DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260311002
引用格式: 石文松, 刘清玉, 罗雨阳, 等. 基于多色编码技术的食源性致病菌多重数字聚合酶链式反应检测体系的构建[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(8): 127–135.
SHI WS, LIU QY, LUO YY, *et al*. Construction of a multiplex digital polymerase chain reaction detection system for foodborne pathogens based on multicolor coding technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(8): 127–135. (in Chinese with English abstract).

基于多色编码技术的食源性致病菌多重数字聚合酶链式反应检测体系的构建

石文松[1], 刘清玉[1], 罗雨阳[1], 夏用恢[1], 朱跃芳[1], 贺 晶[1], 徐刚伟[2*]
(1. 湖南省株洲市食品药品检验所, 株洲 412000; 2. 湖南圣洲生物科技有限公司, 株洲 412000)

摘 要: 目的 构建克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、致病性大肠埃希氏菌 O157 的多重数字聚合酶链式反应(digital polymerase chain reaction, dPCR)定量检测体系。**方法** 从美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) Genome 数据库提供的 7 种致病菌的基因组中筛选物种特异基因并进行保守性分析, 在保守区域设计引物探针, 并利用 MFE Primer (V3.1)工具与来自 NCBI ftp 数据库的人类基因组、细菌和病毒基因组进行比对, 分析引物的特异性和引物探针结构, 合成引物探针和致病菌质粒。利用多色编码技术以不同荧光通道组合模式编码 7 种致病菌的检测靶点, 构建食源性致病菌多重 dPCR 检测体系, 并验证其特异性、准确性、线性和重复性。**结果** 该检测体系具有良好的特异性、准确性和重复性, 在以下浓度范围呈线性: 克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)15.55~17336.02 copies/μL, 金黄色葡萄球菌 11.92~12755.55 copies/μL, 霍乱弧菌 9.47~11811.35 copies/μL, 副溶血性弧菌 9.86~11631.06 copies/μL, 沙门氏菌 12.20~14244.65 copies/μL, 单核细胞增生李斯特氏菌 16.70~15329.10 copies/μL, 致病性大肠埃希氏菌 O157 28.22~26325.95 copies/μL。**结论** 基于多色编码技术的食源性致病菌多重 dPCR 检测体系的构建, 实现 7 种食源性致病菌的同步检测, 可为食品、药品或环境等领域的致病菌监测、污染溯源, 以及相关突发事件快速应对, 提供技术参考, 应用前景广泛。该方法的构建, 有助于超多重致病菌 dPCR 检测体系的进一步探索。

关键词: 致病菌; 多色编码技术; 多重数字聚合酶链式反应; 快速检测

Construction of a multiplex digital polymerase chain reaction detection system for foodborne pathogens based on multicolor coding technology

SHI Wen-Song[1], LIU Qing-Yu[1], LUO Yu-Yang[1], XIA Yong-Hui[1], ZHU Yue-Fang[1], HE Jing[1], XU Gang-Wei[2*]

收稿日期: 2026-03-11
基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2023JJ60556)
第一作者: 石文松(1975—), 男, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为食品药品安全。E-mail: 409911239@qq.com
***通信作者:** 徐刚伟(1999—), 男, 博士, 主要研究方向为数字聚合酶链式反应及病原微生物检测应用。E-mail: 15000359536@163.com

(1. *Hunan Zhuzhou Institute for Food and Drug Control*, *Zhuzhou* 412000, *China*;
2. *Hunan Shengzhou Biotechnology Co*., *Ltd*., *Zhuzhou* 412000, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a multiplex digital polymerase chain reaction (dPCR) quantitative detection system for *Cronobacter* (*Escherichia sakazakii*), *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and pathogenic *Escherichia coli* O157. **Methods** Species-specific genes were screened from the genomes of the 7 kinds of pathogenic bacteria in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genome database, and their conservation was analyzed. Primer-probes were designed based on the conserved regions. The primer specificity and probe structure were analyzed by using MFE Primer (V3.1) to alignment against the human genome, bacterial and viral genomes in the NCBI ftp database, followed by the synthesis of primers probes and pathogenic bacterial plasmids. A multiplex dPCR detection system for foodborne pathogens was established by using multicolor coding technology to encode the detection targets of the 7 kinds of pathogenic bacteria with different fluorescence channel combination modes, and the specificity, accuracy, linearity and repeatability of the system were verified. **Results** The detection system was characterized by high specificity, accuracy and reproducibility, with linear ranges of 15.55–17336.02 copies/μL for *Cronobacter* (*Escherichia sakazakii*), 11.92–12755.55 copies/μL for *Staphylococcus aureus*, 9.47–11811.35 copies/μL for *Vibrio cholerae*, 9.86–11631.06 copies/μL for *Vibrio parahaemolyticus*, 12.20–14244.65 copies/μL for *Salmonella*, 16.70–15329.10 copies/μL for *Listeria monocytogenes*, and 28.22–26325.95 copies/μL for pathogenic *Escherichia coli* O157. **Conclusion** The construction of a multiplex dPCR detection system for various foodborne pathogens, utilizing multicolor coding technology, facilitate the simultaneous detection of 7 kinds of foodborne pathogens. This system offer a valuable technical reference for pathogen surveillance, contamination source tracing and emergency response in the fields of food, medicine, and the environment, demonstrating broad application potential. It will facilitate further exploration of a super-multiplex dPCR detection system for pathogens.

KEY WORDS: pathogens; multicolor coding technology; multiplex digital polymerase chain reaction; rapid detection

0 引 言

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌等食源性致病菌引起的健康危害，一直受到社会的极大关注。快速、精准的检测技术，是预防与及时发现、控制该类致病菌污染及扩散，促进人类健康与安全的关键措施之一。目前主流检测技术仍以传统培养法为主，微生物测试片法、免疫学技术、代谢产物检测技术、传统聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法、荧光 PCR 法在某些领域也得到较多应用[1–4]。但由于部分样品微生物种群庞大,检测方法易受基质干扰，存在效率较低、无法定量或特异性不足等问题，应用范围存在一定局限[5–6]。

常规培养法检测周期耗时较长，尤其不太适用效期较短的产品。当检测结果出来时相关产品可能已被使用，一旦存在致病菌污染，可能危害消费者健康；对于活的非可培养状态(viable but noncuhurable state, VBNC)微生物或出现漏检，以致安全风险。免疫学方法(如胶体金试纸条、酶联免疫吸附法等)，虽可实现现场快检，但易受交叉反应干扰，灵敏度不足；普通 PCR 技术虽可缩短检测周期，但在多重靶标检测、面对复杂基质及抗干扰、区分活菌和绝对定量方面存在瓶颈[6]。虽可通过改进染料来识别活菌，但样本含菌浓度和组成情况未知时，方法或可抑制活菌，影响定量结果[7]。逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)仅适用于存在活跃转录目标基因的细菌进行检测，但因信使核糖核酸(mRNA)稳定性差、拷贝数低[8]，以及对于 mRNA 水平极低的处于休眠、应激状态或代谢极低的细菌，可能出现漏检[5]，对致病菌活菌的快速检测仍存在一定局限性。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)通过扩增曲线定量，快速且特异性好，对难以培养的目标病原体方面尤具有优势，但其量化循环数(cycle quantification, Cq)值高度依赖于反应效率，易受引物二聚体和复杂样品中 PCR 抑制物质的干扰[9]。

基于反应终点绝对定量的数字 PCR (digital PCR, dPCR)，具抗干扰较强[10]、精确、灵敏的特点，在复杂样品背景及低浓度靶基因方面表现出更优的性能[11–13]，成为应对难处理样品的选择[14–15]，于食品等领域食源性致病菌检测中展现很好的应用前景[16]，已为国家进出口食品、化妆品相关致病菌检测标准(如 SN/T 5364.8—2021《出口食品中致病菌检测方法 微滴式 dPCR 法》、SN/T 5760.1—2024

《进出口化妆品中病原菌检测方法 微滴式 dPCR 法》等)采用。dPCR 可以通过以不同的荧光标记目标靶点及改变荧光强度, 或者通过改变探针类型(如双探针)及浓度, 实现多重目标的检测[17]。但目前多以独立荧光单个标记检测靶点, 受荧光通道数量的限制, 在实现较多或超多重目标的检测上存在一定困难[18–20]。在面对批量样品、基质成份复杂、多重病原(甚至较低含量情况下)的高效检测要求时, 需要寻找方便快捷的检测方法。基于多色编码技术构建的多重食源性致病菌 dPCR 检测体系, 既具有 dPCR 的技术特点, 同时通过对不同荧光进行排列组合编码、区分每个检测靶点, 是对突破检测通道数量限制、实现多重检测的探索, 有利于致病菌筛查、快速定量及其高效检测。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

标准菌株沙门氏菌(*Salmonella typhi*) [CMCC(B) 50094]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003)(中国医学细菌保藏管理中心); 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) (CICC 21635)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (CICC 21617)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) (CICC 23794)、肠道出血性大肠埃希氏菌(*Escherichia coil* O157:H7) (CICC 21530)、克罗诺杆菌属(*Cronobacter* sp.) (CICC 24097)(中国工业微生物菌种保藏管理中心); 氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基(soybean casein digest agar, TSA)(广东环凯微生物科技有限公司); 细菌 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 粪便核酸提取试剂盒(BeaverBeads® Wastewater Nucleic Acid Extration Kit)(苏州海狸生物医学工程有限公司); dPCR 检测试剂(包括 Low TE 稀释液、Buffer 缓冲液等)(上海小海龟科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

BSP-150 生化培养箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); Kylin-Bell 漩涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Microfuge® 20R 离心机(美国 Beckmancoulter 公司); HHW21.600 水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司); 1374 生物安全柜[赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司]; SCI Digital PRO dPCR 仪(含 dPCR 芯片上样、液滴制备、PCR 扩增、信号分析及多色编码检测结果输出功能)(上海小海龟科技有限公司)。

1.3　菌株培养及核酸提取

将实验室保存菌株分别接种于 TSB 中, 于 36 ℃静置培养 24 h。取 1 mL 菌悬液(浓度约 10^8 CFU/mL), 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作, 提取各菌基因组 DNA。

1.4　干扰物核酸提取纯化

随机采集人新鲜粪便样品, 按粪便核酸提取试剂盒说明书提取核酸。纯化后的粪便核酸于–20 ℃冻存。

1.5　引物与探针设计

从美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) Genome 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ datasets/genome/)下载沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)、大肠埃希氏菌 O157 物种及其近源物种的全基因组数据, 利用 Blast+物种特异基因筛选特异基因保守性分析, 使用 Mega 对目的基因进行多序列比对, 在保守区域设计引物探针。通过 MFE Primer V3.1 Local Web Server 对所有引物进行特异性分析及对所有引物探针二聚体和二级结构进行分析。比对数据库为下载自 NCBI ftp 数据库的人基因组、细菌和病毒参考数据库。通过序列分析和引物设计后, 获得的引物探针序列, 如表 1。引物与荧光探针及病原体质粒, 委托通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.6　超多重 dPCR 原理与目标菌荧光编码方案

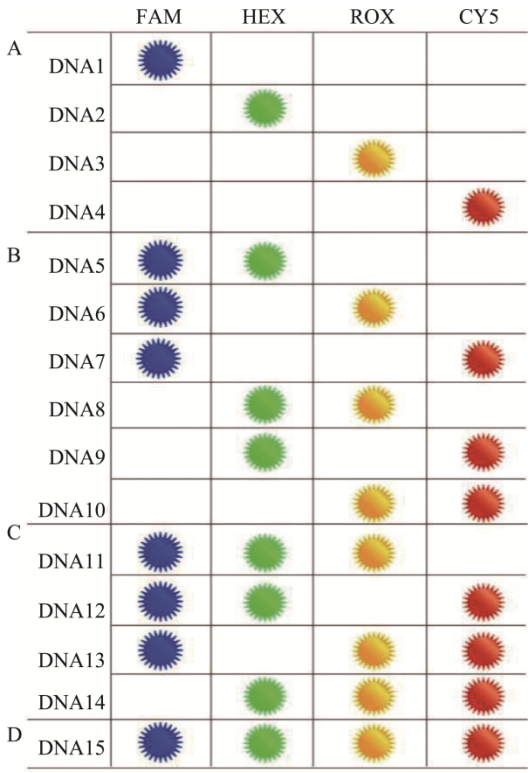
传统的 PCR 检测方法, 大多数都是针对一个待测靶标设计一种特异性探针, 然后在特异性探针上标记一种荧光基团。但是这种方法只能检测样本中的一种核酸, 当样本中可能存在多种待测核酸时, 则无法同时进行检测。为了解决这一问题, 提出了一种切实可行的多重检测技术方案。该方案通过针对探针上标记的荧光基团进行调整, 使得每种探针上可以标记不同的荧光基团且每个靶核酸所对应的荧光通道或其组合只有一种方式, 彼此之间互不相同。按照该规则, 可以突破荧光通道数目的限制, 把原本仅可以在一张芯片内同时检测几个靶点的情况, 拓展到了可以同时实现十几种甚至几十种靶点。如图 1 所示, 以一种 4 色荧光系统的荧光编码表为例, 不同荧光通道按照排列组合的方式编码特定的靶点探针; 通过不同的编码方式, 可以区分不同编码对应的检测靶点。根据排列组合的模式, 该方案可以实现的检测靶点数目为: $T_n=2^N-1$(式中 N 为检测荧光通道数目)。

多色荧光编解码技术在实际应用中还需要解决多重靶标共存时, 如何区分相互交叉干扰的靶点。如图 1 中的靶点 1 和靶点 2 共存时, 存在与靶点 5 的编码荧光完全重叠的情况, 常规荧光 PCR 无法对此进行区分, 然而对于 dPCR 而言, 尤其是腔室阵列的 dPCR, 通过引入腔室的索引一致性, 可以解决该问题。如图 2 所示, 每一个腔室的位置是固定的, 在不同的通道下成像后, 只要确保每一个通道下对应的位置索引一致, 就可以区分是两个靶点共存还是另一个双编码的单一靶点。因为对于两个不同的靶点而言, 会因为随机分布的因素, 被分散在不同的腔室内,

表 1 7 种食源性病原菌的引物探针序列

Table 1 Primer-probe sequences for 7 kinds of foodborne pathogenic bacteria

病原体	靶基因名称		序列
克罗诺杆菌	*hypotetical protein*	上游引物	GGCGAACAAAATAGCGAAAAT
		下游引物	GCAGGCGTGCTTTAATATG
		探针	TGAGYGGCAAATCTCTGGCG
金黄色葡萄球菌	*Hyp*	上游引物	TGAGCAGACATTTGTTGATGT
		下游引物	GAAATATGATGGCCAAATCGT
		探针	CTAACATCGCCTCTAATGAGTTACCA
霍乱弧菌通用型	*LysR*	上游引物	AGTTAAAACGMATAGTGATATTCAAT
		下游引物	CTGTTCACTGACCTTAGATTTG
		探针	AGTGGTTGAGTGTGGTTCTTTTACT
副溶血弧菌	*HAD-IA*	上游引物	TCTCGTGRTCAAAAATGACATT
		下游引物	CGTCAGTTCAGATATGAACTTTC
		探针	ACTCGGTTGCCCTCAAACAGA
沙门氏属通用型	*invB*	上游引物	TTATCACATTCACTGACTTGCTATC
		下游引物	GATTGCACATAAAGATCTTGTCC
		探针	TGATTGAAGGTCGTTTTCCGGAT
单核细胞增生李斯特氏菌	*hly*	上游引物	ACGCGGATGAAATCGATAAG
		下游引物	ACAATGTATTAGTATACCACGGAG
		探针	CCACAACRATATATTCATTTCCATC
大肠埃希氏菌 O157 型	*rfbE*	上游引物	CCTTGTTTCGATGAGTTTATCTG
		下游引物	AGTCCACAAGGAAAGTAAAGATG
		探针	TGCGGTCCTAGTTAGAATTGAGACC



注: 注: A、B、C、D 代表 4 种靶核酸; 深蓝色为以 FAM 荧光标记, 绿色为以 HEX 荧光标记, 黄色为以 ROX 荧光标记, 红色为以 CY5 荧光标记。

图 1 基于 4 色荧光的多色荧光编/解码技术原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of the principle of multi-color fluorescence encoding/decoding technology based on 4-color fluorescence

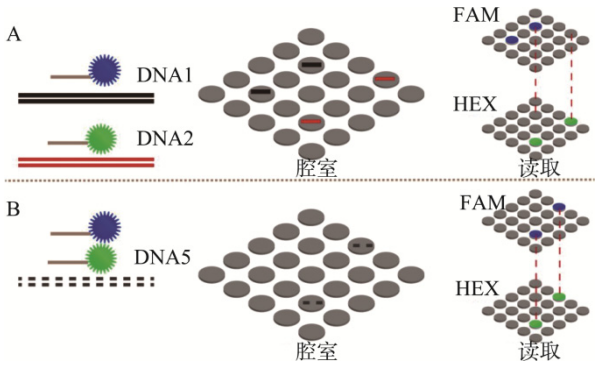


图 2 腔室的索引一致性原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of the index consistency principle for the cavity chamber

虽然也是两个通道内都有阳性信号, 但是大多数阳性信号的索引号是不一致的; 而对于双标的靶点, 会在两个荧光通道内同时产生索引号一致的双阳性腔室信号, 且只有双阳性腔室, 根据这一逻辑, 可以实现多重靶标共存时的多重检测和分析。

按照上述超多重检测原理, 设计 7 种食源性致病菌多重检测的编码表, 如表 2; 其中 4 个靶点采用单色荧光编码检测, 另外 3 个采用双色荧光进行编码检测。

1.7 多色荧光编解码阳性率计算

常规的 dPCR, 通常采用泊松分布的公式进行计算拷贝数浓度, 对于多色荧光编解码技术而言, 常规的 dPCR 通用公式, 在单重靶点存在时是适用的, 但是对于多靶点共存时,

表 2　7 种食源性致病菌的多色荧光编码表
Table 2　Multicolor fluorescent coding table for 7 kinds of foodborne pathogenic bacteria

病原体列表	编码类型			
	FAM	HEX	ROX	Cy5
克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)	-	+	-	-
金黄色葡萄球菌	+	-	-	-
霍乱弧菌	+	+	-	-
副溶血弧菌	-	+	+	-
沙门氏属通用型	-	+	-	+
单核细胞增生李斯特氏菌	-	-	+	-
大肠埃希氏菌 O157 型	-	-	-	+

注: +表示被对应项下的荧光标记; -表示未被对应项下的荧光标记。

需要采用多重解码的多重化的公式进行计算。计算见公式(1)~(2):

$$\lambda=-\ln(1-P_n) \tag{1}$$

$$P_n=1-\prod_{i=1}^{n}(1-T_i)^1\times\prod_{i=1}^{n-1}\prod_{j=i+1}^{n}(1-T_i\cup Tj)^{-1}\times\prod_{i=1}^{n-2}\prod_{j=i+1}^{n-1}\prod_{k=j+1}^{n}(1-T_i\cup T_j\cup T_k)^1\times\cdots(1-T_1\cup T_2\cup T_3\cup\cdots\cup T_n)^{(n-1)^{n-1}} \tag{2}$$

注: λ 为平均分子拷贝数; P_n 为校正阳性率, %; T_i 为对应单通道的阳性率, %。

1.8　多重 dPCR 检测体系测试条件

将待检测的核酸样本、引物探针、反应缓冲液和酶充分混合, 按 Buffer 10 μL、Taq 酶 0.5 μL、混合引物探针 8.5 μL、模板 2~5 μL, 补足无核酸酶水至 30 μL, 配制多重 dPCR 检测体系; 引物浓度为 400 nmol/L、探针浓度为 200 nmol/L, dPCR Buffer 为 3×Maxuseful dPCR Buffer。配制好的反应液和其他耗材及油相一起放置于全自动 dPCR 一体机的指定工位, 使用全自动 dPCR 系统进行检测。按设定的检测程序, 设备自动完成微滴制备、PCR 扩增和信号阅读以及根据多色编解码公式输出定量结果。其中扩增反应程序按 3 个阶段进行: 第 1 阶段 50 ℃固化 5 min; 第 2 阶段 90 ℃预变性 5 min, 第 3 阶段: 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火/延伸 40 s, 45 个循环。

1.9　多重体系特异性测试

配制单重 dPCR 检测体系, 对单独的目标致病菌进行检测, 验证该多重检测体系各致病性病原菌检测时的信号区分度。以 7 种细菌基因组混合样本为阳性对照, 同时添加人基因组(15 ng/μL)/粪便核酸(100 ng/μL)各 3 μL 于上述定容前的多重 dPCR 检测体系检测体系中, 再补足无核酸酶水至 30 μL, 制备含干扰的多重 dPCR 检测混合体系, 测试多重 dPCR 检测体系的特异性。

1.10　多重体系定量准确性测试

将病原体质粒浓度调整至 10^3 copies/μL 数量级, 进行多重食源性致病菌、各对应单重目标菌的 dPCR 定值检测, 并进行对应定量值比较, 评估多重体系定量的准确性。

1.11　多重体系定量线性和重复性测试

将所有病原体质粒浓度调整至 10^4 copies/μL 数量级, 使用溶解有 5 ng/μL 的 Low TE 稀释液 10 倍梯度稀释 3 个梯度, 至 10^3、10^2、10^1 copies/μL 数量级, 按前述反应条件, 分别进行 dPCR 定值测试。每个梯度定值 3 张芯片, 取均值作为评估多重 PCR 扩增体系在不同模板浓度下的扩增情况。以线性测试梯度 2 (10^3 copies/μL 数量级)测定方法的重复性。

1.12　数据处理

以 WPS-office 软件(版本 12.1.2.1125)进行数据统计处理、制表和绘图, 所有实验数据进行 3 次平行测试, 取平均值进行结果分析。

2　结果与分析

2.1　多重体系 dPCR 检测阳性型号测试

对于单重目标致病菌基因阳性样本的检测, 若为单荧光标记靶标, 只需考虑其一维散点图。如图 3 所示, 分别为克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 O157 型的检测结果, 其阳性信号和阴性信号区分明显, dPCR 信噪比均大于 4; 无雨点和非特异性扩增信号(其余通道结果均为阴性, 图片未展示)。若为双色编码的致病菌, 除一维散点图之外, 还应评估其二维散点图, 核对其不同荧光通道的阳性腔室的索引一致性。如图 4 所示, 为霍乱弧菌的检测结果, 其一维散点图在两个荧光通道都有(图 4A、B); 从该二维图(图 4C)可以看出, 其所有的阳性点均在相同的腔室内, 也就是共阳性腔室, 通过其原始图像(图 4D)可以更加清晰的展示出其共阳性腔室, 也表明, 该多重检测技术的可行性; 另外两个通过双色荧光编码的病原菌(副溶血弧菌、沙门氏属通用型), 也有清晰地体现(图 5); dPCR 信噪比均大于 5。通过测试, 验证该多重检测体系在检测致病性病原菌时信号区分度好, 可以实现多重检测等。

2.2　多重检测体系特异性测试

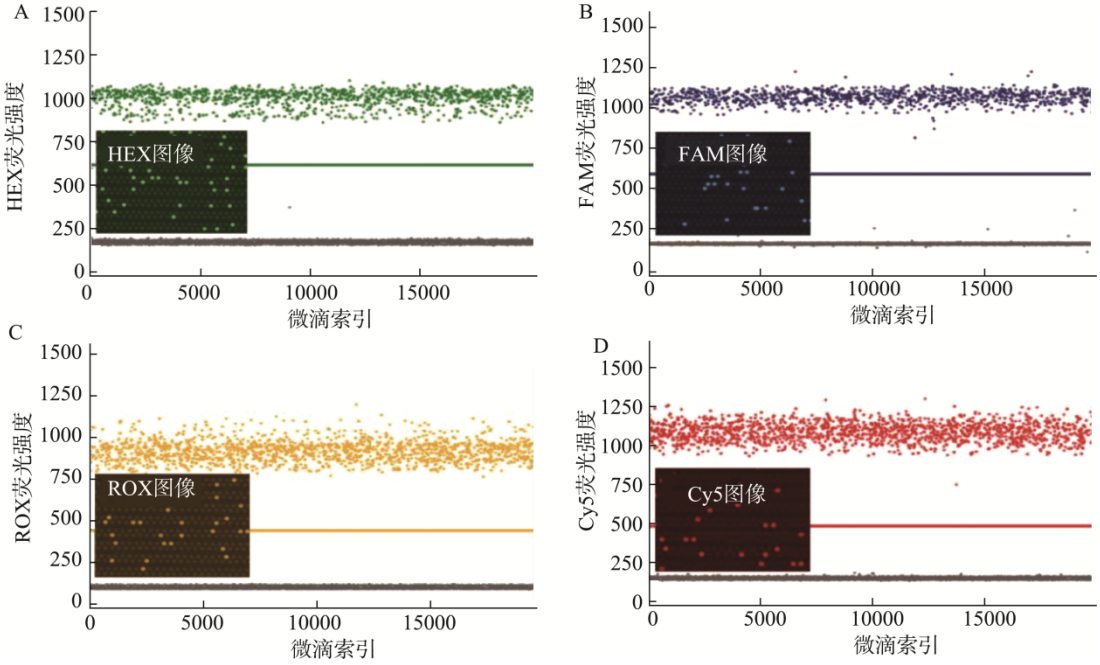
在含 7 种细菌基因组、人基因组和肠道菌群基因组情况下, 进行多重体系 dPCR 检测, 进一步验证体系的特异性。结果如图 6~7 所示, 存在人基因组与肠道菌干扰时 4 个荧光编码通道上均体现出很好的特异性, 不存在非特异性信号, 7 种致病菌均能很好被检出, 表明该检测体系可在较复杂的样本中进行致病菌的定量检测。

2.3　多重体系定量准确性测试

所有靶点特异性引物探针的定值结果与单重体系的定值结果一致, 定值结果无异常。所有双通道编码的靶点, 不同通道的定值拷贝一致, 所有定量结果和单重的测试结果一致。见表 3。

2.4 多重体系定量线性和重复性测试

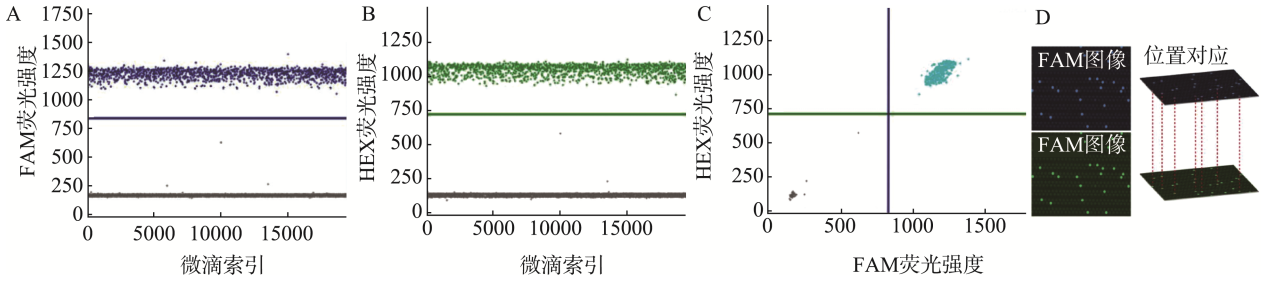
所有病原体线性相关系数(r^2)均大于 0.999, 线性结果优秀, 表示此多重体系对不同浓度下的质粒模板均有可靠的定值结果; 线性测试定值(浓度为 10^3 copies/μL 数量级)重复性, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSDs)均小于 5%, 体系重复性较好。结果如表 4~5, 图 8。



注: A. 克罗诺杆菌属、B. 金黄色葡萄球菌、C. 单核细胞增生李斯特氏菌、D. 大肠埃希氏菌 O157 型。

图 3 单重目标致病菌基因阳性样本的检测结果

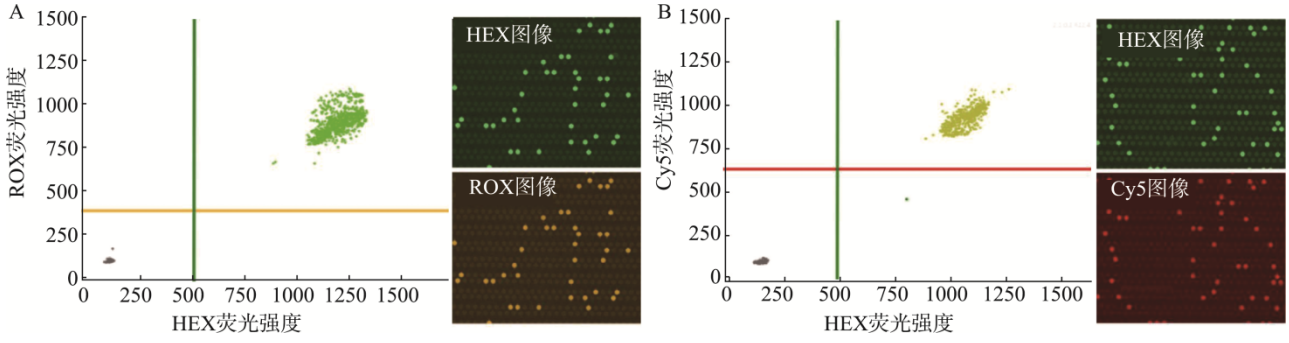
Fig.3 Test results of single target pathogenic bacteria gene positive samples



注: A. FAM 编码通道, B. HEX 编码通道, C. 二维图, D. 原始图谱。

图 4 霍乱弧菌检测结果

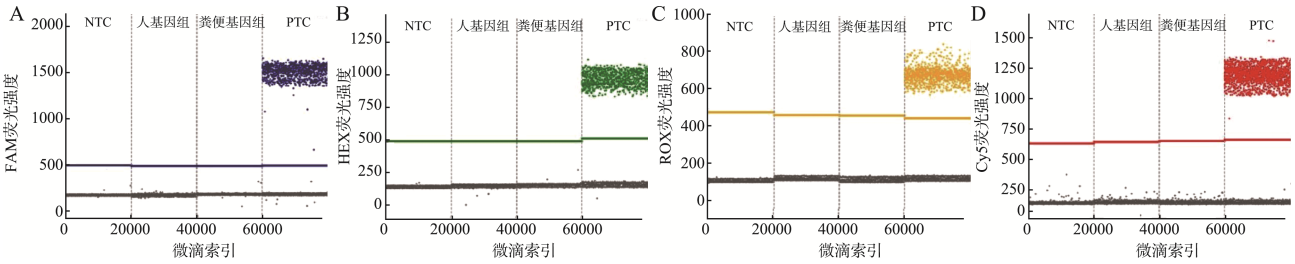
Fig.4 Detection Results of *Vibrio cholerae*



注: A. ROX 和 HEX 编码通道; B, Cy5 和 HEX 编码通道。

图 5 副溶血弧菌检测二维图(A)和沙门氏属通用型二维图(B)

Fig.5 2D image of *Vibrio parahaemolyticus* detection (A) and 2D image of *Salmonella* spp. detection (B)



注: NTC: 阴性对照; PTC: 阳性对照。

图 6　多重体系特异性测试(含人基因组、粪便核酸)一维散点图

Fig.6　One-dimensional scatter plot of multiplex system specificity testing (including human genome and fecal nucleic acids)

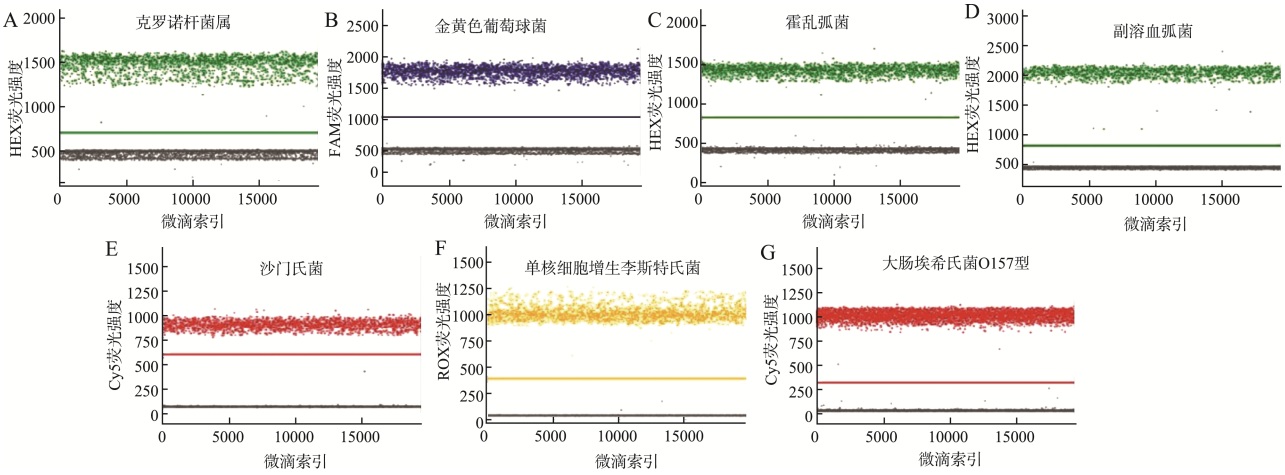


图 7　7 种致病菌的单重检测散点图

Fig.7　Scatter plot of single detection of 7 kinds of pathogenic bacteria

表 3　多重体系定量准确性测试结果

Table 3　Results of quantitative accuracy testing for multiplex systems

病原体	多重体系/(copies/μL)				单重体系/(copies/μL)	结果一致性/%
	FAM	HEX	ROX	CY5		
克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)	-	2177.8	-	-	2240.10	97.22
金黄色葡萄球菌	1420.0	-	-	-	1456.60	97.49
霍乱弧菌	1261.7	1262.7	-	-	1326.50	95.16
副溶血弧菌	-	1291.2	1291.2		1334.10	96.78
沙门氏菌	-	1623.1	-	1623.1	1680.30	96.60
单核细胞增生李斯特氏菌	-	-	1690.5	-	1824.40	92.63
大肠埃希氏菌 O157 型	-	-	-	3026.8	2996.80	101.00

注: -表示未被对应项下的荧光标记。

表 4　多重检测体系定量线性结果

Table 4　Quantitative linear results of multiplex detection system

病原体	梯度 1 /(copies/μL)	梯度 2 /(copies/μL)	梯度 3 /(copies/μL)	梯度 4 /(copies/μL)	r^2
克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)	17336.02	1706.67	163.80	15.55	1.00000
金黄色葡萄球菌	12755.55	1356.22	126.12	11.92	0.99996
霍乱弧菌	11811.35	1201.22	127.23	9.47	1.00000
副溶血弧菌	11631.06	1220.18	114.38	9.86	0.99997
沙门氏菌	14244.65	1537.90	137.55	12.20	0.99993
单核细胞增生李斯特氏菌	15329.10	1523.42	152.13	16.70	1.00000
大肠埃希氏菌 O157 型	26325.95	2613.90	255.92	28.22	1.00000

表 5 多重体系线性测试重复性结果

Table 5 Replicability results of multiplex system linear assay

病原体	平行 1 /(copies/μL)	平行 2 /(copies/μL)	平行 3 /(copies/μL)	平行 4 /(copies/μL)	平均值 /(copies/μL)	RSDs/%
克罗诺杆菌属(坂崎肠杆菌)	1655.40	1685.90	1711.80	1773.60	1706.67	3
金黄色葡萄球菌	1387.30	1376.50	1307.80	1353.30	1356.22	2
霍乱弧菌	1198.05	1257.80	1140.70	1208.35	1201.22	3
副溶血弧菌	1263.45	1227.00	1226.25	1164.05	1220.18	3
沙门氏菌	1611.30	1559.80	1536.60	1443.90	1537.90	4
单核细胞增生李斯特氏菌	1546.10	1572.70	1436.30	1538.60	1523.42	3
大肠埃希氏菌 O157 型	2694.80	2452.40	2542.50	2765.90	2613.90	5

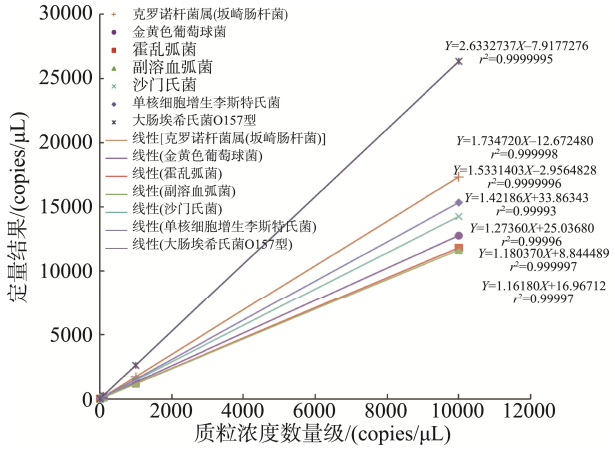


图 8 多重检测体系定量线性图谱

Fig.8 Quantitative linear chromatogram of multiplex detection system

3 讨论与结论

由于 dPCR 技术具有良好的特异性、灵敏度以及重复性，在痕量检测和复杂样本检测上有独特具优势[21]，以及耐受性好，可降低目标菌漏检风险[22]，其为应对相关领域的致病菌检测，提供了一种快速便捷、灵敏准确的方法选择。甚至因为其定值优势，成为食源性致病菌核酸类标准物质研制的先进技术之一[23]。但由于荧光之间可出现相互干扰，以及多重检测体系中扩增条件的彼此冲突等问题，国家进出口食品、化妆品等领域相关致病菌的检测标准目前主要为单重致病菌检测，以及五重以内致病菌检测的研究[24–28]，多为以两个荧光通道对应三重或五重致病菌的检测[24–25]、或四重致病菌检测以每个目标菌对应单独荧光通道(四荧光通道)的检测[26]。国内鲜见超多重致病菌 dPCR 检测方法的报道，难以满足更复杂目标或批量样品检测的现实需求[25]。

基于多色编码的多重 dPCR 技术，通过增加荧光通道、创新探针设计，提升 dPCR 的多重检测能力，实现单反应体系 7 种致病菌的同步检测。该方法大幅降低多重、批量检测操作的复杂程度，可极大节约试剂、样本和工作时间，提高突发事件或批量检测响应的及时性与有效性；其“闭管”的单分子扩增模式，提升扩增效率，且随反应室数量增加，降低抑制剂影响，有效避免其他方法出现的抑制剂影响以及“开管”操作导致的扩增产物污染风险等问题。当然，为更好体现其适用性，此项研究尚需结合人工污染样本及实际样品进一步评估其基质适应性与稳定性，继续开展方法优化与应用实践研究。此外，方法构建中，考虑到含复杂菌群背景的基质，是评估方法抗干扰能力的理想模型。在食品安全等领域，粪便更是导致微生物污染贯穿初级产品到终端成品整个产业链各环节的重要污染源，其所含细菌种群繁多[29]、成份复杂，具较好代表性；以及人也是生产加工环节环境微生物污染的主要来源[30–31]；原辅料、人员、设备、环境之间的微生物交叉污染，是导致产品质量与安全下降的重要原因[32]，以人基因组和肠道菌群核酸为干扰因素，验证了该多重检测体系在此复杂背景中具有较好的特异性、准确性和重复性的特点，体现其在复杂基质背景中实现多重致病菌同步检测的应用潜力与优势，可为后续研究及应用积累数据和技术支撑。

基于多色编码的多重数字 dPCR 检测技术，通过改变检测靶点编码模式，实现荧光通道数量限制上的突破，将有助于超多重致病菌 dPCR 检测体系的进一步探索。比传统培养法极大地缩短检测周期的特点，可为食源性致病菌污染监测与溯源、安全评价及风险预警提供很好的技术支持。随着人工智能发展及与 dPCR 相结合，多重 dPCR 技术在样品检测、定量分析及工作流程方面表现出更好的自动化水平，即使在保持低信号条件下也能保持良好的检测性能[33]，其也将在食品、药品、环境、临床诊断等相关领域展现出更广泛的应用前景。

参考文献

[1] HE Q, PAN J, XU Z, *et al*. Development of a nanobody-based immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples [J]. Food Chemistry, 2025, 473: 142987.

[2] CUMMINGS LA, HOOGESTRAAT DR, RASSOULIAN-BARRETT SL, *et al*. Comprehensive evaluation of complex polymicrobial specimens using next generation sequencing and standard microbiological culture [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 5446.

[3] GUAN H, XUE P, ZHOU H, *et al*. A multiplex PCR assay for the detection of five human pathogenic *Vibrio* species and *Plesiomonas* [J].

Molecular and Cellular Probes, 2021, 55: 101689.

[4] HODZIC E, GLAVINIC A, WADEMAN C. A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR [J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2023, 23(4): 640–648.

[5] YE Y, LI L, CHEN Y, *et al*. Molecular methods for rapid detection and identification of foodborne pathogenic bacteria [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2025, 41(5): 175.

[6] ALADHADH M. A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens [J]. Microorganisms, 2023, 11(5): 1111. DOI: 10.3390/microorganisms11051111

[7] KAUR S, ORTIZ LB, RUDAKOV G, *et al*. Propidium monoazide is unreliable for quantitative live-dead molecular assays [J]. 2024, 94(5): 2914–2921.

[8] 刘婷宇, 董庆利, 李嘉铭, 等. 食品中食源性致病菌活菌检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2025, 46(13): 395–403.
LIU TY, DONG QL, LI JM, *et al*. Research progress of detection technology of viable foodborne pathogens [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(13): 395–403.

[9] ADRIÁN RV, RUIJTER JM, HOFF MJBVD . Use and misuse of Cq in qPCR data analysis and reporting [J]. Life, 2021, 11(6):496.

[10] HOU Y, CHEN S, ZHENG Y, *et al*. Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 158: 116897.

[11] ZHANG S, LI X, WU J, *et al*. Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis [J]. Water, 2021, 13(24): 3551.

[12] DING Z, CUI J, ZHANG Q, *et al.* Detecting and quantifying *Veillonella* by real-time quantitative PCR and droplet digital PCR [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2024, 108(1)): 21–21.

[13] GLEERUP D, TRYPSTEEN W, FRALEY SI, *et al*. Digital PCR in virology: Current applications and future perspectives [J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2025, 29(1): 43–54.

[14] NICOLÒ M. Advancing pathogen identification: The role of digital PCR in enhancing diagnostic power in different settings [J]. Diagnostics, 2024, 14(15): 1598.

[15] FU H, XU W, HUANG M, *et al*. Molecular detection of *Salmonella* [J]. Journal of Food Protection, 2025, 88(12): 100659.

[16] LEI S, CHEN S, ZHONG Q. Digital PCR for accurate quantification of pathogens: Principles, applications, challenges and future prospects [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184(4): 750-759. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.132

[17] QUAN PL, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: A technology review [J]. Sensors (Basel), 2018, 18(4): 1271.

[18] SHRESTHA S, MALLA B, HARAMOTO E. 6-plex crystal digital PCR® for comprehensive surveillance of respiratory and foodborne bacterial pathogens in wastewater [J]. Environmental Pollution, 2025, 375: 126298.

[19] BIKASH M, SADHANA S, EIJI H. Optimization of a 6-plex crystal digital PCR® assay and its application to simultaneous surveillance of enteric and respiratory viruses in wastewater [J]. Science of the Total Environment, 2025, 970: 178939.

[20] HAN Y, WANG J, ZHANG S, *et al*. Simultaneous quantification of hepatitis A virus and norovirus genogroup I and II by triplex droplet digital PCR [J]. Food Microbiology, 2022, 103: 103933.

[21] 秦爱, 王娟, 邓方进, 等. dPCR 技术在食品安全核酸检测领域中的研究进展及标准化现状[J/OL]. 食品科学, 1–15. [2026-03-07]. https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20240119.1655.040
QIN AI, WANG J, DENG FJ, *et al*. Research progress and standardization status of digital PCR technology in food safety nucleic acid detection [J/OL]. Food Science, 1–15. [2026-03-07]. https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20240119.1655.040

[22] 赵雨佳, 梁亮, 吕庆斌, 等. 数字 PCR 在食源性致病微生物检测中的应用与标准化进展[J]. 中国检验检测, 2024, 32(5): 7–11, 29.
ZHAO YJ, LIANG L, LV QB, *et al*. Application and standardization of digital PCR in detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. China Inspection & Testing, 2024, 32(5): 7–11, 29.

[23] 范宏博, 蔡永洪, 李月玥, 等. 数字 PCR 法在食品检测标准物质研制中的应用[J]. 计量学报, 2023, 44(3): 472–478.
FAN HB, CAI YH, LI YY, *et al*. Application of digital PCR in development of food detection reference materials [J]. Acta Metrologica Sinica, 2023, 44(3): 472–478.

[24] 张明明, 肖剑, 林秀敏, 等. 多重微滴数字 PCR 同时定量检测三种食源性致病菌 DNA 拷贝数[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(3): 606–618.
ZHANG MM, XIAO J, LIN XM, *et al*. Simultaneous quantification method of DNA copy number for three food-borne pathogens by multiplex droplet digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(3): 606–618.

[25] YIPU D, ZIHENG Y, KAI S, *et al*. Development and evaluation of a multiplex droplet digital polymerase chain reaction method for simultaneous detection of five biothreat pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 970973. DOI: 10.3389/FMICB.2022.970973

[26] 耿燕华, 邱鑫晨, 何云飞, 等. 配方奶中常见致病菌的四重数字 PCR 生物芯片原位检测[J/OL]. 分析试验室, 1–8. [2026-01-29]. https://link.cnki.net/urlid/11.2017.TF.20250812.1559.002
GENG YH, QIU XC, HE YF, *et al*. *In situ* detection of common pathogenic bacteria in infant formula using multiplex digital PCR biochip [J/OL]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 1–8. [2026-01-29]. https://link.cnki.net/urlid/11.2017.TF.20250812.1559.002

[27] 孙雪奇, 尹玮璐, 蒋佳希, 等. 三重微滴 dPCR 定量检测即食米粉中致病菌方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(11): 1571–1578.
SUN XQ, YIN WL, JIANG JX, *et al*. Research on the quantification method to detect pathogenic bacteria in instant rice noodles by 3-plex droplet digital polymerase chain reaction test [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(11): 1571–1578.

[28] 王越, 张奕南, 刘洋. 四重 dPCR 检测乳及乳制品中致病菌[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(3): 61–69.
WANG Y, ZHANG YN, LIU Y. Quadruplex digital PCR for detection of pathogenic bacteria in milk and dairy products [J]. China Dairy Industry, 2025, 53(3): 61–69.

[29] 樊丽华, 王江雪, 欧宗沅, 等. 微生物源示踪技术在食品链中进行污染源追溯的研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 332–339.
FAN LH, WANG JX, OU ZY, *et al*. Research progress on microbial source tracking for traceability of pollution sources in food chains [J]. Food Science, 2024(7): 332–339.

[30] 陈成坤, 黄锦程, 郑丽君, 等. 纯化车间环境微生物数据库建立和种群分析[J]. 工业微生物, 2025, 55(5): 223–225.
CHEN CK, HUANG JC, ZHENG LJ, *et al*. Establishment and population analysis of environmental microbial database in purification workshop [J]. Industrial Microbiology, 2025, 55(5): 223–225.

[31] 张加稳, 张联琴, 刘羽晏, 等. 学生餐加工车间环境微生物群落的鉴定及分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(20): 95–102.
ZHANG JW, ZHANG LQ, LIU YY, *et al*. Identification and analysis of environmental microbial mommunities in student meal processing workshops [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(20): 95–102.

[32] 杨舒然. 中国熟肉制品产销全程微生物污染研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019.
YANG SR. Research on microbial contamination in the entire production and sales process of China's deli meat products [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2019.

[33] WEI YY, LIU XX, MU Y, *et al.* From droplets to diagnosis: AI-driven imaging and system integration in digital nucleic acid amplification testing [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2025, 2888: 117741. DOI: 10.1016/j.bios.2025.117741

(责任编辑: 蔡世佳　安香玉)