

SD-PMA-ddPCR 检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌

王静^{1*} 刘玉敏¹ 李春喜¹ 赵丽青² 秦燕¹ 张慧敏¹

(1. 威海出入境检验检疫局检验检疫技术中心 山东 威海 264205)

(2. 山东出入境检验检疫局 山东 青岛 266500)

摘要:【目的】检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌活菌。【方法】利用脱氧胆酸钠(SD)对受损细胞预处理,然后使叠氮溴化丙锭(PMA)进入受损细胞与DNA发生共价交联,提取细菌基因组DNA进行微滴式数字PCR(ddPCR)检测。【结果】0.1%SD和5.0mg/LPMA协同作用,可以有效抑制 10^8 CFU/mL的单核细胞增生李斯特氏菌死菌DNA的PCR扩增。经过SD和PMA对样品预处理,ddPCR可以在死菌存在条件下,定量检测鸡肉中单核细胞增生李斯特氏菌活菌,消除了“假阳性”结果的出现。活菌灵敏度检测结果显示:SD-PMA-ddPCR的灵敏度为2.0copies/20 μ L。SD-PMA-ddPCR方法精密度和稳定性良好。【结论】SD-PMA-ddPCR在检测食源性致病菌方面有巨大的发展空间。

关键词: 叠氮溴化丙锭, 脱氧胆酸钠, 微滴式数字PCR, 单核细胞增生李斯特氏菌

Detection of *Listeria monocytogenes* cells in food based on SD-PMA-ddPCR

WANG Jing^{1*} LIU Yu-Min¹ LI Chun-Xi¹ ZHAO Li-Qing² QIN Yan¹
ZHANG Hui-Min¹

(1. Weihai Entry-exit Inspection and Quarantine Inspection and Quarantine Technology Center, Weihai, Shandong 264205, China)

(2. Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266500, China)

Abstract: [Objective] A method to detect live *Listeria monocytogenes* cells was researched in the paper. [Methods] Propidium monoazide (PMA) permeated in the injured cells which were treated by sodium deoxycholate (SD), then PMA and DNA conducted covalent cross-linking reaction. Finally, bacterial genome DNA was extracted to detect by ddPCR. [Results] 0.1% SD and 5.0 mg/L PMA could inhibit the DNA PCR amplification of 10^8 CFU/mL dead *L. monocytogenes* cells. Only live *L. monocytogenes* cells were detected by SD-PMA-ddPCR even in the existence of dead *L. monocytogenes* cells in the chicken. The detection limit is 2.0 copies/20 μ L. SD-PMA-ddPCR

Foundation item: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of Science and Technology Plan Projects (No. 2014IK114)

*Corresponding author: Fax: 86-631-5978117; E-mail: 15705959793@163.com

Received: October 01, 2015; Accepted: May 09, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016
基金项目: 国家质检总局科技计划项目(No. 2014IK114)

*通讯作者: Fax: 86-631-5978117; E-mail: 15705959793@163.com

收稿日期: 2015-10-01; 接受日期: 2016-05-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

showed better accuracy and stability. **[Conclusion]** SD-PMA-ddPCR showed huge potential in foodborne pathogenic bacteria detection.

Keywords: Propidium monoazide, Sodium deoxycholate, ddPCR, *L. monocytogenes*

随着社会的发展和人们对健康的关注,食品安全已经成为影响广泛而深远的社会性问题。单核细胞增生李斯特氏菌是一种常见的食源性致病菌,生命力很强,人感染后可导致脑膜炎、胃肠炎、败血症等^[1-3],严重危害人们身体健康。因此,定量检测单核细胞增生李斯特氏菌引起各国的高度关注。

目前,检测单核细胞增生李斯特氏菌的方法有很多,比如实时荧光聚合酶链式反应^[4]、荧光染色^[5]、免疫学方法^[6]等,虽然这些方法相比于传统培养法有一些优势^[7-8],但是还存在一些无法克服的缺点,诸如操作繁琐费时、灵敏度低、不能真实反映样品的污染水平、出现“假阳性”的结果^[9-10]等。因此,开发快速、准确的定量检测单核细胞增生李斯特氏菌活菌的方法是非常有必要的。本研究将基于核酸共价交联技术从分子水平寻找细菌活的状态的标志物,建立活菌的检测方法。叠氮溴化丙锭(PMA)是一种能和 DNA 共价交联的荧光染料,光照可以使 PMA 的光敏基团转化为氮宾自由基,其可以和 DNA 发生共价交联,进而阻断 DNA 分子的 PCR 扩增,并且 PMA 只能选择性地渗透死菌的细胞膜,因此 PMA 被用于和 PCR 技术相结合定量检测活菌^[11-14]。但是有研究发现,PMA 不能完全有效抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增,可能一些受损细菌的细胞碎片阻止了 PMA 渗透进入细胞膜^[15]。Wang 等^[16]利用 0.1% SD 处理热灭活的细菌,SD 与膜蛋白作用,促进了 PMA 进入死菌细胞内,完全有效地抑制了死菌 DNA 的 PCR 扩增。

微滴式数字 PCR 系统(ddPCR)是近年来发展起来的核酸分子绝对定量检测技术,该方法在传统的 PCR 扩增前将含有核酸分子的反应体系进行微滴化处理,形成了成千上万个微滴,通过 PCR 扩增和荧光信号的积累读取阳性微滴数目,再通过泊松分布计算出样本的 DNA 分子数目^[17-19]。本文首次将 PMA 与 ddPCR 技术相结合,以单核细胞增生李斯

特氏菌为例,开发了高灵敏、高选择性的检测食源性致病菌的新方法。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与仪器

单核细胞增生李斯特氏菌 *L. monocytogenes* (ATCC 19115、ATCC 54009),购自美国 Microbiology 公司。

PMA (1 mg 美国 Biotium 公司) 溶解于 1.0 mL 20%的 DMSO 溶液,得到 1 g/L 储备液,于-20 °C 避光保存。G⁺细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京庄盟国际生物基因科技有限公司;脱氧胆酸钠,国药集团化学试剂有限公司;引物、探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;荧光定量 PCR 反应体系有关试剂,罗氏公司;微滴式数字 PCR 反应体系有关试剂,美国伯乐公司。

QX200 微滴式数字 PCR 系统,美国伯乐公司;7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 系统,美国应用生物系统公司;CF16RXII 高速冷冻离心机,日本日立公司;卤钨灯(500 W),上海飞利浦灯具有限公司。

1.2 培养基

胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE) (g/L): 胰酪胨 15.0,植物蛋白胨 5.0,氯化钠 5.0,酵母粉 6.5,琼脂 15.0,pH 7.3±0.2;营养肉汤(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉粉 3.0,氯化钠 5.0,葡萄糖 1.0,pH 7.5±0.2;科马嘉李斯特菌显色培养基(g/L):琼脂 15.0,蛋白胨 23.0,酵母粉 23.0,氯化钠 5.0,色素 8.5,增补剂 9.0,pH 7.0±0.5。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌培养:用接种环沾取甘油管保存的单核细胞增生李斯特氏菌(ATCC 19115)标准菌株菌液,在胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE)平板上划线,于 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落接种于营养肉汤液体培养基,37 °C 培养至对数生长期,置于 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液备用。

1.3.2 SD 协助条件下热灭活菌的制备:取 10^8 CFU/mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 80°C 水浴 10 min 后冷却至室温, 吸取 1 mL 热灭活菌液涂布于 3 个李斯特菌显色培养基平板, 37°C 培养 24 h 观察, 均未有菌落长出。用 0.1% SD 处理热灭活菌液, 37°C 温育 2 h。

1.3.3 最佳 PMA 浓度的选取:热灭活菌制备同 1.3.2, 分别加入 PMA 终浓度为 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0 mg/L, 混合体系振荡 5 s 后暗处孵育 15 min, 使 PMA 最大限度进入受损细胞内。将离心管置于 500 W 卤钨灯下 20 cm 处曝光 15 min (管口朝上, 置于冰上)。随后用试剂盒法提取基因组 DNA, 进行 PCR 检测。取 10^8 CFU/mL 单核细胞增生李斯特氏菌活菌菌液 500 μL 作为对照组, 处理同实验组。

1.3.4 最佳曝光时间的选取:热灭活菌制备同 1.3.2, 加入终浓度为 5.0 mg/L PMA 暗处孵育 15 min, 置于卤钨灯下方 20 cm 处, 分别曝光 0.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 min, 随后用试剂盒法提取基因组 DNA, 进行 PCR 检测。

1.3.5 细菌 DNA 提取及 qPCR 和 ddPCR 检测:本实验采取试剂盒法提取细菌基因组 DNA, 参考 SN/T 1870-2007 合成引物。上游引物为(23 bp): 5'-CTGAATCTCAAGCAAACGTGGT-3', 下游引物为(18 bp): 5'-CGCGACCGAAGCCAACCTA-3', 探针: 5'-FAMATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGGTAMRA-3'。

qPCR 反应体系(25 μL): 12.5 μL LightCycler[®] 480 Probes master; 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.5 μL ; 模板 DNA 2 μL ; 用 ddH₂O 补至 25 μL 。qPCR 反应条件为: 95°C 3 min; 94°C 5 s, 60°C 40 s (收集 FAM 荧光), 40 个循环。

ddPCR 反应体系(20 μL): 10.0 μL ddPCR[™] Supermix for probes (No dUTP); 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.5 μL ; 模板 DNA 4 μL ; 用 ddH₂O 补至 20 μL 。ddPCR 反应条件为: 95°C 5 min; 94°C 10 s; 60°C 45 s, 40 个循环;

98°C 10 min。

1.3.6 qPCR、PMA-ddPCR、SD-PMA-ddPCR 检测不同比例活菌的比较: 10^8 CFU/mL 的活菌和热灭活菌比例添加, 分别配制活菌比例为 100%、50%、25%、10%、0% 的菌悬液, 0.1% SD 处理后在优化条件下, 进行 qPCR、PMA-ddPCR、SD-PMA-ddPCR 检测。

1.3.7 PMA-qPCR、PMA-ddPCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度:将 10^6 CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌菌液 10 倍梯度稀释, 制得浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL 的菌液, 分别标记为 L6-L1, 进行 PMA-qPCR、PMA-ddPCR 检测。

1.3.8 人工污染样品及实际样品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测:取 25 g 新鲜鸡肉样品, 用均质器制成鸡肉匀浆, 加入 10^8 CFU/mL 死菌, 然后人工污染 10^1 – 10^6 CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌, 在优化条件下进行 SD-PMA-ddPCR 检测。

从超市、市场共采集实际样品 90 份, 其中肉类、乳制品、水产品各 30 份。分别采用食品安全国家标准^[20]中传统的分离培养方法、我国出入境检验检疫行业标准^[21]中规定的 qPCR 方法和本研究建立的 SD-PMA-ddPCR 对实际样品进行单核细胞增生李斯特氏菌检测。

2 结果与分析

2.1 实验原理

如图 1 所示, 把菌液离心, 重悬于生理盐水中, 用 SD 处理受损细菌进一步破坏受损细菌的细胞膜; 随后用 PMA 处理, PMA 穿过细胞膜进入死细胞与 DNA 共价交联, 阻止了 DNA 的扩增, 提取细菌基因组 DNA 进行 qPCR 和 ddPCR 检测, 实现了活菌的特异性检测。

2.2 SD 协助条件下, PMA 处理热损伤细菌的效果

如图 2 所示, 热损伤细菌经过 SD 和 PMA 处理之后, 其 C_t 值明显高于对照组, 说明 SD 可以进一步破坏死菌的细胞膜, 促进了 PMA 渗透进入死

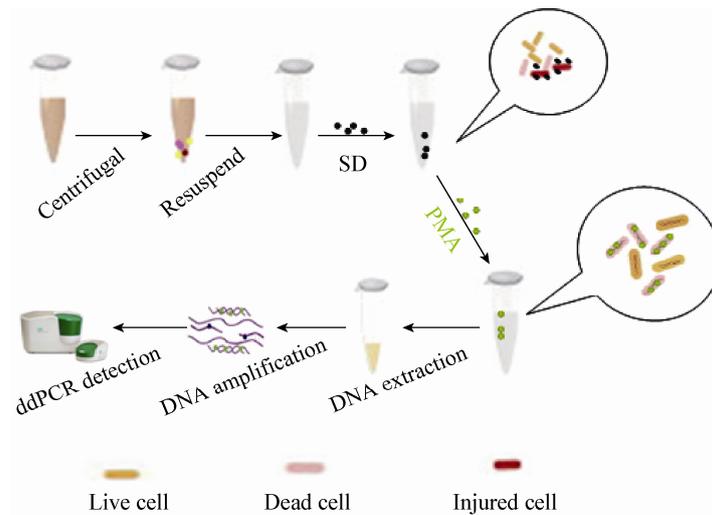


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌的检测原理示意图

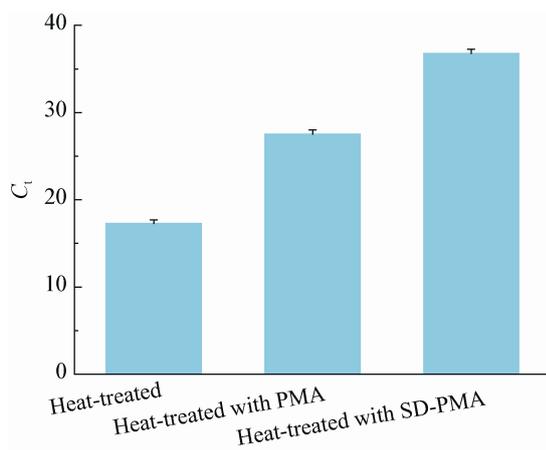
Figure 1 The principle of *L. monocytogenes* detection

图 2 SD 对 PMA 进入死菌细胞的影响

Figure 2 Effect of SD for PMA to enter dead cells

菌细胞膜,从而和 DNA 共价交联,阻止了 DNA 的 PCR 扩增。而且 Wang 等^[15]研究发现,0.1% SD 不会对活菌产生影响。

2.3 最佳 PMA 浓度的优化

如图 3 所示 随着 PMA 浓度的增大 死菌 DNA qPCR 扩增的 C_t 值明显升高,当 PMA 浓度超过 5.0 mg/L 时,反应体系的 C_t 值几乎不再发生变化。当 PMA 浓度为 10.0 mg/L 时,活菌 DNA qPCR 扩增的 C_t 值高于不加 PMA 的对照组,影响了活菌 DNA 的 qPCR 扩增。本研究选用 5.0 mg/L PMA 作为最佳浓度。

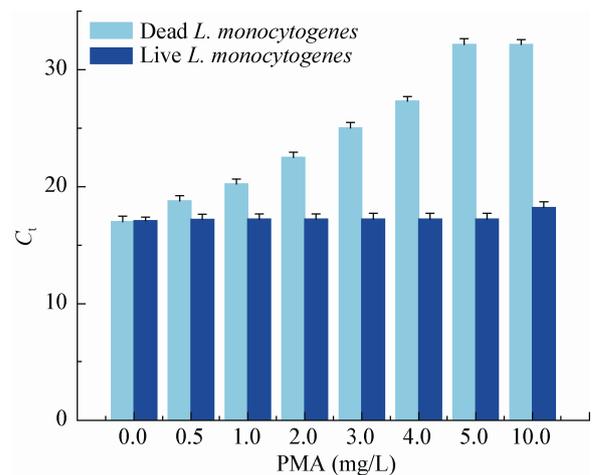


图 3 PMA 浓度对死、活菌 qPCR 的影响

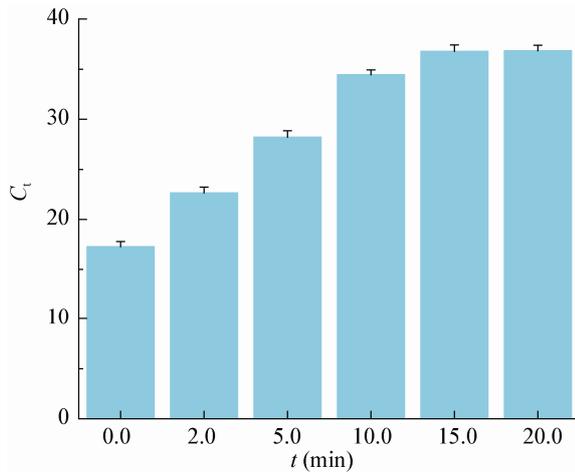
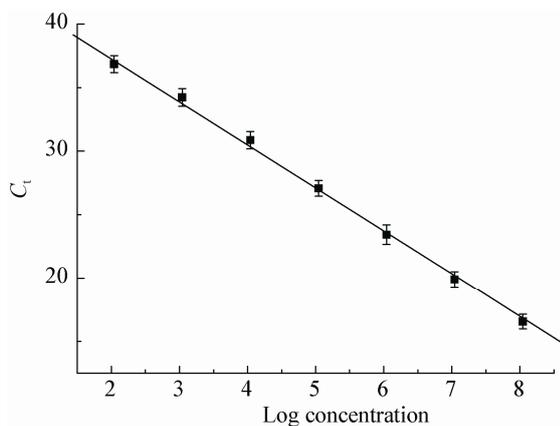
Figure 3 Effect of PMA concentration on qPCR of dead and live cells

2.4 最佳曝光时间的优化

如图 4 所示,随着光照时间的增加,体系的 C_t 值迅速升高,光照时间超过 15.0 min 后,体系的 C_t 值不发生明显变化,本研究选取 15.0 min 作为最佳光照时间。

2.5 qPCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌的标准曲线

如图 5 所示, C_t 值与单核细胞增生李斯特氏菌的浓度在 10²-10⁸ CFU/mL 范围内呈现良好的线性关系(R=0.998 5) y=44.01-3.38x 方程中 y 代表 DNA

图4 不同曝光时间对 C_t 值的影响Figure 4 Effect of different light exposure time on C_t图5 不同单核细胞增生李斯特氏菌浓度对 C_t 值的影响
Figure 5 Effect of different *L. monocytogenes* concentration on C_t

qPCR 扩增的 C_t 值, x 代表单核细胞增生李斯特氏菌浓度的对数值。

2.6 qPCR、PMA-ddPCR、SD-PMA-ddPCR 检测不同比例活菌的比较

将 1.6×10^8 CFU/mL 活菌、热灭活菌按照图 6 所示比例混合后, 进行 qPCR、PMA-ddPCR、SD-PMA-ddPCR 检测, 如图 6 所示, 不论活菌比例如何变化, qPCR 检测结果始终为死活菌的总量; 当活菌比例 0 时, 未经 SD 处理的菌液进行 PMA-ddPCR 检测, 依然可以检出阳性, 说明 5.0 mg/L PMA 单独作用下不能完全抑制 10^8 CFU/mL 死菌的 DNA 扩增; 随着活菌比例的增加, PMA-ddPCR 和

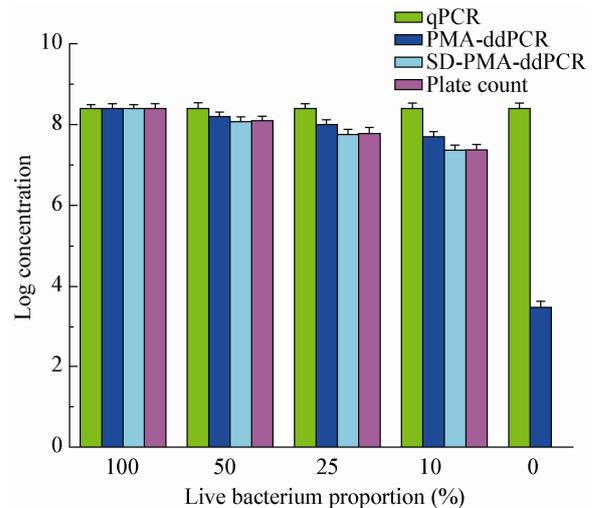


图6 qPCR、PMA-ddPCR、SD-PMA-ddPCR 对活、死菌混合液的检测

Figure 6 Detection of viable and dead cell mixtures by qPCR, PMA-ddPCR and SD-PMA-ddPCR

SD-PMA-ddPCR 检出结果也相应增加, 但是 SD-PMA-ddPCR 检出结果与样本值更加接近。

2.7 PMA-qPCR、PMA-ddPCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度

将 1.7×10^6 CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌菌液 10 倍梯度稀释, 分别标记为 L6-L1, 利用 0.1% SD 处理热灭活菌之后, 进行 PMA-ddPCR、PMA-qPCR 检测。PMA-ddPCR 所有反应生成的微滴数目均大于 10 000 (图 7A), 表明所有反应微滴生成正常, 保证了后续定量分析的准确性。从一维散点图(图 7B)上可以看出 L1 至 L6 生成的阳性微滴数分布, 阳性微滴数目随着浓度的升高而逐渐增多。此外, 阴性对照(NTC)中没有检测到阳性微滴, 可见该体系中并没有污染或非特异性扩增, PMA-ddPCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌有良好的特异性。PMA-ddPCR 灵敏度是 2.0 copies/20 μ L, 并在 $2-1.99 \times 10^4$ copies/20 μ L 呈良好的线性 ($R=0.999$ 1) (图 7C)。PMA-qPCR 最少可检出 10^2 CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌(图 7D), 将 L1-L6 测得 C_t 代入 2.5 标准曲线计算浓度值作图, PMA-qPCR 线性相关系数 $R=0.996$ 8。PMA-ddPCR 线性优于 PMA-qPCR。

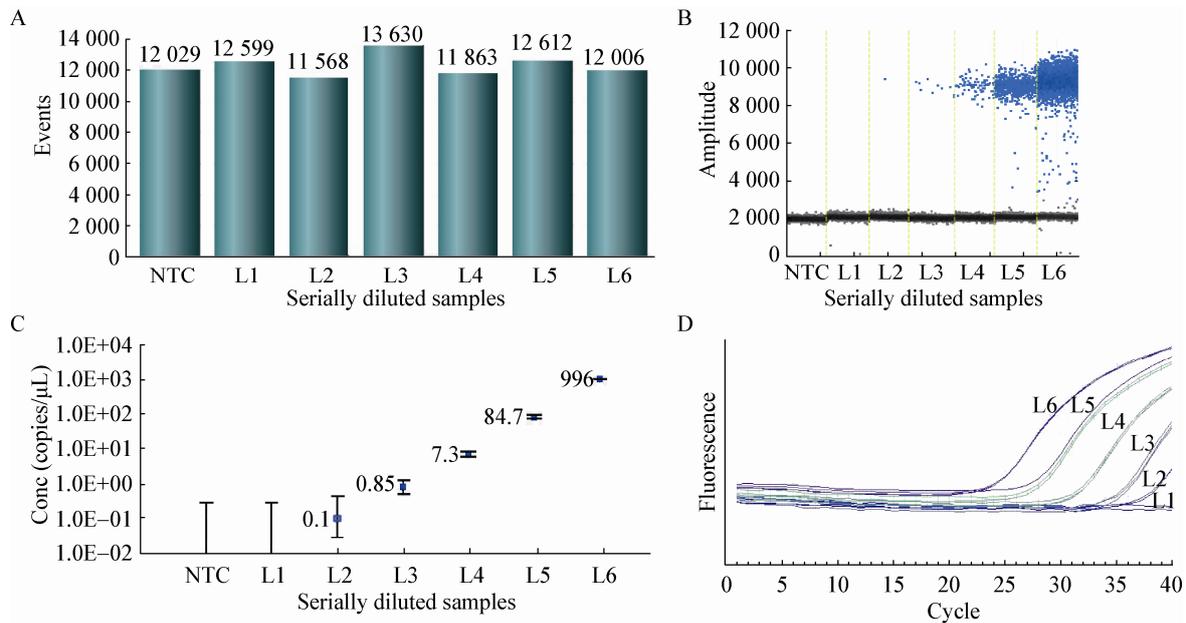


图7 PMA-ddPCR、PMA-qPCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度

Figure 7 The sensitivity of *L. monocytogenes* detected by PMA-ddPCR and PMA-qPCR

注：A：ddPCR 各样本生成的微滴数；B：ddPCR 一维散点图；C：ddPCR 反应体系(20 μ L)中目标基因浓度；D：PMA-qPCR 灵敏度。
 Note: A: The number of droplets generated by digital PCR; B: 1D scatterplot of ddPCR; C: Concentration of target genes in reaction system of ddPCR (20 μ L); D: Sensitivity of PMA-qPCR detection.

2.8 人工污染样品及实际样品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测

对 2 种单核细胞增生李斯特氏菌株、不同污染程度的鸡肉样品进行 SD-PMA-qPCR、SD-PMA-ddPCR 检测，如表 1 和表 2 所示，SD-PMA-ddPCR 检测人工染菌鸡肉样品，最低可检出 10^2 CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌，且与理论添加值基本吻合。当染菌量 $\leq 10^3$ CFU/mL 时，SD-PMA-qPCR 测得值与理论添加值偏差较大。

SD-PMA-ddPCR 检测低浓度染菌样品时优于 SD-PMA-qPCR。SD-PMA-ddPCR 对样品检测的 RSD 均小于 5.0%，精确度、稳定性良好。

从超市、市场共采集的实际样品检测结果如表 3 所示，有 4 份样品为单核细胞增生李斯特氏菌阳性，3 种方法检测结果一致。传统的分离培养方法对实际样品只能做到定性检测；qPCR 检测结果检测的为单核细胞增生李斯特氏菌死菌、活菌的总量，极易造成定量检测结果偏高；SD 和 pMA 可以

表 1 检测人工污染样本中单核细胞增生李斯特氏菌(ATCC 19115)
 Table 1 Detection of *L. monocytogenes* (ATCC 19115) in artificial pollution samples

理论添加量 The theory addition (CFU/mL)	理论添加取对数 Log concentration of theory addition	SD-PMA-qPCR 结果取对数 Log concentration of SD-PMA-qPCR	SD-PMA-ddPCR 结果取对数 Log concentration of SD-PMA-ddPCR	RSD (%)
1.7×10^1	1.23	-	-	-
1.7×10^2	2.23	1.09	2.29	4.19
1.7×10^3	3.23	2.00	3.15	3.84
1.7×10^4	4.23	4.08	4.17	3.61
1.7×10^5	5.23	5.11	5.14	3.47
1.7×10^6	6.23	6.56	6.17	3.22

表2 检测人工污染样本中单核细胞增生李斯特氏菌(ATCC 54009)
Table 2 Detection of *L. monocytogenes* (ATCC 54009) in artificial pollution samples

理论添加量 The theory addition (CFU/mL)	理论添加取对数 Log concentration of theory addition	SD-PMA-qPCR 结果取对数 Log concentration of SD-PMA-qPCR	SD-PMA-ddPCR 结果取对数 Log concentration of SD-PMA-ddPCR	RSD (%)
2.2×10^1	1.34	—	—	—
2.2×10^2	2.34	1.13	2.31	4.02
2.2×10^3	3.34	2.10	3.28	3.88
2.2×10^4	4.34	4.13	4.32	3.57
2.2×10^5	5.34	5.23	5.27	3.42
2.2×10^6	6.34	6.63	6.30	3.20

表3 检测实际样品中单核细胞增生李斯特氏菌
Table 3 Detection of samples polluted by *L. monocytogenes*

阳性样品 Positive samples	传统分离培养法 The traditional separation culture method	qPCR 结果取对数 Log concentration of qPCR	SD-PMA-ddPCR 结果取对数 Log concentration of SD-PMA-ddPCR	RSD (%)
1	Positive	6.86	3.22	3.82
2	Positive	6.13	3.00	4.01
3	Positive	5.35	2.06	3.14
4	Positive	4.18	2.01	3.51

有效抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增, SD-PMA-ddPCR 检测降低了“假阳性”出现的可能性。结合人工污染样品数据分析, SD-PMA-ddPCR 与样品实际污染水平更加接近。

3 结论与讨论

PMA 与 ddPCR 相结合的方法, 可以在死菌存在的条件下定量检测单核细胞增生李斯特氏菌活菌, 消除了“假阳性”结果的出现, SD 对样品预处理, 使得 PMA 更容易穿过死菌细胞膜。SD-PMA-ddPCR 方法简便快速, 成功检测鸡肉等样品中单核细胞增生李斯特氏菌的含量。与 SD-PMA-qPCR 方法相比, 具有灵敏度高、精密度高、检测低浓度染菌样品更精确等优点, Wang 等^[15]应用 SD-PMA-mPCR 方法在 10^7 CFU/mL 热灭活单核细胞增生李斯特氏菌存在的条件下, 定量检测牛肉等样品中的单核细胞增生李斯特氏菌。本方法把曝光时间增加了 3 倍, 应

用 SD-PMA-ddPCR 在 10^8 CFU/mL 热灭活单核细胞增生李斯特氏菌存在的条件下, 定量检测鸡肉样品中的单核细胞增生李斯特氏菌活菌, 说明曝光时间延长可以促进 PMA 与 DNA 共价交联。SD-PMA-ddPCR 方法具有巨大的发展空间, 有望应用于其他样品的检测。

参考文献

- [1] Li JH, Guo HQ, Gao XQ, et al. Immunomagnetic capture PCR for rapid detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science, 2015, 36(12): 226-229 (in Chinese)
李婧姮, 郭慧琴, 高晓强, 等. 免疫磁珠捕获 PCR 快速检测单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 226-229
- [2] Liu SH, Wei YB, Lin XJ, et al. Research advances on determination methods of single cells hyperplasia of *Listeria*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(19): 327-328 (in Chinese)
刘书花, 魏云波, 林小静, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(19): 327-328
- [3] Zhang JL, Yang LX. Single increase of *Listeria* food-borne pollution condition and testing methods[J]. The Journal of Medical Theory and Practice, 2012, 25(8): 910-911 (in Chinese)
张加林, 杨林娴. 单增李斯特菌的食源性污染状况及检测方法

- [J]. 医学理论与实践, 2012, 25(8): 910-911
- [4] Master CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77(1): 73-79
- [5] Ding JY, Han JZ. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in food and its determination method progress[J]. Food Research and Development, 2008, 29(12): 171-174 (in Chinese)
丁建英, 韩剑众. 食品中单增李斯特氏菌的存在现状及检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 171-174
- [6] Lin T, Liu ZZ, Yang XJ, et al. Research on VIDAS-GB assay to determine *Listeria monocytogenes* in aquatic products[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(4): 655-656 (in Chinese)
林涛, 刘真真, 杨雪娇, 等. 全自动荧光酶免疫分析仪-国标法检测水产品中单核细胞增生李斯特氏菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(4): 655-656
- [7] Aricind A, Bhagwat AA. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84(2): 217-224
- [8] Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* enteritidis in poultry meat and consumption eggs[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(2): 245-251
- [9] SEO KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE. Detection and enumeration of *Salmonella* enteritidis in homemade ice cream associated with outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(3): 639-643
- [10] Whyte P, Gill KM, Collins JD, et al. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 89(1): 53-60
- [11] Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, et al. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5111-5117
- [12] Cawthorn DM, Withuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1178-1185
- [13] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(2): 310-320
- [14] Forghani F, Langaee T, Eskandari M, et al. Rapid detection of viable *Bacillus cereus emetic* and enterotoxigenic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR)[J]. Food Control, 2015, 55: 151-157
- [15] Wang LJ, Ye CL, Xu HY, et al. Development of an SD-PMA-mPCR assay with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Staphylococcus aureus* in food products[J]. Food Control, 2015, 57: 314-320
- [16] Wang LJ, Li P, Zhang ZH, et al. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process[J]. Food Control, 2014, 36(1): 119-125
- [17] Morisset D, Štebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(5): 62583-62588
- [18] George D, Czech J, John B, et al. Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR[J]. Chimerism, 2013, 4(3): 102-108
- [19] Beck J, Bierau S, Balzer S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury[J]. Clinical Chemistry, 2013, 59(12): 1732-1741
- [20] GB 4789.30-2010, National food safety standard: Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2010 (in Chinese)
GB 4789.30-2010, 食品安全国家标准: 食品微生物学检验: 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010
- [21] SN/T 1870-2007, Detection of pathogens in food-Real-time PCR Method[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2007 (in Chinese)
SN/T 1870-2007, 食品中致病菌检测方法-实时 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007