DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260518003
引用格式: 付为, 宁占国, 绍先豹, 等. 分子生物学技术在微生物检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(18): 203–210.
Fu Wei, Ning Zhanguo, Shao Xianbao, et al. Research progress on the molecular biology techniques in microbiological detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(18): 203–210. (in Chinese with English abstract).

分子生物学技术在微生物检测中的研究进展

付　为, 宁占国, 绍先豹, 曹建邦, 高学秀, 刘虹丽, 陈又铭, 李　宁*

(山东星光首创生物科技有限公司, 乐陵　253600)

摘　要: 食品安全监管日趋严格, 食品生产企业对微生物检测的速度、效率和准确性提出了更高要求。传统培养法因周期长、无法检测难培养微生物等局限, 难以满足实时监测需求, 分子生物学技术的突破提供了多种解决方案。然而, 当前技术体系普遍面临灵敏度-速度-便捷性三者难以兼顾的核心矛盾, 即高灵敏度技术依赖复杂设备, 快速检测技术则在一定程度上降低了特异性。本文聚焦近几年主流的分子检测技术, 从检测原理、性能参数、成本构成及适用场景等维度进行系统比较与综合分析, 以明晰各技术的综合性能定位及适用场景。在此基础上, 进一步探讨了多技术组合策略对单一技术边界的突破路径, 以及免扩增直接检测、人工智能辅助分析和全流程集成化系统等前沿方向在缩小三者张力区间方面的潜力。最后, 结合当前技术发展趋势, 对微生物检测领域的未来方向进行了展望, 以期为食品配料及更广泛领域的微生物检测方法选择与技术迭代提供系统参考。

关键词: 食品安全; 微生物检测; 分子生物学; 适用场景
中图分类号: TS207.4　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)18–0203–08

Research progress on the molecular biology techniques in microbiological detection

FU Wei, NING Zhan-Guo, SHAO Xian-Bao, CAO Jian-Bang, GAO Xue-Xiu, LIU Hong-Li, CHEN You-Ming, LI Ning*

(*Shandong Starlight So True Biological Technology Co., Ltd., Laoling* 253600, *China*)

ABSTRACT: As food safety regulations tighten, food producers require faster, more efficient and more accurate detection methods. Conventional culture techniques are time-consuming and cannot detect non-culturable or slow-growing microorganisms, limiting their utility for real-time monitoring. The breakthroughs in molecular biology techniques have provided various solutions. However, the current technical system generally faces a core contradiction where it is difficult to balance sensitivity, speed and convenience. That is, high-sensitivity techniques rely on complex equipment, while rapid detection techniques, to some extent, reduce specificity. This study focused on mainstream molecular detection technologies in recent years. It systematically compared and comprehensively analyzed these technologies in terms of detection principles, performance parameters, cost compositions and applicable scenarios,

收稿日期: 2025-05-18
第一作者: 付为(1993—), 女, 博士, 主要研究方向为功能糖醇的研究与开发。E-mail: Fu18840808926@163.com
***通信作者:** 李宁(1982—), 女, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为功能糖醇的研究与开发。E-mail: lining812@163.com

and clarified the comprehensive performance positioning and application scope of each technology. On this basis, this study further explored the pathways through which multi-technology combination strategies broke through the limitations of single technologies. It also investigated the potential of cutting-edge directions, including amplification-free direct detection, artificial intelligence-assisted analysis and full-process integrated systems, to narrow the trade-off range among the three key attributes. Finally, this study forecasted the future development trends of microbial detection based on current technological progress. The findings aims to provide a systematic reference for the selection of microbial detection methods and technological upgrading in food ingredients and other broader fields.

KEY WORDS: food safety; microbial detection; molecular biology; application scenarios

0 引 言

微生物广泛分布在土壤、水体、空气以及生物的体表和体内，与人类健康、环境安全、工业生产都有密切关联。全球微生物总量预计超过万亿种，其中只有一小部分能被分离培养，绝大多数都处于未知状态，所以快速准确地对微生物进行检测，能做到病原微生物的早期预警、生态环境监测，以及食品、药品、化妆品这类产品的质量管控。传统微生物检测方法主要依靠纯培养分离、生化鉴定和血清学分型，这些方法虽然结果直观、操作成熟，但无法忽略检测周期长、流程烦琐，且灵敏度和特异性有限等问题。同时，对部分难培养甚至不能培养的微生物，这类方法基本没法有效检测，最终没法满足突发公共卫生事件应急处置、基层现场快速筛查中的需求。近年来，分子生物学理论和技术不断更新，衍生出多种不同的技术路线，这些技术各有侧重，也有各自的适用范围。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及其衍生技术是比较成熟的方案，可以将微量核酸做指数级扩增，同时给出定量数据；等温扩增技术不需要依靠精密热循环设备，反应时间一般能控制在 30 min 以内，适合现场快速检测；规律成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein system, CRISPR-Cas)依靠自身高特异性和反式切割活性，把检测的分辨率提高到了单碱基水平。

然而，在上述技术快速发展的同时，“灵敏度-速度-便捷性”三者之间往往难以兼顾。灵敏度较高的数字 PCR (digital polymerase chain reaction, dPCR)和测序技术依赖精密仪器和复杂操作，难以满足现场快速检测需求；等温扩增技术虽然可以快速完成扩增，但在开盖操作时扩增产物会以气溶胶形式扩散到环境中，即使极微量污染物都能成为后续反应的模板，最终会产生假阳性结果[1−2]；操作最便捷的 CRISPR 试纸条检测，在不进行预扩增时，其灵敏度无法达到痕量样本的检测要求[3−4]，必须与扩增联用，且 Cas12a 要依赖特定的原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)的限制，限制选择靶点的灵活性[5]。上述分析说明了这些技术具有的不同性能优势，及各自存在的不足，这些特点也共同决定了它们不同的适用场景。因此，本文围绕不同应用场景里技术在灵敏度、速度以及便捷性之间的平衡选择，对主流分子检测技术做了系统比较和综合分析，进一步讨论了打破现有局限的关键方向，从而为微生物检测领域的方法选择和技术更新提供系统参考。

1 基于分子生物学的微生物快速检测技术

1.1 PCR 及其衍生技术

微生物检测中，待测样本的目标核酸序列往往含量极低，需进行信号放大，PCR 正是解决这一问题的核心手段。该技术通过高温变性、低温退火与适温延伸的周期性循环反应，对靶标核酸实现指数级扩增，将微量模板富集至百万倍以上浓度，为后续检测提供充足材料[6]。在此基础上，研究者发展了多种衍生技术，显著拓展了该技术在微生物检测领域的应用范围。

1.1.1 实时荧光定量 PCR 技术

传统 PCR 只能通过终点法判断“有或无”，无法对初始靶标进行准确定量，且存在交叉污染风险。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)通过在反应体系中加入荧光染料或探针，实时监测扩增产物的累积量，实现了对靶标核酸的定量检测，克服了传统 PCR 仅能终点判断且易交叉污染的局限[7]。在灵敏度与多重检测能力方面，杨露瑶等[8]建立了针对 6 种食源性致病菌的两个三重 qPCR 体系，最低检出浓度达 10 拷贝/μL(决定系数 r^2>0.99)，且无非特异性扩增，在人工模拟污染样本中验证了复杂食品基质的适应性；艾鹏飞等[9]基于 TaqMan 探针构建的多重 qPCR 体系，对 3 种致病菌的最低检出限达 12 CFU/mL，表明了 qPCR 在定量准确性、灵敏度和多重检测方面已具备成熟的技术基础。然而，qPCR 本身仍依赖标准曲线进行相对定量，在低丰度靶标检测和复杂基质分析中面临固有局限。同时，qPCR 依赖精密热循环设备，检测时间较长，操作便捷性受限，更适合实验室标准化检测，难以满足现场快速筛查需求。

1.1.2　数字 PCR 技术

dPCR 技术不同于 qPCR 严格依赖标准曲线, 只需要对微滴或者微孔里的阳性单元直接计数, 就能实现绝对定量。dPCR 检测低丰度微生物时, 灵敏度和检出率都更高, 还能区分存活和死亡的微生物, 同时对高盐、高蛋白这类复杂基质中的抑制剂干扰, 也有更强的耐受力。在多靶标检测方面, Sun 等[10]建立的四重微滴 dPCR 方法, 可以同时检测伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌等 4 种食源性病原体, 在近千倍的浓度范围内线性表现良好, 检测结果跟平板计数法没有明显差异(P>0.05)。针对复杂的食品基质, 张雪等[11]把该方法用到即食果蔬中致泻大肠埃希氏菌的检测上, 3 个靶标的线性都符合要求, 而且检测耗时更短。这些研究显示, dPCR 在绝对定量、低丰度靶标检测以及复杂基质分析方面, 比 qPCR 的优势更明显, 尤其适合抑制剂含量高或是需要区分存活状态的食品样本, 但该技术要提高灵敏度则需要增加反应分区和读取时间, 降低了在高通量筛查场景中的适合性。

1.1.3　多重 PCR 技术

多重 PCR 通过在常规 PCR 体系中引入多对特异性引物, 实现了单次反应中多个靶标的同时扩增, 在保留高灵敏度与高特异性的同时提升了通量、降低了成本, 已成为分子诊断和食品安全监测的重要技术工具。该技术已在多个领域得到应用: Sidelev[12]开发的多重 PCR 可同时检测水体中的多种产毒蓝藻; 研究人员建立的 TaqMan-MGB 多重 qPCR 方法可从 38 种其他腐霉属中特异性检出莴苣萎蔫病原菌[13]; Grad 等[14]运用多重 PCR 对罗马尼亚的性传播感染进行筛查, 单次反应可检测 6 种病原体, 验证了其在流行病学监测中的实用性。上述案例表明, 多重 PCR 技术已从单一的通量提升工具, 发展为覆盖定性、定量、高特异识别等多种检测需求的通用平台, 在通量和成本控制方面具有明显优势。但该技术会因靶标数量的增加稀释单个靶标的扩增效率, 在灵敏度和多重性之间存在制约, 因此该技术适用于已知靶标的中高通量筛查, 对于痕量检测或未知病原的发现不适用。

1.2　等温扩增技术

PCR 衍生技术虽在灵敏度、定量能力和多重检测方面具有优势, 但其对精密热循环设备的依赖限制了在资源有限环境中的推广, 而现场快速检测更看重成本、操作简便性和时效性, 为突破这一瓶颈, 研究者开发了等温扩增技术。该类技术可在恒温下进行核酸扩增, 无需热循环仪, 操作简便、设备要求低、扩增效率高, 已逐步成为现场快速检测的重要手段, 且与 PCR 技术形成互补。

1.2.1　环介导等温扩增技术

在众多等温扩增技术中, 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)应用最为广泛, 其利用 Bst DNA 聚合酶的链置换活性, 能在 60~65 ℃的恒温条件下完成高效扩增, 且不需要热循环设备, 在检测速度和操作便捷性上都有明显优势[15−16]。目前, 现有的研究主要从 3 个方向推进, 来拓宽 LAMP 技术的应用场景。在微流控平台集成方面, 离心微流控检测系统做到了核酸提取与 LAMP 扩增的一体化整合, 并且在检出限方面达到了较低水平[17]; Lift-CM 平台则把 LAMP 和 CRISPR/Cas12a 整合进自动化便携系统, 显著简化了操作流程[18]; 而四靶标微流控 LAMP 平台进一步拓展了检测通量, 并具备良好的检出限水平[19]; Deep-LAMP 平台将金纳米粒子比色反应与深度学习分析相结合, 实现了检测过程的智能化[20]。在数字化等温扩增方面, 数字 LAMP 平台可以在 60 s 内完成样品的快速分配, 并结合信号读取实现核酸的绝对定量分析[21]; 而一锅法平台仅需要 20 min 就能完成检测, 且结果和 qPCR 检测保持一致[22]。在和 CRISPR 联用方面, LAMP-CRISPR/Cas12b 体系已经用于志贺氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的可视化检测, 整个过程可在 1 h 内完成[23]。然而, 上述研究报道的检出限会因为样本前处理方法、检测通量的不同出现较大跨度, 这种差异可能和靶标类型、样本基质以及检测平台的区别有关, 目前还没有在统一参考品下完成系统比较, 不同平台的检测性能无法直接横向对比。此外, LAMP 技术的推广也面临引物设计方面的技术门槛, 如引物需同时识别靶标基因多个区域, 导致扩增效率与特异性以及较长的引物筛选周期等问题, 这使得 LAMP 的速度优势难以转化为实际应用的普适性。

1.2.2　重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是近期开发的一种恒温核酸扩增技术[24]。该技术模拟 T4 噬菌体 DNA 天然复制机制, 在 37~42 ℃恒温条件下, 20~30 min 内即可完成检测, 最低可检出 1~10 拷贝的靶标核酸[25]。RPA 的核心优势在于灵敏度高、特异性强、对核酸纯度要求低, 且可与侧向层析试纸条、CRISPR/Cas 系统、微流控芯片等技术联用, 因此广泛应用于病原体检测及食品安全监测等领域[26]。然而, RPA 的局限性同样明显, 如引物设计较为复杂、易产生气溶胶污染、扩增片段较短[27], 这些因素限制了其在某些需要长片段扩增或严格防污染场景中的应用。

1.2.3　滚环扩增技术

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是一种以环状 DNA 为模板的等温扩增技术, 可在恒温条件下生成 10^4~10^5 个碱基的长链串联重复序列, 该技术具有极高的特异性(可区分单碱基差异), 且扩增产物易于与纳米材料、荧光探针等信号系统偶联[28]。近年来, RCA 已发展出溶液相、固相、水凝胶及数字化等多种形式, 并与 CRISPR、生物传感器等技术整合, 拓展了分子诊断的应用范围。目前, 基于 RCA 的原位 RNA 测序技术已用于空间转录组学的高分辨率基因表达分析[29]。然而, RCA 的局限性同样突出, 如该技术仅能以环状 DNA 为模板, 非环状样本需额外进

行环化连接等预处理, 操作烦琐, 难以满足现场快速检测的需求。灵敏度是衡量检测方法能否替代 PCR 的关键指标, 表 1 比较了同一食品基质中多种检测方法的灵敏度, 以评估等温扩增技术的实际检出能力。

表 1 同一食品基质中不同检测方法的灵敏度对比

Table 1 Sensitivity comparison of different detection methods in the same food matrix

基质	靶标	方法	检出限	来源
植物感染样本	解淀粉欧文氏菌	LAMP-LFT	10^4 CFU/mL	[30]
		LAMP-CRISPR/Cas12a	10^3 CFU/mL	
		RPA-LFT	10^2 CFU/mL	
		RPA-CRISPR/Cas12a	10^2 CFU/mL	
乳制品	金黄色葡萄球菌	LAMP-CRISPR/Cas12a-ICS	6.7×10^2 CFU/mL	[31]
		RPA-CRISPR/Cas12a-ICS	6.7×10^2 CFU/mL	
		LAMP-CRISPR/Cas12a-荧光	67 CFU/mL	
		RPA-CRISPR/Cas12a-荧光	67 CFU/mL	
牛乳	金黄色葡萄球菌	RPA-CRISPR/Cas12a	10^4 拷贝/反应	[32]
		LAMP-CRISPR/Cas12a	10^2 拷贝/反应	
乳制品	大肠杆菌 O157: H7	LAMP-CRISPR/Cas12a	9.2 CFU/mL(纯培养)	[33]
		LAMP-CRISPR/Cas12a	7.4 CFU/mL(牛奶, 增菌 3 h)	
猪肉	志贺氏菌	RAA-CRISPR/Cas12a	10^{-2} CFU/25 g	[34]
		GB 4789.5—2012	10^{-1} CFU/25 g	
奶粉	克罗诺杆菌	RAA-CRISPR/Cas12a	10^{-2} CFU/100 g	

注: LFT 为侧流试验(lateral flow test)。GB 4789.5—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》。

1.3 基因测序技术

1.3.1 宏基因组测序技术

宏基因组测序不用先分离培养, 直接提取环境样本里所有微生物的 DNA 进行测序, 该技术能全面展现微生物群落物种组成、基因功能以及代谢潜力的技术。该技术分为两类, 扩增子测序(16S rRNA 基因测序)针对保守区域做扩增, 成本更低但分辨率有限; 全宏基因组鸟枪法测序可以拿到完整的基因组信息, 给出菌株水平分辨率及功能基因信息, 但对测序深度和数据分析要求更高[35–36]。Mchugh 等[37]用 16S rRNA 扩增测序追踪了乳粉生产链中的微生物群落动态, 结果发现和腐败有关的假单胞菌属(*Pseudomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)存在于所有样本里, 在食品生产链中体现了高通量测序追踪微生物移动、确定污染来源的实用价值。然而, 即使宏基因组测序在信息全面性和发现未知微生物的能力上拥有不可替代的优势, 但该技术对测序深度和数据分析的要求高, 使得它的时间成本和经济成本较高, 更适合用来做群落结构分析和功能基因挖掘, 不能当作常规监测和快速筛查的方法。

1.3.2 全基因组测序技术

全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)利用高通量技术, 不仅能得到细菌的完整基因组序列, 同时能够给出毒力基因谱、耐药基因谱、血清型信息以及系统发育关系。在致病菌溯源领域, WGS 广泛用在克罗诺杆菌、肺炎克雷伯菌以及单核细胞增生李斯特菌这类食源性致病菌的溯源和毒力分析[38–41], 围绕这些研究成果积累, WGS 已经从实验室方法发展成国家级溯源网络的核心工具, 且已成为致病菌溯源的黄金标准。美国食品药物管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)在 2012 年启动的 GenomeTrakr 项目, 是第一个使用 WGS 进行病原体鉴定的分布式实验室网络, 利用 NCBI 平台实时共享基因组和地理数据[42]; 我国国家食品安全风险评估中心 TraNet 网络带有毒力因子、耐药基因、血清分子分型等自动化分析模块, 已经覆盖全国 32 个省级和 266 家地市级疾控中心, 在多起重大食源性暴发事件的跨省溯源中起到了关键作用[43]。然而, 尽管 WGS 在暴发调查和网络化溯源中的价值已经得到充分确认, 但该技术在常规检测中的推广仍面临单次检测的设备投入和试剂成本较高, 数据分析需要专业人员操作, 且从样本处理到输出报告的整个周期偏长等阻碍。因此, 目前 WGS 主要用在致病菌溯源、暴发调查这类对分辨率有较高要求的关键场景, 不适合进行大规模筛查和现场检测。

1.3.3 第三代测序技术

第三代测序(以牛津纳米孔技术为代表)是一种不需要 PCR 扩增、可以直接读取单个 DNA 分子的测序技术, 它依靠检测核酸穿过生物纳米孔时引发的电流变化来确定 DNA 序列[44]。这一技术有 3 方面优点: (1)避开了 PCR 扩增带来的偏好性与错误, 让测序结果能更真实地对应原始样本; (2)支持实时测序, 可以在测序过程中立刻分析数据;

(3)操作步骤更简单, 设备便携性更高, 方便在加工场所内进行现场检测[44–45]。在临床场景使用时, 搭配实时分析软件, 牛津纳米孔技术可以在测序过程中, 把读段和细菌、耐药基因数据库做实时比对, 从获取样本到得出结果仅需大约 1 h, 还能将耐药基因和特定病原体对应起来, 为定制抗生素治疗方案给出参考[46]。目前, 纳米孔测序虽然在实时性和便携性上打破了传统测序的限制, 但它的单碱基准确率仍然需要提高, 因此这项技术现在更适用于现场溯源和临床即时检测领域, 而在需要高准确度的精细基因组分析中还存在不足。

1.4　CRISPR-Cas 检测技术

目前, PCR 和等温扩增技术已经被广泛用于病原微生物的检测工作中, 但 PCR 技术对热循环设备有硬性要求, 在资源条件有限的场景里很难推广开来; 等温扩增虽然对温控的要求更低, 但是它存在引物设计难度大, 还容易出现非特异性扩增的问题。所以, 在对便捷性要求更高、对设备依赖度要求更低的场景中, CRISPR-Cas 系统的“反式切割”活性为高特异性检测给出了新思路[47]。然而, CRISPR-Cas 技术在实际应用时, 需要较高的靶标浓度进行高效激活, 但实际样本的浓度远低于这个阈值, 所以需要先利用等温扩增放大信号[48–50], 这使得在复杂样本中很容易受到非特异性扩增和基质成分干扰, 严重影响检测结果的可靠性[51–52]。此外, PAM 序列带来的限制还有脱靶的风险[5], 也进一步限制了选择靶点时的灵活性。为打破这一限制, 研究者也在探索 CRISPR-Cas 之外的可编程核酸酶。原核 Argonaute 蛋白可依靠短链 DNA 向导介导完成特异性识别和切割, 整个过程不依赖 PAM 序列, 在多重检测方面拥有理论优势[53–54]。目前, 基于丁酸梭菌 Argonaute 蛋白(*Clostridium butyricum* Argonaute, CbAgo)开发的检测平台已能实现多种食源性致病菌的同步检测[55–56], 但该技术在中温条件下的切割效率不如某些同源 Ago 蛋白, 且整体的文献积累和产业化程度不如 CRISPR-Cas 体系成熟, 相关研究还处于早期探索阶段。

综合来看, 无论是 Cas 体系还是 Ago 体系, 都难以绕开核酸扩增这一前置步骤, 因此不能从根本上消除扩增步骤带来的污染和非特异性问题, 而免扩增直接检测也就成了突破性能瓶颈的必然方向。目前, 免扩增研究主要沿着 3 条技术路径推进: (1)级联信号放大, 即在 CRISPR 反应内部搭建正反馈回路, 让信号实现自催化增强, 代表性平台如 CasSPORT, 其对前列腺癌相关 miRNA 的检出限较传统 Cas12a 明显降低[57]; (2)与超灵敏传感器的结合, 即把 CRISPR 对核酸的识别过程直接转换为电学或光学信号, 如 CRISPR-Cas13a 搭配石墨烯场效应晶体管, 可以在 30 min 内检测出浓度极低的靶标[58], 而基于 CRISPR 的检测与响应技术(CRISPR-based detection and response technology, CRISPR-DART)通过动态光散射读取信号, 实现了高灵敏度检测[59]; (3)数字化微反应器, 即把 CRISPR 反应分散到大量皮升级的微小液滴中, 让信号在局部聚集增强, 如 d3CRISPR 平台就可以在不需要扩增的条件下, 完成极微量核酸的绝对定量[60]。尽管免扩增检测展现出巨大的发展潜力, 但仍面临探针设计复杂、芯片制造要求高、微反应器通量有限等工程化难题, 随着 Cas 蛋白人工改造和微流控技术不断发展, 这个方向有望在保留单碱基分辨率的同时, 进一步提高灵敏度和对不同基质的适应能力。

2　各技术比较与综合分析

2.1　灵敏度、特异性与检测时间对比

检测灵敏度、特异性以及检测时长是评估核酸检测技术性能的 3 个核心方面, 这三者通常会互相制约, 即想要获得更高灵敏度, 一般要拉长反应时间或提高操作复杂度, 而想缩短检测时间, 就需要对灵敏度或特异性进行让步。从各类技术的整体表现来看, qPCR 与 dPCR 的灵敏度最高, 可达单拷贝级别, 特异性也比较稳定, 是定量检测的标准方法, 但这两种方法都需要依靠精密热循环设备, 检测耗时较长; 等温扩增的检测时长较短、所需设备简单, 灵敏度和 PCR 技术相差不大, 但是在开放环境中操作容易受到气溶胶污染产生假阳性结果; CRISPR-Cas 的特异性表现突出, 但不经过扩增的灵敏度有限, 需要额外的扩增辅助; 测序技术的分辨率最高、获取信息最全面, 但耗时久且成本很高。因此, 不同技术的竞争优势, 本质上就是对灵敏度、速度、便捷性以及信息量方面做出的不同取舍。

2.2　成本与操作复杂度

成本和操作复杂度也是影响技术可及性的两个关键因素, 二者共同决定了技术从实验室走向实际应用的难易程度。在设备投入上, 等温扩增和 CRISPR-Cas 体系要求较低, 仅需恒温金属浴或水浴锅; qPCR 与 dPCR 需精密热循环仪及荧光检测系统, 但 dPCR 耗材成本更高; 基因芯片需专用杂交仪与激光扫描仪; 测序技术的前期投入高, 需配套生物信息学平台。而在操作复杂度上, 等温扩增最为简便, 结果可肉眼判读; CRISPR-Cas 和 pAgo 全程恒温完成; qPCR 核酸纯化仍依赖离心机; dPCR 涉及微滴生成、转移、读取等多个环节; 基因芯片和测序操作流程较长, 对人员要求较高。在试剂成本上, qPCR 和等温扩增单次检测成本最低, 适合批量筛查; dPCR 专用耗材成本较高; 基因芯片制备成本高, 但在靶标固定的高频次检测中可分摊; 测序成本持续下降, 其在获取完整基因组信息方面具有独特性价比优势。因此, 设备投入、操作复杂度与试剂成本分别受信息产出能力、现场化需求及检测通量的制约, 三者的综合平衡共同划定了不同技术的

适用边界。

2.3 适用场景分析

在适用场景上，实验室精准定量检测以 qPCR 与 dPCR 为首选，两者在定量准确性、标准化程度和结果溯源性方面具有不可替代的优势，其中 dPCR 尤其适合高抑制物含量的食品样本，且与 PMA 联用可区分死活菌，适用于评估杀菌效果或活菌载量；现场快速筛查以等温扩增技术(LAMP、RPA)为主要支撑，其无须精密温控、检测时间短、结果可肉眼判读，CRISPR-Cas 与 pAgo 则在保持快速检测的同时提供单碱基分辨能力，适用于亚型鉴别或耐药基因筛查；高通量多靶标同步检测方面，基因芯片可在单次反应中覆盖数千个靶标，适合大规模筛查，多重 PCR 和多重 qPCR 虽通量相对有限，但操作更简便、定量能力更强；致病菌溯源以全基因组测序为金标准，可提供菌株水平的遗传信息，第三代纳米孔测序凭借便携性与实时性为现场溯源提供了新路径。此外，宏基因组测序可全面解析微生物群落的物种组成和功能基因，16S rRNA 扩增子测序成本较低但分辨率有限；全基因组测序和多重 qPCR 均可用于耐药基因与毒力基因的同步筛查。上述各场景对应的首选技术、主要局限及核心优势见表 2。

表 2 各检测技术的优势与局限对比

Table 2 Comparison of advantages and limitations of various detection technologies

应用场景	首选技术	主要局限	核心优势
实验室精准定量	qPCR/dPCR	时间、设备成本、操作复杂	高灵敏度、定量准确、可溯源
现场快速筛查	LAMP/RPA	定量能力、多重检测能力	时间小于 1 h、便携性、肉眼判读
高通量筛查	多重 PCR	单靶标灵敏度、定量精度	高通量、单位样本低成本
致病菌溯源	WGS/纳米孔测序	时间、成本、数据分析难度	菌株级分辨率、全基因组信息
微生物群落分析	宏基因组测序	数据分析复杂度、成本	“未知”信息挖掘能力
资源有限地区	LAMP/CRISPR 试纸条	灵敏度、定量能力	设备依赖性低、操作简便

3 结束语

本文围绕“灵敏度-速度-便捷性”3 个方向，梳理了各类分子检测技术的性能和适用范围。分析表明，现有各类检测技术都存在局限，单一技术没法满足所有场景的检测需求。虽然实际应用中会根据检测要求设计组合方案，且整合流程后提高了自动化程度，但各个操作环节在物理层面仍然相互分开，还没有做到真正的一体化，同时，依赖扩增的技术路径本身存在噪声和污染风险。因此，现有的应对方法只能在一定程度上缓解，没办法从根本上解决技术瓶颈。为了打破上述限制，未来研究可以从以下 3 个方向重点推进。

开发免扩增的直接检测技术，从根源上去除对核酸扩增的依赖。扩增步骤是污染和产生非特异性问题的来源，也是导致复杂操作的主要原因，免扩增检测通过提高 CRISPR 反式切割效率、开发高灵敏度物理传感器和新型信号放大方法，有希望在不需要扩增的条件下直接检出痕量靶标。目前，已经报道的免扩增 CRISPR 检测方案里，部分平台在纯化样本中已经达到和 qPCR 相近的灵敏度，能检测病毒 RNA、细菌 DNA 等多种靶标。然而，从实验室成果向实际应用转化过程中，该技术也存在相应问题，如在非纯化样本体系中，食品基质干扰物(脂肪、蛋白质、多糖)对识别和切割反应的抑制作用未被量化评估，且检测仍依赖实验室级别设备(如 DLS 读数仪、半导体分析仪)，无法有效进行现场应用。因此，如何把传感器读出模块一体化集成到便携设备上，是实现真正“免扩增、易操作”的下一个关键研究方向。

推动人工智能(artificial intelligence, AI)辅助分析，用算法补上物理层面的性能短板。AI 技术本身不会改变检测原理，只在信号处理和数据分析环节起作用。在多重 PCR 检测过程里，AI 技术可以通过解析扩增曲线的波形特征，不用探针就能完成靶标区分和定量工作，还能降低试剂花费，减轻引物设计的工作负担。对于 CRISPR 检测，AI 技术能通过自动识别荧光图像，去掉人工判读结果带来的主观误差，保证现场检测得到的结果稳定一致。在纳米孔测序领域，AI 还拥有分析纳米孔测序原始电信号的能力，可以从同一组数据里判断出微生物的存活状态，这些信息是传统碱基序列比对得不到的，所以，AI 通过优化算法降低操作门槛、提高数据质量，在一定程度上有效拓宽了检测系统获取信息的范围。

推进针对即时检测的全流程系统工程开发，搭建“样本进-结果出”的一体化检测平台。目前，已经有部分原型系统展现了出色的分析性能，如 SMART 系统可以在 76 min 内完成 15 种靶标的并行检测[61]；集成在智能手机上的数字 RPA/CRISPR 平台达到了低至 1 拷贝/μL 的检测灵敏度，而且全程耗时不超过 50 min[62]，但受到工程化转换的瓶颈限制，大部分集成系统仍然停留在实验室验证阶段，同时，从研发原型过渡到标准化生产，目前还缺少成体系的质量控制规程。此外，该阶段还面临着微流控基材物料成本高、批次间差异大、核心生物试剂很难在常温环境下长期保持活性等技术难题。因此，后续研究需要从材料科学、制造

工艺与品控体系 3 个方向联合攻关, 筛选出低成本、高均一性的基底材料, 开发适合常温储运的试剂固化技术, 建立覆盖生产全链条的质控标准, 实现检测性能与产品可靠性的双重提高。

基于此, 微生物检测技术未来发展会呈现清晰的分层格局: 中心实验室以 dPCR 和测序为核心, 保持检测灵敏度与信息的全面性; 现场快速检测主要依靠等温扩增与 CRISPR 试纸条技术, 不断提高检测速度与便捷性, 免扩增检测、AI 辅助分析和全集成化系统, 则会在保证灵敏度的基础上, 重点优化操作便捷程度。这 3 个方向共同发力, 促进微生物检测技术体系在灵敏度、速度和便捷性之间实现更好的协同与平衡, 为食品安全监管和公共卫生保障提供更坚实的技术支撑。

参考文献

[1] 陈星湘, 费樱, 黄月明, 等. 防气溶胶污染的 UDG-LAMP-LFD 核酸检测体系的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(2): 147–152.
Chen Xingxiang, Fei Ying, Huang Yueming, et al. Establishment of udg-lamp-lfd nucleic acid detection system against aerosol pollution [J]. Journal of Parasitic Biology, 2023, 18(2): 147–152.

[2] 初亚男, 封利颖, 张婕妤, 等. 环介导等温扩增技术改进的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 729–735.
Chu Yanan, Feng Liying, Zhang Jieyu, et al. A systematic review of the research progress and improvement of loop-mediated isothermal amplification [J]. Microbiology China, 2015, 42(4): 729–735.

[3] Chen J S, Ma Enbo, Harrington L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. Science, 2018, 360(6387): 436–439.

[4] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. Science, 2017, 356(6336): 438–442.

[5] Xie Siying, Wang Shulin, Hu Yilin, et al. Recent advances in CRISPR/Cas12a activation modes for versatile and robust diagnostics [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2026, 200: 118829.

[6] Law J W, Ab Mutalib N S, Chan K G, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 770.

[7] Postollec F, Falentin H, Pavan S, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology [J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 848–861.

[8] 杨露瑶, 任小东, 毛怡心, 等. 六种食源性病原微生物多重定量聚合酶链式反应检测方法的建立[J]. 疾病监测, 2025, 40(4): 512–519.
Yang Luyao, Ren Xiaodong, Mao Yixin, et al. Establishment of a multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for detections of six foodborne pathogens [J]. Disease Surveillance, 2025, 40(4): 512–519.

[9] 艾鹏飞, 王珊, 高辉明, 等. TaqMan 多重实时定量 PCR 快速检测 3 种常见食源性病原菌[J]. 中国食品学报, 2024, 24(5): 373–380.
Ai Pengfei, Wang Shan, Gao Huiming, et al. Rapid detection of three common foodborne pathogens by multiplex real-time quantitative PCR based on TaqMan probes [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(5): 373–380.

[10] Sun Xueqi, Xiao Jian, Wei Haiyan, et al. A ddPCR method for simultaneous detection and quantification of *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus cereus* in foods [J]. Scientific Reports, 2025, 15: 32092.

[11] 张雪, 马丽侠, 叶德萍, 等. 即食果蔬制品中致泻大肠埃希氏菌检测微滴数字 PCR 系统的建立[J]. 食品工业科技, 2025, 46(21): 357–365.
Zhang Xue, Ma Lixia, Ye Deping, et al. Establishment of a droplet digital PCR system for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in ready-to-eat fruit and vegetable products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(21): 357–365.

[12] Sidelev S I. A novel multiplex PCR-based technique for detection of toxigenic cyanobacteria [J]. Microbiology, 2019, 88(3): 375–377.

[13] Van der Heyden H, Wallon T, Lévesque C A, et al. Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in soil by multiplex real-time qPCR [J]. Plant Disease, 2019, 103(3): 475–483.

[14] Grad A I, Vica M L, Ungureanu L, et al. Assessment of STI screening in *Romania* using a multiplex PCR technique [J]. The Journal of Infection in Developing Countries, 2020, 14(4): 341–348.

[15] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR [J]. Cells, 2021, 10(8): 1931.

[16] 禹兰平, 王楷宸, 潘俊慧, 等. 等温扩增技术概述及其在动物病原检测中的应用[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(12): 96–103.
Yu Lanping, Wang Kaicheng, Pan Junhui, et al. Overview of isothermal amplification technology and its application in animal pathogen detection [J]. China Animal Health Inspection, 2022, 39(12): 96–103.

[17] Wang Siyuan, Shen Shuqi, Kang Shimo, et al. Magnet regulating valve reconstructed lab-on-a-disc POCT system [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2026, 294: 118185.

[18] Shu Taowei, Yin Xueer, Xiong Qiangyuan, et al. Lift-CM: an integrated lift-heater centrifugal microfluidic platform for point-of-care pathogen nucleic acid detection using isothermal amplification and CRISPR/Cas12a [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2025, 274: 117178.

[19] Lv Ji, Liu Wenping, Wang Fangfang, et al. Multi-target microfluidic loop-mediated isothermal amplification technology for the detection of foodborne pathogens in various food matrices [J]. Analytica Chimica Acta, 2025, 1346: 343751.

[20] Chen Yuxin, Zhu Yuanshou, Qi Wenbao, et al. DeepLAMP: deep learning-assisted Hive-Chip integrated with AuNP-enhanced colorimetric LAMP for smartphone-based multiplex detection of African swine fever virus [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2026, 451: 139398.

[21] Honda R, Saruwatari T, Natsuhara D, et al. A high-speed sequential liquid compartmentalization method for digital loop-mediated isothermal amplification in a microfluidic device [J]. Lab on a Chip, 2025, 25(18): 4787–4799.

[22] Li Qiang, Zhou Qiao, Yang Litao. BOLD: a novel BrCas12b-based one-pot LAMP detection platform for rapid and sensitive identification of foodborne pathogens [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2026, 449: 139145.

[23] 郑雨婷, 张行雨, 王诗琪, 等. 环介导等温扩增-CRISPR/Cas12b 可视化检测志贺氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 131–139.
Zheng Yuting, Zhang Xingyu, Wang Shiqi, et al. Visual detection of *Shigella* by loop-mediated isothermal amplification-CRISPR/Cas12b assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 131–139.

[24] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.

[25] 张娟, 徐颖, 张涛, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在病原检测中的研究进展[J]. 中国口岸科学技术, 2025, 7(6): 20–24.
Zhang Juan, Xu Ying, Zhang Tao, et al. Research progress in recombinase polymerase amplification technology for pathogen detection [J]. China Port Science and Technology, 2025, 7(6): 20–24.

[26] 刘培海, 姜涛, 陈颖, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在粮谷相关病原检测中的应用[J]. 中国口岸科学技术, 2025, 7(11): 39–48.
Liu Peihai, Jiang Tao, Chen Ying, et al. Application of recombinase polymerase amplification in the detection of grain and cereal-related pathogen [J]. China Port Science and Technology, 2025, 7(11): 39–48.

[27] Han J, Song Yejin, Lee J, et al. Rolling circle amplification for next-generation molecular diagnostics, genome analysis, and spatial transcriptome profiling [J]. Nanoscale, 2025, 17(37): 21345–21378.

[28] Ali M M, Li Feng, Zhang Zhiqing, et al. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine [J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(10): 3324–3341.

[29] 刘艳秀, 叶培莹, 陈诗婕, 等. 基于滚环扩增的原位测序空间转录组学技术研究进展[J]. 科学通报, 2026, 71(1): 55–68.
Liu Yanxiu, Ye Peiying, Chen Shijie, et al. Advances in rolling circle

amplification-based *in situ* sequencing for spatial transcriptomics technologies [J]. Chinese Science Bulletin, 2026, 71(1): 55–68.

[30] Ivanov A V, Safenkova I V, Drenova N V, et al. Comparison of biosensing methods based on different isothermal amplification strategies: a case study with *Erwinia amylovora* [J]. Biosensors, 2022, 12(12): 1174.

[31] Xu Danhong, Zeng Haijuan, Wu Wenhui, et al. Isothermal amplification and CRISPR/Cas12a-system-based assay for rapid, sensitive and visual detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Foods, 2023, 12(24): 4432.

[32] Amanzholova M, Shaizadinova A, Bulashev A, et al. Genetic identification of *Staphylococcus aureus* isolates from cultured milk samples of bovine mastitis using isothermal amplification with CRISPR/Cas12a-based molecular assay [J]. Veterinary Research Communications, 2024, 48(1): 291–300.

[33] Wang Zuwei, Chen Huan, Hu Antuo, et al. Establishment of LAMP-CRISPR/Cas12a for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and one-pot detection [J]. Food Microbiology, 2024, 124: 104622.

[34] 张欣悦, 杨钰娟, 孔祥翔, 等. 重组酶介导的等温扩增结合 CRISPR/Cas12a 检测志贺氏菌和克罗诺杆菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(11): 35–44.
Zhang Xinyue, Yang Yujuan, Kong Xiangxiang, et al. Detection of *Shigella* and *Cronobacter* using recombinase-aided amplification combined with CRISPR/Cas12a [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024, 15(11): 35–44.

[35] 翟齐啸, 张川. 基因组学在食品微生物研究中的应用[J]. 中国食品学报, 2025, 25(4): 1–7.
Zhai Qixiao, Zhang Chuan. The application of genomics to food microbiology research [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(4): 1–7.

[36] Liu Biqi, Yang Jinghua, Wang Jiayue, et al. Application of whole-genome sequencing and metagenomic sequencing in microbial analysis of milk powder and its processing environment: current findings and challenges [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2026, 25(3): e70478.

[37] McHugh A J, Feehily C, Fenelon M A, et al. Tracking the dairy microbiota from farm bulk tank to skimmed milk powder [J]. MSystems, 2020, 5(2): e00226–e00220.

[38] Gan Xin, Li Menghan, Yan Shaofei, et al. Genomic landscape and phenotypic assessment of *Cronobacter sakazakii* isolated from raw material, environment, and production facilities in powdered infant formula factories in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 686189.

[39] Holý O, Parra-Flores J, Lepuschitz S, et al. Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered milk [J]. Foods, 2020, 10(1): 20.

[40] Wareth G, Linde J, Hammer P, et al. WGS-based phenotyping and molecular characterization of the resistome, virulome and plasmid replicons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from powdered milk produced in Germany [J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 564.

[41] Portmann A C, Fournier C, Gimonet J, et al. A validation approach of an end-to-end whole genome sequencing workflow for source tracking of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 446.

[42] FDA. GenomeTrakr video library [Z]. U. S. Food and Drug Administration, 2025.

[43] 国家食品安全风险评估中心. 我国首个基于全基因组测序技术的新型食源性疾病分子溯源网络建成[Z]. 2025-06-11.
China National Center for Food Safety Risk Assessment. China's first novel foodborne disease molecular traceability network based on whole genome sequencing technology established [Z]. 2025-06-11.

[44] Wang Yunhao, Zhao Yue, Bollas A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications [J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(11): 1348–1365.

[45] Amarasinghe S L, Su Shian, Dong Xueyi, et al. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis [J]. Genome Biology, 2020, 21(1): 30.

[46] Sharma A, Bansal S, Moore M D, et al. Exploring the frontiers of nanopore sequencing in food safety and food microbiology [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2025, 16(1): 219–244.

[47] Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/cas BiosensingTechnologies [J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1226–1233.

[48] Qian Weidong, Huang Jie, Wang Ting, et al. Ultrasensitive and visual detection of human norovirus genotype GII. 4 or GII. 17 using CRISPR-Cas12a assay [J]. Virology Journal, 2022, 19(1): 150.

[49] Zhao Furong, Wang Pei, Wang Haoxuan, et al. CRISPR/Cas12a-mediated ultrasensitive and on-site monkeypox viral testing [J]. Analytical Methods, 2023, 15(17): 2105–2113.

[50] Fang Taisong, Shen Jinling, Xue Junxin, et al. Sensitive and rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 from beef samples based on recombinase aided amplification assisted CRISPR/Cas12a system [J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2022, 106(1): 156–164.

[51] 杨雪, 冯丽. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(17): 22–30.
Yang Xue, Feng Li. Research progress on rapid detection technology of foodborne pathogenic bacteria [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(17): 22–30.

[52] 寇秀颖, 周宝青, 陈玲, 等. CRISPR/Cas 系统在食源性致病菌快速检测新技术中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(7): 313–323.
Kou Xiuying, Zhou Baoqing, Chen Ling, et al. Progress in the rapid detection of foodborne pathogens based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated protein(cas) [J]. Food Science, 2023, 44(7): 313–323.

[53] Li Letian, Feng Niu, Chen Yiping. Prokaryotic Argonaute-based multiplexed detection assays for food safety: recent advances and perspectives [J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 164: 105243.

[54] Kropocheva E V, Lisitskaya L A, Agapov A A, et al. Prokaryotic argonaute proteins as a tool for biotechnology [J]. Molecular Biology, 2022, 56(6): 854–873.

[55] Wang Zhipan, Cheng Xinrui, Ma Aimin, et al. Multiplexed food-borne pathogen detection using an argonaute-mediated digital sensor based on a magnetic-bead-assisted imaging transcoding system [J]. Nature Food, 2025, 6(2): 170–181.

[56] Wang Mengjiao, Li Letian, Wei Luyu, et al. Multiplexed pathogenic bacteria detection *via* a two-dimensional encoded fluorescent microsphere system [J]. Nano Letters, 2025, 25(6): 2256–2265.

[57] Zhang Decai, Jiang Juan, Zhong Zhijuan, et al. Split PAM-orchestrated cascade CRISPR tool for amplification-free and high-sensitivity detection of prostate cancer-associated miRNAs [J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 524: 169462.

[58] Li Huijie, Yang Jie, Wu Guangfu, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 and respiratory syncytial virus using CRISPR Cas13a and graphene field-effect transistors [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, 61(32): e202203826.

[59] Guo Yuqian, Xiong Yuanqian, Tong Weipeng, et al. CRISPR/Cas12a-based dynamic light scattering assay for nucleic acid amplification-free and ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(45): 25232–25244.

[60] Zhang Yang, Liu Hangrui, Tang Shiyang, et al. Double-emulsion droplet digital CRISPR/Cas12a for amplification-free, absolute quantification of nucleic acids at attomole levels [J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 512: 162098.

[61] Sun Jingjing, Yin Weihong, Shen Dan, et al. Rotary cylinder based fully integrated microfluidic system for the multiplex molecular diagnosis of respiratory pathogens [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2026, 447: 138820.

[62] Zhao Shuhao, Zhang Yunyun, Wang Yifei, et al. Sample-to-answer nucleic acid detection using a fully integrated microdevice for nucleic acid extraction and smartphone-based droplet digital RPA/CRISPR [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2025, 289: 117886.

(责任编辑: 曹岱琳 范彩旭)