

TaqMan 多重实时定量 PCR 快速检测 3 种常见食源性病原菌

艾鹏飞, 王 珊, 高辉明, 王雁伟, 庞艳荣, 张 萌

(河北科技大学食品与生物学院 石家庄 050018)

摘要 建立一种可同时快速检测大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的多重实时定量 PCR(qPCR)方法。依据大肠杆菌 O157:H7 *tir* 基因、单增李斯特菌 *mpl* 基因和蜡样芽孢杆菌 *entFM* 基因的保守序列分别设计特异性引物和 TaqMan 探针,建立多重 qPCR 反应体系,进行灵敏度、特异性和稳定性试验,同步检测人工染菌牛奶样品中的病原菌并与国家标准方法作对比。结果表明,建立的多重 qPCR 方法灵敏度高,最低检出限为 12 CFU/mL;特异性强,只对 3 种目标菌进行 PCR 扩增;稳定性好,各重复性试验中 Ct 值的变异系数 <1%;所有受污染样品阳性检出率均为 100%,与国家标准方法检测结果一致,且检测周期缩短至 6 h。本研究建立的 TaqMan 多重 qPCR 方法能同时快速、准确地检测乳品中的大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌,为食品安全提供技术支持。

关键词 TaqMan 探针; 多重实时定量 PCR; 大肠杆菌 O157:H7; 单增李斯特菌; 蜡样芽孢杆菌

文章编号 1009-7848(2024)05-0373-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.031

近年来,随着食品工业的快速发展,食源性病原菌引发的中毒事件常有发生,极大地威胁着人们的身体健康。据统计,美国每年约 4 800 万人感染食源性疾病^[1]。相较于世界上其它国家,近几年在我国由食源性病原菌引发的食物中毒和发病人数最多^[2]。在食品生产实践中实时监控有害微生物以确保食品安全,对预防和控制食源性疾病事件的发生具有重要意义。

大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是常见的引起食物中毒或疾病感染的食源性病原菌^[3-8],已被列入《食品安全国家标准 食品微生物学检测》(GB 4789)中需要检测的有害微生物范畴。感染大肠杆菌 O157:H7 可引起血性肠炎、血性腹泻和溶血尿毒症综合征等疾病^[3-4],感染单增李斯特菌不仅引起消化系统症状,还会导致脑膜炎、心肌炎和败血症等疾病发生^[5-6]。感染蜡样芽孢杆菌常见的临床表现为呕吐型或腹泻型的消化系统中毒^[7-8]。在食品鲜食、加工和保藏过程中,如果能同时对这 3 种常见食源性病原菌进行科学、有效地检测,就可以以

时掌握食品受污染情况,评定食品是否安全。

传统的食源性病原菌检测方法主要为国标培养法和免疫学方法,而这些方法存在操作繁琐、检测周期长(5~7 d),易产生假阳性和灵敏度低等弊端^[9],无法满足当今食品加工业快速发展的需求。基于 TaqMan 探针的实时定量 PCR 方法具有剪性强、灵敏度高和快速高效等优点,被广泛应用于食源性病原菌的检测^[9-11]。本研究针对大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的特异性基因序列设计引物和探针,建立一种可同时检测上述 3 种病原菌的 TaqMan 多重实时定量 PCR 方法,以期提高这 3 种常见食源性病原菌的检测效率。

1 材料与方 法

1.1 菌株

本研究中涉及 20 种细菌,其中 3 种目标菌依次为:大肠杆菌 O157:H7 CICC21530、蜡样芽孢杆菌 CMCC63001、单增李斯特菌 CMCC54001,17 种非目标菌依次为:鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115、肠炎沙门氏菌 CICC10982、金黄色葡萄球菌 CMCC26003、副溶血性弧菌 CICC21617、表皮葡萄球菌 CMCC26069、福氏志贺氏菌 CMCC(B)26003、多黏类芽孢杆菌 CMCC63512、苏云金芽孢杆菌 ATCC51024、枯草芽孢杆菌 CICC10002、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、阪崎肠杆菌

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19227137D);河北省大中学生科技创新能力培育专项(22E50074D)

第一作者: 艾鹏飞,男,博士,教授

E-mail: apf2002@sina.com

ATCC51024、英诺克李斯特菌 ATCC 33090、伊氏李斯特菌 CICC 21663、结合分枝杆菌 ATCC 25177、空肠弯曲杆菌 ATCC 29428、巴氏醋杆菌 CICC23561、英诺克李斯特氏菌 ATCC330090。这些菌株分别购自中国医学菌种保藏中心、中国工业微生物菌种保藏中心和美国标准菌种收藏所。

1.2 仪器和试剂

7900 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 12GC 全自动核酸提取仪, 日本 PSS 公司; 5417R 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 营养肉汤、胰蛋白胨、琼脂等培养基组分、细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒等、荧光定量 PCR

反应体系中各种试剂, 天根生物技术(北京)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计 根据 GenBank 公布的大肠杆菌 O157:H7 毒素基因 *tir* (GenBank: NC_002695.2)、单增李斯特菌毒力岛基因 *mpl* (GenBank: NC_003210.1) 和蜡样芽孢杆菌肠毒素 FM 基因 *entFM* (GenBank: WP_089170826.1) 的保守序列设计引物和 TaqMan 探针, 经 BLAST 分析后, 委托上海生物工程技术有限公司合成, 引物和探针序列详见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物和探针序列

Table 1 Primers and probes for real-time quantitative PCR

靶基因	序列名称	碱基序列(5'—3')	碱基数/ bp	T _m 值/ ℃	扩增长度/ bp
<i>tir</i>	<i>tir</i> -F	GTATTTACTGGAGGCCGTGG	20	59.5	98
	<i>tir</i> -R	GGCTCTAACAGCTCCAGTATCC	22	59.4	
	<i>tir</i> -P	ROX-TGGTCACCGTTGCTTCAGATATCAC-BHQ II	25	66.5	
<i>mpl</i>	<i>mpl</i> -F	GTGGACGTAGAAACCGGC	18	59.1	97
	<i>mpl</i> -R	CCTTTACCAAGCGCTTGA	18	57.6	
	<i>mpl</i> -P	FAM-TTTCGAGGTAGAACGGGCTGATAC-BHQ I	25	67.3	
<i>entFM</i>	<i>entFM</i> -F	CAATCGCTGGTTTCGCTAGATC	22	59.5	94
	<i>entFM</i> -R	TAGTGAATGAATCCACTGCAGTC	23	58.4	
	<i>entFM</i> -P	HEX-GTTCACCATACAGAAGCTGCTGGTACAAC-BHQ I	28	64.7	

1.3.2 模板 DNA 制备 分别将 20 株菌接种到 LB 液体培养基, 37℃ 摇床培养过夜后, 取 1.5 mL 菌悬液移入离心管, 12 000 r/min 室温离心 5 min, 弃上清液, 沉淀涡旋后使用溶菌酶 37℃ 处理 1 h。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA, 溶解于双蒸水(ddH₂O)至质量浓度为 50 ng/μL, -20℃ 保存备用。

1.3.3 阳性模板验证 分别以 3 种靶标菌的基因组为模板, 采用设计的引物扩增目的基因片段。反应体系: 2×Premix Taq 反应液 12.5 μL; 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL; 模板 DNA 1 μL; 双蒸水补足至 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。产物检测: PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 分别将回收的条带连接到 pGM19-T 载体上, 导入感受态细胞 JM109 中, 37℃ 摇床培养

过夜, 依据蓝白斑筛选挑取阳性克隆, 移送生物公司 DNA 测序后, 进行序列验证。

1.3.4 反应体系优化 参照试剂盒说明书上的反应体系和扩增程序, 本试验设置多重 qPCR 反应体系 20 μL: 5×Super Real-time PCR PreMix 4 μL, 各模板 DNA 0.5 μL, 对 3 种目标菌株的引物和探针使用量进行筛选和优化。首先将 3 种目标菌株的引物和探针两两组合进行 qPCR 扩增, 确认彼此间不相互干扰, 再对 3 组引物和探针的使用量进行筛选, 以扩增曲线具有较低的 Ct 值和较高的荧光值为最优多重 qPCR 反应体系。多重 qPCR 扩增程序: 95℃ 变性 10 min; 95℃ 3 s、60℃ 30 s, 40 个循环。

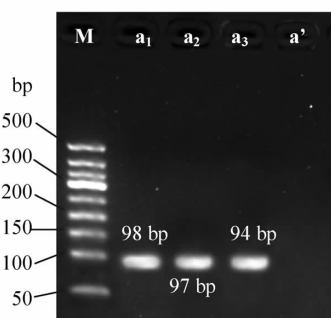
1.3.5 灵敏度评价 采用平板菌落计数法, 分别将原始浓度为 1.2×10⁷ CFU/mL 的 3 种目标菌液进行 10 倍梯度稀释, 从每个稀释梯度中取 2 mL, 按

照 1.3.2 节方法提取 DNA 溶解于 50 μL ddH₂O 中, 采用本试验建立的 qPCR 反应体系进行敏感性试验, 以确定 qPCR 检测 3 株目标菌的灵敏度。为了维持 qPCR 反应体系中模板 DNA 浓度与各稀释梯度时一致, 提取的 DNA 溶于 ddH₂O 的体积 (50 μL) 是按照菌液量 (2 mL) \times 模板 DNA 添加量 (0.5 μL) / qPCR 总体积 (20 μL) 计算得来。

1.3.6 特异性试验 以 3 种靶标菌和 17 种非靶标菌的 DNA 为模板, 构建多重 qPCR 反应体系: 5 \times Super Real-time PCR PreMix 10 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 靶基因 *tir* 上、下游引物各 1 μL , 15 $\mu\text{mol/L}$ 靶基因 *mpl* 和 *entFM* 上、下游引物分别各为 1 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针分别各为 1 μL ; 各模板 DNA 1 μL ; 2 \times ROX (参比荧光剂) 1 μL ; 双蒸水补足至 50 μL 。qPCR 扩增参照 1.3.4 节优化后的方法进行。qPCR 扩增曲线指数期明显、Ct 值 < 35 的判定为阳性^[12]。

1.3.7 重复性试验 分别取 3 种目标菌不同浓度的菌液提取模板 DNA, 进行重复性扩增试验, 检测多重荧光 qPCR 扩增体系的稳定性。

1.3.8 模拟样品检测 分别将 10⁷ CFU/mL 的 3 种目标菌液各 1 mL 添加到 5 mL 牛奶中作为一个样品, 混匀后 10 倍梯度的双蒸水稀释, 根据平板计数选取 3 个浓度梯度, 以未添加菌液的样品 (5 mL 牛奶添加 3 mL 无菌水, 经检测无菌) 为阴性对照, 按照 1.3.2 节方法制备模板 DNA 进行 qPCR 扩增。同时按照《食品安全国家标准 食品微生物学检测》(GB 4789) 进行常规培养法检测, 以评价 qPCR 检测的准确性。



注: M 为 50 bp Marker, a₁~a₃ 依次为大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌, a' 为 ddH₂O。

图 1 阳性模板 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 Electrophoresis profiles of PCR amplifications for target-DNA templates

2 结果与分析

2.1 阳性模板检测

分别使用 3 株目标菌的引物进行普通 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖电泳的结果见图 1。采用 DNA 纯化回收试剂盒对目的片段进行回收后, 构建重组质粒进行克隆, 提取阳性克隆质粒移送上海生物工程技术服务有限公司进行测序。结果表明, 扩增片段与 GenBank 数据库中核苷酸序列完全一致, 说明本研究中设计的特异性引物和探针是准确可靠的。

2.2 多重 qPCR 反应体系优化

通过试验比较和体系优化, 筛选出的最佳多重 qPCR 反应体系 (20 μL) 见表 2。在此反应体系下, 3 种目标菌的多重 qPCR 扩增结果如图 2 所示, 3 组引物探针之间没有产生干扰和非特异性扩增, 各自的特异性扩增曲线指数期增长明显, Ct 值都小于 35, 靶标基因扩增的荧光信号强。

2.3 标准曲线建立及灵敏度测试

分别将 3 种目标菌 10 倍梯度稀释后, 提取不同稀释梯度的 DNA 为模板进行 qPCR 扩增以确定检测的灵敏度。扩增结果见图 3, 在不同的梯度浓度时, 3 种病原菌都表现出有效扩增 (Ct 值 < 35), 扩增曲线指数上升期明显。以菌液浓度对数为横坐标和其对应的 Ct 值为纵坐标建立的标准曲线如图 4 所示, 3 个靶标基因扩增的 Ct 值与菌液浓度对数之间线性关系良好, 相关系数 R^2 分别为 0.993, 0.999, 0.998, 扩增效率分别为 93.42%, 101.22%, 94.47%。理想的 qPCR 扩增体系要求相

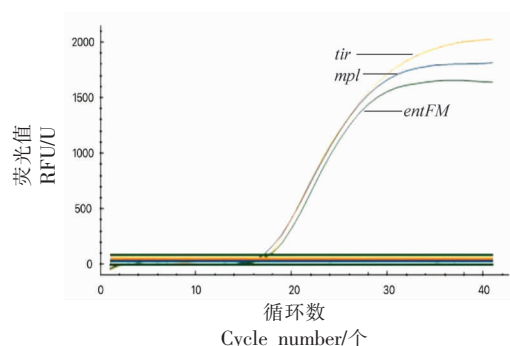


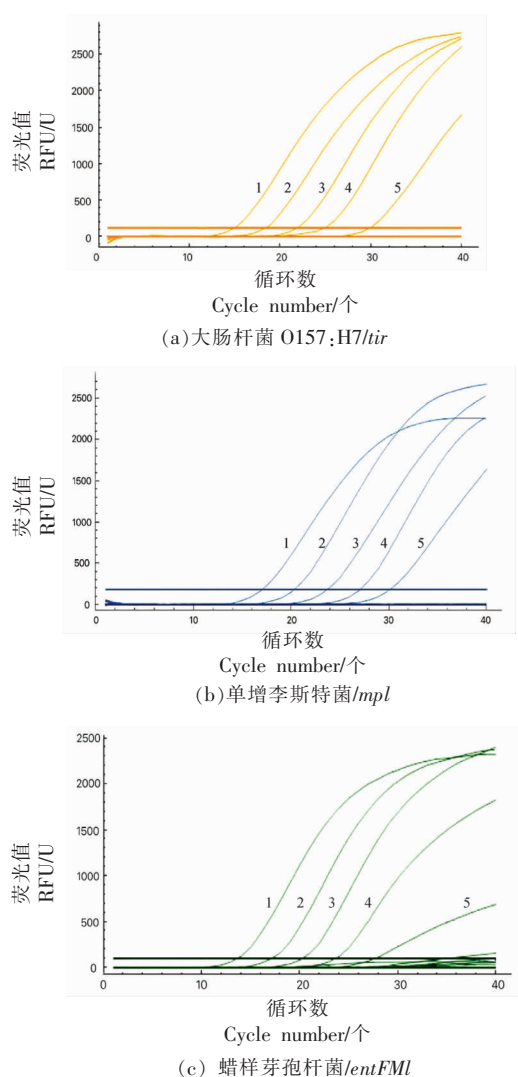
图 2 多重 qPCR 扩增结果

Fig.2 Amplifying curves of multiplex qPCR

表2 多重 qPCR 反应体系优化结果

Table 2 Optimized multiplex qPCR reaction system

体系组分	目标菌株(靶标基因)		
	大肠杆菌 O157:H7/ μL	单增李斯特菌/ μL	蜡样芽孢杆菌/ μL
5×Probe qPCR Mix		4.0	
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.4	0.6	0.6
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.4	0.6	0.6
10 $\mu\text{mol/L}$ 探针	0.4	0.4	0.4
50 ng/ μL DNA 模板	0.5	0.5	0.5
ddH ₂ O		10.1	



注:1~5 的菌液浓度依次为 1.2×10^5 , 1.2×10^4 , 1.2×10^3 , 1.2×10^2 , 1.2×10^1 CFU/mL。

图3 qPCR 灵敏度测试

Fig.3 Sensitivity testing of qPCR amplification

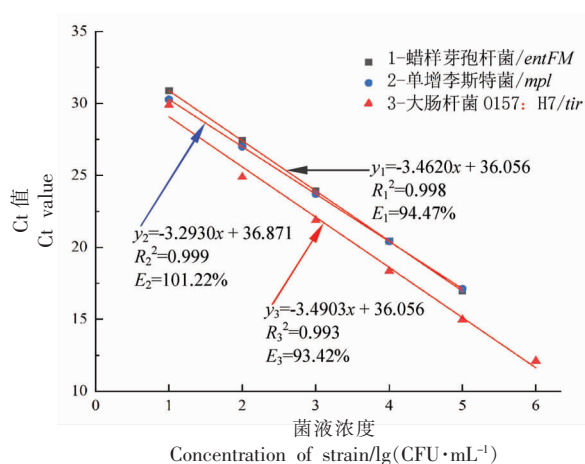


图4 qPCR 标准曲线

Fig.4 Standard curves of qPCR amplification

关系数 R^2 大于 0.99, 扩增效率在 90% 至 105% 范围^[13]。本研究优化的 qPCR 扩增体系的 R^2 值和扩增效率均在上述的理想范围, 表明设计的引物和探针序列匹配良好, 扩增体系优化。综上所述, 可将 12 CFU/mL 作为多重 qPCR 体系的最低检出限。

2.4 多重 qPCR 特异性检测

采用目标病原菌的特异性靶标基因保守序列设计引物和探针组合进行多重 qPCR 试验, 结果如图 5 所示, 只显示出 3 种目标菌的靶标基因 *tir*、*mpl*、*entFM* 的荧光扩增曲线, 而其它 17 种非目标菌都没有产生有效的扩增信号 (指数上升期明显的扩增曲线), 说明本研究中的 3 组引物探针具有良好的特异性, 适用于大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的多重 qPCR 检测。

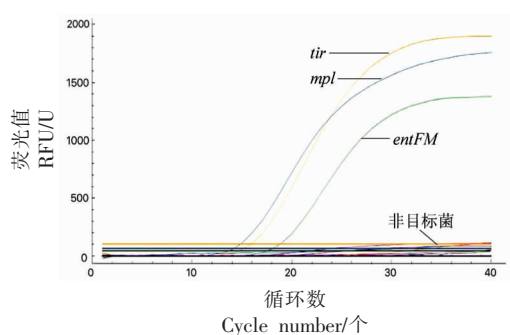


图 5 多重 qPCR 特异性测试

Fig.5 Specificity testing of multiplex qPCR

2.5 多重 qPCR 重复性试验

分别提取 3 种目标菌株 10^5 , 10^4 , 10^3 CFU/mL 的 DNA 为模板进行扩增试验,重复 3 次的结果统计学分析见表 3,不同浓度的大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌多重 qPCR 重复性试验的 Ct 值变异系数都在 0.19%至 0.79%之间。刘继超等^[14]将 Ct 值变异系数 < 3% 作为 qPCR 重复性好的标准。本研究建立的多重 qPCR 反应体系中的 Ct 值变异系数均 < 1%, 显示出良好的重复稳定性。

表 3 多重 qPCR 重复性测试

Table 3 Repeatability testing of Multiplex qPCR

菌株	菌液浓度/ CFU·mL ⁻¹	Ct 值			平均值	变异系数/%
		试验 1	试验 2	试验 3		
大肠杆菌 O157:H7	10^5	15.12	15.11	15.21	15.12	0.37
	10^4	18.51	18.45	18.57	18.51	0.32
	10^3	21.83	21.91	21.79	21.84	0.28
单增李斯特菌	10^5	17.26	17.23	17.31	17.27	0.24
	10^4	20.53	20.61	20.57	20.57	0.19
	10^3	23.87	23.85	24.01	23.91	0.36
蜡样芽孢杆菌	10^5	13.58	13.62	13.49	13.56	0.49
	10^4	17.49	17.52	17.65	17.55	0.48
	10^3	20.23	20.35	19.98	20.19	0.79

2.6 模拟样品检测

选取人工染菌牛奶的 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀释梯度进行平板计数,统计这 3 个梯度的菌液浓度依次为 4.6×10^2 , 4.3×10^3 , 4.1×10^4 CFU/mL。将这 3 个稀释梯度和阴性对照提取模板 DNA 后进行多重 qPCR 检测,结果发现 3 个被污染的梯度样品均出现了 3 种目标菌的特异扩增曲线,且 Ct 值都小于

35,可以判定为有效扩增,阴性对照没有出现任何扩增曲线,这与国标培养法检测的结果完全一致(见表 4)。相较于国标培养法检测一个模拟样品,试验周期需要 5~7 d,多重 qPCR 检测在 6 h 内就能完成。综合以上结果,说明本研究建立的多重 qPCR 体系可以应用于乳品安全生产的快速检测实践中。

表 4 牛奶污染样品的检测结果

Table 4 Detection results of contaminated milk samples

污染浓度/ CFU·mL ⁻¹	大肠杆菌 O157:H7		单增李斯特菌		蜡样芽孢杆菌	
	Ct 值	GB 4789	Ct 值	GB 4789	Ct 值	GB 4789
0.0	-	-	-	-	-	-
4.6×10^2	25.1	+	26.8	+	23.7	+
4.3×10^3	22.7	+	23.5	+	20.4	+
4.1×10^4	18.5	+	20.3	+	17.2	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

3 讨论与结论

单重荧光定量 PCR 检测技术,相较于传统的

检测方法有着实时、快速、高效、灵敏、准确等无法比拟的优势,与普通的 PCR 检测方法相比也表现

出试验流程简单、检测周期短、特异性强的优点^[9-12],已被成功地应用于食品安全检测和食源性疾病监控。多重荧光定量 PCR 技术是在同一反应体系中同时对多个基因序列进行 PCR 扩增,不仅节省了试剂、耗材,还提高了检测效率,在食品安全检测中应用前景更加广阔。

成功建立多重实时定量 PCR 检测方法的前提是靶标基因序列的特异性选择。大肠杆菌 O157:H7 的 *tir* 基因具有菌种特异性且高度保守,是致病性大肠杆菌的强毒素标志基因^[15]。*mpl* 基因是位于单增李斯特菌毒力岛 1(LIPI-1)上的致病性基因,通过 PCR 扩增 *mpl* 序列检测单增李斯特菌已被证实具有很好的特异性^[16]。王远洋等^[17]研究表明,肠毒素 *entFM* 基因是进行食品中蜡样芽孢杆菌检测极具代表性的候选基因。因此,本研究中分别选取 3 种病原菌的 *tir* 基因、*mpl* 基因和 *entFM* 基因作为 qPCR 的靶标基因。此外,本研究还针对靶标基因的保守序列设计引物,依据阳性克隆测序结果设计 TaqMan 探针,在一定程度上保证了多重 qPCR 的灵敏度和特异性。后期的试验结果表明,利用建立的多重 qPCR 方法检测 3 种目标菌表现出敏感性高(最低检出限均为 12 CFU/mL)、稳定性好(Ct 值变异系数均<1%)和特异性强(目标荧光信号强)等特点也印证了前期的靶标基因序列选择合适、引物和探针设计合理。

综上所述,本研究建立的 TaqMan 探针多重实时定量 PCR 方法检测大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌具有特异性强、灵敏度高、稳定性好的优点。对人工模拟污染的牛奶样品的检出结果表明,该方法为乳品中大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的检测和食源性疾病预防提供了及时、可靠的技术手段,在快速应对突发性食物中毒等公共卫生事件中具有极大的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 陈琼,周昱,孔繁德,等. 多重 PCR 技术同时检测四种肠道致病菌方法的建立与初步应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1116-1123.
CHEN Q, ZHOU Y, KONG F D, et al. Establishment and primary application of multiplex polymerase chain reaction for synchronous detection of four food-borne pathogens[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2013, 4(4): 1116-1123.
- [2] 付萍,王连森,陈江,等. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64-70.
FU P, WANG L S, CHEN J, et al. Analysis of food borne disease outbreaks in China mainland in 2015[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 64-70.
- [3] WEISS-MUSZKAT M, SHAKD D, ZHOU Y Z, et al. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1545-1554.
- [4] ZHAO X H, XIA J, LIU Y. Contrast of real-time fluorescent PCR methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and of introducing an internal amplification control[J]. Microorganisms, 2019, 7(8): 230-237.
- [5] 蔡志强,杨菊艳,蒋小燕. 单核细胞增生李斯特菌感染的临床特征[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(10): 900-903.
CAI Z Q, YANG J Y, JIANG X Y. Clinical characteristics of *Listeria monocytogenes* infection[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2020, 19(10): 900-903.
- [6] MAGALHÃES R, MENA C, FERREIRA V, et al. *Listeria Monocytogenes*: Methods and protocols[M]. Trenton: Humana Press, 2021: 3-16.
- [7] FAYAD N, AWAD M K, MAHILLON J. Diversity of *Bacillus cereus sensu lato* mobilome[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 436-447.
- [8] YUAN X M, LYU S J, ZHANG H Q, et al. Complete genome sequence of novel isolate SYJ15 of *Bacillus cereus* group, a highly lethal pathogen isolated from Chinese soft shell turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(1): 85-92.
- [9] 赵丽,申玉金,胡宝翠,等. 多种不同方法对微生物能力验证样品测试结果的比较及分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(1): 320-325.
ZHAO L, SHEN Y J, HU B C, et al. Comparison and analysis of microbial proficiency test results by different methods[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(1): 320-325.

- [10] 袁慕云, 许龙岩, 柯碧霞, 等. 基于 TaqMan 探针荧光 PCR 检测致泻性大肠埃希氏菌[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 274-281.
YUAN M Y, XU L Y, KE B X, et al. Detection for diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) by real-time PCR with TaqMan probe[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 274-281.
- [11] 汪华, 左靖文, 杨学军, 等. 三重荧光 PCR 检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 4179-4187.
WANG H, ZUO J W, YANG X J, et al. Detection of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 by triple fluorescent PCR[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(10): 4179-4187.
- [12] 王华健, 张宁, 杨威, 等. 3 种食源性致病菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1201-1209.
WANG H J, ZHANG N, YANG W, et al. Establishment of multiplex TaqMan fluorescence quantitative PCR method for detection of three foodborne pathogens[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Scandinavica, 2022, 53(4): 1201-1209.
- [13] YI Z W, DING R, CAO R B, et al. Development of a duplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of goose astrovirus genotypes 1 and 2[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 306(5): 114542-114547.
- [14] 刘继超, 姜铁民, 姜阿赤, 等. 基于 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术快速检测乳中金黄色葡萄球菌肠毒素 A[J]. 中国食品学报, 2015, 15(6): 162-166.
LIU J C, JIANG T M, JIANG A C, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A in milk using real-time PCR based on TaqMan probe [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(6): 162-166.
- [15] 周倩, 王嘉福, 冉雪琴, 等. 致病性大肠杆菌全基因组测序及毒力基因分析[J]. 工业微生物, 2021, 51(3): 10-19.
ZHOU Q, WANG J F, RAN X Q, et al. Whole genome sequencing and virulence gene analysis of pathogenic *Escherichia coli*[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(3): 10-19.
- [16] 郝民, 阮明捷, 王恒伟, 等. 北京市朝阳区单核细胞增生李斯特菌关键毒力基因缺失与致病性关联性分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 75-81.
HAO M, RUAN M J, WANG H W, et al. Study of association between deletion of key virulence genes and pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in Chaoyang District of Beijing[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 75-81.
- [17] 王远洋, 刘钟栋, 陈国培, 等. 食品中蜡样芽孢杆菌的毒力基因分布研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(12): 5304-5310.
WANG Y Y, LIU Z D, CHEN G P, et al. Study on distribution of virulence genes of *Bacillus cereus* in food[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(12): 5304-5310.

Rapid Detection of Three Common Foodborne Pathogens by Multiplex Real-time Quantitative PCR Based on TaqMan Probes

Ai Pengfei, Wang Shan, Gao Huiming, Wang Yanwei, Pang Yanrong, Zhang Meng
(College of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract The study was to establish a multiplex real-time quantitative PCR (qPCR) method based on TaqMan probes for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. Specific primers and TaqMan probes were designed according to the conservative sequences of *tir*, *mpl* and *entFM* genes, corresponding *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *B. cereus*, respectively, and a multiplex qPCR assay was presented to test their sensitivity, specificity and stability. The assay was used to detect pathogenic bacteria in contaminated milk samples, comparing with the national standard method. The experimental results showed that the multiplex qPCR assay exhibited high sensitivity, strong specificity and good stability, corresponding the minimum detection limited being 12 CFU/mL, only three kinds of target bacteria being amplified in the multiple-bacteria sample and the variation coefficient of repeti-

tive amplification being less than 1%, respectively. The positive detection rate of bacteria-contaminated samples was up to 100% through the multiplex qPCR assay, consisting with the national standard method, and the testing can be fast finished within 6 h. It confirmed that the multiplex qPCR assay can rapidly and accurately detect the three common food-borne pathogens, namely *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *B. cereus* in contaminated milk, and provided effective technical supports for food security.

Keywords TaqMan probe; multiplex real-time quantitative PCR; *Escherichia coli* O157:H7; *Listeria monocytogenes*; *Bacillus cereus*