刘需霖, 匙辰鹏, 王雁伟, 等. 3 种食源性致病菌 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法建立及其在乳品中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 311−317. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120184
LIU Peilin, SHI Chenpeng, WANG Yanwei, et al. Establishment and Application of an SDS-PMA-mRT-qPCR Assay for the Detection of Three Food-borne Pathogenic Bacteria in Dairy Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 311−317. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120184

· 分析检测 ·

3 种食源性致病菌 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法建立及其在乳品中的应用

刘需霖, 匙辰鹏, 王雁伟, 艾鹏飞*
（河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018）

摘　要: 本研究利用十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）联合叠氮溴化丙锭（propidium monoazide，PMA）预处理样品后，采用多重实时荧光定量 PCR（multiple real-time quantitative polymerase chain reaction，mRT-qPCR）方法快速、准确检测乳制品中沙门氏菌、单增李斯特菌和产志贺毒素大肠埃希氏菌 3 种食源性致病菌。通过对沙门氏菌中的 *invA* 基因、单增李斯特菌中的 *hly* 基因和产志贺毒素大肠埃希氏菌中的 *stx* 基因的保守序列分别设计特异性引物和探针，建立 mRT-qPCR 反应体系，探讨 PMA 预处理消除由死菌造成的检测的假阳性结果，并对检测的特异性、检出限、稳定性以及模拟样品中的检测效果进行了研究。结果表明，PMA 结合 SDS 的预处理能有效排除死菌对 mRT-qPCR 检测结果的干扰，最佳 PMA 浓度为 20 μmol/L；建立的 mRT-qPCR 方法特异性强，在 18 株非目标菌的干扰下仅对 3 种目标菌进行特异性扩增；灵敏度高，3 种目标菌的检出限均为 10^2 CFU/mL；稳定性好，不同批次内和批次间的重复性检测的变异系数均小于 1%；对不同污染乳品的检测结果与国家标准中的培养法一致，检测周期约 7 h。本研究建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 方法可以实现对沙门氏菌、单增李斯特菌和产志贺毒素大肠埃希氏菌的快速检测，为乳品安全提供技术支持。

关键词: 多重实时荧光定量 PCR（mRT-qPCR）, 叠氮溴化丙锭, 沙门氏菌, 单增李斯特菌, 产志贺毒素大肠埃希氏菌
中图分类号: TS207.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0311−07　　本文网刊:
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120184

Establishment and Application of an SDS-PMA-mRT-qPCR Assay for the Detection of Three Food-borne Pathogenic Bacteria in Dairy Products

LIU Peilin, SHI Chenpeng, WANG Yanwei, AI Pengfei*
（College of Food and Bioscience, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China）

Abstract: This study employed a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction (mRT-qPCR) method incorporating SDS (sodium dodecyl sulfate) and PMA (propidium monoazide) pretreatment to enable rapid and accurate detection of three food-borne pathogens *Salmonella* spp. (SA), *Listeria monocytogenes* (LM), and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STE) in dairy products. Three sets of specific primers and TaqMan probes were designed targeting conserved regions of the *invA* gene (SA), *hly* gene (LM), and *stx* gene (STE), facilitating the development of an optimized mRT-qPCR assay. Furthermore, PMA pretreatment efficacy was evaluated for eliminating false-positive results caused by dead bacterial cells, and the evaluation of the specificity, detection limit, stability, and detection effect in the simulated dairy samples was conducted in this study. The results revealed that pretreatment with PMA combined with SDS prevented the

收稿日期: 2024−12−16
基金项目: 河北省重点计划项目（22326312D）; 河北省大中学生科技创新能力培育专项（22E50074D）。
作者简介: 刘需霖（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学, E-mail: wakingofinsects@126.com。
*** 通信作者:** 艾鹏飞（1974−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: apf2002@sina.com。

interference of dead bacterial cells, and the optimal effective PMA concentration was 20 μmol/L. The assay showed high specificity and sensitivity and good stability in detecting the three target strains amplified in the presence of 18 non-target strains, with the lowest limits of detection for the three target strains being up to 10^2 CFU/mL and the variation coefficients of inter-batch and intra-batch being less than 1%. The results obtained for the detection of causal organisms in bacterially contaminated dairy products using the SDS-PMA-mRT-qPCR assay were comparable to those obtained using the national standard method, with a test cycle of 7 h. These findings indicate that the SDS-PMA-mRT-qPCR assay can be used for the rapid and accurate detection of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, and Shiga toxin-producing *E. coli* in dairy products and represents an appropriate technique for ensuring the safety of dairy products.

Key words: multiple real-time quantitative polymerase chain reaction (mRT-qPCR); propidium monoazide; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*; Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

随着社会经济的发展和人们生活水平的提高，市场对乳品的需求量日益增加，乳品安全越来越受到重视。乳品中含有丰富的营养物质，易受病原菌污染而腐败变质[1−2]。近年来，因误食病原菌污染的乳品引起食物中毒或诱发疾病的事件时有发生，且呈现持续上升趋势[3−4]。乳品中食源性病原菌主要包括单增李斯特菌[5]、蜡样芽孢杆菌[6]、沙门氏菌[7]、产志贺毒素大肠埃希氏菌[8]、金黄色葡萄球菌[9] 等，其中沙门氏菌、单增李斯特菌和产志贺毒素大肠埃希氏菌更为常见[10]。沙门氏菌（*Salmonella* spp., SA）作为人畜共患的肠道致病菌，引起的食物中毒事件常年位居我国食源性致病菌榜首[11]。单增李斯特菌（*Listeria monocytogenes*, LM）致病性强，临床症状主要为败血症、脑膜炎和流产等，是世界卫生组织（WHO）食品安全工作计划中重点检测的四大食源性致病菌之一[12]。产志贺毒素大肠埃希氏菌（Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STE）可引起包括出血性腹泻、溶血性尿毒症、肾衰竭在内的严重疾病甚至死亡，曾在世界范围内引发多起食物中毒事件[13]。因此，亟需建立起这三种病原菌快速高效的检测方法，以便可以及时监测乳品的污染情况，有效预防和控制由食源性致病菌引起的疾病发生。

对于食源性病原菌的检测，常用的是国家标准中的微生物培养法，但该方法存在操作步骤多、过程繁琐、检测周期长（5~7 d）且不易定量等弊端[14−15]，难以应用于保鲜期短的乳品中致病菌的实时检测。后续发展起来的检测方法，如腺苷三磷酸发光技术[16]、免疫学技术[17]、生物传感器技术[18]、流式细胞技术[19]等，在灵敏度、稳定性、检测效率等方面尚有欠缺。近年来，基于 TaqMan 探针的多重实时荧光定量 PCR（multiple real-time quantitative polymerase chain reaction, mRT-qPCR）检测技术具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、快速高效等优点而备受青睐[20−21]。

叠氮溴化丙锭（propidium monoazide, PMA）是一种 DNA 结合剂，能透过受损细胞或死菌细胞的细胞膜后与 DNA 结合。十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS）是一种辅助 PMA 透过受损细胞膜的增强剂[22−23]。在进行 mRT-qPCR 检测过程中，采用 PMA 结合 SDS 对菌悬液的预处理能够消除死菌细胞带来的假阳性检测结果，从而对活菌的检测结果更加准确可靠，因而在实际检测中得到广泛应用[24−25]。本研究针对沙门氏菌、单增李斯特菌和产志贺毒素大肠埃希氏菌的特异性基因序列设计引物和探针，结合 PMA 和 SDS 对菌液的预处理，建立一种可同时对这 3 种致病菌活细胞高效快速检测的 SDS-PMA-mRT-qPCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

单增李斯特菌（54001）、蜡样芽孢杆菌（63001）、鼠伤寒沙门氏菌（50115）、表皮葡萄球菌（26069）、多黏芽孢杆菌（63512） 中国医学菌种保藏中心（CMCC）；沙门氏菌（21484）、产志贺毒素埃希氏菌（10670）、福氏志贺氏菌（21534）、大肠埃希氏菌（10372）、金黄色葡萄球菌（21600）、肠炎沙门氏菌（10982）、副溶血性弧菌（21617）、枯草芽孢杆菌（10002）、巴氏醋杆菌（23561）、大肠杆菌 O157:H7（21530）、伊氏李斯特氏菌（21633） 中国工业微生物菌种保藏中心（CICC）；苏云金芽孢杆菌（51024）、弗氏柠檬酸杆菌（43864）、阪崎肠杆菌（51024）、英诺克李斯特菌（33090）、空肠弯曲杆菌（29428） 美国标准菌种收藏所（ATCC）；pGM19-T 质粒载体、大肠杆菌 JM109 本实验室；牛肉膏、蛋白胨、营养肉汤、琼脂等细菌培养基组分 天根生化科技（北京）有限公司；细菌质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、5×Super RT-qPCR PreMix 试剂盒 北京索莱宝科技有限公司；十二烷基硫酸钠（SDS）、叠氮溴化丙锭（PMA）等其它试剂 北京赛百盛生物工程有限公司。

VeritiPro PCR 仪 Thermo Fisher 公司；Gel Doc XR 凝胶成像系统 Bio Rad 公司；7900 实时荧光定量 PCR 仪 ABI 公司；超微量紫外可见分光光度计 Mettler Toledo 公司；5417R 高速冷冻离心机 Eppendorf 公司；LUV-260AD 紫外透射切胶仪 上海路阳仪器有限公司；DYY-6D 电泳仪、DYCP-31BN 电泳槽 北京六一生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液制备和 DNA 提取 本实验中所使用的 21 种菌株在-80 ℃ 超低温冰箱中长期冻存。活化培养时从超低温冰箱中取出菌株，用牙签蘸取菌液

在 LB 平板培养基上划线培养，37 ℃ 培养箱中培养 12 h 后备用。菌悬液制备时挑取单菌落到 LB 液体培养基中在 160 r/min 摇床上培养 16 h 后，将菌液浓度调整至 10^7 CFU/mL。使用 0.01 mol/L 无菌磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）制备 10 倍梯度稀释菌悬液。为了获得部分细胞死亡或受损的菌悬液，将沙门氏菌在 60 ℃ 下孵育 6 min，单增李斯特菌和产志贺毒素大肠埃希氏菌在 52 ℃ 热激 10 min[26]，热处理后的菌悬液冰浴 5 min 后，涂布于 LB 平板培养（37 ℃）过夜后计数。采用 Liang 等[27] 的沸水浴法提取细菌基因组 DNA，用双蒸水（ddH_2O）溶解 DNA 至 50 ng/μL，-20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2　引物和探针的设计与合成　根据 GenBank 收录的 SA *invA* 基因（NC_0031997.2）、LM *hly* 基因（NC_003210.1）和 STE *stx* 基因（NC_017060.1）的保守序列，采用 Premier 5.0 软件设计引物，经 BLAST 和 DNAMAN 软件分析引物的可行性[28]；采用设计的引物（具体序列见表 1）进行目标菌 PCR 试验，扩增产物经 2% 琼脂糖电泳，回收纯化目的条带，构建重组 pGM19-T 质粒载体，转入 JM109 感受态细胞中，37 ℃ 平板培养过夜后，挑选阳性克隆测序，依据测序结果设计 TaqMan 探针[24]；基因测序、引物和探针合成委托生工生物工程（上海）有限公司完成。

1.2.3　mRT-qPCR 反应体系优化　在 DNA 模板相同的情况下，引物浓度和探针浓度是影响整个反应体系的关键因素[29]。参照试剂盒说明书分别对 3 种目标菌的引物和探针的添加量进行 9 种组合 RT-qPCR 试验（引物和探针组合为①0.4、0.3 μL，②0.6、0.3 μL，③0.8、0.3 μL，④0.4、0.4 μL，⑤0.6、0.4 μL，⑥0.8、0.4 μL，⑦0.4、0.5 μL，⑧0.6、0.5 μL，⑨0.8、0.5 μL），即总反应体系 20 μL 中，5×Super RT-qPCR PreMix 4 μL，各模板 DNA 0.5 μL，浓度为 10 μmol/L 的引物及探针采用上述的不同用量组合，ddH_2O 补足至 20 μL。分别用以上引物和探针不同用量组合对 3 种目标菌进行 mRT-qPCR 试验，扩增曲线为标准的 S 型的相应引物和探针用量组合确认为良好体系。mRT-qPCR 扩增条件：95 ℃ 预变性 8 min；94 ℃ 变性 3 s，退火/延伸温度 60 ℃ 时间 30 s，40 个循环。

1.2.4　菌悬液预处理　取经过热处理后部分细胞死亡或损伤的菌悬液在室温下 8000 r/min 离心 8 min，弃上清，每个样品加入 300 μmol/L 的 SDS 溶液约 500 μL 后，在水浴锅中 37 ℃ 孵育 30 min[30]。将 SDS 处理后的菌悬液添加不同体积的 PMA 溶液至终浓度分别为 0、5、10、20、30 和 50 μmol/L，室温（25 ℃）下处理 20 min（期间颠倒混匀 2~3 次）后，将样品放置在距离 500 W 卤素灯 20 cm 处的冰浴中处理 20 min（期间颠倒混匀 4~5 次）。将处理后的菌悬液于 8000 r/min 离心 8 min，弃上清后加入 0.01 mol/L PBS 缓冲液，重复 2 次以洗去多余的 PMA，将菌体重悬于 100 μL 无菌水备用。

1.2.5　特异性验证试验　以 3 株目标菌（沙门氏菌、单增李斯特菌、产志贺毒素大肠埃希氏菌）和 18 株非目标菌（蜡样芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、表皮葡萄球菌、多黏芽孢杆菌、福氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血性弧菌、枯草芽孢杆菌、巴氏醋杆菌、大肠杆菌 O157:H7、伊氏李斯特氏菌、苏云金芽孢杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、阪崎肠杆菌、英诺克李斯特菌、空肠弯曲杆菌）的 DNA 混合液为模板，参照 1.2.3 方法进行 mRT-qPCR 试验，以验证建立的 mRT-qPCR 检测方法的特异性。试验结果以只出现 3 个目标菌株的 S 型扩增曲线且 Ct 值小于 35 判定为特异性良好。

1.2.6　检出限的确定　采用细菌平板计数法，分别对培养过夜的 3 种目标菌进行 10 倍的梯度稀释后计数，取各浓度梯度的菌液 2 mL，按照 1.2.4 预处理后按照 1.2.1 方法提取 DNA，溶解于 50 μL ddH_2O 中。分别以各相同稀释梯度的 DNA 为模板进行 mRT-qPCR 扩增，以菌液浓度的对数为横坐标和 Ct 值为纵坐标制作标准曲线，确定检出限。各反应管中模板 DNA 浓度=菌液梯度浓度（CFU/mL）×取样量（2 mL）/DNA 溶解体积（50 μL）×模板 DNA 添加量（0.5 μL）/反应总体积（20 μL）。

1.2.7　重复性试验　分别对各目标菌的 3 个浓度梯度（10^4、10^3、10^2 CFU/mL）进行 3 个批次的 SDS-PMA-mRT-qPCR 试验，每个浓度梯度重复 3 次，每次 3 个平行，根据批次内和批次间 Ct 值变异系数评估建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法的稳定性。

表 1　RT-qPCR 引物和探针序列

Table 1　Primers and probes for RT-qPCR

菌株	引物/探针	碱基序列（5'-3'）	Tm值（℃）	产物长度（bp）
SA	*invA*-F	TGATGCGAGTGGTAAATTATTCC	60.2	110
	invA-R	CTCCCCCTCTTCATGCGTTA	62.4	
	invA-P	ROX-CCAACAATCCATCAGCAAGGTAGCAGTCA-BHQⅡ	70.1	
LM	*hly*-F	CATGGCACCACCAGCATC	62.2	65
	hly-R	CATCCGCGTGTTTCTTTTCG	62.8	
	hly-P	FAM-CCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-BHQⅠ	72.8	
STE	*stx*-F	CATCGCTCTTGCCACAGA	61.3	84
	stx-R	TTTCGCCATTCGTTGACTACTTC	61.0	
	stx-P	Cy5-CGCATAGCGGAACCTCACTGACGC-BHQⅢ	71.7	

1.2.8 模拟样品检测 目前，我国乳品中病原菌的检测主要采用国家标准中的“培养法”[28]。为了验证建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法的有效性，从市场上购买新鲜的牛奶、酸奶、奶粉和奶酪各 8 份（共 32 份），其中 28 份 100 mL(g)乳品样品中添加 10^4 CFU/mL 不同目标菌液 2 mL，其余 4 份为对照（不添加任何菌液）。样品均质后取 2 mL 进行细菌基因组 DNA 提取和 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测。同时按照《GB 4789 食品安全国家标准 食品微生物学检验》中的培养法分别对样品中的 SA、LM 和 STE 进行检测，比对 2 种方法的检测结果。

1.3 数据处理

本文中每份样品或每种菌液重复三次平行实验，数据处理及 *T* 检验使用 Excel 2019 和 SPSS v20.0 软件进行归纳与整理。

2 结果与分析

2.1 靶标序列检测结果

分别以 3 株目标菌基因组 DNA 为模板，采用上述表 1 中针对靶基因设计的引物进行 PCR 扩增，扩增产物经 2% 琼脂糖电泳结果如图 1 所示，扩增出与预期大小一致的 3 个 DNA 片段。将这些目的片段回收后构建重组质粒，转入大肠杆菌获得阳性克隆。对阳性克隆的重组质粒进行测序和序列分析，发现扩增出的 3 个 DNA 片段的序列与 GenBank 中的完全一致，说明本试验设计的引物是准确可行的。分别依据这 3 个 DNA 片段的核苷酸序列设计的 TaqMan 探针如表 1 中所示。这相较于前人的同类研究[20,23,25]完全根据 GeneBank 中的靶标序列设计探针更加准确可靠。

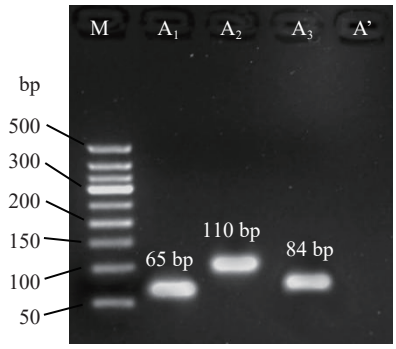


图 1 目标菌株 PCR 扩增结果

Fig.1 Electrophoresis profiles of PCR amplifications for objective strains

注：M 为 50 bp DNA Ladder，A_1~A_3 依次为目标菌株 SA、LM、STE，A’为 ddH_2O。

2.2 引物和探针浓度的优化结果

引物和探针的浓度直接影响着 mRT-qPCR 扩增效果。不同引物和探针用量的 RT-qPCR 结果如图 2A~C 所示，在 SA 中 9 种用量组合都能扩增出 S 型曲线，其中组合④(0.4 μL 和 0.4 μL)荧光信号最强；在 LM 和 STE 中，组合⑤(0.6 μL 和 0.4 μL)和⑥(0.8 μL 和 0.4 μL)扩增出标准的 S 型曲线。在 mRT-qPCR 扩增中，考虑到最大限度提高扩增效率，一般优先选用较低浓度的引物和探针[31]。本试验中，SA 引物和探针选用 0.4 μL 和 0.4 μL，LM 和 STE 的引物和探针均选用 0.6 μL 和 0.4 μL，mRT-qPCR

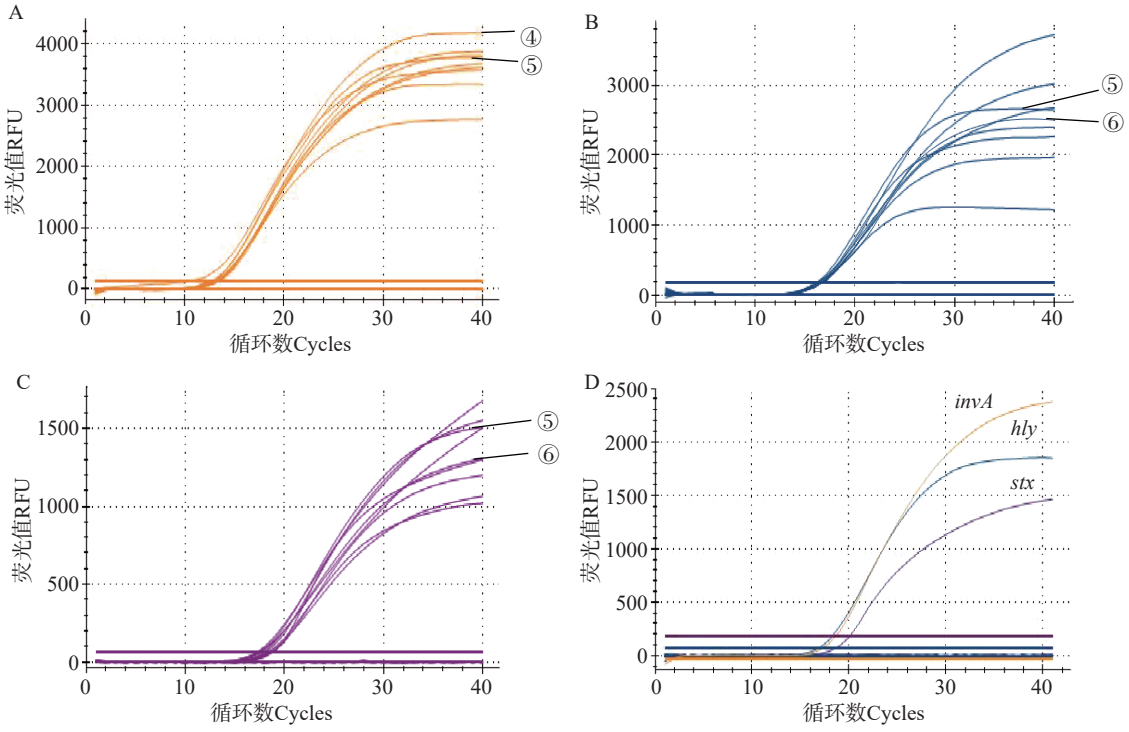


图 2 引物和探针用量优化结果

Fig.2 Optimization of usages for primers and probes

注：A、B、C 依次为 SA、LM 和 STE，④、⑤、⑥依次为引物和探针组合 0.4 μL 和 0.4 μL、0.6 μL 和 0.4 μL、0.8 μL 和 0.4 μL。D 为三种目标菌在同一优化后的反应体系。

扩增的结果如图 2D 所示，3 种目标菌均能扩增出标准的 S 型曲线，表明选用的 3 种目标菌的引物和探针浓度可用于后续试验。

2.3　PMA 处理浓度优化结果

为了获得合适的 PMA 处理浓度，对经过 300 μmol/L SDS 处理的 3 种菌液分别进行系列浓度（0、5、10、20、30 和 50 μmol/L）PMA 处理后，mRT-qPCR 扩增结果如图 3 所示。在 SA 菌液中（图 3A），对照组（未经热处理）在不同浓度（0~50 μmol/L）PMA 处理下的 Ct 值趋于一致，热处理组（部分菌体细胞被杀死）随着 PMA 处理浓度增加（0~20 μmol/L），Ct 值逐渐升高，且至 20 μmol/L 趋于平稳，与 30 μmol/L 和 50 μmol/L 无显著性差异，表明 20 μmol/L PMA 处理能有效排除死菌细胞对检测结果的干扰。在 LM（图 3B）和 STE（图 3C）的 PMA 处理试验中也获得与 SA 的一致结果，表明 3 种目标菌 PMA 处理的最佳浓度均为 20 μmol/L。这与 Liang 等[27] 对大肠杆菌 O157:H7、克罗诺杆菌和沙门氏菌的 PMA 处理结果一致。

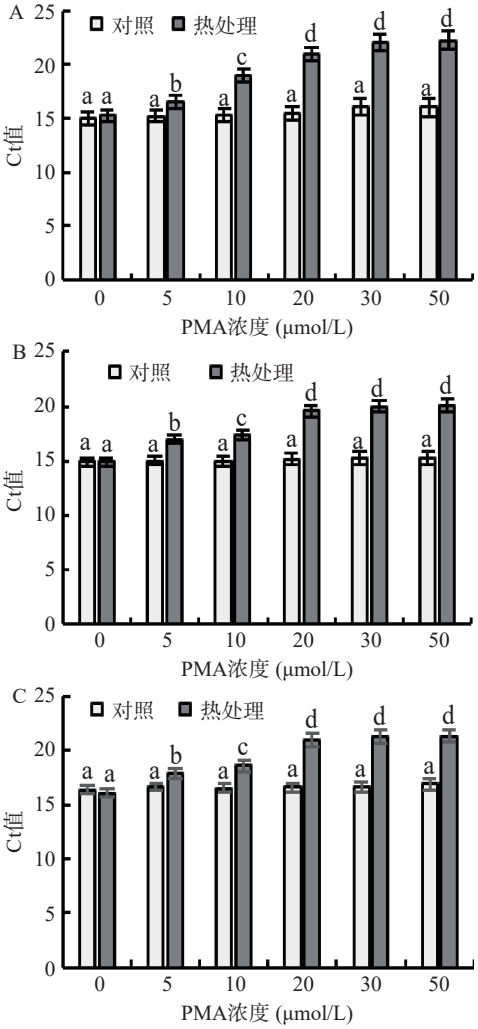


图 3　PMA 浓度优化

Fig.3　Optimization of concentration for PMA

注：A、B、C 依次为 SA、LM 和 STE。

2.4　mRT-qPCR 特异性试验结果

图 4 为混合菌液（3 株目标菌和 18 株非目标菌）同时 mRT-qPCR 检测的结果，只有 3 种目标菌株表现出 S 型扩增曲线，且 Ct 值小于 35，而其他 18 种非目标菌株均未出现扩增曲线。这表明针对 3 种目标菌建立的 mRT-qPCR 方法具有良好的特异性，对其他病原菌不存在交叉反应。杨健等[1] 认为在 mRT-qPCR 反应体系中，靶标序列、引物和探针直接决定着扩增的特异性。因此，本试验针对 3 种致病菌的特异基因序列设计的引物和探针在一定程度上保证了 mRT-qPCR 扩增的特异性。

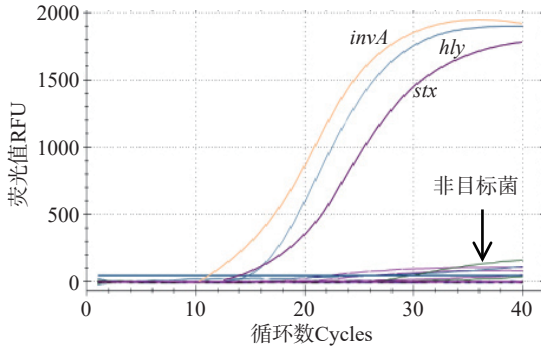


图 4　三重 RT-qPCR 特异性检测

Fig.4　Specificity of triplex RT-qPCR

2.5　SDS-PMA-mRT-qPCR 标准曲线建立和检出限确定结果

图 5A 为不同浓度梯度菌液的 SDS-PMA-mRT-qPCR 扩增结果，SA、LM 和 STE 为 10^2~10^7 CFU/

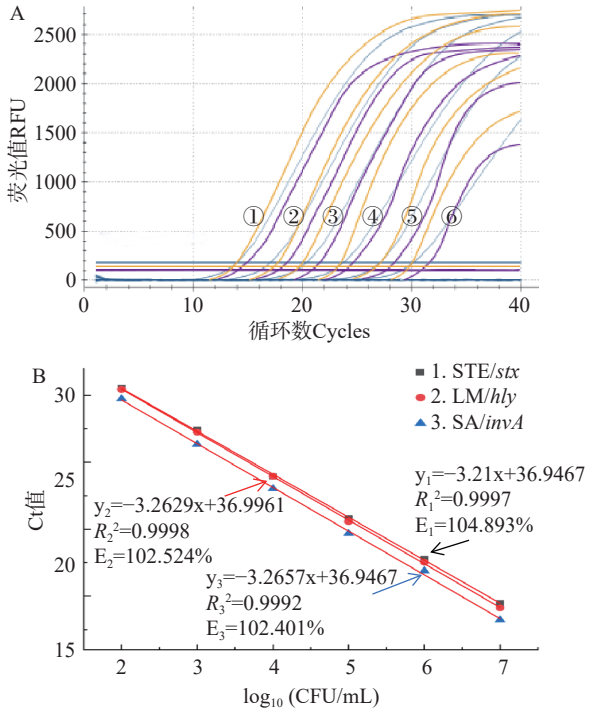


图 5　三重 RT-qPCR 灵敏度评价

Fig.5　Sensitivity of triplex RT-qPCR

注：A 为 mRT-qPCR 灵敏度测试结果，图中①~⑥依次代表菌液浓度 10^7~10^2 CFU/mL；B 为 mRT-qPCR 扩增标准曲线图。

mL 时，均表现出 S 型扩增曲线，且为有效扩增（Ct 值<35）。以菌液浓度的常用对数为横坐标（x）和对应的 Ct 值为纵坐标（y）绘制标准曲线，结果如图 5B 所示，SA、LM 和 STE 在 10^2~10^7 CFU/mL 范围内均表现出良好的线性关系，且相关系数（R^2）在 0.9992~0.9998 之间，扩增效率（E）在 102.401%~104.893% 之间，满足 qPCR 扩增相关系数不得低于 0.99、扩增效率在 90%~105% 之间的要求[21]。这说明设计的引物和探针与靶基因序列匹配良好，qPCR 扩增体系优良。综上所述，3 种目标菌的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检出限为 10^2 CFU/mL。

2.6 SDS-PMA-mRT-qPCR 重复性试验结果

表 2 为不同浓度梯度（10^2~10^4 CFU/mL）菌液的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测结果，SA、LM、STE 在不同批次内和批次间的 Ct 值变异系数均在 0.12% 至 0.81% 之间，小于 1%。在 qPCR 反应体系中，通常将 Ct 值变异系数<3% 作为重复性良好的标准[28]。可见，本试验建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法具有良好的重复稳定性。

表 2 SDS-PMA-mRT-qPCR 重复性测试结果

Table 2 Reproducibility test results of SDS-PMA-mRT-qPCR

菌液浓度（CFU/mL）	目标菌	批次内变异系数(%)			批次间变异系数(%)
		第1批次	第2批次	第3批次	
10^4	SA	0.41	0.68	0.53	0.25
	LM	0.62	0.47	0.72	0.20
	STE	0.51	0.46	0.37	0.16
10^3	SA	0.71	0.60	0.81	0.15
	LM	0.27	0.41	0.65	0.43
	STE	0.54	0.35	0.67	0.31
10^2	SA	0.28	0.45	0.57	0.34
	LM	0.68	0.34	0.52	0.33
	STE	0.40	0.51	0.46	0.12

2.7 模拟样品检测结果

采用 SDS-PMA-mRT-qPCR 和国家标准中的培养法分别对人工污染的不同类型的乳品试样（牛奶、酸奶、奶粉和奶酪）进行检测，结果统计如表 3 所示，两种方法的检测结果完全一致。相较于传统培养法的检测周期 5~7 d，SDS-PMA-mRT-qPCR 方法缩短至 7 h。这表明建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 方法可以应用于乳品中 SA、LM 和 STE 的快速检测。在后续的研究中，需要对该方法进一步优化和完善，以更广泛地应用于其他各类食品的安全检测[20]。

表 3 不同乳品样品信息及检测结果

Table 3 Test results of various dairy samples by SDS-PMA-mRT-qPCR and culture method respectively

添加目标菌	样品数	三重RT-qPCR（Ct值）			培养法（CFU/mL）		
		SA	LM	STE	SA	LM	STEC
0	4	0	0	0	–	–	–
SA	4	26.24±0.45	–	–	1.1×10^2	–	–
LM	4	–	26.55±0.37	–	–	8.9×10^1	–
STE	4	–	–	25.74±0.52	–	–	9.6×10^1
SA+LM	4	29.45±0.19	29.54±0.23	–	9.8×10^1	1.0×10^2	–
SA+STE	4	29.34±0.26	–	29.17±0.31	9.1×10^1	–	8.7×10^1
LM+STE	4	–	29.73±0.45	29.38±0.28	–	9.1×10^1	8.3×10^1
SA+LM+STE	4	29.52±0.27	29.68±0.36	29.32±0.42	8.5×10^1	8.9×10^1	9.1×10^1

注：“–”为未检出，4种样品分别为牛奶、酸奶、奶粉和奶酪。

3 结论

TaqMan 定量 PCR 在 PCR 反应体系中加入荧光探针，实现了扩增和检测的同时并行，解决了普通 PCR 需要对扩增产物进行电泳才能获得检测结果的局限性。本研究建立的乳品中 SA、LM、STE 的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法，即在一个 PCR 反应管中同时定量检测 3 种目标菌的活菌，达到了操作过程简便、检测周期短、检测效率高的目的，同时消除了死菌细胞造成检测结果的假阳性的影响。

在本研究中，通过对含有 3 株目标菌和 18 株非目标菌的混合菌液进行 mRT-qPCR 扩增，结果显示 3 株目标菌呈现出 S 型扩增曲线，而 18 株非目标菌均无典型的扩增曲线，说明以 SA 的侵袭蛋白基因 *invA*、LM 的溶血素 O 基因 *hly* 和 STE 的毒力基因 *stx* 的保守区序列为靶标设计引物和探针的 SDS-PMA-mRT-qPCR 方法具有良好的特异性。此外，本方法对 3 种目标菌的检出限都达到了 10^2 CFU/mL，这说明本文建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法具有更高的灵敏度，在实际乳品安全检测的应用中更加准确可靠。此外，采用本文建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 方法对 SA、LM、STE 污染的多种乳品检测的结果与国家标准中的微生物培养法完全一致，且相较于国标培养法 5~7 d 的检测周期，本研究建立的方法可以将检测周期缩短至 7 h，大大节约了时间成本、提高了检测效率。

综上所述，本研究针对 SA、LM 和 STE 建立的 SDS-PMA-mRT-qPCR 检测方法特异性强、灵敏度高、稳定性好、快速高效，可以应用于乳品中食源性致病菌的安全监测。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 杨健, 侯婷婷, 佐兆杭, 等. 牛乳中蜡样芽孢杆菌荧光定量PCR检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2019(3): 324−327,332. [YANG Jian, HOU Tingting, ZUO Zhaohang, et al. Establishment and verification of fluorescence quantitative PCR assay for *Bacillus cereus* in milk[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019(3): 324−327,332.]

[2] LUCEY J A, OTTER D, HORNE D S. A 100-year review: Progress on the chemistry of milk and its components[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(12): 9916−9932.

[3] MARTIN N H, TORRES-FRENZEL P, WIEDMANN M. Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss

and waste[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(2): 1251−1261.
[4] 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.
[5] KYERE E O, FOONG G, PALMER J, et al. Rapid attachment of *Listeria monocytogenes* to hydroponic and soil grown lettuce leaves[J]. Food Control, 2019, 101: 77−80.
[6] JUNEJA V K, GOLDEN C E, MISHRA A, et al. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* at temperatures applicable to cooling of cooked Pasta[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(3): 590−598.
[7] WILLIAMS M S, EBEL E D, SAINI G, et al. Changes in *Salmonella* contamination in meat and poultry since the introduction of the pathogen reduction and hazard analysis and critical control point rule[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(10): 1707−1717.
[8] 佟盼盼, 陈文霞, 王芋丹, 等. 新疆牛源和人源产志贺毒素大肠埃希氏菌毒力岛的分布[J]. 动物医学进展, 2022, 43(11): 1−5. [TONG Panpan, CHEN Wenxia, WANG Yudan, et al. Distribution of pathogenic islands of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and humans in Xinjiang[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(11): 1−5.]
[9] CHEN Xuelong, WANG Honghai, LIU Chang, et al. Technical note: Development of a closed-tube isothermal multiple self-matching-initiated amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk samples[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(3): 3569−3574.
[10] VALERO A, ORTIZ J C, FONGARO G, et al. Definition of sampling procedures for collective-eating establishments based on the distribution of environmental microbiological contamination on food handlers, utensils and surfaces[J]. Food Control, 2017, 77: 8−16.
[11] XIAO Xingning, WANG Wen, ZHANG Jianmin, et al. A quantitative risk assessment model of *Salmonella* contamination for the yellow-feathered broiler chicken supply chain in China[J]. Food Control, 2021, 121: 107612.
[12] SELF J L, CONRAD A, STROIKA S, et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015-2016[J]. Emerging Infectious Diseases, 2019, 25(8): 1461−1468.
[13] MAJOWICZ S E, SCALLAN E, JONES-BITTON A, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(6): 447−455.
[14] 刘占鳌, 裴艳琴, 叶华. 多重荧光 PCR 快速检测食源性致病菌的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9308−9313. [LIU Zhanao, PEI Yanqin, YE Hua. Research progress on rapid detection of foodborne pathogens by multiplex fluorescent PCR[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9308−9313.]
[15] 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.
[16] 常超, 王凌, 伍金娥. 基于 ATP 再生体系快速检测乳品中微生物[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 320−324. [CHANG Chao, WANG Ling, WU Jin'e. Development of a bioluminescence method combined with ATP amplification for detection of bacteria in dairy products[J]. Food Science, 2018, 39(4): 320−324.]
[17] LI Baoguang, CHEN Jinqiang. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 273.
[18] LIU Ningwei, ZOU Dayang, DONG Derong, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45601.
[19] CASTRO-WALLACE S L, CHIU C Y, JOHN K K, et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the international space station[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 18022.
[20] 袁慕云, 许龙岩, 柯碧霞, 等. 基于 TaqMan 探针荧光 PCR 检测致泻性大肠埃希氏菌[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 274−281. [YUAN Muyun, XU Longyan, KE Bixia, et al. Detection for diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) by real-time PCR with TaqMan probe[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 274−281.]
[21] LI Xiaofang, CUI Jinghua, DU Xiaoli, et al. Duplex real-time PCR method for the differentiation of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(1): 50−56.
[22] TAKAHASHI H, GAO Yun, MIYA S, et al. Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment[J]. Food Control, 2017, 71: 79−82.
[23] WANG Hui, GILL C O, YANG Xianqin. Use of sodium lauroyl sarcosinate (sarkosyl) in viable real-time PCR for enumeration of *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 98: 89−93.
[24] CHANG C W, LIN M H. Optimization of PMA-qPCR for *Staphylococcus aureus* and determination of viable bacteria in indoor air[J]. Indoor Air, 2018, 28(1): 64−72.
[25] HUANG Zhiqing, ZHENG Jianwei, SHI Chunmei, et al. Flow cytometry-based method facilitates optimization of PMA treatment condition for PMA-qPCR method[J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 40: 37−39.
[26] ARROYO C, CONDÓN S, PAGÁN R. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(1): 110−118.
[27] LIANG Taobo, ZHOU Ping, ZHOU Baoqing, et al. Simultaneous quantitative detection of viable *Escherichia coli* O157: H7, *Cronobacter* spp. , and *Salmonella* spp. using sodium deoxycholate-propidium monoazide with multiplex real-time PCR[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(4): 2954−2965.
[28] 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.]
[29] 范维, 高晓月, 李贺楠, 等. 3 种致病菌多重 real-time PCR 检测方法的建立及其在散装即食肉制品中的应用[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 332−338. [FAN Wei, GAO Xiaoyue, LI Henan, et al. Establishment and application of multiple real-time PCR method for detection of three kinds of pathogenic bacteria in bulk ready-to-eat meat products[J]. Food Science, 2022, 43(2): 332−338.]
[30] ZHAO Yankun, CHEN He, LIU Huimin, et al. Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in milk[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 661.