.
- [5] GILL A. The importance of bacterial culture to food microbiology in the age of genomics [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 777.
- [6] ZHAO X, LIN CW, WANG J, *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(3): 297–312.
- [7] SINGH J, BIRBIAN N, SINHA S, *et al.* A critical review on PCR, its types and applications [J]. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2014, 1(7): 65–80.
- [8] HENDOLIN PH, MARKKANEN A, YLIKOSKI J, *et al.* Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(11): 2854–2858.
- [9] SCHOENMAKERS JW, DE-BOER R, GARD L, *et al.* First evaluation of a commercial multiplex PCR panel for rapid detection of pathogens associated with acute joint infections [J]. *Journal of Bone and Joint Infection*, 2023, 8(1): 45–50.
- [10] NYGAARD U, KIRKBY NS, BLOCH J, *et al.* Parapneumonic effusion in children: Rapid pathogen detection in pleural fluid using multiplex bacterial PCR [J]. *Acta Paediatrica*, 2023, 112(7): 1555–1557.
- [11] CAO X, LI P, FENG X, *et al.* Detection of 13 foodborne pathogens in aquatic products using visual chromogenic chips based on asymmetric multiplex polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization [J]. *Food Control*, 2024, 155: 110100.
- [12] MA M, WANG S, ZHU X, *et al.* The identification of *Streptococcus pasteurianus* obtained from six regions in China by multiplex PCR assay and the characteristics of pathogenicity and antimicrobial resistance of this zoonotic pathogen [J]. *Pathogens*, 2023, 12(4): 615.
- [13] 郭瑞, 赵林萍, 韩小改, 等. TaqMan 探针双重荧光聚合酶链式反应技术检测食源性沙门氏菌和志贺氏菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(10): 261–269.  
GUO R, ZHAO LP, HAN XG, *et al.* Detection of *Salmonella* and *Shigella* using duplex fluorescence real-time polymerase chain reaction with TaqMan probe [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(10): 261–269.
- [14] RUANO G, FENTON W, KIDD KK. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via ‘booster’ PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(13): 5407.

- [15] MARKOULATOS P, SIAFAKAS N, MONCANY M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2002, 16(1): 47–51.
- [16] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(2): 171–179.  
ZHONG ZC, WANG J, ZHANG SY. Advances in multiple PCR technology studies [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(2): 171–179.
- [17] BIANCA BI, FEDORCA A. Principles of capillary electrophoresis—A small synthesis [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 3(2): 127.
- [18] MCCORD B, HARTZELL-BAGULEY B, KING S. Separation of DNA by capillary electrophoresis [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 384: 415–429.
- [19] THALINGER B, PÜTZ Y, TRAUGOTT M. Endpoint PCR coupled with capillary electrophoresis (cePCR) provides sensitive and quantitative measures of environmental DNA in singleplex and multiplex reactions [J]. *PLoS One*, 2021, 16(7): 254356.
- [20] LIANOU A, PANAGOUEZ, NYCHAS GJE. Meat safety—I foodborne pathogens and other biological issues—Lawrie’s meat science [M]. 9th ed. Witney: Woodhead Publishing, 2023.
- [21] ENACHE E, PODOLAK R, KATAOKA A, *et al.* Control of *Salmonella* and other bacterial pathogens in low moisture foods [M]. 1st ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell, 2017.
- [22] RAMAMURTHY T, GHOSH A, PAZHANI GP, *et al.* Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria [J]. *Frontiers in Public Health*, 2014, 2: 103.
- [23] MORISHIGE Y, KOIKE A, TAMURA-UEYAMA A, *et al.* Induction of viable but nonculturable *Salmonella* in exponentially grown cells by exposure to a low-humidity environment and their resuscitation by catalase [J]. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(2): 288–294.
- [24] OLIVER JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 415–425.
- [25] MA Z, XU W, LI S, *et al.* Effect of *RpoS* on the survival, induction, resuscitation, morphology, and gene expression of viable but non-culturable *Salmonella Enteritidis* in powdered infant formula [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 410: 110463.
- [26] ZHANG Y, LIAO X, FENG J, *et al.* Induction of viable but nonculturable *Salmonella* spp. in liquid eggs by mild heat and subsequent resuscitation [J]. *Food Microbiology*, 2023, 109: 104127.
- [27] 李慧琴, 黄亚娟. 食源性病原微生物快速检验技术的应用与研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(16): 5369–5375.  
LI HQ, HUANG YJ. Application and research progresses of rapid detection technology for foodborne pathogenic microorganism [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(16): 5369–5375.
- [28] REZA ZM, MOHAMMAD A, SALOMEH K, *et al.* Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak City using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (most probably number) [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, 4(5): 404–409.
- [29] LEI IF, ROFFEY P, BLANCHARD C, *et al.* Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens [J]. *Journal of Food and Drug analysis*, 2008, 16(4): 6.
- [30] ZHANG J, XU Y, LING X, *et al.* Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101477.
- [31] HE S, HUANG Y, MA Y, *et al.* Detection of four foodborne pathogens based on magnetic separation multiplex PCR and capillary electrophoresis [J]. *Biotechnology Journal*, 2022, 17(1): 2100335.
- [32] NDRAHA N, LIN HY, TSAI SK, *et al.* The Rapid Detection of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* via polymerase chain reaction combined with magnetic beads and capillary electrophoresis [J]. *Foods*, 2023, 12(21): 3895.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)