

乳品中乙型副伤寒沙门氏菌qPCR方法的构建与评价

徐佳薇¹，刘灵帆¹，蔡国屹¹，薛瑞奇²，于 玺²，张业尼^{1*}

(1.天津农学院食品科学与生物工程学院，天津 300384；2.山东德正乳业股份有限公司，山东威海 264400)

摘 要：[目的] 构建并评价乳品中乙型副伤寒沙门氏菌的实时荧光定量PCR（qPCR）检测方法。[方法] 以乙型副伤寒沙门氏菌的特异性 $invA$ 基因为靶标设计引物，优化SYBR Green I 染料法的qPCR反应体系与条件后，对梯度稀释的质粒标准品进行扩增以建立标准曲线，并系统验证该方法的灵敏度、特异性与重复性，同时与传统培养法进行检测性能对比。[结果]所建立的标准曲线方程为 $y=-3.186\ 6x+13.172$ ，相关系数（ R^2 ）达0.994 9，扩增效率（E%）为105.9%，线性关系良好；该qPCR方法检测乙型副伤寒沙门氏菌的灵敏度可达17.9 拷贝数/ μL ；特异性验证中，仅乙型副伤寒沙门氏菌呈阳性扩增，大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等非沙门氏菌均为阴性，无交叉反应；重复性试验表明，组内变异系数为0.2%~0.69%，组间变异系数为0.49%~1.54%，均小于3%，稳定性优异。与传统培养法（需5~7 d）相比，该qPCR方法可将检测时间缩短至6 h内，显著提升检测效率。[结论] 本研究建立的SYBR Green I qPCR方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简便及检测快速的优势，为乳品中乙型副伤寒沙门氏菌的快速筛查、精准定量及食品安全风险防控提供了可靠技术支撑。

关键词：qPCR；乙型副伤寒沙门氏菌； $invA$ 基因

文章编号：1671-4393（2026）04-0071-09

DOI:10.12377/1671-4393.26.04.12

Construction and Evaluation of qPCR Method for *Salmonella Paratyphi* B in Dairy Products

XU Jiawei¹，LIU Lingfan¹，CAI Guoyi¹，XUE Ruiqi²，YU Xi²，ZHANG Yeni^{1*}

(1.College of Food Science and Bioengineering，Tianjin Agricultural University，Tianjin 300384；
2.Shandong Dezheng Dairy Co.，Ltd.，Weihai Shandong 264400)

基金项目：天津农学院校企合作项目—高蛋白健康乳粉深加工关键技术及产业化（TNHXKJ2025016）

作者简介：徐佳薇（2001-），女，辽宁抚顺人，硕士，研究方向为食品加工与安全；

刘灵帆（2004-），男，河南洛阳人，本科，研究方向为微生物检测；

蔡国屹（2006-），男，贵州黔西南人，本科，研究方向为微生物检测；

薛瑞奇（2001-），男，山西怀仁人，本科，研究方向为乳源功能物质开发；

于 玺（1982-），男，山东威海人，本科，研究方向为功能性乳制品开发。

通信作者：张业尼（1984-），女，山东济南人，博士，研究方向为病原微生物检测。

Abstract: [Objective] To establish and evaluate a real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method for detecting *Salmonella paratyphi* B in dairy products.[Method] Specific *invA* gene of *Salmonella paratyphi* B was used as the target to design primers. After optimizing the qPCR reaction system and conditions with SYBR Green I dye, amplification was performed on gradient diluted plasmid standards to establish a standard curve. The sensitivity, specificity and repeatability of the method were systematically verified, and the detection performance was compared with the traditional culture method.[Result] The standard curve equation was $y = -3.1866 + 13.172x$, with a correlation coefficient (R^2) of 0.9949. The amplification efficiency (E%) was 105.9%. The linear relationship was good. The qPCR method for detecting *Salmonella paratyphi* B had a sensitivity of 17.9 copies/ μ L. In the specificity verification, only *Salmonella paratyphi* B showed positive amplification, while *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc. were negative. There was no cross-reaction. The repeatability test showed that the intra-group coefficient of variation was 0.2%~0.69%, and the inter-group coefficient of variation was 0.49%~1.54%, all of which were less than 3%, indicating excellent stability. Compared with the traditional culture method (requiring 5~7 days), this qPCR method can shorten the detection time to within 6 hours, significantly improving the detection efficiency.[Conclusion] The SYBR Green I qPCR method established in this study has the advantages of high sensitivity, strong specificity, good repeatability, simple operation and rapid detection, providing reliable technical support for the rapid screening, precise quantification and food safety risk prevention and control of *Salmonella paratyphi* B in dairy products.

Keywords: qPCR; *Salmonella Paratyphi* B; *invA* gene

乙型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Paratyphi* B) 作为一种重要的食源性病原菌, 属肠杆菌科沙门氏菌属, 系革兰氏阴性杆菌。该菌在临床上主要引起人类副伤寒及肠热症。其菌体呈短杆状, 大小为 (0.6~1.0) μ m $\times$ (2~4) μ m, 无芽孢及荚膜, 具周身鞭毛, 属兼性厌氧菌。该菌在自然环境中具有较强的生存能力, 可在水体中存活2~3周, 在粪便中维持活性1~2个月, 在干燥沙土中可存留2~3个月, 在冰封条件下其存活期更为持久^[1]。然而, 该菌对理化因素的耐受性较弱, 在65℃湿热条件下15~30 min即可被灭活。因此, 使用热处理工艺的食品加工和制备方法可有效消除食品中的沙门氏菌污染风险^[2]。食源性疾病是威胁全球公共卫生的重大风险因素之一^[3], 其中沙门氏菌感染被广泛认定为导致全球食源性疾病暴发的主要病原体之一。在引发沙门氏菌中毒的食品中, 乳品占5%~10%。乙型副

伤寒沙门氏菌作为沙门氏菌的重要血清型之一, 对乳品质量安全构成严重威胁, 其定量检测对保障食品安全有至关重要的意义。

传统的病原菌检测方法面临诸多挑战。传统培养法虽被视为“金标准”, 但存在显著局限性: 检测周期长达3~7 d, 操作繁琐, 灵敏度低, 且难以实现精确定量检测。因此, 需开发更多检测快速、灵敏度高和特异性强的技术方法。贾方芳等^[4]针对沙门氏菌*invA*基因设计特异性引物, 建立单重PCR检测方法, 检出限达0.118 pg/ μ L, 准确率100%。此外, 新型联用技术突破了传统检测局限, 刘健慧等^[5]将As-PCR与G-四链体结合, 通过比色信号实现沙门氏菌可视化检测; Xu等^[6]将纳米材料与动态光散射技术联用, 使沙门氏菌检测限降至100 CFU/mL。Fu等^[7]利用地高辛和生物素修饰肠炎沙门氏菌的特异性上下游引物, 构建的RPA-金标试纸对肠炎沙门氏菌检出限

达91.4 CFU/mL；厉佳丽^[8]针对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和沙门氏菌开发的多重RPA体系，结合胶体金读数仪可同时检测3种致病菌，检测限可达10 CFU/mL。

本研究旨在构建乳品中乙型副伤寒沙门氏菌qPCR检测的标准化流程，通过优化引物设计、反应条件和内标准化方法，实现乙型副伤寒沙门氏菌的快速检测与精确定量，为乳品质量安全监控提供有力支撑。此外，本研究将所构建的qPCR检测方法与传统方法进行对比，以系统评估其检测性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株与样品

试验菌株：乙型副伤寒沙门氏菌（CMCC50094），购自中国医学细菌菌种保藏管理中心。对照菌株：大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、德氏乳杆菌、实验室非沙门氏菌均由天津农学院实验室保存并提供。试验样品：生乳、稀奶油、全脂乳粉，来源于山东德正乳业股份有限公司。

1.1.2 试剂

缓冲蛋白胨水（BPW）、四硫磺酸钠煌绿增菌（TTB）、氯化镁孔雀绿大豆胨（RVS）增菌液、亚硫酸铋（BS）琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂、三糖铁（TSI）琼脂、蛋白胨水、尿素琼脂、氰化钾（KCN）培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、胰蛋白胨，北京陆桥技术股份有限公司；氯化钠，天津市津东天正精细化学试剂厂；酵母浸粉，北京奥博星生物科技有限责任公司；实时荧光定量PCR试剂盒（2×SYBR Green I PCR Master mix）、细菌基因组DNA提取试剂盒、Universal DNA Purification Kit通用型DNA纯化回收试剂盒（离心柱型）、BL21（DE3）感受态细胞、绿色核酸荧光染料（10 000×）、6×DNA上样缓冲液、50×核酸电泳（TAE）缓冲溶液、氨苄青霉素，北京索莱宝科技有限公司；T载体PCR产物快速连接试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；质粒小提试剂

盒，天根生化科技（北京）有限公司；DNA Marker III（100~5 000 bp），北京兰杰柯科技有限公司；琼脂糖，德国neoFroxx GmbH公司；DEPC水，福州希景生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

Biometra TADVANCED普通PCR仪，德国Analytik Jena公司；CFX Connect实时荧光定量PCR仪、BIORAD伯乐XRS与凝胶成像仪，美国Bio-Rad Laboratories公司；PYX-DH450-S普通型电热恒温培养箱，上海天恒医疗器械有限公司；Nano-500超微量分光光度计，杭州奥盛仪器有限公司；TGL-16G高速台式离心机，上海安亭科学仪器厂；PST-0208-AFT-C 0.2 mL连盖平盖八排管，北京兰杰柯科技有限公司；Q223N精密电子天平，天津市德安特传感技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 乙型副伤寒沙门氏菌DNA制备

将乙型副伤寒沙门氏菌接种于LB固体培养基上，37℃过夜培养，挑取单菌落于LB液体培养基中，220 r/min离心，37℃过夜培养至菌液浓度为OD₆₀₀=1.2。收集菌液并进行菌种保藏，使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取乙型副伤寒沙门氏菌DNA，保存于-20℃冰箱。

1.2.2 引物设计

根据美国国家生物技术信息中心（NCBI）GenBank提供的沙门氏菌invA基因序列，应用Primer Premier 6设计引物并合成。应用引物序列见表1。

表1 应用引物序列		
Table 1 Sequence of Applied Primers		
名称	引物序列	产物长度 (bp)
invA 基因	FP:	201
	5' -TAAAACCAGCAAAGGCGAGC-3'	
	RP:	
	5' -CGCACGCCATAATCAATAAAG-3'	

1.2.3 invA基因的扩增与纯化

以提取的乙型副伤寒沙门氏菌DNA为模板，应用设计引物对其进行PCR扩增，扩增条件：94℃，3 min；

94 °C, 30 s; 57 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 经30 个循环; 72 °C, 5 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 对扩增目的片段按Universal DNA Purification Kit通用型DNA纯化回收试剂盒(离心柱型)进行纯化。

1.2.4 *invA*基因的T-A克隆

将纯化后的目的基因与pUCm-T载体混合均匀, 反应体系: 总体积10 μL, 其中目的基因2 μL, pUCm-T载体1 μL, 50% PEG 4000 1 μL, 2×Ligation Buffer5 μL, T4 DNA Ligase1 μL。22 °C连接20 min, 取10 μL连接液于100 μL BL21 (DE3)感受体细胞进行重组质粒的转化, 冰上放置30 min, 42 °C水浴90 s, 取出冰浴2~5 min, 加入900 μL LB液体培养基混匀, 37 °C摇床, 150 r/min复苏1 h, 将菌液进行4 000 r/min, 3 min离心, 吸除750 μL上清液, 用剩余菌液将细胞均匀悬浮, 取100 μL菌液至LB固体培养基(含氨苄)平板上涂匀, 37 °C倒置过夜培养。挑取单菌落至LB液体培养基(含氨苄)中进行增菌。使用质粒小提试剂盒进行质粒提取制备标准品, -20 °C冰箱保存。

1.2.5 重组质粒定量

使用超微量分光光度计测定标准品质粒的浓度和纯度, 当OD₂₆₀/OD₂₈₀的值在1.8~2.0时, OD₂₆₀/OD₂₃₀应>2, 表明质粒纯度高, 质量好。将重组质粒按1:10进行梯度稀释, 吸取1 μL质粒加入9 μL ddH₂O中, 以此类推。

1.3 SYBR Green I qPCR 标准曲线的建立

将含有目的基因的乙型副伤寒沙门氏菌质粒DNA作为标准品, 对其进行10倍等比稀释, 取不同稀释度的质粒模板进行qPCR, 每个浓度重复3 个反应孔, 反应体系: 总体积25 μL, 其中2×SYBR Green I PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物各2.5 μL, 标准品DNA5 μL, ddH₂O 2.5 μL。

以起始量的对数值为X轴, 以循环数(Cycle threshold, Ct)为Y轴, 建立乙型副伤寒沙门氏菌实时荧光定量PCR标准曲线, 并计算标准曲线的斜率和相关系数。

1.4 SYBR Green I qPCR 特异性检测

以目标菌株乙型副伤寒沙门氏菌标准品质粒浓

度为 $5.9 \times 10^{-9} \sim 5.9 \times 10^{-2}$ ng/μL为阳性对照, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、德氏乳杆菌、实验室非沙门氏菌、ddH₂O为阴性对照, 设置3 组平行试验, 验证qPCR的特异性。

1.5 SYBR Green I qPCR 灵敏度检测

设置 $5.9 \times 10^{-11} \sim 5.9 \times 10^0$ ng/μL稀释度, 以ddH₂O为阴性对照, 按照qPCR反应体系和反应条件进行检测。采用SYBR Green I 染料法进行实时荧光定量PCR检测, 以确定乙型副伤寒沙门氏菌的最低检出限。

1.6 SYBR Green I qPCR 重复性检测

选择10 倍梯度稀释后质粒浓度为 $5.9 \times 10^1 \sim 5.9 \times 10^5$ ng/μL的质粒标准品为模板, 分别进行组内及组间变异系数检测。组内检测: 同一批次不同浓度进行3 组重复试验; 组间检测: 选择相同质粒浓度区间, 在不同时段做3 组重复试验, 对其稳定性进行检测, 并计算各组间的标准差(SD)和组内变异系数(CV):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (Cq_i - \overline{Cq})^2}{n-1}}; CV(\%) = \left(\frac{SD}{\overline{Cq}} \right) \times 100$$

1.7 qPCR 方法与传统培养法对比验证

1.7.1 传统培养法对样品的检测

根据传统培养法《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》^[9], 选取生乳、稀奶油、全脂乳粉为检测样品, 分别对其进行预增菌、选择性增菌、分离操作后选取6 个典型菌落进行生化试验。

1.7.2 SYBR Green I qPCR方法对样品的检测

挑取传统培养法中进行生化试验的6 个典型菌落作为模板进行qPCR检测, ddH₂O为阴性对照, 验证建立的qPCR方法在乳品中乙型副伤寒沙门氏菌污染检测的准确性, 并与传统培养法生化试验结果进行比较分析, 对本研究建立方法进行评价。

2 结果与分析

2.1 *invA* 基因扩增结果

以乙型副伤寒沙门氏菌DNA (CMCC50094) 为模板进行普通PCR反应, 得到目的基因*invA*的扩增

片段（图1），为201 bp；将PCR产物用DNA纯化回收试剂盒进行纯化，使用T4 DNA连接酶将PCR产物与T载体进行连接，连接产物转化至BL21（DE3）感受态。

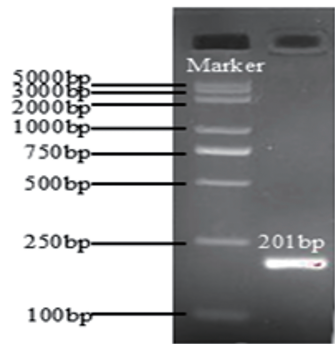


图1 *invA* 基因 PCR 扩增结果凝胶电泳图
Figure 1 Gel Electrophoresis Diagram of PCR Amplification Results of the *invA* Gene

2.2 标准质粒构建

通过普通PCR扩增乙型副伤寒沙门氏菌*invA*片段，扩增序列进行测序后的结果通过BLAST验证与GenBank提供的序列完全一致，目的片段长度为201 bp。使用超微量分光光度计测定标准质粒的浓度和纯度，结果显示OD₂₆₀/OD₂₈₀的值为1.96，OD₂₆₀/OD₂₃₀的值为2.02，表明质粒纯度高，质量好。测得的质粒标准品浓度为5.9 ng/μL。

2.3 SYBR Green I qPCR 方法的建立

分别对qPCR反应体系中的引物浓度和反应条件中的退火温度进行优化，确定qPCR检测的最佳反应体系及反应条件（表2）。

表2 qPCR 反应体系 Table 2 qPCR Reaction System		
反应组分	25 μL 体系 (μL)	终浓度 (μM)
2×SYBR Green PCR mix	12.5	2x
上游引物	2.5	1.0
下游引物	2.5	1.0
DNA 模板	5	-
ddH ₂ O	2.5	-
总体积	25	-

反应条件：预变性94℃，2 min；（变性94℃，30 s；退火57℃，30 s；延伸72℃，30 s）×40

cycles；熔解曲线65~95℃，每5 s升高0.5℃。优化的qPCR扩增曲线呈现出特异的S型荧光扩增特征，其熔解曲线仅显示单一扩增峰。

2.4 SYBR Green I qPCR 标准曲线

以质粒浓度为 $5.9 \times 10^{-5} \sim 5.9 \times 10^0$ ng/μL区间的质粒标准品为模板，用优化的qPCR反应条件进行检测。以Ct值为纵坐标，不同标准品浓度对数值为横坐标，制作标准曲线。所得标准曲线方程为 $y = -3.1866x + 13.172$ ，斜率为-3.1866，相关系数（R²）为0.9949，扩增效率（E%）为105.9%，在qPCR扩增效率范围90%~110%内，但接近100%为佳。图2所示，建立的标准曲线具有良好的线性关系。扩增效率略高的原因可能为反应条件优化不足，但鉴于溶解曲线呈现单一峰值，电泳验证无杂带，因此该结果仍可接受。

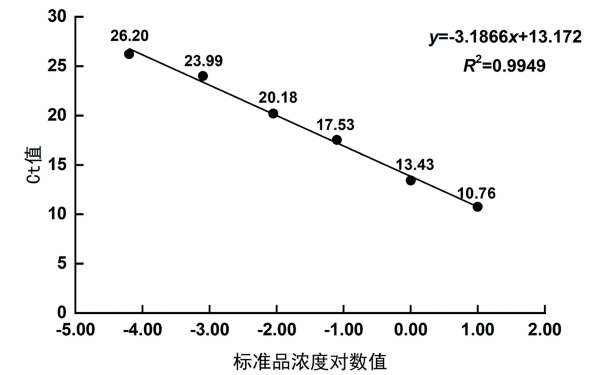


图2 qPCR 标准曲线
Figure 2 qPCR Standard Curve

2.5 SYBR Green I qPCR 特异性检测结果

选取标准品质粒浓度为 $5.9 \times 10^{-9} \sim 5.9 \times 10^{-2}$ ng/μL的乙型副伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、德氏乳杆菌和实验室非沙门氏菌DNA为模板，以ddH₂O为阴性对照，采用优化的qPCR方法进行扩增。乙型副伤寒沙门氏菌出现典型“S”型扩增曲线，荧光信号在特定循环数后显著上升，超过阈值线，而其他4种非目标菌株样品和阴性对照均未出现特异性扩增曲线，仅在31循环左右起峰（图3），且样品Ct值均大于阴性对照，呈现阴性结果，说明该qPCR方法仅对于乙型副伤寒沙门氏菌产生特异性扩

增，具有良好的特异性。

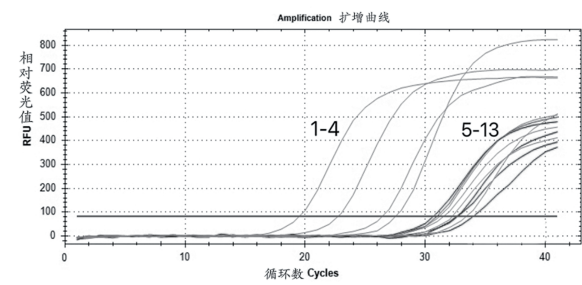


图 3 SYBR Green I qPCR 特异性检测结果

Figure 3 Specificity Results of SYBR Green I qPCR
注：1-4：乙型副伤寒沙门氏菌质粒标准品浓度 $5.9\times 10^{-5}\sim 5.9\times 10^{-2}$ ng/μL；5：阴性对照；6：大肠杆菌；7-9、12：乙型副伤寒沙门氏菌质粒标准品浓度 $5.9\times 10^{-9}\sim 5.9\times 10^{-6}$ ng/μL；10：德式乳杆菌；11：金黄色葡萄球菌；13：实验室非沙门氏菌

2.6 SYBR Green I qPCR 灵敏度检测结果

选取乙型副伤寒沙门氏菌质粒标准品，设置 $5.9\times 10^{-11}\sim 5.9\times 10^0$ ng/μL共12个稀释度分别作为qPCR模板，按照qPCR反应体系进行检测，测定qPCR最低检测限。随着菌液浓度的降低，Ct值依次升高，前8个稀释度样品Ct值<30，具有有效扩增，实时荧光定量PCR检测乙型副伤寒沙门氏菌的最低检测限为 5.9×10^{-8} ng/μL。根据公式：

$$\text{拷贝数}/\mu\text{L} = \frac{\text{质粒浓度 (ng}/\mu\text{L})\times 10^{-9}\text{g}/\text{ng}\times 6.02\times 10^{23}\text{拷贝数}/\text{mol}}{\text{质粒总长度 (bp)}\times 660\text{g}/\text{mol}\cdot\text{bp}}$$

可计算得出实时荧光定量PCR检测乙型副伤寒沙门氏菌的最低检测限为17.9 拷贝数/μL（图4），

说明该法具有极佳的灵敏度。

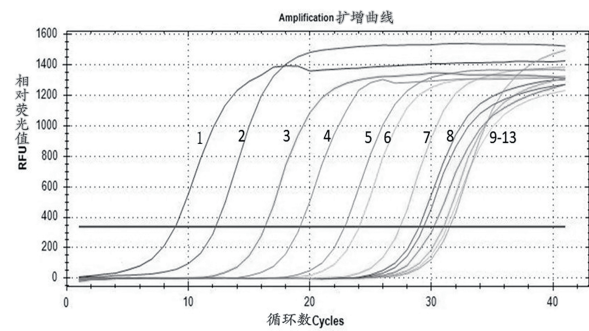


图 4 SYBR Green I qPCR 灵敏度检测结果

Figure 4 Results of SYBR Green I qPCR Sensitivity Detection
注：1-9、11-13： $5.9\times 10^{-11}\sim 5.9\times 10^0$ ng/μL的质粒标准品；10：阴性对照

2.7 SYBR Green I qPCR 重复性检测结果

由重复性检测结果可知，乙型副伤寒沙门氏菌的组内变异系数为0.2%~0.69%，组间变异系数为0.49%~1.54%，组内及组间的SD<0.5，CV<5%（表3），证明该法具有较好的重复性和稳定性（图5）。本试验以 5.9×10^{-1} ng/μL浓度组为例，其组间Ct值为10.24~10.50，对应的组间CV值为1.37%。根据qPCR方法通用标准及MIQE指南要求，组内组间及组间Ct值的变异系数（CV）均≤5%即视为数据重复性良好。本试验该浓度组CV值远低于阈值，表明样品扩增的组间一致性优异，随机误差处于可接受范围。Ct值最大差异仅0.26，换算后靶标浓度偏差约20%，符合定量试验的允许误差要求，该组数据可

表 3 SYBR Green I qPCR 重复性结果

Table 3 Repetitive Results of SYBR Green I qPCR

重复性	质粒浓度 (ng/μL)	循环数				SD	CV (%)
		1 (次)	2 (次)	3 (次)	平均值		
组内	5.9×10^{-1}	11.06	10.96	11.04	11.02	0.05	0.48
	5.9×10^{-2}	14.53	14.60	14.68	14.60	0.08	0.51
	5.9×10^{-3}	18.49	18.45	18.69	18.54	0.13	0.69
	5.9×10^{-4}	20.96	20.98	21.06	21.00	0.05	0.25
	5.9×10^{-5}	23.99	24.06	24.08	24.04	0.05	0.20
组间	5.9×10^{-1}	10.24	10.47	10.50	10.40	0.14	1.37
	5.9×10^{-2}	14.56	14.52	14.93	14.67	0.23	1.54
	5.9×10^{-3}	18.32	18.15	18.28	18.25	0.09	0.49
	5.9×10^{-4}	21.30	21.26	21.68	21.41	0.23	1.08
	5.9×10^{-5}	23.91	24.19	23.87	23.99	0.17	0.73

用于后续定量分析。

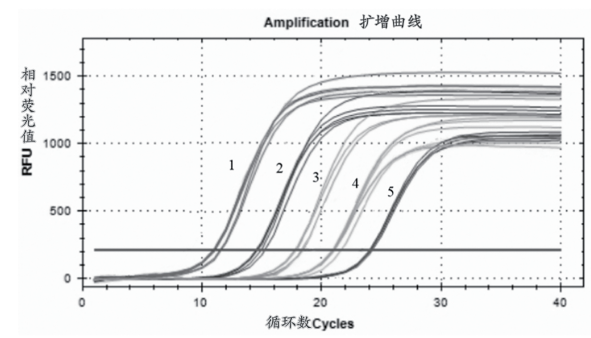


图 5 SYBR Green I qPCR 重复性检测结果
Figure 5 Results of SYBR Green I qPCR Repeatability Test
注：1-5：5.9×10⁻⁵~5.9×10⁻¹ ng/μL 浓度的质粒标准品

2.8 SYBR Green I qPCR 方法检测效果评价

用传统培养法选取生乳、稀奶油、全脂乳粉为样品，取样均质后分别对其进行预增菌、选择性增菌和分离操作，选取 6 个典型菌落进行生化试验，菌落形态见图6，根据生化试验结果判断均为非沙门氏菌（表4）。

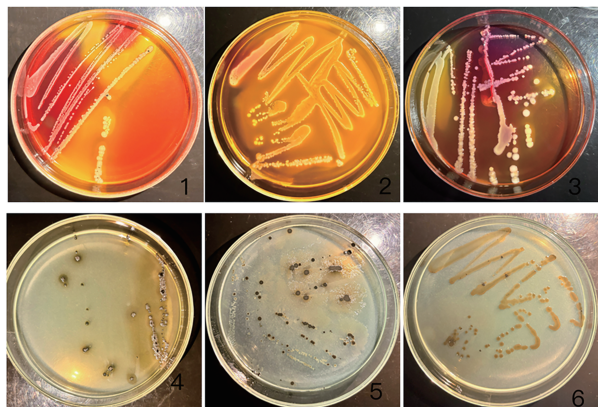


图 6 典型菌落形态
Figure 6 Typical Colony Morphology

使用本研究建立的qPCR方法对上述样品进行检测，检测结果与传统培养法分离鉴定结果一致，均未在样品中检出目标菌（图7），但qPCR方法在保证准确性的前提下，将检测时间由5~7 d缩短至6 h 内，降低了检测强度，提高了检测效率。

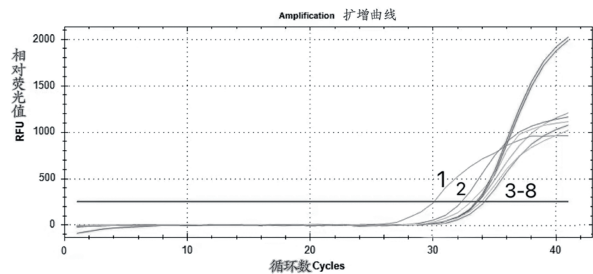


图 7 qPCR 检测结果
Figure 7 qPCR Test Results

3 讨论与结论

目前，食源性疾病已成为全球重点关注的食品安全与卫生问题^[10]。据世界卫生组织（WHO）统计，全球每年约有13 亿例由沙门氏菌感染引起的急性肠胃炎与腹泻，从而导致约300 万人死亡^[11]。其中，乙型副伤寒沙门氏菌系专性人类病原体，无动物宿主。其传染源主要为感染者及无症状带菌者，主要通过粪-口途径传播，常见媒介为污染的水源、未灭菌乳制品或生食（如沙拉）。此外，乙型副伤寒沙门氏菌是引起人类副伤寒的主要病原体之一，其流行病学特征呈现显著的地域性与人群特异性。因此，建立一种快速、高效的乙型副伤寒沙门氏菌检测方法，对保障食品安全与公共卫生安全、及时有效地防控食源性疾病的暴发与传播有重

表 4 传统培养法生化试验结果

Table 4 Biochemical Test Results of Traditional Culture Method

菌株	凝固基质	赖氨酸脱羧酶	氰化钾	三糖铁				尿素酶	ONPG	结果
				H ₂ S	产气	斜面	底层			
1	-	+	-	-	-	A	A	-	+	非沙门氏菌
2	+	+	-	-	+	A	A	-	+	非沙门氏菌
3	-	+	-	-	+	A	A	-	+	非沙门氏菌
4	-	+	-	-	+	A	A	+	+	非沙门氏菌
5	-	-	-	+	-	K	A	+	-	非沙门氏菌
6	+	+	-	+	-	A	A	+	+	非沙门氏菌

注：K：产碱；A：产酸；+：阳性；-：阴性

要意义^[10]。目前,常规检测方法有传统培养法、常规PCR、血清学鉴定等。然而,这些方法在检测周期、灵敏度、高通量、交叉反应等方面具有一定限制。因此,探索快速、高效的检测方法,可以起到对食源性疾病的防治效果。

近年来,常见的PCR方法主要有多重PCR(mPCR)、实时荧光PCR和数字PCR^[12]。研究者通过引物优化、前处理改良和技术联用等手段推动PCR技术的创新发展。例如,mPCR通过多引物体系实现多病原同步检测,如Jaroenporn等^[13]建立的志贺毒素大肠杆菌、李斯特菌和沙门氏菌三重检测体系,灵敏度达100%;孙少迪等^[14]建立的沙门氏菌荧光定量PCR的最低检测限为1.4 拷贝数/ μL 。此外,乙型副伤寒沙门氏菌的检测方法还有基因芯片技术、免疫学检测法(酶联免疫吸附法)、生物传感器法。徐晓静等^[15]开发的肠道菌基因芯片可同步检测沙门氏菌、葡萄球菌及志贺菌等多种致病菌,兼具多靶标筛查能力与实用价值。该技术通过荧光标记探针实现可视化检测,结合计算机自动化分析系统,显著提升了食源性致病菌检测的效率和精度,充分展现了其在分子诊断领域的高度集成化优势。Ding等^[16]创新性地采用噬菌体T41受体结合蛋白RBP 102修饰磁性微珠,结合HRP标记抗体构建磁性酶联法(MELISA),检测时间压缩至1.5 h,灵敏度达10 CFU/mL,较常规方法提升百倍。以电化学生物传感器为例,Zheng等^[17]开发的集成SRCA扩增与CRISPR/Cas12a切割功能的体系,利用二茂铁(Fc)和亚甲蓝(MB)的电流信号比,实现了对沙门氏菌的超灵敏检测,线性范围达5.8 fg/ μL ~5.8 ng/ μL ,纯培养物最低检测限2.08 fg/ μL ,并通过双信号比值消除非特异性干扰。

本研究针对乙型副伤寒沙门氏菌特异性基因*invA*设计引物,通过对反应体系和反应程序的优化,建立的SYBR Green I qPCR方法的标准曲线具有良好的线性关系($R^2=0.992$)。SYBR Green I qPCR检测具有较高的特异性和灵敏度,仅对目标菌株产生特异扩增信号,与其他4种非沙门氏菌并无交叉

反应,最低检出限为 5.9×10^{-8} ng/ μL ,组内CV为0.20%~0.69%,组间CV为0.49%~1.54%,说明该法具有良好的重复性和较高的稳定性。此外,以生乳、稀奶油、全脂乳粉为检测样品,将该法与传统培养法进行比较,结果显示,建立的qPCR方法降低了检测强度,提高了检测效率,同时缩短了检测周期,由原来的5~7 d缩减为6 h之内。

综上所述,沙门氏菌的传统检测方法步骤复杂、耗时长,并且精度较低,无法进行定量分析,难以实现快速检测,因此qPCR方法迅速成为沙门氏菌检测的有效方法。目前,qPCR方法包括探针法和嵌合荧光法。探针法引物设计要求高且合成费用高,而嵌合荧光法可以使用普通PCR引物结合荧光染料,在引物设计和使用成本上更具优势。本研究中的qPCR方法具有特异性强、灵敏度高的特点,可用于乳品中沙门氏菌的定量检测。

参考文献

- [1] 于美英,祝永英,冯海燕.一起乙型副伤寒沙门氏菌引起食物中毒的病原学分析[J].中国农村卫生,2019,11(10):42-43.
- [2] Jarvis N A, O' Bryan C A, Dawoud T M, et al. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation[J]. Food Control, 2016, 68: 280-290.
- [3] 李夸巧,张云嫻,黄豆,等.食品中食源性致病菌污染状况分析[J].食品安全导刊,2017(33):95.
- [4] 贾方芳,张自强,张倩文,等.兔源性沙门氏菌PCR检测方法的建立[J].中国养兔,2023(1):10-13.
- [5] 刘健慧,张先舟,张蕴哲,等.G-四链体与As-PCR联用可视化检测沙门氏菌[J].中国食品学报,2023,23(5):371-380.
- [6] Xu Q, Xie G, Shi Q, et al. The dual nucleic acid amplification with dynamic light scattering strategy for ultrasensitive detection of *Salmonella* in milk[J]. Microchemical Journal, 2023(184):108143.
- [7] Fu Q, Yuan L, Cao F, et al. Lateral flow strip biosensor based on streptavidin-coated gold nanoparticles with recombinase polymerase amplification for the quantitative point-of-care testing of *Salmonella*[J]. Microchemical Journal, 2021(171):106859.
- [8] 厉佳丽.食源性致病菌多重重组酶聚合酶扩增快速检测技术研究[D].杭州:中国计量大学,2020.

- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局.GB4789.4—2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
- [10] 刘婷, 林晓惠, 陈谦, 等.基于表面印迹聚合物的电化学传感器用于乙型副伤寒沙门氏菌的检测[J].分析化学, 2022, 50 (1) : 127-135.
- [11] Wang P , Pang S, Pearson B, et al.Rapid concentration detection and differentiation of bacteria in skimmed milk using surface enhanced Raman scattering mapping on 4-mercaptophenylboronic acid functionalized silver dendrites[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409 (8) : 2229-2238.
- [12] 刘晓飞, 陈嘉, 马静静, 等.乳制品中沙门氏菌检测技术应用研究进展[J].中国检验检测, 2024, 32 (5) : 26-29.
- [13] Jaroenporn C, Supawasit W, Bundidamorn D, et al.In-house validation of Multiplex PCR for simultaneous detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw meats[J].Foods, 2022, 11 (11) : 1557.
- [14] 孙少迪, 田堯, 高艺玮, 等.禽源沙门氏菌荧光定量PCR方法的构建及应用[J].湖南畜牧兽医, 2024 (1) : 41-45.
- [15] 徐晓静, 文思远, 韩毅.应用基因芯片方法检测几种肠道菌[J].华北农学报, 2007 (1) : 182-183.
- [16] Ding Y, Huang C, Zhang Y, et al.Magnetic microbead enzyme-linked immunoassay based on phage encoded protein RBP 41-mediated for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food matrices[J].Food Research International, 2023 (163) : 112212.
- [17] Zheng S, Yang Q, Yang H, et al.An ultrasensitive and specific ratiometric electrochemical biosensor based on SRCA-CRISPR/Cas12a system for detection of *Salmonella* in food[J].Food Control, 2023 (146) : 109528.