

## 实验技术与方法

## 荧光 MIRA 法快速检测食品中产气荚膜梭菌

张士财<sup>1</sup>,丁卫平<sup>1</sup>,伊廷存<sup>2</sup>,张瑞<sup>1</sup>,朱富强<sup>1</sup>,崔俊凤<sup>1</sup>,霍胜楠<sup>2</sup>

(1. 滨州市检验检测中心,山东滨州 256600;2. 山东省食品药品检验研究院,山东济南 250101)

**摘要:**目的 基于荧光多酶恒温快速扩增(MIRA)技术,建立一种快速准确检测食品中产气荚膜梭菌的方法。方法 利用产气荚膜梭菌共有 $\alpha$ 毒素编码基因 $plc$ 保守序列设计引物探针,并建立和优化荧光 MIRA 方法;提取 17 种非目标菌基因组 DNA 进行方法特异性验证;梯度稀释目标菌基因组 DNA 和菌液用于方法灵敏度评价;选取 4 种食品进行基质干扰试验,评估方法的稳定性;检测实际样品并与国家标准方法进行比较,以验证该方法的实用性。结果 该方法特异性强,检测多种非目标致病菌均呈阴性反应;灵敏度高,以基因组 DNA 为模板和菌液为模板时最低检测限分别为  $1.05\times 10^1$  fg/ $\mu$ L 和  $7.5\times 10^0$  CFU/mL;该方法不受基质影响,抗干扰能力强;耗时短,约 20 min 即可完成检测。结论 本研究中的荧光 MIRA 方法快速准确、灵敏度高、特异性强,可用于食品中产气荚膜梭菌的快速检测。

**关键词:**多酶恒温快速扩增;产气荚膜梭菌; $plc$ 基因;分子检测;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)02-0139-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.02.005

Fluorescent MIRA assay for the rapid detection of *Clostridium perfringens* in foodZHANG Shicai<sup>1</sup>, DING Weiping<sup>1</sup>, YI Tingcun<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, ZHU Fuqiang<sup>1</sup>,  
CUI Junfeng<sup>1</sup>, HUO Shengnan<sup>2</sup>

(1. Binzhou Testing Center, Shandong Binzhou 256600, China;

2. Shandong Institute of Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250101, China)

**Abstract: Objective** To establish a rapid and accurate molecular method for detecting *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) in food using fluorescent multi-enzyme isothermal rapid amplification (MIRA). **Methods** Primers and probes based on the conserved sequence of the *C. perfringens* alpha toxin-coding gene  $plc$  were designed separately, and the fluorescence MIRA method was established and optimized. The genomic DNA of 17 non-*C. perfringens* strains were extracted for specificity verification, and the isolated DNA and bacterial solutions of different dilutions were used for sensitivity evaluation. Matrix interference testing with 4 types of food media was also performed to evaluate the stability of the method, and the actual sample detection results were compared with the standard method to verify its practicality. **Results** The fluorescent MIRA method for *C. perfringens* used in this study had high specificity. The results returned negative for other non-*C. perfringens* strains. MIRA also had high sensitivity, with detection limits of  $1.05\times 10^1$  fg/ $\mu$ L for genomic DNA and  $7.5\times 10^0$  CFU/mL for pure *C. perfringens* cultures. It also had a strong anti-interference ability; the detection results were not affected by the matrix, and the detection time was short (approximately 20 min). **Conclusion** This study developed a rapid, accurate, sensitive and specific fluorescent MIRA method for the molecular detection of *C. perfringens* in food.

**Key words:** Multi-enzyme isothermal rapid amplification; *Clostridium perfringens*;  $plc$  gene; molecular detection; foodborne pathogens

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)为革兰阳性厌氧杆菌,属于芽胞杆菌科梭状芽胞杆菌属,主要存在于土壤、污水、食物、粪便以及人类和动物

肠道内<sup>[1]</sup>。产气荚膜梭菌易感染肉、禽等高蛋白质的生食品,是引起食源性疾病的重要细菌性病因之一<sup>[2]</sup>,其芽胞具有极强的抗逆性,即使经烹制加热,

收稿日期:2023-07-05

基金项目:2021年度山东省市场监督管理局科研项目(202108)

作者简介:张士财 男 工程师 研究方向为食品微生物及分子生物学检测 E-mail:shiczhang@163.com

通信作者:丁卫平 男 高级工程师 研究方向为食品微生物及分子生物学检测 E-mail:46266430@qq.com

仍极易萌发芽胞形成大量的繁殖体随食物进入肠道中生长、繁殖并产生芽胞,同时释放毒素,引起中毒,严重危害人类身体健康。因此,快速准确检测食品中的产气荚膜梭菌具有极为重要的意义。产气荚膜梭菌致病因子主要是其分泌的外毒素,目前发现有20种,其中 $\alpha$ 毒素是引起人和动物气性坏疽食物中毒的主要致病因子<sup>[3-4]</sup>。 $\alpha$ 毒素是一种锌金属磷脂酶C,由 $plc$ (Phospholipase C)基因编码,所有类型菌株均携带 $plc$ 基因且会分泌该毒素<sup>[5-6]</sup>,因此,检测产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素编码基因更具有普遍性和代表意义。

目前对于产气荚膜梭菌检测手段应用最多的包括基于传统微生物学的生化鉴定、基于免疫学的酶联免疫吸附法、基于分子生物学的聚合酶链式反应、荧光定量PCR等<sup>[7]</sup>,这些检测手段往往在检测周期、检测特异性、人员环境要求、投入成本等方面存在不足或限制,不适用于即时检验,难以在畜禽养殖源头或农贸市场等基层检测实验室普及应用。恒温扩增技术由于扩增温度恒定且温度要求低、设备需求简单、扩增时间短等优点,成为近年来食源性致病菌快检技术研究的热点<sup>[8-10]</sup>。

多酶恒温快速扩增(Multi-enzyme isothermal rapid amplification, MIRA)是在重组酶介导核酸扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术上发展起来的一种新型恒温核酸扩增方法<sup>[11]</sup>。MIRA基于生物体重组修复机制,在体外利用重组酶、单链结合蛋白、DNA聚合酶等可以实现37~42℃条件下的核酸扩增<sup>[12-13]</sup>。荧光MIRA方法,则是在MIRA原理基础上通过在探针上添加荧光基团以实现实时观察的检测手段,其基本原理如图1所示。本研究建立了针对产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素编码基因的荧光MIRA检测方法,能够满足高效便捷的检测要求,适用于食品中产气荚膜梭菌的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与样品

本试验所用标准菌株:产气荚膜梭菌(ATCC13124)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC14028)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, ATCC17802)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC19115)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*, ATCC9027)、生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*, CMCC(B)64941)、溶血性链球菌(*Sreptococcs*

*Hemolytic- $\beta$* , CMCC(B)32210)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*, ATCC29544)、非O1霍乱弧菌(*Vibrio cholerae non O1*, VBO)均购自广东环凯微生物科技有限公司,产气荚膜梭菌(CICC24751, CICC25011)、双酶梭菌(*Clostridium bifermentans*, CICC22952)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*, CICC24854)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*, CICC22954)、巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*, CICC10391)均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,大肠埃希菌O157:H7/NM(*Escherichia coli* O157:H7, ATCC43888)由山东省食品药品检验研究院提供,产气荚膜梭菌(JI-CQJC230614-1, ZHU-CQJC230614-1, NIU-CQJC230614-1)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, JPJC221209)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*, KCJC230208)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*, THWT230317)均由本实验室分离保存且均通过16S rDNA测序鉴定。

所用食品样品购自于山东省滨州市本地农贸市场和超市,其中猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉各1份用于基质干扰试验;猪肉及其制品(包括生猪肉、猪肉丸、熟猪肉)、牛肉及其制品(包括生牛肉、牛肉丸、熟牛肉)、鸡肉及其制品(包括鸡腿肉、烧鸡、鸡肉丸)、鱼肉及其制品(包括鲜鱼、鱼丸、冻鱼)各10份用于真实样品检测。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

生化培养箱、冷冻离心机、超微量分光光度计(QuickDrop, 美谷分子仪器(上海)有限公司),荧光定量PCR仪(LightCycler 480 II, 瑞士罗氏)。

MIRA恒温快速扩增试剂盒(荧光型,由缓冲液A、缓冲液B、正对照模板、正对照引物探针Mix组成,潍坊安普未来生物科技有限公司);营养肉汤、胰酪亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(Tryptose-sulfite-cycloserine agar, TSC)、液体硫乙醇酸盐培养基(Fluid thioglycollate medium, FTG)、0.1%蛋白胨水均购自北京陆桥技术股份有限公司;微生物裂解缓冲液(Code No. 9164)、TaKaRa细菌基因组DNA提取试剂盒(Code No. 9763)均购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细菌培养

##### 1.2.1.1 增菌培养

产气荚膜梭菌、生孢梭菌等同源厌氧菌接种到无菌FTG培养基中,37℃培养20h;其他标准菌株和分离株接种至营养肉汤中,37℃增菌培养18~24h。

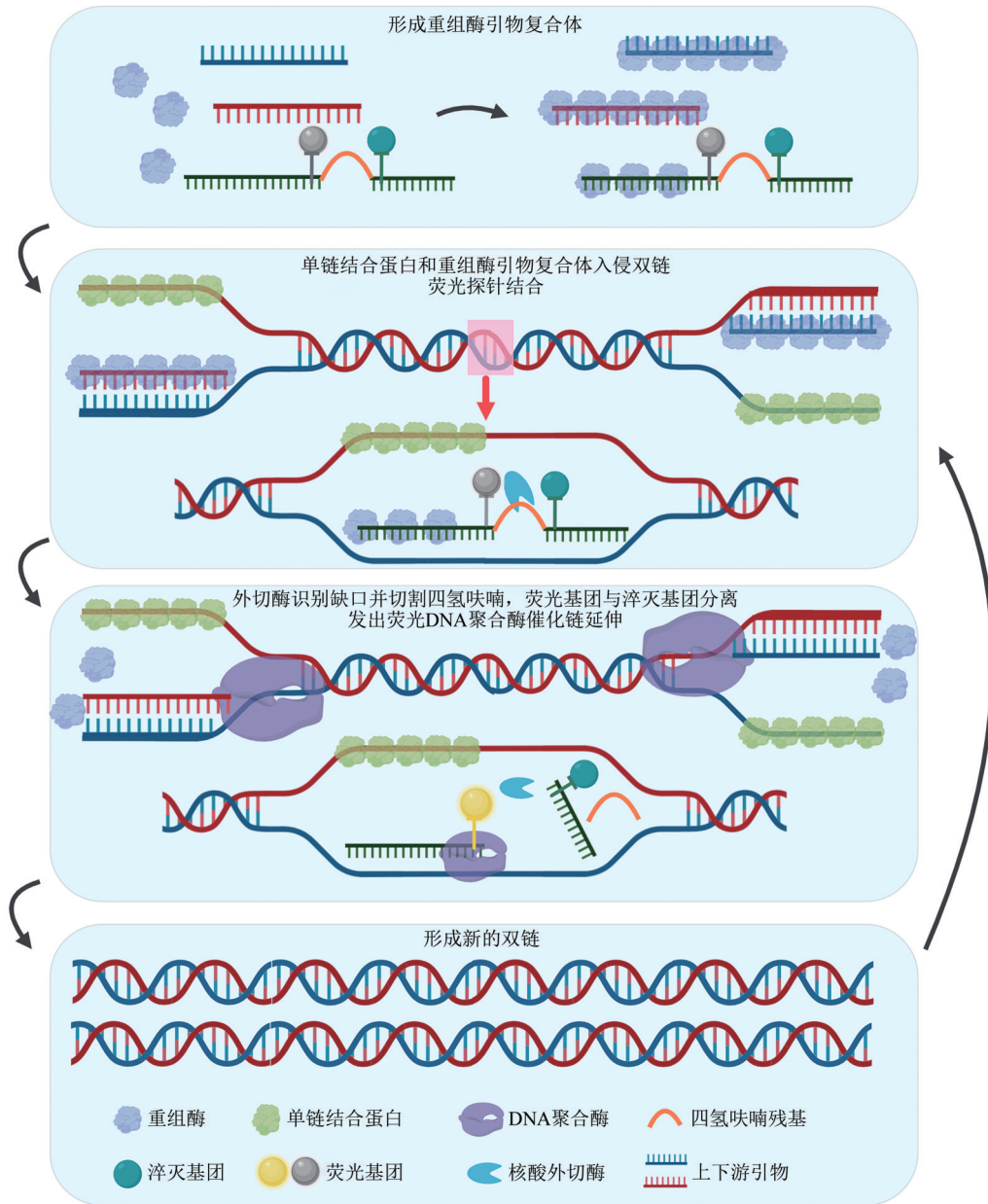


图 1 荧光 MIRA 基本原理

Figure 1 Schematic diagram of fluorescent MIRA

1. 2. 1. 2 平板计数培养

吸取 1 mL 菌液至无菌培养皿中, 倒入约 15 mL TSC 琼脂, 混匀, 凝固后, 上层继续倒入 10 mL TSC 琼脂, 待完全凝固, 正置放入厌氧培养装置中, 于 37 °C 培养 18~24 h, 计数。

1. 2. 2 细菌基因组 DNA 提取

柱式法: 按 TaKaRa 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取, 使用 QuickDrop 超微量分光光度计测定核酸质量浓度, 于 -20 °C 保存。用于基因组 DNA 为模板的方法灵敏度检测和特异性试验。

快捷法: 吸取 1 mL 菌液至 1.5 mL 无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min (离心半径为 8.6 cm), 去上清, 加入 50 μL 裂解缓冲液, 85 °C 水浴 10 min,

4 000 r/min 离心 1 min, 现提用。

1. 2. 3 引物与探针设计

为实现对产气荚膜梭菌的特异性检测, 从 NCBI 获取产气荚膜梭菌标准菌株 (ATCC13124) α 毒素编码基因 *plc* (GenBank: KY584046. 1) 在内的多个同源基因序列进行比对, 利用高度保守区域, 根据 MIRA 设计原则进行引物和探针设计, 并通过 BLAST 程序进行对比。引物探针均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物、探针序列如表 1 所示。

1. 2. 4 荧光 MIRA 方法的建立和优化

首先对引物和探针组合进行适用性测试, 根据恒温快速扩增试剂盒说明书, 按表 2 配置荧光 MIRA 反应体系, 设置扩增程序: 39 °C 1 min; 39 °C 40 个循



表1 荧光MIRA引物探针序列

Table 1 Sequence of primer and probe for fluorescent MIRA

基因	引物/探针名称	引物/探针序列	预扩增片段长度/bp
plc	plc-F	5'-TGACTCATAGTTGGGATGATTGGGATTATGCA-3'	209
	plc-R	5'-TCCAAAATACATGTCATCTGTTCCAGCA-3'	
	plc-P	5'-CTAACTCTCAAAAAGGAACAGCGGGATATAT[FAM-dT][T][THF][BHQ1-dT]AGATTCTTACCGAT-3'spacer	

表2 荧光MIRA反应体系

Table 2 Reaction system of fluorescent MIRA

组分	体积/ $\mu\text{L}$
缓冲液 A	29.4
引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0
引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0
荧光探针 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.6
模板	2.0
ddH <sub>2</sub> O	11.5
缓冲液 B	2.5
合计	50.0

环,每30 s采集1次荧光信号。由于探针添加量影响荧光信号强度,决定反应体系的灵敏度,故分别添加0.4、0.6、0.8、1.0、1.2  $\mu\text{L}$ 探针,同时以ddH<sub>2</sub>O为模板做阴性对照,检测荧光信号值,确定最优探针添加量。

### 1.2.5 荧光MIRA特异性试验

对“1.1.1”中6株产气荚膜梭菌和17株常见非产气荚膜梭菌食源性致病菌进行增菌培养,用柱式法提取基因组DNA,按照优化的荧光MIRA法配置反应体系进行检测,对该方法的特异性进行验证。

### 1.2.6 荧光MIRA灵敏度试验

基因组DNA模板灵敏度检测:将柱式法提取的产气荚膜梭菌基因组DNA依次进行10倍梯度稀释,分别取2  $\mu\text{L}$ 不同稀释度的基因组DNA为模板,进行灵敏度测试。

菌体灵敏度检测:将培养的产气荚膜梭菌菌液,用0.1%蛋白胨水进行10倍梯度稀释,制备 $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ 系列稀释液,分别从不同稀释度的菌液中吸取1.0~1.5 mL至无菌离心管中,按快提法提取细菌基因组DNA,用于配置反应体系,同时根据GB 4789.13—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》<sup>[14]</sup>方法进行菌落平板计数。

### 1.2.7 样品基质对检测灵敏度的影响试验

该方法直接检测对象为细菌DNA,用食品样品基质液稀释菌液,以探究食品样品中动物核酸及其他杂质对核酸提取和检测灵敏度的影响,用来评估该方法的稳定性。分别取经GB 4789.13—2012方法检测不含产气荚膜梭菌的牛肉、猪肉、鸡肉、鱼肉各1份,粉碎研磨,各称取25 g,加入225 mL 0.1%

蛋白胨水,均质,取基质液9 mL,添加1 mL“1.2.1”培养的产气荚膜梭菌纯菌液,混匀,分别用4种基质液进行10倍倍比稀释,每个稀释度取1 mL按快提法进行核酸提取,并按优化的荧光MIRA方法进行检测。

### 1.2.8 实际样品检测

取40份易被目标菌污染的食品样品,按“1.2.7”进行处理,均质后,吸取1.0~1.5 mL至无菌离心管中,快提法提取基因组DNA,按照荧光MIRA法和GB 4789.13—2012方法同时进行检测。

### 1.3 统计学分析

导出荧光定量PCR仪器运行数据,并通过OriginPro 2022软件进行处理。呈现类似“S”型扩增曲线且 $C_t \leq 35$ ,为阳性结果;无扩增曲线,且 $C_t \geq 40$ 或未检出,为阴性结果;如果 $35 < C_t < 40$ ,则复检1次,若仍为 $35 < C_t < 40$ ,则为阳性结果。

## 2 结果

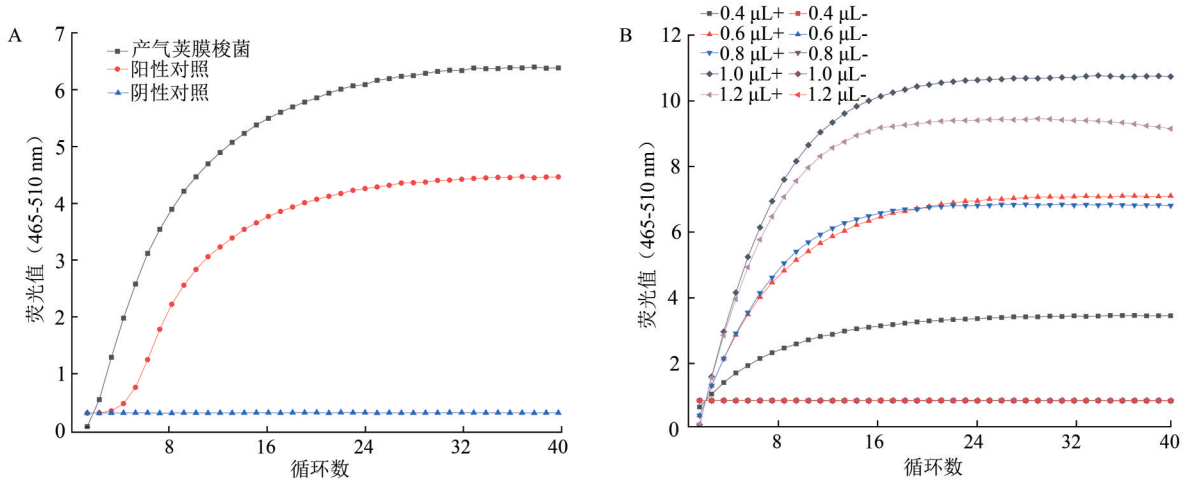
### 2.1 荧光MIRA方法的建立和优化

按试剂盒说明书对引物和探针进行初步测试,以目标菌基因组DNA为模板,在添加0.6  $\mu\text{L}$ 探针量的条件下,出现类似“S”型扩增曲线(图2A),表明该引物和探针组适用于产气荚膜梭菌靶基因片段扩增。

在表2基础上按不同探针添加量配置反应体系,进行检测,不同探针添加量均出现指数型扩增曲线,检测结果均为阳性(图2B)。随着探针量增加,荧光强度和探针量关系呈现 $1.0 > 1.2 > 0.8 = 0.6 > 0.4$ ,故选用1.0  $\mu\text{L}$ 为最佳探针添加量。综上,该方法最优反应体系为:缓冲液A 29.4  $\mu\text{L}$ 、引物各2  $\mu\text{L}$ 、探针1  $\mu\text{L}$ 、模板2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 11.1  $\mu\text{L}$ 、缓冲液B 2.5  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 特异性试验结果

分别以6株产气荚膜梭菌基因组DNA和其他17种细菌基因组DNA为模板,进行特异性试验。此方法对6株产气荚膜梭菌均检测阳性,对其他17种细菌均未检出。此结果表明建立的荧光MIRA方法对产气荚膜梭菌具有良好的特异性。



注:A为引物和探针初步测试结果,B为探针添加量的优化结果;+为基因组 DNA 作模板,-为 ddH<sub>2</sub>O 作模板

图2 荧光 MIRA 的建立和优化

Figure 2 Establishment and optimization of fluorescent MIRA

2.3 灵敏度试验结果

2.3.1 基因组 DNA 模板灵敏度试验结果

产气荚膜梭菌基因组 DNA 测定质量浓度为 10.5 ng/μL,将其进行 10 倍倍比稀释至 1.05×10<sup>6</sup>、1.05×10<sup>5</sup>、1.05×10<sup>4</sup>、1.05×10<sup>3</sup>、1.05×10<sup>2</sup>、1.05×10<sup>1</sup>、1.05×10<sup>0</sup> fg/μL,进行检测。结果表明,荧光 MIRA 方法对基因组 DNA 的最低检测限为 1.05×10<sup>1</sup> fg/μL (图 3A)。

2.3.2 菌体灵敏度试验结果

对产气荚膜梭菌菌液培养计数,根据 GB 4789.13—2012 菌落计数原则,计算原菌液菌落数为 7.5×10<sup>7</sup> CFU/mL,从不同稀释度菌悬液吸取 1 mL,按“1.2.2”和“1.2.4”进行检测。结果如图 3B 所示,当菌液浓度为 7.5×10<sup>-1</sup> CFU/mL 时,无扩增曲线,说明该方法对产气荚膜梭菌菌体的最低检测限为

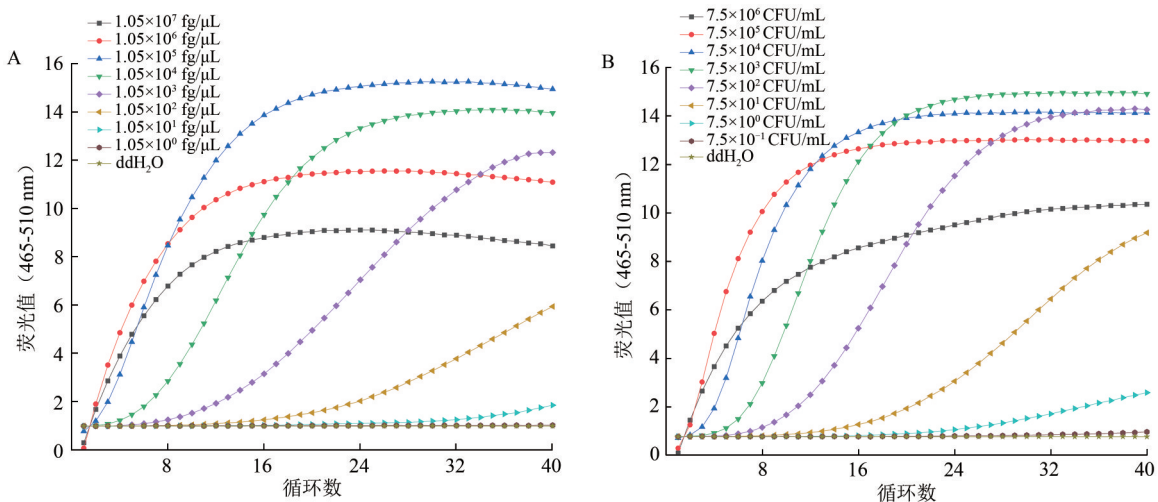
7.5×10<sup>0</sup> CFU/mL。

2.4 样品基质对检测灵敏度的影响试验结果

同时分别对 4 种基质液梯度稀释的菌液进行检测,结果显示,4 种基质液稀释菌液呈现典型“S”扩增曲线,且均在基质稀释菌液浓度为 7.5×10<sup>0</sup> CFU/mL 时检出阳性(图 4),基质液对检测灵敏度未产生影响,表明此方法具有较强的抗干扰能力和稳定性。

2.5 实际样品检测

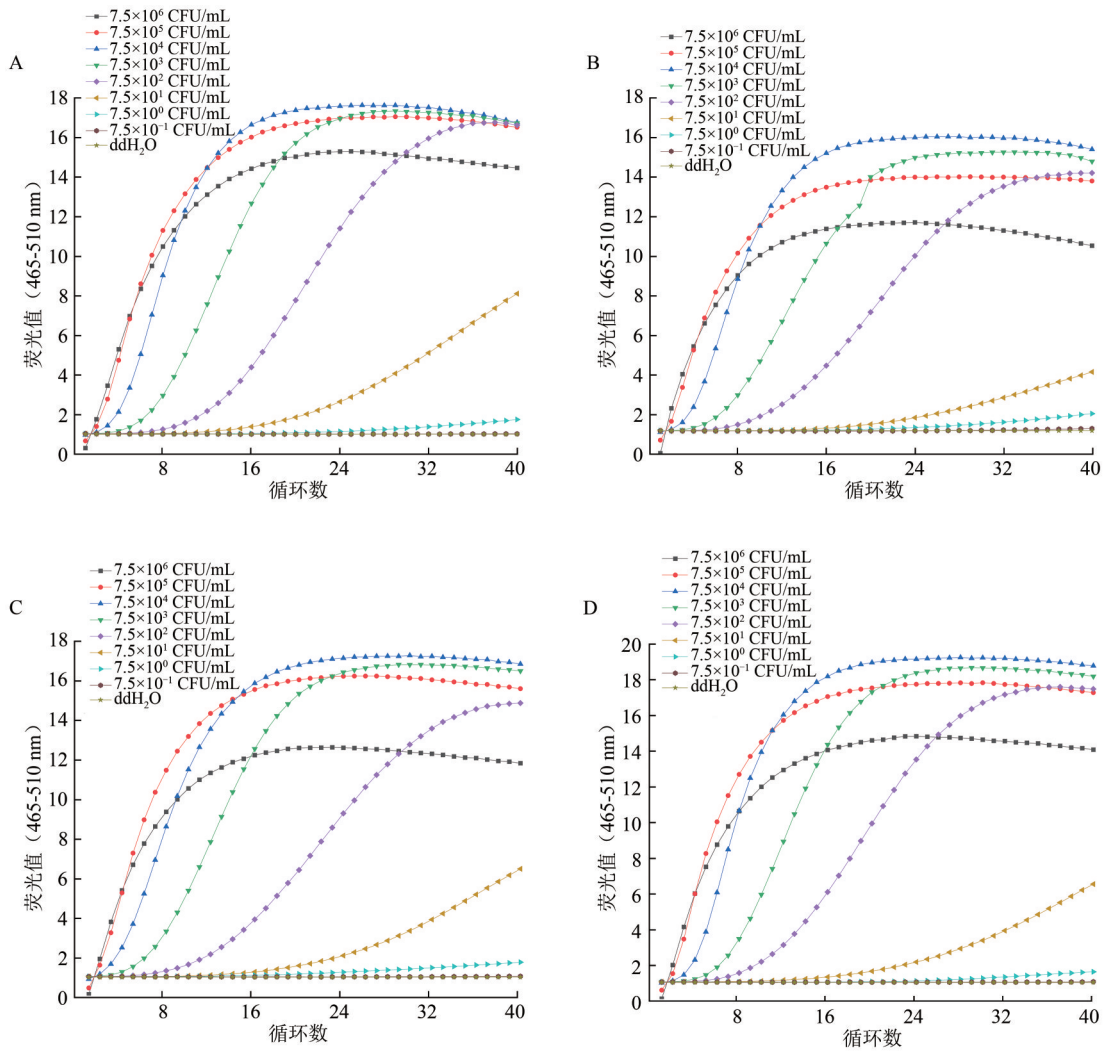
为验证荧光 MIRA 方法在实际食品样品中的检测效果,取 40 份食品样品,利用本研究建立的方法进行检测,并与 GB 4789.13—2012 方法进行比较。结果显示,荧光 MIRA 方法和国家标准方法检测结果一致(表 3),表明该方法适用于实际样品检测。



注:A为不同质量浓度基因组 DNA 检测结果;B为不同稀释度菌液检测结果

图3 荧光 MIRA 灵敏度试验

Figure 3 Sensitivity test of the fluorescent MIRA



注:A为鸡肉基质稀释菌液检测结果;B为牛肉基质稀释菌液检测结果;C为猪肉基质稀释菌液检测结果;D为鱼肉基质稀释菌液检测结果

图4 样品基质干扰试验

Figure 4 Sample matrix interference test

表3 实际样品检测结果

Table 3 Results of actual samples test

样品类型	检测份数	检出份数	
		荧光 MIRA 法	GB 4789.13—2012 法
鸡肉及其制品	10	1	1
牛肉及其制品	10	1	1
猪肉及其制品	10	1	1
鱼肉及其制品	10	0	0

### 3 讨论

当前,恒温扩增技术与荧光探针、胶体金试纸条、成簇规则间隔的短回文重复序列等技术联用建立的快速检测方法在多种食源性致病菌检测<sup>[15-17]</sup>、动物源性成分检测<sup>[11]</sup>,以及肺炎支原体检测<sup>[18]</sup>研究中应用较多,但对产气荚膜梭菌研究尚不够深入。

本研究建立的荧光 MIRA 方法在灵敏度方面优势明显。以基因组 DNA 为模板时最低检测限可以达到  $1.05 \times 10^1$  fg/ $\mu$ L,以菌液为模板时最低检测限为  $7.5 \times 10^0$  CFU/mL,而刘立兵等<sup>[9]</sup>建立的 RPA 方法基因组 DNA 最低检测限为  $1.3$  pg/ $\mu$ L,菌液最低

检测限为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL,董银苹等<sup>[19]</sup>建立的荧光 PCR 法鉴定产气荚膜梭菌的灵敏度为  $10^2$  CFU/g (mL),本方法相较于上述两种方法在菌体检测灵敏度上提高了十几倍,可大幅提高食品中产气荚膜梭菌的检测灵敏度。本试验中用到的核酸快提法全程在同一离心管中操作,相较于 DNA 试剂盒法,菌体丢失较少,对于提高检测灵敏度有一定作用。

食品基质复杂多样,极易对微生物等检测指标产生干扰<sup>[20]</sup>。产气荚膜梭菌检出率较高且危险性最大的食品主要是含蛋白质量高的肉制品,包含生肉、熟肉、鱼等<sup>[21]</sup>,故选取易被目标菌污染的高蛋白食品进行基质对检测灵敏度的影响试验,评估该方法的稳定性,试验结果表明该方法具有较强的抗干扰能力和稳定性。在真实食品样品检测方面,该方法与国家标准方法均检出 3 份相同阳性样品,两者检测结果一致,体现了该方法的实用性和准确性。然而,对于一些深加工食品,可能存在菌体受损或死亡情况,虽菌体不能增殖,但核酸极难降解,像



PCR、RPA、MIRA 等以核酸为靶标的方法由于无法区分死活菌体而可能出现假阳性的检测结果,这也是此类方法共有的不足之处,通过结合其他技术或手段克服此方面的不足将是下一步的研究重点。

本研究建立的荧光 MIRA 方法与核酸快提法结合,提高了检测灵敏度,同时缩短了整体检测时限。一方面,本方法与 RPA 方法相较于实时荧光 PCR 和 LAMP 方法在仪器运行时间上优势一致,约 20 min 即可得到检测结果,与王朋冲等<sup>[8]</sup>建立的 LAMP 法检测产气荚膜梭菌耗时 50 min 相比用时更短;另一方面,本方法通过与核酸快提法结合,减少了试剂盒核酸提取繁琐步骤,与王立平等<sup>[22]</sup>优化的免疫磁珠法相比操作步骤更简单,从核酸提取、体系配置至得到检测结果,整个过程只需约 40 min,整体检测时间更短。

核酸快提法作为一种粗提方法,提取的产物杂质多但耗时短,本研究通过将核酸快提法应用到菌体灵敏度验证试验、样品基质干扰试验和实际样品检测中,在保证检测灵敏度的同时缩短了整体检测时限,证明了核酸快提法与荧光 MIRA 快检法结合应用于产气荚膜梭菌检测的可行性,同时,本方法与李盛杰等<sup>[17]</sup>建立的 MIRA 结合试纸条检测霍乱弧菌相比,只需通过简单的恒温荧光扩增仪即可实时观察结果,避免了开盖交叉污染的风险,适合在即时检测领域应用。

当前,RPA 试剂受国外专利保护,试剂价格昂贵,MIRA 主要试剂组分均为国内自主研发生产,对核心蛋白和关键酶以及生产工艺体系进行了改造和优化,获取途径和价格也更加合理。本研究基于国产 MIRA 试剂设计具有更高灵敏度的引物探针组合,建立了食品中产气荚膜梭菌快速准确的分子检测方法,以期多种食源性致病菌的快速检测提供思路,同时为 MIRA 技术在即时检测领域的应用提供技术支持。

### 参考文献

- [ 1 ] MEHDIZADEH G I, NAVARRO M A, LI J H, et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens* [J]. Virulence, 2021, 12(1): 723-753.
- [ 2 ] 龚紫凤, 冶贵生. A 型产气荚膜梭菌致病机理的研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(7): 787-791.
- GONG Z F, YE G S. Progress on pathogenesis mechanism of the *Clostridium perfringens* type A [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(7): 787-791.
- [ 3 ] FREEDMAN J C, SHRESTHA A, MCCLANE B A. *Clostridium perfringens* enterotoxin: Action, genetics, and translational applications [J]. Toxins, 2016, 8(3): 73.
- [ 4 ] 杨文静, 张富友, 刘娜, 等. 禽产气荚膜梭菌研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2023, 40(3): 46-53.
- YANG W J, ZHANG F Y, LIU N, et al. Advances in the researches on poultry *Clostridium perfringens* [J]. China Animal Health Inspection, 2023, 40(3): 46-53.
- [ 5 ] LI J H, ADAMS V, BANNAM T L, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2013, 77(2): 208-233.
- [ 6 ] ROOD J I, ADAMS V, LACEY J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme [J]. Anaerobe, 2018, 53: 5-10.
- [ 7 ] 王柏森, 谷长勤, 佟建南. 产气荚膜梭菌检测方法研究进展 [J]. 当代畜牧, 2020, 10: 37-42.
- WANG B S, GU C Q, TONG J N. Research progress on detection methods of *Clostridium perfringens* [J]. Contemporary Animal Husbandry, 2020, 10: 37-42.
- [ 8 ] 王朋冲, 潘奕帆, 许大伟, 等. 环介导等温扩增技术检测产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(5): 953-959.
- WANG P C, PAN Y F, XU D W, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification for detection of  $\alpha$ -toxin of *Clostridium perfringens* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(5): 953-959.
- [ 9 ] 刘立兵, 李睿文, 陈志敏, 等. 产气荚膜梭菌实时荧光 PCR 和实时荧光 RPA 检测方法的建立和比较 [J]. 食品科学, 2020, 41(4): 268-272.
- LIU L B, LI R W, CHEN Z M, et al. Development and comparison of real-time polymerase chain reaction and real-time recombinase polymerase amplification assays for detection of *Clostridium perfringens* in food [J]. Food Science, 2020, 41(4): 268-272.
- [ 10 ] 秦爱, 刘明明, 邓方进, 等. 重组酶介导等温核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(10): 173-182.
- QIN A, LIU M M, DENG F J, et al. Application of recombinase aided amplification in the detection of foodborne pathogens [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(10): 173-182.
- [ 11 ] 尚柯, 张敏, 张彪, 等. MIRA-LFD 鉴别肉制品中鸭源性成分的方法研究 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 179-186.
- SHANG K, ZHANG M, ZHANG B, et al. Detection of duck-derived production using MIRA-LFD [J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 179-186.
- [ 12 ] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [ 13 ] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.
- GAO W F, ZHU P, HUANG H L. Recombinase polymerase amplification: A new DNA/RNA amplification strategy [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 32(6): 627-634.
- [ 14 ] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验: GB 4789.13—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

- Ministry of Health of the People's Republic of China. National Food Safety Standard Food microbiological examination *Clostridium perfringens*: GB 4789.13—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [15] 安柏霖, 苏璇, 郭悦, 等. 重组酶介导的等温扩增技术联合 CRISPR-Cas13a 快速检测 4 种腹泻病原菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(3): 381-389.
- AN B L, SU X, GUO Y, et al. Rapid detection of four diarrheal bacteria by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(3): 381-389.
- [16] 郭晨瑶, 梁莹, 胡同静, 等. 霍乱弧菌荧光 RAA 快速检测方法的建立和应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 23: 68-72.
- GUO C Y, LIANG Y, HU T J, et al. Establishment and application of rapid detection method of *Vibrio cholerae* by fluorescent RAA[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 23: 68-72.
- [17] 李盛杰, 江海涛, 吴雨龙. 基于 MIRA 技术的霍乱弧菌胶体金试纸条快速检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(24): 167-171.
- LI S J, JIANG H T, WU Y L. Establishment of rapid detection method of *Vibrio cholerae* colloidal gold test strip based on MIRA technology[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(24): 167-171.
- [18] 胡茜盼, 翁兴塘, 吕芷贤, 等. 多酶恒温扩增核酸试纸条法快速检测肺炎支原体方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3049-3057.
- HU X P, WENG X Y, LYU Z X, et al. Establishment and application of multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) nucleic acid test strip method for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3049-3057.
- [19] 董银苹, 李凤琴, 王美美, 等. 梭状芽胞杆菌鉴定用荧光 PCR 方法的建立[J]. 现代预防医学, 2018, 45(12): 2229-2232.
- DONG Y P, LI F Q, WANG M M, et al. The establishment of real-time quantitative PCR methods for the Clostridia identification [J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(12): 2229-2232.
- [20] AL-BAHRY S N, MAHMOUD I Y, AL-MUSHARAFI S K, et al. *Staphylococcus aureus* contamination during food preparation, processing and handling [J]. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 2014, 5(5): 388-392.
- [21] 任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 352-359.
- REN H R, LI M Y, ZHU Y D, et al. Recent progress in hazards and control of *Clostridium perfringens* in foods. Food Science, 2021, 42(7): 352-359.
- [22] 王立平, 王丹, 李赫婧, 等. 快速荧光 PCR 法检测包装饮用水中产气荚膜梭菌[J]. 食品科技, 2023, 48(7): 292-298.
- WANG L P, WANG D, LI H J, et al. Rapid and sensitive detection of *Clostridium Perfringens* in packaged drinking water by real-time fluorescent PCR [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(7): 292-298.