

陈光哲,曾德新,周 昊,等. PMA 在副溶血性弧菌检测中的应用[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):162-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.039

PMA 在副溶血性弧菌检测中的应用

陈光哲¹, 曾德新², 周 昊¹, 谢青轩¹, 沈嘉敏¹

(1. 江苏省农业科学院中心实验室, 江苏南京 210014; 2. 南京海关检验检疫动植物与食品检测中心, 江苏南京 210019)

摘要:在我国,副溶血性弧菌被认为是海产品衍生疾病的主要因素,因此急需一种能快速、灵敏、特异、准确地检测食品中副溶血性弧菌的方法。传统培养法一直是检测的金标准,但是其检测周期较长;分子生物学方法如聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR(qPCR)、环介导等温扩增技术(LAMP)已被广泛用于食品中副溶血性弧菌的检测,但是这些方法不能区分死菌和活菌的 DNA,容易造成假阳性。而叠氮溴化丙锭(propidium monoazide,简称 PMA)等核酸染料的使用可以有效地消除这一弊端。研究者们将 PMA 处理与 PCR(qPCR)结合,应用于食品中多种食源性致病菌活菌的检测,但是关于 PMA 在副溶血性弧菌检测中应用的报道并不多见。因此,拟对 PMA 应用于食品中副溶血性弧菌检测的可行性进行分析,以便为进一步开展相关研究提供参考。

关键词:副溶血性弧菌;活菌检测;食源性病原菌;叠氮溴化丙锭(PMA)

中图分类号: TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0162-06

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP)是导致胃肠道感染的主要致病菌,广泛存在于海水、沉积物和各类海鲜(包括牡蛎、蛤蜊、扇贝、章鱼、虾、蟹、龙虾、克氏原螯虾和众多鱼类)中^[1]。VP 感染可引起腹泻、呕吐、腹部痉挛,在少数情况下可引起发烧^[2],但并不是所有的副溶血性弧菌都具有致病性。该菌的致病性与耐热直接溶血素(TDH)和耐热相关溶血素(TRH)相关,分别由 *tdh*、*trh* 基因编码^[3-5]。此外,VP 的主要毒力因子还有不耐热溶血毒素(TLH)。研究表明,TLH 是一种非典型的磷脂酶,能溶解人和马的红细胞,具有副溶血性弧菌种属的特异性。TDH 能在我妻氏血平板上引起 β -溶血(神奈川现象),具有致死毒性、心脏毒性、细胞毒性和肠毒素作用;TRH 虽然不能引起神奈川现象,但其与 TDH 有相似的免疫原性和 67% 的相同氨基酸序列,并同样具

有致死作用和细胞毒性。我国食源性疾病监测网站相关工作人员调查了其监测地区(16 个省)14 年间的 8 000 多起食物中毒案例,发现微生物性病原仍然是我国食源性疾病的主要病因(占 30%~40%)。近 10 年来,由交叉污染导致肉类食品或水产品(包括淡水鱼污染)而引起的副溶血性弧菌食物中毒已取代沙门氏菌,跃居第 1 位^[6]。因此,迫切需求一种快速、简便、准确、实用的检测方法对副溶血性弧菌进行实时监控。

用传统培养法检测食品中的副溶血性弧菌一般需要经历增菌、选择性平板培养、生化鉴定等过程,检测周期长达 5~7 d。而对副溶血性弧菌的定量检测,在对样品中的病原菌做定量分析后还需要对可疑菌落做定性验证,使得检测周期更长^[7-10]。分子生物学方法,如实时荧光定量 PCR(qPCR)具有快速、检测灵敏度高的优点,但是这类检测技术无法区分死菌和活菌,因为细菌 DNA 在菌体死亡后还能留存几天到几周。因此,使用该检测技术用于副溶血性弧菌的定性检测可能导致假阳性,若用于定量检测则无法得到准确的数据^[11-12]。

收稿日期:2018-10-19

作者简介:陈光哲(1965—),女,江苏南通人,副研究员,主要研究方向为食品农产品检测技术及方法。E-mail:13813841207@126.com。

[9] Saah S, Chanthachum S, Petcharat J. Effect of herb on insect growth in brown jasmine rice during storage[J]. Kasetsart Journal (Nature Science), 2008, 42: 144-149.

[10] 尉洪超, 杨志清. 12 种 PE 防虫薄膜对赤拟谷盗触杀效果的研究[J]. 内蒙古农业科技, 2014(6): 56-57.

[11] 欧阳建勋, 朱邦雄, 夏延斌, 等. 辣椒素粉剂防治书虱的效果[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(6): 690-693.

[12] 罗 磊, 张冰洁, 朱文学, 等. 响应面试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 13-19.

[13] Zheng Y, Li Y, Wang W D. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes orientalis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(20): 315-323.

[14] 李芬芳, 马艳弘, 赵密珍, 等. 草莓多酚的提取工艺优化及其抑

菌活性研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 155-158.

[15] 施 琰, 裴 斐, 周玲玉, 等. 响应面法优化紫菜藻红蛋白复合酶法提取工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 51-57.

[16] 甘 锋, 唐建忠, 王 轩, 等. 响应面法优化红曲霉固态发酵产 Monacolin K 工艺条件的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, 104(1): 131-136.

[17] 张红波, 高艳平, 周恩旭, 等. 响应面法对酶解法提取鲤鱼多肽工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 151-154.

[18] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂 辣椒油树脂: GB 28314—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[19] 刘营营. 辣椒素对中南地区储粮害虫的作用研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012: 11-26.

[20] 纪明山, 刘少武, 谷祖敏, 等. 辣椒碱对小菜蛾的驱避活性及其体内谷胱甘肽-S-转移酶和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2008, 51(10): 1039-1043.

叠氮溴化丙锭(PMA)是一种核酸染料,可用于 PCR (qPCR),有效排除死菌 DNA 的干扰,达到特异性检测活菌的效果^[12]。目前,众多学者已将 PMA 处理同 qPCR 结合应用于各种活菌检测,包括单增李斯特杆菌^[13]、大肠杆菌 O157:H7^[14]、弯曲菌^[15]、金黄色葡萄球菌^[16]、沙门氏菌^[17]等。然而,将上述方法用于副溶血性弧菌检测的研究尚不多见。因此,本研究仅探讨 PMA 在副溶血性弧菌检测中应用的必要性和可行性,以期副溶血性弧菌快速检测技术的研究提供新的思路。

1 副溶血性弧菌检测技术概述

1.1 传统培养法

GB 4789.7—2013《食品卫生学检验 副溶血性弧菌检验》中阐述了对副溶血性弧菌检测的传统培养方法。该方法包括增菌培养、选择性平板培养、生化鉴定、血清学反应等过程,整个过程耗时 5~7 d。传统培养法可以得到活的病原菌,为检测结果的判定提供了切实有力的证据,一直是食品检测的金标准。但是其耗时长,操作繁琐,给实际检测工作造成了诸多不便;在市场经济高速发展的今天,超长的检测周期也影响了食品贸易的发展;而传统培养法对检测人员的要求也相对较高,可疑菌落的挑选决定了检测结果的准确度,在实际检测中容易出现人为因素而导致的假阳性或假阴性。

1.2 分子生物学检测法

应用于副溶血性弧菌检测的分子生物学检测方法主要包括聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR(qPCR)、环介导等温扩增技术(LAMP)、变性高效液相色谱检测技术(DHPLC)、基因芯片技术等。PCR 技术有操作简单、成本低、用时短等特点,已被广泛用于副溶血性弧菌的检测^[6],但在灵敏度和多基因检测方面有一定的局限性。除普通 PCR 外,多重 PCR(MPCR)和巢式 PCR 也被广泛应用于副溶血性弧菌的检测中,它们在一定程度上优化了普通 PCR,在缩短检测时间的同时可增强 PCR 的灵敏度和特异性。qPCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过检测聚合酶链式反应中产生的荧光信号来实现对 VP 的定性或定量检测。与 PCR 相比,qPCR 不需要电泳确认,大大提高了检测效率,同时该方法在灵敏度、特异性、重复性等方面也更具有优势。qPCR 可分为染料法和探针法,其中探针法通过探针可以增强反应收集信号的特异性,只有探针结合的片段上发生扩增才能收集到信号,能够用多重体系反应的方法,能够预测和提前进行反应条件的优化,缺点是要合成探针,成本高;染料法经济实惠,可以作溶解曲线,分析全部 PCR 产物的 T_m 值,缺点就是特异性相对于探针法较差。LAMP 是在 PCR 的基础上发展起来的,相比于 PCR 方法,其操作流程更为简单,灵敏度更高,整个检测过程仅需 15~30 min,且结果也不需要电泳等途径判定,凭肉眼观察颜色即可^[18]。但是其颜色也经常介于阳性和阴性之间,会导致假阳性、假阴性或无法判断^[19]。DHPLC 常用于分子分型和流行病学研究,但也可用于致病菌的检测。Zhan 等利用 PCR-DHPLC 技术建立副溶血性弧菌特异基因检测平台,可以通过洗脱峰快速判断结果^[20]。该方法能有效避免 PCR 产物电泳检测的后污染,也使检测成本明显降低,具有简便快捷、高通量和自动化的特点,且其准确性和灵敏度高,

重复性好,特别适用于大样本量的快速检测。除了上述检测手段外,基因芯片技术也被应用于副溶血性弧菌的检测中。基因芯片可以同时高通量检测多株副溶血性弧菌的多个基因及基因表达、SNP 突变和缺失,具有很好的特异性和检测灵敏度,适用于副溶血性弧菌的系统化研究。目前,已有商品化的副溶血性弧菌基因芯片出售。但是基因芯片成本过高,需要特殊的设备,且检测流程复杂,并未得到广泛使用。

1.3 免疫学检测

目前,免疫学检测手段也被广泛应用于副溶血性弧菌的检测,免疫学检测主要是利用抗原-抗体特异性结合的方法鉴别病原菌,具有特异性强、操作简单、耗时短等优点。目前常见的用于副溶血性弧菌检测的免疫学手段有酶联免疫吸附技术(ELISA)、免疫胶体金技术和生物传感器技术。Zhong 等基于 IgY 建立了用于 VP 检测的夹心 ELISA 法,该方法的检测灵敏度达到 2.5 万 CFU/mL,耗时仅 4 h^[21];王报贵等研制了用于 VP 检测的胶体金试纸条,其检测灵敏度为 10^6 CFU/mL^[22];孔繁德等研发的 VP 胶体金试纸条的检测灵敏度可以达到 3.592 万 CFU/mL^[23]。目前,用于 VP 检测的商品化 ELISA 试剂盒及胶体金试纸条已被广泛用于检测机构中,与分子生物学方法相比,它们耗时更短,操作更加简单方便,但是其检测灵敏度却相对偏低。

除了上述常用的方法外,生物传感器技术^[24]、上转换发光免疫层析技术也可用于副溶血性弧菌的检测^[25],通过与分子生物学检测技术或免疫学检测技术结合,可进一步优化副溶血性弧菌的检测方法,可以在提高检测灵敏度、增强稳定性等方面发挥积极作用。

然而,值得注意的是,除了传统培养法外,上述检测方法均不能鉴别活菌和死菌。受死菌的干扰,分子生物学检测法和免疫学检测法容易产生假阳性而导致误判,特别是在定量检测中更无法提供真实的检测数据。

2 活菌检测技术

有效检测食品中的 VP 活菌是评估食品潜在危害并及时做好防控措施的关键和必要条件。除了传统培养法,有 2 种方法可以快速检测食品中的活菌。第 1 种是通过反转录(q)PCR 检测 mRNA 的方法^[26-27]。有研究表明,由于细菌的转录过程对细胞内外的 RNA 酶特别敏感,细菌的 mRNA 含量会在细菌死亡后急剧下降,因此 mRNA 的检测不同于基于 DNA 的检测,mRNA 仅可在活的且有活力的细胞中被检测到。基于这一理论,反转录定量 PCR(RT-PCR)已被应用于多种食源性致病菌的检测,包括肠出血性大肠杆菌、单增李斯特杆菌、沙门氏菌、弧菌属及弯曲菌属等^[28-36]。然而,这种检测方法需要表达目的基因,而基因的表达在外界影响下易发生改变。此外,RNA 在复杂的食品基质中容易降解。总的来说,使用反转录 PCR(qPCR)技术更适合基因表达研究,而不适合用于食源性病原菌检测系统^[37]。还有些研究指出,mRNA 会在细胞死亡后快速消失^[26],而其他研究者则表示,转录过程在细胞死亡后还会持续较长一段时间^[38-39]。第 2 种检测技术可称为活性 PCR(V-PCR)或活性 qPCR(V-qPCR),这种方法依赖于对完整细胞膜内 DNA 的检测。V-(q)PCR 技术,分为活性鉴别和(q)PCR 扩增 2 个步骤。

目前有 2 种物质常被用于活性鉴别阶段,即叠氮溴化乙锭(edthidium monoazide,简称 EMA)和叠氮溴化丙锭(propidium monoazide,简称 PMA),它们是 2 种对 DNA 具有高度亲和力的光敏 DNA 染料,会被完整的细菌细胞壁排斥,但是能进入受损的细胞壁或细胞膜^[40]。进入细胞后,当暴露在强光下时,由于有叠氮基团的存在,上述 2 种分子染料能与 DNA 偶联。强光的作用会形成高活性氮自由基,该自由基团能与其附近包括 DNA 在内的任何有机分子结合生成稳定的共价氮碳键,经过上述核酸染料修饰的 DNA 将无法进行后续 PCR 扩增。当 EMA/PMA 等核酸染料在强光作用下与 DNA 偶联结合的同时,强光也会促使多余的核酸染料与水分子结合而生成不具有活性的羟胺(hydroxylamine),因此,完整细胞内的 DNA 在此过程中不会受到核酸染料的影响^[41]。经过核酸染料处理后,后续的 PCR(qPCR)能特异地扩增细胞膜完整的即活菌内的 DNA,实现有效鉴别活菌的目的(图 1)。与 mRNA 检测相比,V-(q)PCR 更稳定,可操作性更强,受到众多学者的认可^[42-46]。

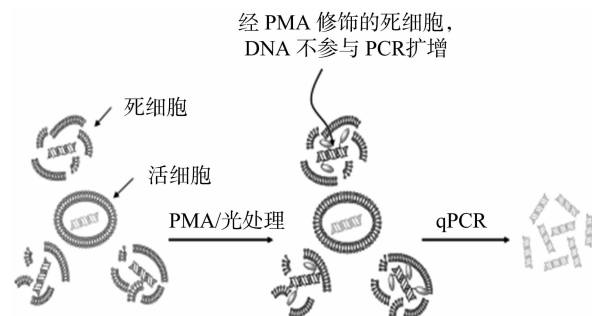


图1 PMA 染料选择性检测活菌的原理

3 PMA 与 EMA 的比较

PMA、EMA 具有几乎相同的排除死菌 DNA 干扰的功能,但是它们在穿透细胞膜方面有差异。有研究指出,由于化学成分的差异,EMA 在信号抑制方面的作用优于 PMA,而 PMA 在鉴别死菌-活菌方面的能力要强于 EMA^[46]。Nocker 等指出,PMA 的膜穿透力比 EMA 差,可能与它们携带的电荷数量有关,他们用 4 种革兰氏阳性菌和 4 种革兰氏阴性菌比较 EMA 和 PMA 的穿透能力,结果表明,EMA 对细胞膜的穿透能力比 PMA 强,但 EMA 对活菌 DNA 具有一定的破坏性^[40]。Cawthorn 等也指出,EMA 对活菌 DNA 有损害,他们采用与婴幼儿配方奶粉相关的阪崎肠杆菌作为研究对象,结果显示,当用 100、50、10 $\mu\text{g/mL}$ PMA 处理阪崎杆菌活菌时,总 DNA 的回收率分别为 95%、96%、97%,而用相同浓度的 EMA 处理时,总 DNA 的回收率则分别降低为 74%、82%、92%,当分别使用上述 3 种浓度的 PMA 或 EMA 作用于死菌(热灭活)时,总 DNA 的回收率均为 0%,从而充分证明了这 2 种核酸染料在排除死菌干扰方面的能力以及 EMA 的破坏力^[47]。此外,有研究者指出,EMA 在选择性扩增活菌 DNA 方面的能力不如 PMA,作为继 EMA 之后用于活菌检测研究的核酸染料,PMA 是一种有效的替代品,更受研究者青睐^[48]。

4 PMA 在副溶血性弧菌检测中的应用

将 PMA 处理同(q)PCR 结合用于活菌检测的技术已被

广泛应用于各种食源性致病菌,包括大肠杆菌 O157:H7^[49-51]、沙门氏菌^[52-53]、金黄色葡萄球菌^[11,45]、单增李斯特杆菌^[11,54]、弯曲菌^[15,55]等的检测。然而,PMA 在副溶血性弧菌活菌检测中的应用并不多见,仅有少数研究者作了相关报道。Zhu 等将 PMA 与 qPCR 结合,用于检测海鲜食品中副溶血性弧菌活菌,通过与传统培养法和 qPCR 法比较,表明 PMA-qPCR 在副溶血性弧菌活菌检测中更具有优势^[42]。在该试验设计中,研究者使用了 70 株不同来源的副溶血性弧菌和 120 份样品,充分证实了该方法的准确性和可行性;同时研究者也指出,他们构建的检测体系也存在一定的缺陷,对于活菌的有效检出,受到了菌液浓度的约束。

笔者所在实验室也对 PMA 在副溶血性弧菌活菌检测中的应用作了探索性研究,选择 *tdh* (GenBank 登录号:AY249144.1)作为目的基因,设计引物及探针如下:TDH-F:5'-TTGAGCTTCCATCTGTCCCTTTTCCTG-3';TDH-R:5'-TGACCGAGCTTGGGTATTA-3';TDH-P:5'-FAM-TTGCTGCATTCAAAACATC-TAMRA-3'。将 6.0×10^6 CFU/mL 菌液经 10 倍梯度稀释至 6.0×10^0 CFU/mL,经 Real-Time PCR 后,用 C_T 值与菌液浓度构建标准曲线,可获得其检测灵敏度达 6 CFU/mL(图 2)。为了验证 PMA 的功效,设计 4 个试验组,分别为活菌(PMA 处理)、死菌(PMA 处理)、活菌(未用 PMA 处理)、死菌(未用 PMA 处理),其菌液浓度均为 6.0×10^6 CFU/mL,其中死菌经煮沸灭活得到。对于未用 PMA 处理组,将其菌液提取 DNA(TIAGEN, TIANamp Bacteria DNA Kit, DP302)后用于 Real-Time PCR 扩增[TaKaRa, Premix Ex Taq(probe qPCR), RR390A],具体步骤严格按操作说明书执行。对于 PMA 处理组,菌液先经 PMA 处理,流程如下:在 1 mL 菌液中加入 PMA,使其终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,充分振荡混匀,于暗处静置 5 min,将菌液置于距 650 W 卤素灯 20 cm 处,强光照射 2 min,促使 PMA 与 DNA 交联^[49]。此后菌液同未处理组一样,经 DNA 提取纯化后用 Real-Time PCR 扩增,结果见图 3。可以看出,PMA 处理能有效鉴别副溶血性弧菌死菌和活菌,当菌液浓度高达 6.0×10^6 CFU/mL 时能充分抑制死菌 DNA 的 PCR 扩增,而对活菌无影响。

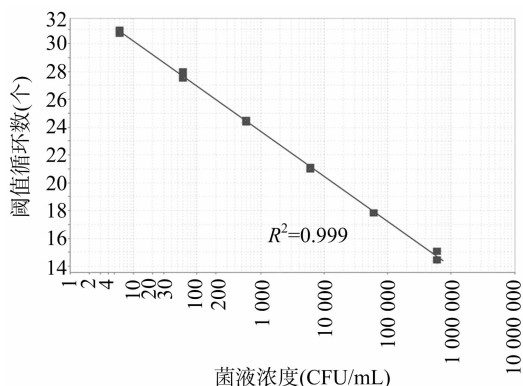
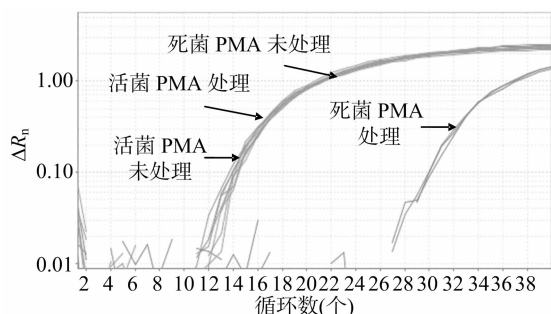


图2 Real-Time PCR 检测副溶血性弧菌灵敏度分析

显然,将 PMA 与(q)PCR 结合,对于实现副溶血性弧菌活菌的快速检测是切实可行的。鉴于食品中有害副溶血性弧菌检测及副溶血性弧菌定量检测的要求,将 PMA 应用于副溶血性弧菌的快速检测具有很好的应用前景,针对不同食品基质中副溶血性弧菌的检测也有待于学者们的进一步研究。



R_n 是荧光报告基因的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值, ΔR_n 为 R_n 扣除基线后得到的标准化结果

图3 PMA处理对活菌和死菌 Real-time PCR 扩增的影响

5 结论

副溶血性弧菌常见于水产品中^[56-57],用传统的培养法对食品中的副溶血性弧菌进行检测一般需要 4~5 d,涉及到定量检测则需要 7 d,其检测流程复杂,对检测人员要求较高,在可疑菌落挑选方面容易造成人为因素的假阳性或假阴性,此外,5~7 d 的检测周期,会极大影响水产品的品质,增加水产品的贸易成本,造成经济损失。鉴于传统培养法的弊端,迫切需要一种快速、灵敏度高、特异性强的食品中副溶血性弧菌的检测方法。分子生物学方法如 PCR、qPCR 及 LAMP 具有检测灵敏度高、特异性强和耗时短等优点,但是上述方法均不能区分活菌和死菌,用于食品中副溶血性弧菌的检测容易导致假阳性的结果。为了解决特异性检测活菌的难题,有研究者使用了反转录 PCR 检测 mRNA 的方法,然而由于 mRNA 提取难度大且易降解,该方法并未广泛使用。此外也有学者研究表明,mRNA 并不能代表活细胞,他们指出,RNA 的转录在细胞死亡后的一段时间内仍会进行。EMA/PMA 等核酸染料也被应用到食品中活菌的检测,并得到了众多学者的认可。近期,研究者们对将 EMA/PMA 与 PCR、qPCR 或 LAMP 等技术结合用于食品中活菌的检测做了广泛研究,该方法不仅被应用于活菌的定性检测,也被应用于活菌的定量检测,不仅适用于单一菌种的检测,也适用于多种致病菌的混合检测,不仅被应用于纯培养物的检测,也被应用到各种食品基质的检测。总的来说,这是一种检测食品中活菌切实有效的手段。值得注意的是,众多学者对 EMA/PMA 在 *E. coli* O157:H7、沙门氏菌 (*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等食源性致病菌活菌检测中的应用做了研究和报道,而对于副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 仅有少数报道,急需广大学者进一步探索。

PMA-qPCR 是目前使用较多的一种方法,具有快速、特异性强、灵敏度高和定量检测等优点;PCR 同生物染料结合也有较高的检测灵敏度,虽然不及 qPCR,但是该方法可以设计大片段的目的条带,可以避免紫外线 (UV) 灭活或其他原因造成的假阳性或假阴性结果;EMA/PMA-LAMP 法检测灵敏度不及 qPCR,但是其操作简单,适用于大量样本的处理。

EMA 和 PMA 同作为具有鉴别功能的核酸染料,对其优越性的比较也受到了广大学者的探讨。多数学者认为,EMA 在抑制死菌 DNA 参与 PCR 扩增的同时,也能穿透部分活菌的细胞膜并抑制其 DNA 扩增,从而对实际检测结果造成偏

差。PMA 比 EMA 更适合食品基质中活菌的快速检测。随着核酸染料在活菌检测技术中的成熟发展,EMA 也逐步被 PMA 替代。食品中副溶血性弧菌活菌快速检测技术的研究对 PMA 的选择也无可置疑。当然,也有学者指出,PMA 存在缺陷:PMA 处理时的强光照射会对菌体造成杀伤;当 PCR 或 qPCR 的目的片段过短时,易造成 PMA 与目的片段结合疏漏,从而导致 PMA 对死菌 DNA 的抑制不完全;菌液浓度过高或特殊的成团菌体形态会影响 PMA 的穿透力,从而影响 PMA 的处理效果^[16,40,42,52,54,58-61]。但是这些缺点并非不能解决,对于强光引起的高温杀伤,可以在 PMA 处理时用冰浴对菌液降温;对于小目的片段的影响,可以设计特异性强的引物或设计巢式 PCR;对于菌液浓度及特殊菌体形态的影响,可以通过稀释及滤膜过滤分解成团菌体。另外,对于浓度过低或复杂基质的情况,可以通过磁珠富集优化。此外,对于部分革兰氏阳性菌细胞膜成分复杂的情况,可以用 sodium lauroyl sarcosinate (月桂基硫酸乙酸钠)来增强 PMA 对死菌细胞膜的通透性。也有学者针对 PMA 处理工艺进行研究,他们研发的微流体装置能简单、快速地完成 PMA 标记^[62],为 PMA 用于食品病原性活菌的快速检测提供了新的动力。总之,PMA 在食品中副溶血性弧菌快速检测中的应用是切实可行的,也应受到广泛关注,丰富的水产品种类、不同的水质环境、定性或定量的不同要求以及上述 PMA 存在的弊端,都有待于广大学者的进一步研究。

参考文献:

- [1] Shen X S, Cai Y Q, Liu C C, et al. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136 (1): 129-132.
- [2] Lin Y T, Labbe R G, Shetty K. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid [J]. Food Sci Emerg, 2005, 6 (4): 453-458.
- [3] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct haemolysin and related haemolysins [J]. Rev Med Microbiol, 1993, 4 (2): 106-113.
- [4] Honda S, Goto I, Minematsu I, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infectious disease caused by Kanagawa phenomenon - negative O3:K6 originated from Maldives [J]. Kansenshoku Zasshi, 1987, 61 (9): 1070-1078.
- [5] Honda S, Goto I, Minematsu I, et al. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus* [J]. The Lancet, 1987, 29 (37): 331-332.
- [6] 郭钦, 陈会, 徐海堂, 等. 副溶血弧菌快速检测技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (24): 395-400.
- [7] Kim H J, Lee H J, Lee K H, et al. Simultaneous detection of pathogenic *Vibrio* species using multiplex real-time PCR [J]. Food Control, 2012, 23 (2): 491-498.
- [8] Garrido A, Chapela M J, Román B, et al. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples [J]. Food Control, 2013, 30 (1): 76-85.
- [9] Ma K, Deng Y, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of

- Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real - time PCR assay based on immunomagnetic separation [J]. *Food Control*, 2014, 42: 87 - 93.
- [10] Zhang Z H, Xiao L L, Lou Y, et al. Development of a multiplex real - time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp [J]. *Food Control*, 2015, 51: 31 - 36.
- [11] Martinon A, Cronin U P, Quealy J, et al. Swab sample preparation and viable real - time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces [J]. *Food Control*, 2012, 24(1/2): 86 - 94.
- [12] Nocker A, Sossa K E, Camper A K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(2): 252 - 260.
- [13] Pan Y, Breidt J. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real - time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(24): 8028 - 8031.
- [14] Elizaquível P, Sánchez G, Selma M V, et al. Application of propidium monoazide - qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7 in fresh - cut vegetable wash water [J]. *Food Microbiol*, 2012, 30(1): 316 - 320.
- [15] Josefsen M H, Löfström C, Hansen T B, et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real - time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 5097 - 5104.
- [16] Martinon A, Cronin U P, Wilkinson M G. Development of defined microbial population standards using fluorescence activated cell sorting for the absolute quantification of *S. aureus* using real - time PCR [J]. *Mol Biotechnol*, 2012, 50(1): 62 - 71.
- [17] Singh G, Vajpayee P, Bhatti S, et al. Determination of viable *Salmonellae* from potable and source water through PMA assisted qPCR [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 93(1): 121 - 127.
- [18] Letchumanan V, Chan K G, Lee L H. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(705): 1 - 13.
- [19] Malcolm T T H, Cheah Y K, Radzi C W J W M, et al. Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop - mediated isothermal amplification assay [J]. *Food Control*, 2015, 47: 664 - 671.
- [20] Zhan X W, Zheng Q Y, Fu J F, et al. A rapid multiplex PCR - DHPLC method of detection and identification of pathogenic bacteria in aquatic products [J]. *Journal of Food Safety*, 2015, 35(1): 50 - 58.
- [21] Zhong Q P, Dong Y Q, Wang L, et al. Development of IgY - based sandwich enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Information Tech and Agricultural Eng*, 2012, 134: 517 - 524.
- [22] 王报贵, 王广峰, 武晓丽, 等. 副溶血弧菌胶体金检测试纸条的改进 [J]. *食品工业科技*, 2014, 34(10): 57 - 61, 65.
- [23] 孔繁德, 刘 阳, 徐淑菲, 等. 免疫金层析技术快速检测副溶血弧菌方法的初步研究 [J]. *中国兽医科学*, 2012, 41(8): 819 - 824.
- [24] Teng J, Ye Y W, Yao L, et al. Rolling circle amplification based amperometric aptamer/immuno hybrid biosensor for ultrasensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(9): 3477 - 3485.
- [25] 李春风, 赵 勇, 王晓英, 等. 基于上转发光免疫层析技术的常见食源性致病菌快速检测方法研究与评价 [J]. *军事医学*, 2015(2): 128 - 132.
- [26] McIngvale S C, Elhanafi D, Drake M A. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga - toxin - producing *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 799 - 806.
- [27] Yaron S, Matthews K R. A reverse transcriptase - polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7: investigation of specific target genes [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(4): 633 - 640.
- [28] Klein P G, Juneja V K. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription - PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4441 - 4448.
- [29] Sheridan G E, Masters C I, Shallcross J A, et al. Detection of mRNA by reverse transcription PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1313 - 1318.
- [30] Szabo E A, Mackey B M. Detection of salmonella enteritidis by reverse transcription - polymerase chain reaction (PCR) [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 51(2/3): 113 - 122.
- [31] de Wet S C, Denman S E, Sly L, et al. An improved method for RNA extraction from carcass samples for detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 by reverse - transcriptase polymerase chain reaction [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(5): 399 - 404.
- [32] D'Souza D H, Critzer F J, Golden D A. Real - time reverse - transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of *Salmonella* using inv A primers [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6: 1097 - 1106.
- [33] Miller N D, Draughon F A, D'Souza D H. Real - time reverse - transcriptase - polymerase chain reaction for *Salmonella enterica* detection from jalapeno and serrano peppers [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(4): 367 - 373.
- [34] Techathuvanan C, Draughon F A, D'Souza D H. Real - time reverse transcriptase PCR for the rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* from pork [J]. *Food Prot*, 2010, 73(3): 507 - 514.
- [35] Kurakawa T, Kubota H, Tsuji H, et al. Development of a sensitive RNA - targeted reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction for detection of *Vibrio cholerae/mimicus*, *V. parahaemolyticus/alginolyticus* and *Campylobacter jejuni/coli* [J]. *Microbiol Immunol*, 2012, 56(1): 10 - 20.
- [36] Zhou M, Yang J, Zhou X, et al. Development of a sigDE - based real - time reverse - transcriptase PCR for the detection of viable *Salmonellae nterica* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(7): 537 - 544.
- [37] Postollec F, Falentin H, Pavan S A, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology [J].

- Food Microbiology, 2011, 28(5): 848–861.
- [38] Sung K, Hielt K L, Stern N J. Heat – treated *Campylobacter* and mRNA stability as determined by reverse transcriptase – polymerase chain reaction[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2005, 2(2): 130–137.
- [39] Xiao L L, Zhang L, Wang H H. Critical issues in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real – time reverse transcriptase PCR [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(3): 512–517.
- [40] Nocker A, Cheung C Y, Camper A K. 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.
- [41] Zi C, Zeng D X, Ling N, et al. An improved assay for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* cells by incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR[J]. BMC Microbiology, 2018, 18: 132.
- [42] Zhu R G, Li T P, Jia Y F, et al. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(3): 262–266.
- [43] Li H, Xin H, Li S F. Multiplex PMA – qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(24): 14249–14256.
- [44] Wu G P, Chen S H, Levin R E. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead cells of *Salmonella enterica* by real – time loop – mediated isothermal amplification [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 117: 41–48.
- [45] Zhang Z, Liu W, Xu H, et al. Propidium monoazide combined with real – time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(3): 1625–1633.
- [46] Soejima T, Minami J I, Xiao J Z, et al. Innovative use of platinum compounds to selectively detect live microorganisms by polymerase chain reaction [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(2): 301–310.
- [47] Cawthorn D M, Witthuhn R C. 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.
- [48] van Frankenhuyzen J K, Trevors J T, Lee H A, et al. Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(3): 263–272.
- [49] Li B, Chen J Q. Real – time PCR methodology for selective detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 cells by targeting Z3276 as a genetic marker [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(15): 5297–5304.
- [50] Liu Y R, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 in ground beef by propidium monoazide real – time PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 170: 48–54.
- [51] Dinu L D, Bach S. Detection of viable but non – culturable *Escherichia coli* O157 : H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays [J]. Food Control, 2013, 31(2): 268–273.
- [52] Li B, Chen J Q. 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: 273.
- [53] Barbau – Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, et al. Evaluation of viability – qPCR detection system on viable and dead *Salmonella serovar* Enteritidis [J]. Microbiol Methods, 2014, 103: 131–137.
- [54] Elizaquível P, Sánchez G, Aznar R. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157 : H7 in vegetables after inactivation by essential oils [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(2): 115–121.
- [55] Banihashemi A, Van Dyke M I, Huck P M. Long – amplicon propidium monoazide – PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella* [J]. Appl Microbiol, 2012, 113(4): 863–873.
- [56] 康昌源, 王庆奎, 王静波, 等. 肉桂醛脂质体对 3 种水产动物致病菌抑菌效果比较 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 176–178.
- [57] 吕孙建, 刘莉, 曹铮, 等. 一株中华鳖气单胞菌噬菌体的分离及功能鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(2): 108–111.
- [58] Zhang Z H, Liu H Q, Lou Y, et al. Quantifying viable *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* simultaneously in raw shrimp [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(15): 6451–6462.
- [59] Luo J F, Lin W T, Guo Y. Method to detect only viable cells in microbial ecology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(1): 377–384.
- [60] Schnetzinger F, Pan Y, Nocker A. Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false – positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2153–2162.
- [61] Pacholewicz E, Swart A, Lipman L J, et al. Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR [J]. Microbiol Methods, 2013, 95(1): 32–38.
- [62] Duarte – Guevara P, Duarte – Guevara C, Ornob A A. On – chip PMA labeling of foodborne pathogenic bacteria for viable qPCR and qLAMP detection [J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2016, 20(8): 114.