

实验技术与方法

三重微滴数字PCR定量检测即食米粉中致病菌方法研究

孙雪奇¹,尹玮璐¹,蒋佳希¹,张明明²,梁美丹¹,曾善美³,肖剑¹

(1. 广州市食品检验所,广东广州 511400;2. 广州知识产权保护中心,广东广州 510010;

3. 澳实分析检测有限公司(加拿大),加拿大不列颠哥伦比亚省 V4A1W9)

摘要:目的 建立三重微滴数字PCR(ddPCR)方法同时定量检测即食食品中的沙门菌、蜡样芽胞杆菌和单核细胞增生李斯特菌。方法 选择以沙门菌 *trA/trC*、蜡样芽胞杆菌 *essC*、单核细胞增生李斯特菌侵袭相关内肽酶基因等3个单拷贝基因对应的3对引物探针,采用实时荧光定量PCR验证引物/探针特异性后,建立三重ddPCR方法同时定量检测3种致病菌的拷贝数。结果 该方法的线性范围分别为:沙门菌25~22 687 copies/20 μL;蜡样芽胞杆菌19~15 620 copies/20 μL;单核细胞增生李斯特菌18~23 373 copies/20 μL,线性相关因子 $r^2 \geq 0.999$,6个浓度3次重复测定3种菌的相对标准偏差(RSD)≤12%,重复性好,对于上述菌株的最低检出限分别为6、3和7 copies/20 μL;采用已建立的ddPCR方法和平板计数方法对模拟染菌米粉样品进行检测,两种方法测定值结果RSD小于9%,结果一致性较好。结论 本研究建立的三重ddPCR同时定量检测即食食品中沙门菌、蜡样芽胞杆菌和单核细胞增生李斯特菌的方法与平板计数法相比,更快速、灵敏,结果准确。

关键词:食源性致病菌;沙门菌;蜡样芽胞杆菌;单核细胞增生李斯特菌;三重微滴数字PCR;即食食品

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)11-1571-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.11.004

Research on the quantification method to detect pathogenic bacteria in instant rice noodles by 3-plex droplet digital polymerase chain reaction test

SUN Xueqi¹, YIN Weilu¹, JIANG Jiayi¹, ZHANG Mingming², LIANG Meidan¹,
ZENG Shanmei³, XIAO Jian¹

(1. Guangzhou Institute for Food Inspection, Guangdong Guangzhou 511400, China;

2. Guangzhou Intellectual Property Protection Center, Guangdong Guangzhou 510010, China;

3. ALS Canada Ltd., British Columbia V4A1W9, Canada)

Abstract: Objective This study aimed to establish a quantitative 3-plex droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method for simultaneously detecting the copy numbers of *Salmonella*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* in instant food. **Methods** Three pairs of primers and probes corresponding to three single-copy-genes were selected as target genes. The genes were the *essC* gene in *Bacillus cereus*, *trA/trC* gene in *Salmonella*, and invasion-associated endopeptidase gene in *Listeria monocytogenes*. The specificity of the primers and probes were verified by real-time fluorescence quantitative PCR separately. A 3-plex ddPCR method was constructed to detect the copy numbers of three pathogenic bacteria simultaneously. **Results** The linear ranges were: 25-22 687 copies/20 μL for *Salmonella*, 19-15 620 copies/20 μL for *Bacillus cereus*, and 18-23 373 copies/20 μL for *Listeria monocytogenes*. The three linear correlation coefficients were $r \geq 0.999$. relative standard deviation (RSD) ≤ 12% at six concentrations and repeated thrice, indicating favorable repeatability. The minimum detection limits were six copies/20 μL for *Salmonella*, three copies/20 μL for *Bacillus cereus*, and seven copies/20 μL for *Listeria monocytogenes*. When a simulated sample of contaminated rice noodles was detected by 3-plex ddPCR and the plate counting method, the deviation between these two methods was <9%, indicating a good consistency in the results. **Conclusion** The 3-plex ddPCR method for the simultaneous and quantitative detection of *Salmonella*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* in instant food was quicker, more sensitive, and more

收稿日期:2022-12-02

基金项目:广州市科技计划项目(201904010253);广州市科技计划项目(202206010095)

作者简介:孙雪奇 女 主任药师 研究方向为食品安全质量研究控制 E-mail:sun-xueqi@163.com

通信作者:肖剑 男 高级工程师 研究方向为食品安全质量研究控制 E-mail:xjhq521@163.com

accurate than the plate-counting method.

Key words: Foodborne pathogens; *Salmonella*; *Bacillus cereus*; *Listeria monocytogenes*; 3-plex droplet digital PCR; instant food

食源性病原微生物引起的疾病已经成为日益严重的全球性公共卫生问题,2020年世界卫生组织指出,每年全世界有5.5亿人因食物污染而引起腹泻等食源性疾病,其中约23万人死亡^[1],在世界各地食源性疾病的发病率均居前列,沙门菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)、其他产志贺毒素的大肠杆菌和弧菌(*Vibrio*)是目前主要的食源性致病菌^[2]。即食食品因有效期短、可直接食用等特点更容易导致食源性疾病发生,其中盒饭、熟制米面制品、凉拌菜、烧烤类和寿司等因微生物污染风险较高,每年被列入各地监督抽检计划^[3],这些品种的控制菌即为上文提及的主要食源性致病菌。沙门菌是一种主要的全球食源性病原体^[4-5];蜡样芽胞杆菌孢子抵抗力强,其分泌的毒素耐高温和高压^[6-7];单核细胞增生李斯特菌可以在低温生长,一旦感染,死亡率达30%^[8]。近年来上述3种致病菌导致的食物中毒事件时有发生^[4-9]。食品中致病菌的现行检验方法主要是采用选择性培养分离结合形态特征与生化鉴定,存在耗时长、准确度低、操作繁琐等问题^[10],微生物漏检风险较大。即食食品发生食源性疾病的风险超过其他类食品,因此对检验时效性要求更高,亟需更加快速、灵敏、准确的检验方法来进行微生物控制,从而在重大活动保障、应急救援等方面提供食品安全的即时保障。

微滴式数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 原理^[11]为将含有目标基因的反应体系均匀分布到20 000个微滴中进行 PCR 扩增,读取每个微滴的荧光信号确定阳性反应单元数,无需制作标准曲线,根据泊松分布(Poisson distribution)计算出反应体系中的模板拷贝浓度,从而实现对检测目标核酸分子的定量,具有灵敏度高、精确度高和绝对定量等优点^[12]。目前,ddPCR方法在食品中多用于源性成分分析、病毒检测和单个食源性菌株检测^[13-14],多为一重或者二重 ddPCR 方法研究,除了本课题组发表的一篇文章^[15]外,国内未见三重及以上微滴数字 PCR 方法检测食品中多种致病菌的研究报道。

本研究选择3种食品日常监督抽检常见致病菌:沙门菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽胞杆

菌,建立了同时扩增并定量检测3种食源性致病菌的多重 ddPCR 方法,探索食品微生物日常监管更加快速、灵敏、准确的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验菌株:伤寒沙门菌(*Salmonella typhi* CMCC (B) 50071)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus* CICC 10352)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)。

引物/探针特异性试验参照菌株:大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、大肠埃希菌 O157:H7(*Escherichia coli* NCTC 12900)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii* ATCC 29544)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni* CICC 22936)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis* CMCC(B) 49005)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* ATCC 27562)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* ATCC 33787)、副溶血性弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus* ATCC 17802)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae* CMCC(B) 51105)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri* CMCC(B) 51572)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica* CMCC(B) 52204)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei* CMCC(B) 51592)、环状芽胞杆菌(*Bacillus circulans* ATCC 4516)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua* ATCC 33090)、斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri* CICC 21671)、伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii* ATCC 19119)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* CMCC(B) 26069)、马红球菌(*Rhodococcus equi* ATCC 6939)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae* CICC 10465)。上述标准菌株中,标示 CMCC 的菌株来自于中国医学细菌保藏管理中心;标示 CICC 的菌株来自于中国工业微生物菌种保藏中心;标示 ATCC 的菌株来自于美国典型菌种保藏中心;标示 NCTC 的菌株来自于英国典型菌种保藏中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

QX200™ 微滴数字 PCR 系统、CFX96 实时荧光

定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), NanoDrop One 超微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司), Microfuge® 20R 冷冻离心机(美国 Beckman coulter 公司), KB240 生化培养箱(美国 BINDER 公司)。

2×qPCR Mix(东洋纺生物科技有限公司), 2×ddPCR Supermix for Probes、微滴发生油、微滴检测油(美国 Bio-Rad 公司), 溶菌酶 Lysozyme(TRANGEN 公司), TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(含 Buffer TE, 天根生化科技有限公司), 胰酪大豆胨琼脂培养基、营养肉汤培养基(北京陆桥技术股份有限公司)。食品样品米粉购自本地超市。实验所用引物和探针由华大基因科技有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 提取

将 1.1.1 所列的 26 种菌株分别接种于营养肉汤培养基中置 36 °C 培养过夜, 取菌悬液用细菌基因组 DNA 提取试剂盒分别提取 DNA, 最后加 50 μL TE 洗脱核酸, 用超微量紫外可见分光光度计测定所提取 DNA 浓度及纯度。要求所有菌株提取的 DNA 浓度范围在 10~100 ng/μL, 其 A_{260}/A_{280} 均在 1.7~1.9 范围内, 方可用于后续实验。所有菌株提取的 DNA 均符合要求。

1.2.2 引物/探针筛选

查询国内外相关标准、文献及数据库^[5-7,9,14,16-21]获得 3 种菌已报道的 *invA*^[16]、*fimY*^[17]、*ttrA/ttrC*^[5]、invasion associated endopeptidase^[20]、*hlyA*^[8]、*essC*^[6]和 *gyrB*^[21]等基因的 PCR 检测引物和探针序列, 使用生物信息学分析软件 DNASTar 7.1 分析多对引物和探针中的二聚体及发夹结构, 经吉布斯自由能 ΔG 数值(绝对值不超过 9)配对筛选, 确定蜡样芽胞杆菌第 VII 型分泌蛋白(Type VII secretion protein, *essC*)基因、沙门菌编码连四硫酸盐还原酶(*ttr*)的 *ttrA/ttrC* 基因、单核细胞增生李斯特菌侵袭相关内肽酶(Invasion associated endopeptidase)基因等 3 个单拷

贝基因 PCR 检测的引物和探针序列为本次研究的引物和探针(表 1), 其中沙门菌和蜡样芽胞杆菌检测探针连接 6-羧基荧光素基团(6-carboxy-fluorescein, FAM), 单核细胞增生李斯特氏菌检测探针连接六氯-6-甲基荧光素基团(Hexachloro fluorescein, HEX)。引物和探针由华大基因公司合成。

1.2.3 引物/探针特异性分析

利用荧光定量 PCR 方法, 分别用沙门菌、蜡样芽胞杆菌和单核细胞增生李斯特菌检测引物/探针扩增 1.1.1 中菌株的基因组 DNA 成分, 对 3 种致病菌检测引物/探针分别进行特异性验证, 荧光 PCR 反应体系: 2×qPCR Mix 12.5 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.75 μL, 10 μmol/L 探针 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 加去离子水至 25 μL; 荧光 PCR 扩增程序: 95 °C 15 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

1.2.4 三重 ddPCR 体系的构建及优化

先构建 3 种致病菌的单重 ddPCR 检测体系, 然后构建沙门氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌的二重 ddPCR 检测体系^[15], 然后在构建的二重体系中加入蜡样芽胞杆菌检测引物/探针组合构建三重体系, 并对构建的三重 ddPCR 体系进行优化, 分别使用 10、20、25 μmol/L 的引物/探针进行 ddPCR 扩增及检测进行引物/探针浓度优化; 设置退火温度为 55~65 °C 的梯度进行退火温度优化; 设置退火时间为 0.5、1、1.5 和 2 min 进行退火时间优化。根据靶标微滴区分效果确定最适引物/探针浓度、退火温度和时间。

1.2.5 线性范围、最低检出限和重复性

将 3 种致病菌基因组 DNA 各取 1/3 混合均匀, 取混合液从起始浓度进行 4 倍梯度稀释, 共计 8 个浓度, 分别进行单重 ddPCR 和 3 次三重 ddPCR 扩增检测, 根据检测拷贝数平均值分析该方法的线性范围和最低检出限。分别计算 8 个浓度 3 次重复测定拷贝数的平均值、偏差及相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD), 评价方法的重复性。

表 1 三重 ddPCR 方法的引物/探针序列

Table 1 Primer and probe sequence of 3-plex ddPCR method

致病菌	靶基因名称	引物/探针 be	序列(5'-3')	参考文献
沙门菌	<i>ttrA/ttrC</i>	Sal-F	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	[5]
		Sal-R	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	
		Sal-Probe	FAM-CACCGACGCGGAGACCGACTTT-TAMRA	
蜡样芽胞杆菌	<i>essC</i>	Bc-F	CAGAACAACCAGAAATTTATGAAAGAGT	[6]
		Bc-R	ATCATCTACAACACCACTCGGTTT	
		Bc-Probe	FAM-CAGCGCGTATCGGTCTCACTCGG-BHQ1	
单核细胞增生李斯特菌	Invasion associated endopeptidase gene	Lm-F	CTGAATCTCAAGCAAAAACCTGGT	[20]
		Lm-R	C GCGACCGAAGCCAACTA	
		Lm-Probe	HEX-ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG-BHQ1	

1.2.6 模拟染菌食品样品测定

称 25 g 米粉样品于无菌袋中,加稀释液 225 mL,混匀,制备 1:10 样品稀释液。取 1 mL 样品稀释液加入适量三种致病菌的新鲜培养物,混匀,提取 DNA,加 TE 50 μL,取 10 μL 加入 40 μL 水中,混匀,水中混匀作为第 1 个稀释级,以下 4 倍梯度稀释至第 6 个稀释级,取模板 2 μL 用 ddPCR 测定拷贝数;同时,分别取上述 3 种菌新鲜培养物用营养琼脂培养基测定加入菌数量,比较 ddPCR 检测与平板计数定值结果的一致性。

50 μL TE 中的拷贝数(copies/50 μL TE)=
测定拷贝数(copies/μL)×A/B×稀释倍数×C
式中:A:反应体系体积,20 μL;B:反应体系中模板

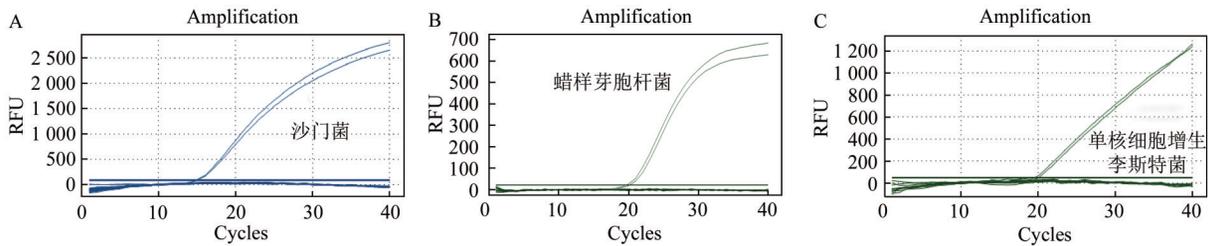
体积,2 μL;C:提取的 DNA 总体积,50 μL。

2 结果

2.1 引物/探针的特异性分析

用荧光定量 PCR 方法,分别用沙门菌、蜡样芽胞杆菌和单核细胞增生李斯特菌检测引物/探针扩增靶标菌和 1.1.1 中其他 25 种菌株的基因组 DNA 成分,扩增结果见图 1。

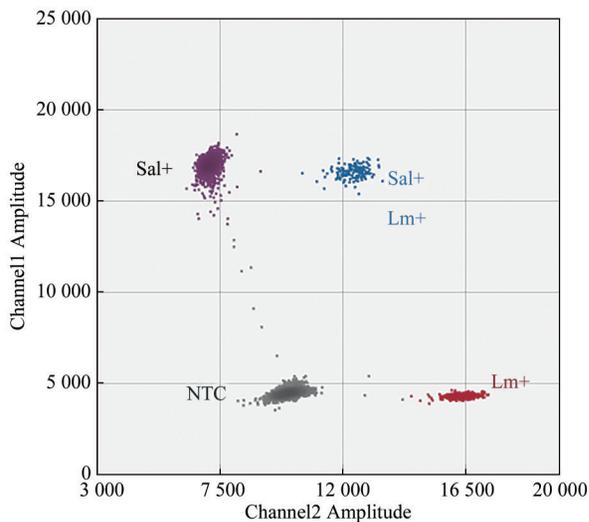
在图 1 中,使用 3 种致病菌的引物/探针扩增不同菌株的 DNA,只有该菌的特异性扩增曲线,未见其他菌有扩增曲线,表明所选择的引物/探针特异性好。



注:A:沙门菌;B:蜡样芽胞杆菌;C:单核细胞增生李斯特菌

图1 三种致病菌引物/探针的荧光PCR特异性验证

Figure 1 Specificity verification of primers/probes for 3 pathogenic bacteria by quantitative real-time PCR



注:灰色点 NTC:空白对照;Sal+:含沙门菌基因的阳性微滴簇;Lm+:含单核细胞增生李斯特菌基因的阳性微滴簇;Sal+Lm+:同时含有沙门菌和单核细胞增生李斯特菌基因的阳性微滴簇。

图2 沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的二重 ddPCR 检测结果二维图

Figure 2 Two-dimensional map of 2-plex ddPCR detection result of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*

2.2 二重 ddPCR 扩增体系构建

构建的二重体系为:ddPCR 反应预混液 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.8 μL,两种探针(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 1 μL,加去离子水至 20 μL。反应混合液制成微滴后,转移至 96 孔

板进行 PCR 反应,反应程序为:95 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 1 min,40 个循环;98 °C 酶热失活 10 min,4 °C 保存,整个程序温度升降速度为 2 °C/s。结果见图 2。二重 ddPCR 采用两个不同检测通道。

2.3 三重 ddPCR 扩增体系构建

经引物/探针浓度优化,确认构建的三重 ddPCR 检测体系为:ddPCR 反应预混液 10 μL,三种目的菌株上下游引物(25 μmol/L)各 0.72 μL,三种探针(25 μmol/L)各 0.2 μL,模板 DNA 2 μL,加去离子水至 20 μL。根据 7 个阳性靶标微滴簇相对集中且微滴簇之间区分情况,确定退火温度为 61 °C;退火时间为 2 min,结果见图 3、图 4。

微滴簇共分为 8(2³)个点,各点之间间隔良好充分分离。最终确定 ddPCR 的反应程序为:95 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 2 min,40 个循环;98 °C 酶热失活 10 min,4 °C 保存(整个程序温度升降速度为 2 °C/s)。

2.4 三重 ddPCR 检测体系的线性范围、重复性和与平板计数检测一致性分析

2.4.1 重复性试验

3 种致病菌基因组 DNA 混合液起始浓度分别为:沙门菌 612 pg/μL;蜡样芽胞杆菌 374 pg/μL;单核细胞增生李斯特菌 191 pg/μL,混合液从起始浓

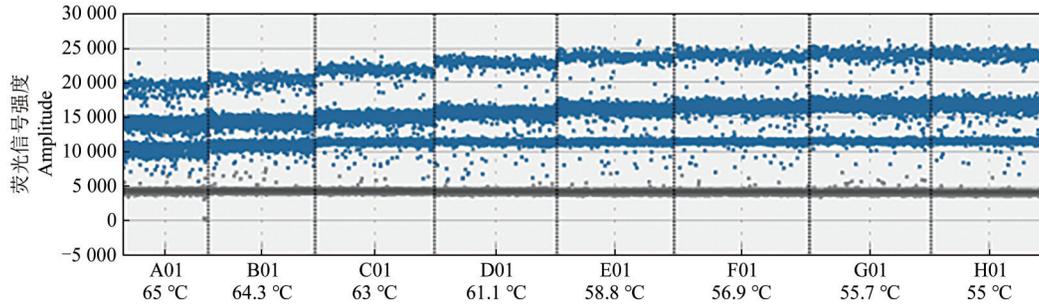
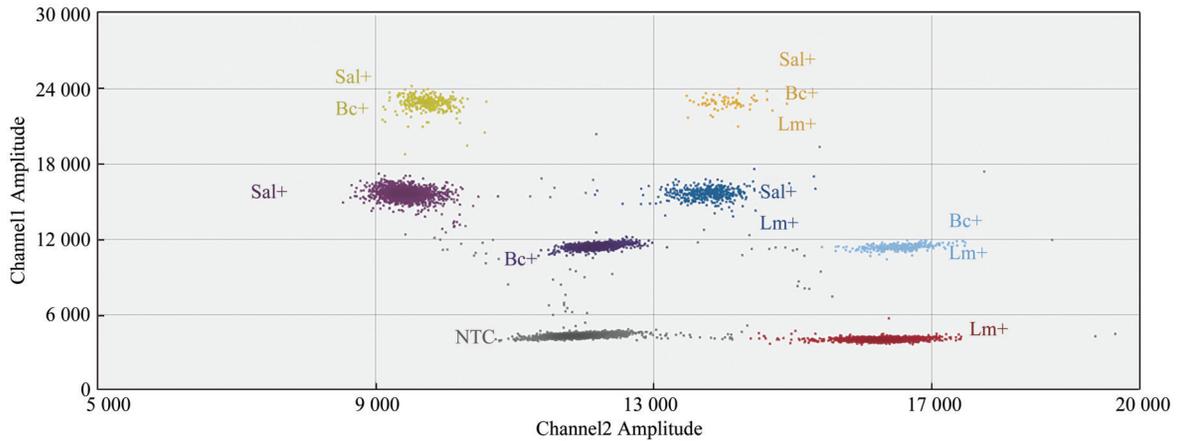


图3 退火温度优化

Figure 3 Optimization of annealing temperature



注:灰色点 NTC:空白对照;Sal+:含沙门菌基因的阳性微滴簇;Bc+:含蜡样芽胞杆菌基因的阳性微滴簇;Lm+:含单核细胞增生李斯特菌基因的阳性微滴簇;图中一个点标示2个或3个+表示同时含有2个或3个阳性微滴簇

图4 三重 ddPCR 检测结果二维图

Figure 4 Two-dimensional map of 3-plex ddPCR detection result

度开始 4 倍梯度稀释,共计 8 个浓度,分别取模板通过一次 PCR 扩增,同时检测 3 种致病菌,重复 3 次实验,结果见表 2~4。3 个菌的第一个 DNA 模板浓

度较高,二维图谱显示几个微滴簇未得到有效分离,受泊松分布分析影响,其微滴数不准确,故表中未给出数据;3 个菌的最后一个稀释度模板浓度过

表2 沙门菌三重 ddPCR 与单重 ddPCR 的线性范围

Table 2 Linear range of single ddPCR and 3-plex ddPCR of *Salmonella*

浓度/(pg/ μ L)	三重 ddPCR				RSD/%	单重 ddPCR/(copies/ μ L)
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值 \pm SD		
612	—	—	—	—	—	4 141
153	1 108	1 178	1 117	1 134.33 \pm 38.08	3.4	1 107
38.3	289	286	267	280.67 \pm 11.93	4.3	278
9.56	69.0	66.7	67.6	67.77 \pm 1.16	1.7	68.9
2.39	17.8	17.5	14.9	16.73 \pm 1.59	9.5	15.3
0.598	4.72	4.37	4.29	4.46 \pm 0.23	5.1	4.03
0.149	1.39	1.19	1.16	1.25 \pm 0.13	10.0	1.13
0.037 3	0.34	0.40	0.11	0.28 \pm 0.15	54.2	0.242

表3 蜡样芽胞杆菌三重 ddPCR 与单重 ddPCR 的线性范围

Table 3 Linear range of single ddPCR and 3-plex ddPCR of *Bacillus cereus*

浓度/(pg/ μ L)	三重 ddPCR				RSD/%	单重 ddPCR/(copies/ μ L)
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值 \pm SD		
374	—	—	—	—	—	2 832
93.4	745	823	775	781.00 \pm 39.34	5.0	795
23.4	203	203	189	198.33 \pm 8.08	4.1	200
5.84	49.0	52.5	48.0	49.83 \pm 2.36	4.7	48.9
1.46	12.4	12.3	12.5	12.40 \pm 0.10	0.8	12.1
0.365	3.06	2.64	2.93	2.88 \pm 0.22	7.5	3.74
0.091 2	0.81	1.01	1.00	0.94 \pm 0.11	12.0	0.74
0.022 8	0.23	0.10	0.11	0.15 \pm 0.07	49.3	0.10

低, RSD>25%。根据文献报道以 RSD≤25%^[22]作为评价分子生物学方法重复性的判断依据,所以除第一个和最后一个浓度外, RSD 均≤12%, 方法的重复

性好。另外, 经 SPSS 中的 *T* 检验计算, 3 个致病菌的 ddPCR 单重和三重检验方法对所有样品定量测定结果均无显著性差异。

表4 单核细胞增生李斯特菌三重 ddPCR 与单重 ddPCR 的线性范围

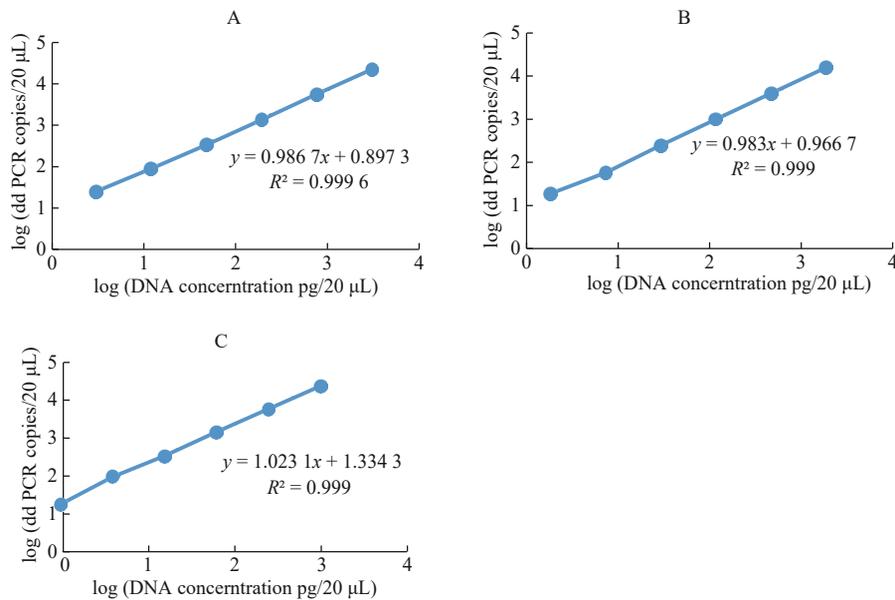
Table 4 Linear range of single ddPCR and 3-plex ddPCR of *Listeria monocytogenes*

浓度/(pg/μL)	三重 ddPCR				RSD/%	单重 ddPCR/(copies/μL)
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值±SD		
191	—	—	—	—	—	4 175
47.7	1 143	1 216	1 147	1 168.67±41.04	3.5	1 171
11.9	301	300	269	290.00±18.19	6.3	275
2.98	73.3	74.3	69.4	72.33±2.59	3.6	71
0.746	17.4	17.5	15.7	16.87±1.01	6.0	16.0
0.186	4.84	4.98	4.52	4.78±0.24	4.9	4.65
0.046 6	0.81	0.92	0.96	0.90±0.08	8.7	1.01
0.011 7	0.46	0.20	0.33	0.33±0.13	39.4	0.17

2.4.2 线性范围

以 3 次测定结果 20 μL 反应体系中 DNA 拷贝

数平均值的对数为纵坐标、DNA 浓度的对数为横坐标做标准曲线, 结果见图 5。



注: A: 沙门菌; B: 蜡样芽胞杆菌; C: 单核细胞增生李斯特菌

图5 三种致病菌的线性范围

Figure 5 Linear range of three pathogenic bacteria

3 条标准曲线的 r^2 均≥0.999, 表明所建立的方法 3 个菌均在 6 个浓度梯度范围内线性关系良好。分别选择标准曲线最大值和最小值(测定的拷贝数浓度)与反应体系体积(20 μL)相乘, 即为三重 ddPCR 的线性范围: 沙门菌为 25~22 687 copies/20 μL; 蜡样芽胞杆菌为 19~15 620 copies/20 μL; 单核细胞增生李斯特氏菌为 18~23 373 copies/20 μL, 上述线性范围与单个菌株线性范围一致, 线性范围较宽。

2.4.3 最低检出限

3 个菌的最低检出限均为第 8 个稀释度, 分别为: 沙门菌 6 copies/20 μL、蜡样芽胞杆菌 3 copies/20 μL、单核细胞增生李斯特菌 7 copies/20 μL。与其他研究者报道的单重 ddPCR 相当^[14], 检出灵敏度

较高。

2.5 模拟染菌米粉样品测定

模拟染菌食品样品测定的拷贝数与平板计数结果对数的 RSD<9%, 结果一致性较好。结果见表 5。

3 讨论

微生物传统检测方法检测成本低, 但耗时长, 操作繁琐, 在染菌浓度较低时漏检风险较大。微滴数字 PCR 方法快速、灵敏、准确度高, 但检测的仪器和试剂成本较高。建立多重 ddPCR 方法的目的是通过在同一 PCR 反应体系中同时检测多个靶标基因的拷贝数, 实现同时对多种致病菌的快速、准确定量检测。二重 ddPCR 一次只能测定两种菌, 一重

表 5 模拟染菌米粉样品的三重 ddPCR 定量测定结果

Table 5 The 3-plex ddPCR results of simulated contaminated rice noodles

	测定拷贝数/ (copies/ μ L)	50 μ L TE 中的拷贝数/ (copies/50 μ L TE)	对数值/(Copies/ 50 μ L TE)	菌落计数/ (CFU/mL)	加入菌落体积/mL	加入菌落数/CFU	对数值 (CFU)	RSD/%
Sal	63.4	1.6×10^8	8.20	3.0×10^8	1.0	3.0×10^8	8.48	3.36
Lm	48.3	1.2×10^8	8.08	3.6×10^8	0.29	1.0×10^8	8.02	0.75
Bc	62.3	1.6×10^8	8.20	2.0×10^7	1.6	3.2×10^7	7.51	8.78

注:Sal:沙门菌;Lm:单核细胞增生李斯特菌;Bc:蜡样芽孢杆菌

ddPCR 一次只能测定一种菌,而食品常常需要检测多个致病菌项目,三重 ddPCR 是通过一次扩增同时对三种致病菌进行定量检测,可以实现多个样品多个检测项目的同时完成。所以三重 ddPCR 不仅减少了 PCR 扩增次数和微滴检测次数,而且减少了较贵的试剂如 ddPCR Supermix 和实验材料如微滴检测板、检测油等材料的使用,即三重 ddPCR 优于一重 ddPCR 和二重 ddPCR,不仅节约时间,而且还降低了每一种菌的检测成本,大大提高检测效率,使 ddPCR 这种快速、准确的定量检测方法在基层检验机构中普及使用成为可能。

本研究建立的三重 ddPCR 检测方法,对沙门菌、蜡样芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特菌在检测线性范围内 r^2 均大于 0.999 且重复性较好,与单重 ddPCR 检测结果非常接近。同时,该检测方法对沙门菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌的最低检出限分别为 6、3 和 7 copies/20 μ L,与其他一重或二重 ddPCR 定量检测食源性致病菌的线性范围^[14]一致,说明三重 ddPCR 方法实现了多种菌同时检测仍然保持了方法的灵敏度。

查询 NCBI 数据库, *essC* 基因在单核细胞增生李斯特菌中也存在,但引物/探针特异性试验结果显示,使用蜡样芽孢杆菌 *essC* 基因的引物/探针不能扩增单核细胞增生李斯特菌,保证了定量的准确性。另外,使用蜡样芽孢杆菌 *essC* 基因的引物/探针采用 qPCR 扩增苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792) 和蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides* ATCC 10206),其 Ct 值分别为 36.25 和 37.72,表明所选择的引物/探针特异性较好。

染菌米粉样品测定的拷贝数与加入菌落平板计数结果有一定差异,可能是由于不同菌的细胞组成不同,使用同一种 DNA 提取方法时,不同菌的 DNA 提取效率也不相同,同时,也不排除样品基质的影响,另外,平板计数方法误差较大也可能是差异产生的原因之一。

因为 ddPCR 检测体系线性范围比化学分析法窄,为了保证标准曲线的准确性,本次研究采用 4 倍梯度稀释,实验结果有 6 个数据用于构建标准曲线,且其 r^2 均 ≥ 0.999 。

本次食品染菌米粉样品测定结果与法定平板计数结果偏差小于 9%,说明方法应用于即食食品检测可行。但米粉样品背景相对简单,其他食品如辣条、牛奶等因成分复杂可能对 DNA 提取或检测存在干扰, LV 等^[23]使用 ddPCR 法检验牛奶中的阪崎肠杆菌时,先使用免疫磁珠对样品中的特定微生物进行富集然后再提取 DNA,有效避免了食品基质对检测的影响,故在后续工作中可以参照该方法富集微生物后再提取 DNA,以增加方法的耐用性。

参考文献

- [1] World Health Organization. Food safety [DB/OL]. (2020-04-30) [2023-06-28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- [2] KIRK M D, PIRES S M, BLACK R E, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis[J]. PLoS Medicine, 2015, 12(12): e1001921.
- [3] 刘勋, 廖杉, 郑文, 等. 2010—2015 年郴州市 410 份即食食品中食源性致病菌监测分析[J]. 现代预防医学, 2018, 45(3): 423-426.
LIU X, LIAO S, ZHENG W, et al. Surveillance of foodborne pathogens contamination in 410 ready-to-eat food samples in Chenzhou, 2010-2015[J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(3): 423-426.
- [4] LIAN X L, WANG X R, LIU X, et al. oqxAB-Positive IncHI2 Plasmid pHXY0908 increase *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Strains Tolerance to Ciprofloxacin[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019(9): 242-246.
- [5] MALORNY B, PACCASSONI E, FACH P, et al. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7046-7052.
- [6] 柯振华. 餐饮食品中蜡样芽孢杆菌的实时荧光 PCR 检测方法研究[J]. 福建轻纺, 2020, 371(4): 19-23.
KE Z H. 餐饮食品中蜡样芽孢杆菌的实时荧光 pcr 检测方法研究[J]. The Light & Textile Industries of Fujian, 2020, 371(4): 19-23.
- [7] 张玲艳, 宋丽丽, 贾伟娟, 等. 蜡样芽孢杆菌检测方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1360-1372.
ZHANG L Y, SONG L L, JIA W J, et al. Research progress on detection methods of *Bacillus cereus* [J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1360-1372.
- [8] TRAUNŠEK U, TOPLAK N, JERŠEK B, et al. Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of

- Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(1): 40-46.
- [9] 周璐, 郑开伦, 黄琼, 等. 湿粉类制品蜡样芽胞杆菌污染风险及控制研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(2): 166-170.
ZHOU L, ZHENG K L, HUANG Q, et al. Research on the contamination and control measures of *Bacillus cereus* in wet rice products and starch products [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(2): 166-170.
- [10] 王丹丹, 刘鸣畅, 杨艳歌, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 276-285.
WANG D D, LIU M C, YANG YG, et al. Recent progress in technologies for rapid detection of foodborne pathogens [J]. Food Science, 2022, 43(3): 276-285.
- [11] GEORGE K N, FRANCISCO B. Digital PCR-Method and protocol [M]. CA, USA: Humana Press, 2018: 3-25.
- [12] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8604-8610.
- [13] 陈传君, 金鹭, 林华, 等. 食品中羊肉源性成分微滴数字PCR定量方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 229-237.
CHEN C J, JIN L, LIN H, et al. Quantification of mutton-derived ingredients in food by droplet digital PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(6): 229-237.
- [14] 赵丽青, 方佩佩, 唐静, 等. 数字PCR定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4133-4138.
ZHAO L Q, FANG P P, TANG J, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by droplet digital PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(11): 4133-4138.
- [15] 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 M M, XIAO J, LIN X M, 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.
- [16] UPADHYAY B P, UTRARACHKIJ F, THONGSHOUB J, et al. Detection of *Salmonella invA* gene in shrimp enrichment culture by polymerase chain reaction [J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2010, 41(2): 426-435.
- [17] YE H K S, CHEN T H, LIAO C W, et al. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(3): 227-234.
- [18] 王静, 秦燕, 张慧敏, 等. PMA结合ddPCR检测食品中沙门氏菌[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(10): 1059-1063.
WANG J, QIN Y, ZHANG H M, et al. Detection of *Salmonella* in food based on PMA-ddPCR [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(10): 1059-1063.
- [19] OMICCIOLI E, AMAGLIANI G, BRANDI G, et al. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk [J]. Food Microbiology, 2009, 26(6): 615-622.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法: SN/T 1870—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Method for the detection of pathogens in food for export—Real-time PCR method: SN/T 1870—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [21] PORCELLATO D, NARVHUS J, SKEIE S B. Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 127: 1-6.
- [22] MAZZARA M, SAVINI C, DELOBEL C, et al. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [M]. Ispra: Joint Research Centre, 2008.
- [23] LV X, WANG L, ZHANG J, et al. Quantitative detection of trace VBNC *Cronobacter sakazakii* by immunomagnetic separation in combination with PMAxx-ddPCR in dairy products [J]. Food Microbiology, 2021, 99: 103831.