

水产预制菜食源性致病菌多重qPCR检测体系的建立

黄浪萍^{1,2}, 汪智², 丁郁³, 吴清平², 张菊梅², 周聪煜^{1,2}, 潘紫英^{1,2}, 刘鸣², 王涓^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广东广州 510642)(2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东广州 510070)(3. 暨南大学生命科学技术学院食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要: 水产预制菜因便捷性深受消费者青睐, 但其加工和储存过程中易受食源性致病菌污染, 威胁食品安全。为快速准确筛查此类风险, 本研究基于副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌的特异性靶标设计引物及 TaqMan 探针, 开发了一种多重实时荧光定量 PCR 检测体系。纯菌检测实验显示, 副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌在该多重检测体系的最低检测限分别为 8.67×10^1 、 3.47×10^2 和 6.56×10^3 CFU/mL。三种菌的菌液浓度对数值与检测循环数 Cq 值之间呈现良好的线性关系, 相关系数 R^2 均大于 0.98。三种菌在 $10^8 \sim 10^1$ CFU/mL 浓度范围内三次重复扩增的变异系数均在 5.08% 内。在人工加标样品中, 经 12 h 增菌后, 三种菌的最低检测限分别为 6.30×10^0 、 6.13×10^2 、 2.44×10^1 CFU/mL。本研究对 60 份水产预制菜实际样品检测的准确性高达 100%。该体系特异性强、灵敏度高、稳定性优、抗干扰能力突出, 可实现水产预制菜中三种食源性致病菌的快速精准检测。本研究为水产预制菜食源性致病菌监控提供高效的检测工具, 对保障消费者健康具有重要意义。

关键词: 多重实时荧光 PCR 检测; 副溶血性弧菌; 单增李斯特菌; 沙门氏菌; 水产预制菜

文章编号: 1673-9078(2026)6-350-357

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0397

Establishment of Multiplex qPCR Detection System for Foodborne Pathogens in Aquatic Prefabricated Dishes

HUANG Langping^{1,2}, WANG Zhi², DING Yu³, WU Qingping², ZHANG Jumei², ZHOU Congyu^{1,2},
PAN Ziyi^{1,2}, LIU Ming², WANG Juan^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(2. Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, National Health Commission, Guangzhou 510070, China)(3. Department of Food Science and Engineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Aquatic prefabricated dishes are widely favored for their convenience; however, they are susceptible to contamination by foodborne pathogens during processing and storage, posing a threat to food safety. To rapidly and accurately

引文格式:

黄浪萍,汪智,丁郁,等.水产预制菜食源性致病菌多重qPCR检测体系的建立[J].现代食品科技,2026,42(6):350-357.

HUANG Langping, WANG Zhi, DING Yu, et al. Establishment of multiplex qPCR detection system for foodborne pathogens in aquatic prefabricated dishes [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 350-357.

收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-05-23; 接受日期: 2025-05-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1801000; 2017YFC1601200); 广东特支计划(2021TQ06N119)

作者简介: 黄浪萍(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌检测, E-mail: 13158898652@163.com; 共同第一作者: 汪智(1994-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食源性致病菌检测, E-mail: wz1282074436@163.com

通讯作者: 王涓(1986-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全检测与防控, E-mail: wangjuan@scau.edu.cn

screen such risks, a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction detection system was developed in this study. Specific primers and TaqMan probes were designed based on the unique target sequences of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp.. In pure culture tests, the minimum detection limits for *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. were 8.67×10^1 , 3.47×10^2 , and 6.56×10^3 CFU/mL, respectively. A strong linear relationship was observed between the logarithmic bacterial concentrations and Cq values, with correlation coefficients (R^2) exceeding 0.98. Within the concentration range of $10^8 \sim 10^1$ CFU/mL, the coefficient of variation from three replicate amplifications was within 5.08%. In artificially spiked samples, after 12 h of enrichment, the detection limits improved to 6.30×10^0 , 6.13×10^2 , and 2.44×10^1 CFU/mL for the three pathogens, respectively. The accuracy of the system was validated by testing 60 real aquatic prefabricated dish samples, achieving a 100% concordance with traditional culture methods. This detection system was highly specific, sensitive, stable, and resistant to interference, enabling rapid and precise identification of the three foodborne pathogens in aquatic prefabricated dishes. An efficient tool was thus provided for monitoring foodborne pathogens in aquatic prefabricated dishes, contributing significantly to consumer health protection.

Key words: multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction detection; *Vibrio parahaemolyticus*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* spp.; aquatic prefabricated dishes

随着冷链物流技术的持续升级,水产预制菜行业迎来新的发展契机。然而,作为新兴产业,该领域目前仍处于发展初期,存在生产标准化程度低、质量管控体系不完善等结构性缺陷^[1],在此背景下,水产预制菜的食品安全问题亟待重视。食源性致病菌的污染是水产预制菜质量安全急需解决的问题之一,其直接影响人体健康。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和沙门氏菌(*Salmonella* spp.)分布于水产品^[2-4],它们会引发人体产生腹泻、发热等症状^[5-7],涉及胃肠炎、流产、败血症、脑部炎症和肝炎^[8-10]等疾病,严重的感染会导致人或水产动物的死亡^[11-13]。因此,开发水产预制菜中可能污染的副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌准确可靠的检测方法是控制食品安全至关重要的一环。

国家标准食品微生物检验以传统培养法为主,经过选择性培养基增菌及筛选后,采用生化反应鉴定。美国食品和药物管理局标准方法检测致病菌耗时 5~7 d^[14],采用国际标准化组织认证的方法检测食源性致病菌需耗时 3~6 d^[15]。随着分子生物学技术的发展,食源性致病菌检测进入快速分子诊断时代^[16]。目前已经开发了很多食源性致病菌的分子检测方法,包括聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)、恒温扩增和实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-Time PCR, qPCR)等^[11]。聚合酶链式反应是分子检测的金标准^[17],但 PCR 扩增结果的呈现依赖核酸电泳。环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)是在恒温条件下扩增 DNA 的方法,它不需要

复杂的变温设备^[18],但其检测结果容易产生假阳性。qPCR 由一系列的循环扩增组成,使用不同吸收波长的荧光报告基团监测扩增,循环数 Cq 值和核酸浓度相关联^[19]。qPCR 在检测沙门氏菌中被证明比 LAMP 的检测限低 1~2 个数量^[20]。多重 qPCR 检测目前已经运用到食源性致病微生物的检测中, Raymond 等^[21]用多重 qPCR 检测方法区分不同血清型肠道沙门氏菌, Nagham 等^[22]运用双重 qPCR 同时检测两个不同属的致病菌沙门氏菌和空肠弯曲杆菌。多重 qPCR 检测系统可特异、准确的检测单增李斯特菌^[23],其已应用于单增李斯特菌的人工模拟加标样如肉类、牛奶、鱼等样品检测^[24]。但多重 qPCR 技术仍存在检测限低的问题^[25],并且缺少针对水产预制菜中副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌检测的研究。

本研究突破了单一菌株检测的局限,成功构建了一种高效、精准的多重 qPCR 检测体系,能够同时检测水产预制菜中副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌三种重要食源性病原菌,为真实食品样品中食源性致病菌快速诊断提供了强有力的技术支持。

1 材料和方法

1.1 菌株

副溶血性弧菌、单增李斯特菌、沙门氏菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)均保存于广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 试剂与仪器

Probe qPCR SuperMix (DUG)、细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、氯化钠、LB 肉汤、营养琼脂等培养基, 购自广东环凯生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪 LightCycler® 96 Instrument, 购自瑞士 Roche 公司。高速微量离心机, 购自中国大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。MALDI-TOF MS, 购自美国 Bruker 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌活化培养及模板DNA的提取

-80℃菌株自然化冻, 副溶血性弧菌于 3 g·L⁻¹ 氯化钠营养琼脂平板划线 37℃过夜培养。其他菌于 LB 琼脂平板划线 37℃过夜培养, 挑取单菌落转接至液体培养基于 37℃恒温摇床培养 10~12 h, 混匀取 1 mL 菌液于离心管中参照广东环凯生物科技有限公司细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒方法提取 DNA。

1.3.2 引物及探针的设计

根据副溶血性弧菌、单增李斯特菌的种靶标^[26,27]和沙门氏菌的属靶标^[28]序列, 使用 PrimerExpress (V3.0.1) 软件在序列保守区域设计特异性引物及探针, 经 BLAST 分析后, 委托北京六合华大基因科技有限公司合成。引物及探针序列如表 1。

表 1 实时荧光定量PCR引物及探针
Table 1 Primers and probes used in real-time fluorescent quantitative PCR

序列名称	碱基序列 (5'—3')	扩增长度/bp
VP-F	GTCGGCAGTGCGTTTTATGA	101
VP-R	CGCAGTGCATTGCGATTAA	
VP-P	Texas Red-CGCCACTAGCACCACCTTTTCATTTCGT-BHQ2	
LM-F	CCCTAGCAGCACCTTAGATTC	93
LM-R	GCGTCTTCTTCGCTGTATGTG	
LM-P	Cy5-AGGCTTAATAACCCCTGACCGCGACA-BHQ2	
S-F	AAGCGATGAATGGCGTTACC	104
S-R	CTGCTTTTTTGCCTGGTTCAC	
S-P	FAM-TATCGACCTGAGCCAGATCTCCAGGG-BHQ1	

1.3.3 多重qPCR检测体系的优化

参照 Probe qPCR SuperMix (DUG) 说明书上的扩增程序和引物/探针组的退火温度, 确定多重检测体系的 *T_m* 值, 并根据 3 种菌引物及探针浓度的优化结果进行多重 qPCR 检测体系的组合。确认彼此之间

不会相互干扰, 以扩增曲线中较早出现荧光信号和较高的荧光强度为最优体系的判断标准。多重 qPCR 扩增程序: 50℃ 120 s; 94℃ 120 s; 94℃ 15 s, 65℃ 60 s, 40 个循环。

1.3.4 多重qPCR特异性试验

3 种目标菌副溶血性弧菌、单增李斯特菌、沙门氏菌及其他非目标菌接种于液体培养基中培养至对数期, 取菌液按细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。将 DNA 作为模板, 参照 1.3.3 中优化的多重 qPCR 检测体系进行扩增, 以 ddH₂O 作为空白对照, 验证引物及探针的特异性。根据 qPCR 扩增曲线荧光信号和荧光强度判断结果, *C_q* 值 < 35 结果判定为阳性。

1.3.5 多重qPCR检测灵敏度评价

分别将过夜培养的目标菌株按 10 倍梯度稀释, 选取 3 个适宜的梯度取 100 μL 涂布计数, 每个稀释梯度取 1 mL 菌液提取 DNA, 以 ddH₂O 作为空白对照, 根据建立的多重 qPCR 检测体系进行敏感度评价。以菌液浓度的对数为横坐标, *C_q* 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.6 多重qPCR抗干扰实验

3 种目标菌过夜培养, 按细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 多重 qPCR 体系中单独检测某一个菌与同时检测 3 种菌, 以 ddH₂O 作为空白对照, 重复 3 次实验。单菌检测 *C_q* 值和混菌检测中对应检测通道的 *C_q* 值比较, 计算其平均值及显著差异性。

1.3.7 多重qPCR重复性实验

不同浓度的菌液 DNA 为反应模板, 以 ddH₂O 作为空白对照, 在多重 qPCR 检测体系中重复 3 次实验, 将扩增曲线的 *C_q* 值进行统计学分析, 计算不同菌液浓度 *C_q* 值的平均值、标准偏差和变异系数。

1.3.8 人工模拟加标样品检测

从某水产市场购买腌制调味的预制虾仁, 低温保存运送至实验室。称取 1 g 虾仁进行无菌处理, 体积分数为 75% 的酒精浸泡虾仁 15 min, 倒掉酒精使用无菌水清洗 3 次去除样品表面残留的酒精及其他污染物, 置于生物安全柜紫外灯照射 30 min。液体培养基中过夜培养目标菌, 用无菌生理盐水按 10 倍梯度稀释菌液, 选取 3 个适宜的梯度涂布计数。使用不同浓度的副溶血性弧菌、单增李斯特菌、沙门氏菌分别侵染 1 g 虾仁样品, 分别于 9 mL 3 g·L⁻¹ 的氯化钠蛋白胨水、李斯特增菌肉汤 LB1 和碱性蛋白胨水中增菌, 在增菌的 0、6、12 h 取增菌液按细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法提取 DNA。

1.3.9 水产预制样品检测

在广东市场和商超购买 60 份水产预制菜，参照国家标准 GB 4789.7-2013 食品安全国家标准食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验、GB 4789.30-2016 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、GB 4789.4-2024 食品安全国家标准食品微生物学检验 沙门氏菌检验方法进行菌株的分离，并通过 MALDI-TOF MS 鉴定。60 份样品增菌 12 h 后，混匀采集 1 mL 增菌液，提取 DNA，进行多重 qPCR 检测。将国家标准检测和多重 qPCR 检测的结果进行对比。

1.3.10 数据统计分析

通过 *t* 检验，评估多重 qPCR 检测体系中单一菌株模板 DNA 和 3 种目标菌的混菌模板 DNA 的 *C*_q 值之间的显著差异性。当 *P* > 0.05，则判定两者间无显著差异性。

2 结果与讨论

2.1 多重qPCR检测体系优化

通过实验比较筛选出最佳的多重 qPCR 检测体系见表 2。多重 qPCR 扩增曲线如图 1 所示。3 种菌在此反应体系中，相互之间没有产生相互干扰和非特异性扩增，均在短时间内出现明显的荧光信号并且均具有高的荧光强度。

表 2 多重qPCR检测体系			
Table 2 Multiplex qPCR detection system			
体系组分	副溶血性弧菌	单增李斯特菌	沙门氏菌
2 × Probe qPCR Mix/μL		5.00	
正向引物浓度/(μmol·L ⁻¹)	0.07	0.20	0.40
反向引物浓度/(μmol·L ⁻¹)	0.07	0.20	0.40
探针浓度/(μmol·L ⁻¹)	0.30	0.10	0.10
DNA 模板/μL	1.00	1.00	1.00
ddH ₂ O/μL		0.16	

2.2 多重qPCR检测体系特异性

本研究对多重 qPCR 引物和探针的特异性进行验证，结果如图 2 所示。3 种目标菌扩增出荧光曲线，成功被检出，而针对其他非目标菌，如大肠杆菌、克罗诺杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌及空白对照，均未出现任何扩增信号。这充分证明该体系能同时检出 3 种不同属的目标菌，且具有高度特异性，可用于水产预制菜中 3 种常见食源性致病菌的检测。

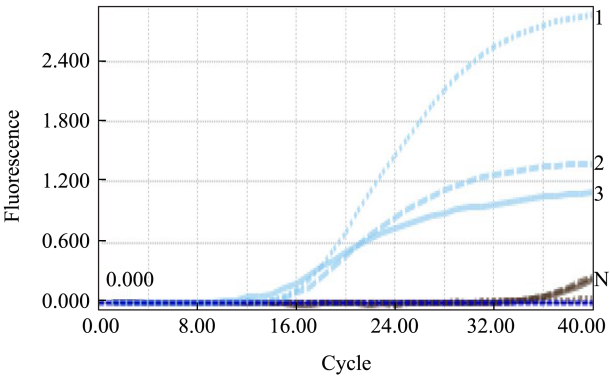


图 1 多重 qPCR 扩增曲线

Fig.1 Multiplex qPCR amplification curves

注：曲线 1~3 分别表示副溶血性弧菌、单增李斯特菌、沙门氏菌的扩增曲线，N 为空白对照。

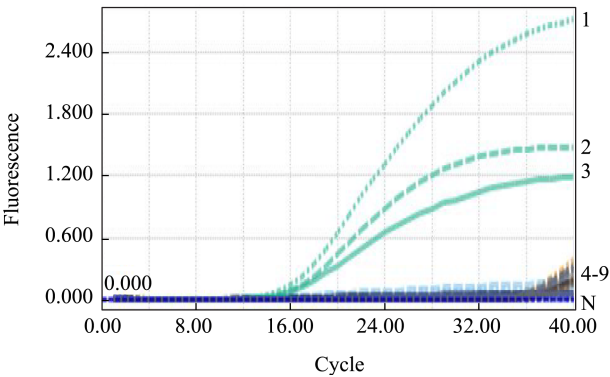


图 2 多重 qPCR 检测体系特异性评价

Fig.2 Evaluation of specificity of multiplex qPCR detection system

注：曲线 1~3 分别表示副溶血性弧菌、单增李斯特菌、沙门氏菌的扩增曲线；曲线 4~9 是非目标菌分别为大肠杆菌、克罗诺杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的扩增曲线；N 为空白对照。

2.3 多重qPCR检测体系的灵敏度评价及标准曲线

本研究采用菌液梯度稀释法对检测体系的灵敏度进行评估，与食品安全检测以及临床病原学诊断领域要求相契合。相较于使用拷贝数评价灵敏度^[29,30]的方式，菌液梯度稀释法能够更精准地模拟实际检测场景，更贴近实际的检测需求。多重 qPCR 检测体系中 3 种菌的检测限如图 3 所示。目标菌株按 10 倍梯度稀释提取 DNA，平板计数结果显示副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌初始菌液浓度分别是 8.67×10⁶ CFU/mL、3.47×10⁸ CFU/mL 和 6.56×10⁸ CFU/mL。多重 qPCR 检测结果显示随着菌液浓度的降低，*C*_q 值呈现有规律的变化。副溶血性弧菌的检测限达到 8.67×10¹ CFU/mL、单增李斯特菌的检测限达到 3.47×10² CFU/mL、沙门

氏菌的检测限达到 6.56×10^3 CFU/mL。以菌液浓度的对数值作为横坐标,不同菌液浓度在多重 qPCR 检测体系中的 C_q 值为纵坐标绘制标准曲线如图 4。3 种菌液浓度的对数与 C_q 值之间具有良好的线性关系,它们的相关系数 R^2 分别为 0.98、0.99 和 0.99。这一结果表明该多重 qPCR 检测体系适用于这三种菌的定量检测。

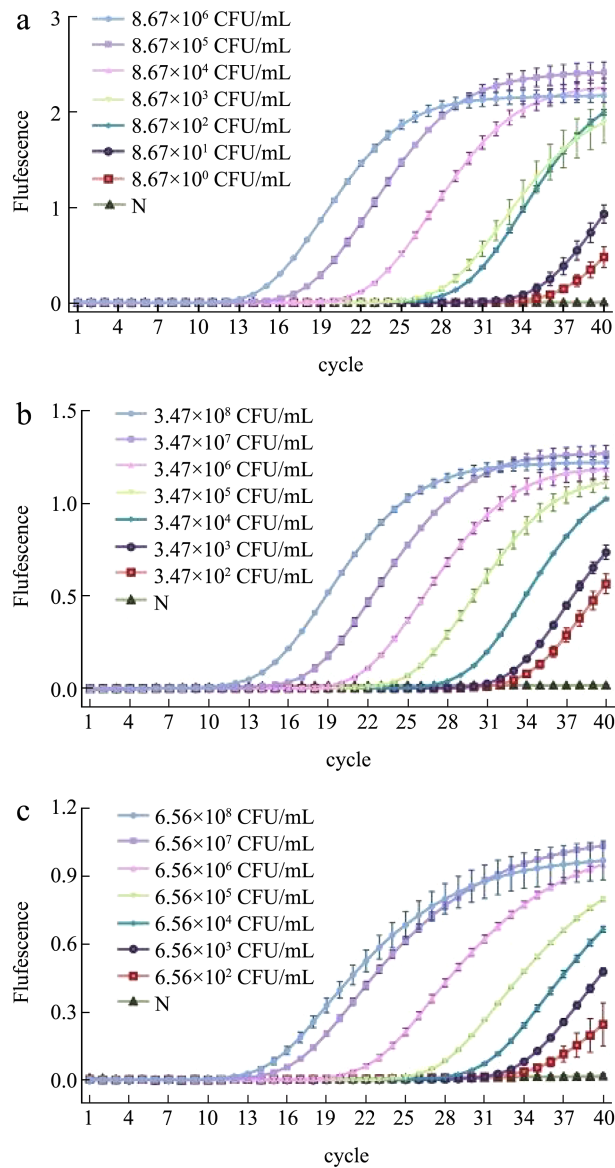


图3 多重 qPCR 检测体系的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of multiplex qPCR detection system

注: a 表示副溶血性弧菌灵敏度扩增曲线, b 表示单增李斯特菌灵敏度扩增曲线, c 表示沙门氏菌灵敏度扩增曲线。

2.4 多重qPCR检测体系的抗干扰实验

分析这三种菌株在混菌检测中,其中某一个检测通道的荧光信号出现的循环数(C_q 值)是否受到其他两个菌株的影响发生显著变化,来评估检测体系的抗干扰性能。分别在检测体系中加入单个目标菌的模

板 DNA,在另一个反应管中同时加入 3 种目标菌的模板 DNA,重复 3 次实验。实验结果如图 5 所示,显著性分析结果表明多重 qPCR 检测体系中加入单一模板 DNA 和加入混菌模板 DNA 的 C_q 值没有显著性差异 ($P>0.05$)。多重 qPCR 检测体系中 3 种菌的检测不产生相互影响,表明此检测体系抗干扰能力强。

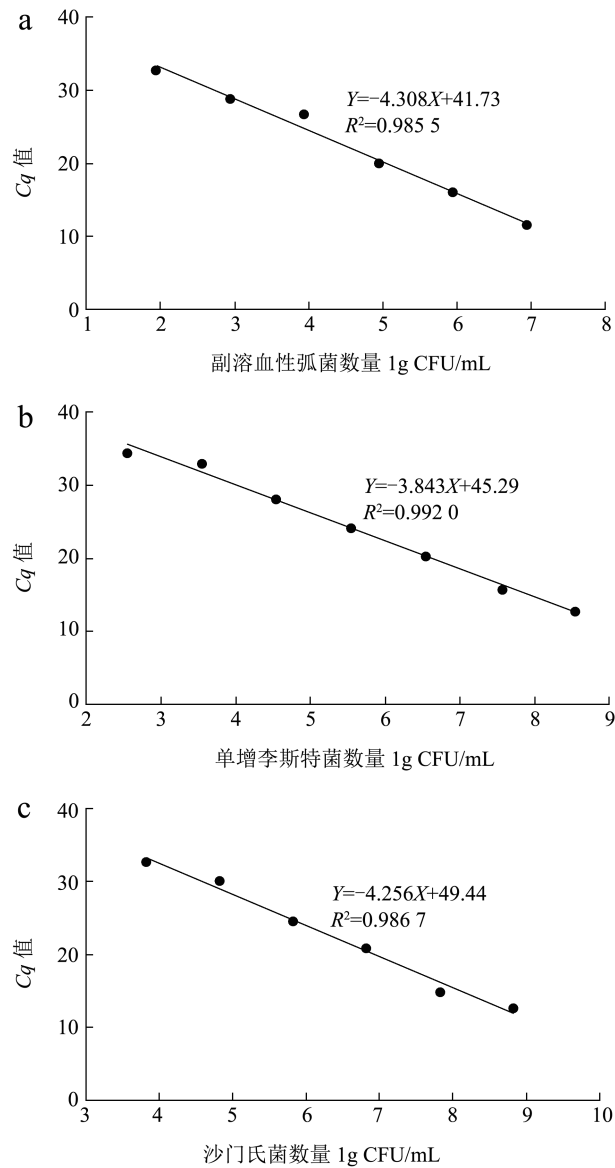


图4 多重 qPCR 检测体系的标准曲线

Fig.4 Standard curve of multiplex qPCR detection system

2.5 多重qPCR重复性评价

10 倍梯度稀释的副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌菌液进行 3 次重复性实验,计算其标准偏差及变异系数,结果见表 3~5。不同浓度的副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌在多重 qPCR 检测中 C_q 值变异系数均在 5.08% 内,这一数据充分表明此多重 qPCR 检测体系展现出优异的重复性和稳定性。

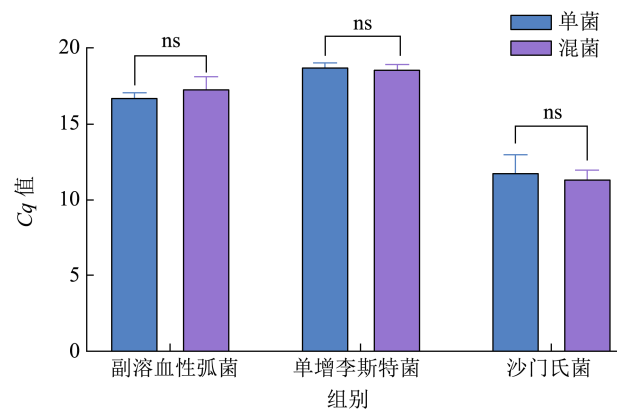


图 5 多重 qPCR 检测体系的抗干扰实验

Fig.5 Anti-interference experiment of a multiplex qPCR detection system

注: ns 表示无显著差异。

表 3 多重qPCR重复性实验结果（副溶血性弧菌）

Table 3 Repeatability results of multiplex qPCR (*Vibrio parahaemolyticus*)

菌液浓度/ (CFU/mL)	Cq 值			平均值	标准差	变异系 数/%
	1	2	3			
8.67×10^6	13.18	13.48	13.32	13.33	0.15	1.13
8.67×10^5	15.85	16.23	16.57	16.22	0.36	2.22
8.67×10^4	20.80	20.75	20.86	20.80	0.06	0.26
8.67×10^3	26.21	26.07	26.75	26.34	0.36	1.36
8.67×10^2	27.31	27.5	27.56	27.46	0.13	0.48
8.67×10^1	32.30	34.19	33.72	33.40	0.98	2.95

表 4 多重qPCR重复性实验结果（单增李斯特菌）

Table 4 Repeatability results of multiplex qPCR (*Listeria monocytogenes*)

菌液浓度/ (CFU/mL)	Cq 值			平均值	标准差	变异系 数/%
	1	2	3			
3.47×10^8	13.08	13.21	12.79	13.03	0.22	1.65
3.47×10^7	15.80	16.82	17.18	16.60	0.72	4.31
3.47×10^6	20.77	20.6	20.79	20.72	0.10	0.50
3.47×10^5	24.39	24.43	24.86	24.56	0.26	1.06
3.47×10^4	28.47	28.38	28.43	28.43	0.04	0.16
3.47×10^3	32.16	31.89	31.82	31.96	0.18	0.56
3.47×10^2	33.83	32.60	33.38	33.27	0.62	1.87

表 5 多重qPCR重复性实验结果（沙门氏菌）

Table 5 Repeatability results of multiplex qPCR (*Salmonella* spp.)

菌液浓度/ (CFU/mL)	Cq 值			平均值	标准差	变异系 数/%
	1	2	3			
6.56×10^8	13.52	14.89	13.85	14.09	0.72	5.08
6.56×10^7	15.53	15.77	16.00	15.77	0.24	1.49
6.56×10^6	21.12	21.79	22.12	21.68	0.51	2.35
6.56×10^5	27.05	27.25	27.02	27.11	0.12	0.46
6.56×10^4	30.13	30.26	30.66	30.35	0.29	0.91
6.56×10^3	33.41	33.09	32.91	33.14	0.25	0.76

2.6 人工模拟样品检测

将不同浓度的菌液侵染预制虾样品，未侵染目标菌的预制虾样品作为空白对照，选取适宜梯度的菌液涂布计数。在增菌 0、6、12 h 取 1mL 菌液提取 DNA 进行多重 qPCR 检测。人工污染结果如图 6 所示，副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌未增菌的检测限分别为 6.30×10^4 、 6.13×10^5 和 2.44×10^4 CFU/mL。三种菌增菌 12 h 的检测限分别为 6.30×10^0 、 6.13×10^2 、 2.44×10^1 CFU/mL。人工模拟样品增菌 12 h 后，检测限提高 3~4 个数量级。这一结果说明增菌过程能有效富集目标菌，提升多重 qPCR 检测体系在实际样品检测中的灵敏度。

2.7 水产预制菜实际样品检测

本研究采集了 60 份水产预制菜样品，在增菌 12 h 后提取 DNA 进行多重 qPCR 检测。多重 qPCR 的检测结果与国家标准微生物检测法比较，结果见图 7。副溶血性弧菌呈阳性样本有 11 份（18.33%）、单增李斯特菌呈阳性样本有 2 份（3.33%）、沙门氏菌呈阳性样本有 2 份（3.33%）。多重 qPCR 检测水产预制菜实际样品的准确性达 100%，表明此检测体系具有高度准确性和可靠性。现行国家标准微生物检测采用的传统培养法通常需要 4-5 天时间，而本方法仅需 15 h 即可完成 3 种致病菌的检测。多重 qPCR 更适用于大量的样品检测，它可实现单个反应同时检测多种细菌，从而减少时间、降低成本和劳动力^[31]。本研究克服了传统培养法的不足，缩短了检测时间，提高了检测效率，为水产预制菜食源性致病菌快速检测提供有效工具。

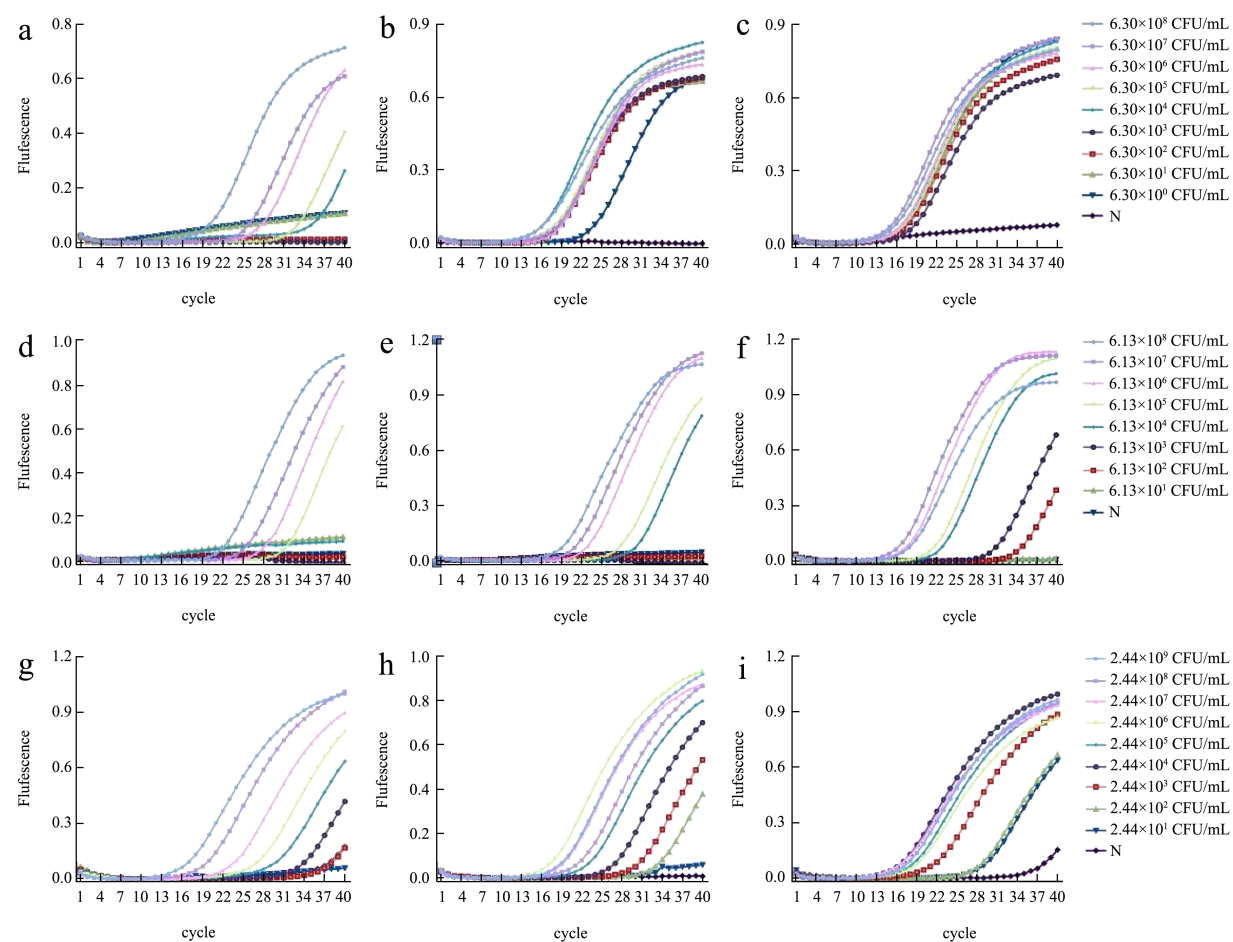


图 6 多重 qPCR 模拟样品检测结果

Fig.6 Detection results of multiplex qPCR simulated samples

注：a~c 分别表示副溶血性弧菌未增菌、增菌 6 h、增菌 12 h 的扩增曲线，d~f 分别表示单增李斯特菌未增菌、增菌 6 h、增菌 12 h 的扩增曲线，g~i 分别表示沙门氏菌未增菌、增菌 6 h、增菌 12 h 的扩增曲线。

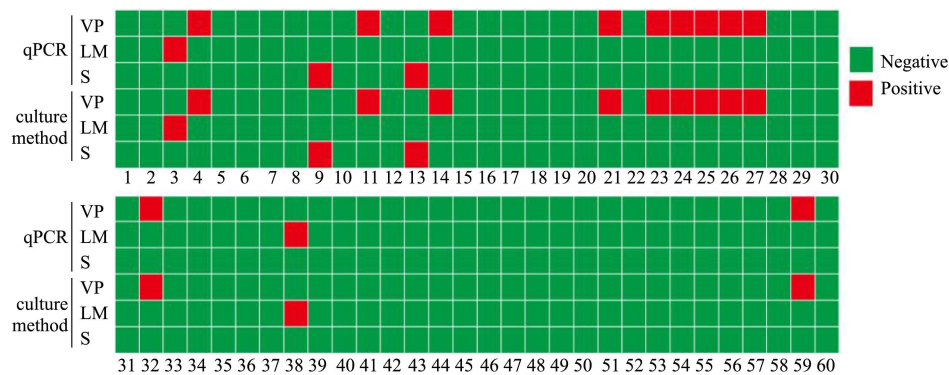


图 7 水产预制菜实际样本检测结果

Fig.7 Test results of actual samples of aquatic prefabricated dishes

注：VP 表示副溶血性弧菌，LM 表示单增李斯特菌，S 表示沙门氏菌。

3 结论

本研究基于多重 qPCR 技术构建了水产预制菜多种食源性致病菌同步检测体系，突破了传统检测方法耗时长、步骤繁琐的技术瓶颈。该检测体系实现了副

溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌三种高风险致病菌的精准识别。人工模拟加标样品选择性增菌 12 h 后，副溶血性弧菌、单增李斯特菌和沙门氏菌检测限分别是 6.30×10^0 、 6.13×10^2 、 2.44×10^1 CFU/mL。本研究建立的多重 qPCR 检测体系兼具高灵敏度和强特异

性的特点,该体系可高效检测复杂食品基质水产预制菜中的三种重要食源性致病菌,对保障食品安全和推动行业标准化发展具有重要应用价值。

参考文献

- [1] 王艺红,林嘉铭,许智海.水产预制菜产业现状及发展措施[J].当代水产,2023,5:77-81.
- [2] RAMIRES T, KLEINUBING N R, IGLESIAS M A, et al. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi [J]. Food Research International, 2021, 140: 1-8.
- [3] SILVA L V D, OSSAI S, CHIGBU P, et al. Antimicrobial and genetic profiles of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the maryland coastal bays, United States [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 1-9.
- [4] MUMBO M T, NYABOGA E N, KINYUA J K, et al. Antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from fresh Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish marketed for human consumption [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 23(1): 306.
- [5] EMILY F, LEX E X L, ALESSIA C, et al. *Vibrio parahaemolyticus* foodborne illness associated with oysters, Australia, 2021-2022 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2024, 30(11): 2271-2278.
- [6] KEITH I, ROMAN M, GAURAV C G, et al. Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes* [J]. Molecular Microbiology, 2021, 116(6): 1407-1419.
- [7] SEARS K T, GALEN J E, TENNANT S M. Advances in the development of *Salmonella*-based vaccine strategies for protection against salmonellosis in humans [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(6): 2640-2658.
- [8] LU J, WU H, WANG S L, et al. *Salmonella*: infection mechanism and control strategies [J]. Microbiological Research, 2025, 292: 1-13.
- [9] OSEK J, WIECZOREK K. *Listeria monocytogenes*-how this pathogen uses its virulence mechanisms to infect the hosts [J]. Pathogens, 2022, 11(12): 1-25.
- [10] JIANG H J, TAN R, JIN M, et al. Visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* using combined CRISPR/Cas12a and recombinase polymerase amplification [J]. Biomedical and Environmental Sciences 2022, 35(6): 518-527.
- [11] LIAO L, SHI W, MA C, et al. Duplex detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* by real-time recombinase polymerase amplification [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2022, 35(12): 1161-1165.
- [12] CATHY Z, BRIAN B, HONG S H, et al. Assessment of *Listeria monocytogenes* surface proteins identified from proteomics analysis for use as diagnostic biomarkers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(10): 1-13.
- [13] FERRARI R G, ROSARIO D K A, CUNHA N A, et al. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(14): 1-21.
- [14] DONOSO W, CASTRO R I, GUZMÁN L, et al. Fast detection of *Listeria monocytogenes* through a nanohybrid quantum dot complex [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(22): 5359-5371.
- [15] ROTH K M, GREEN O, HUPFELD M, et al. Ultrasensitive detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by small-molecule chemiluminescence probes [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(30): 10361-10367.
- [16] OMAR R F, BOISSINOT M, HULETSKY A, et al. Tackling infectious diseases with rapid molecular diagnosis and innovative prevention [J]. Infectious Disease Reports, 2024, 16(2): 216-227.
- [17] WANG R, ZHONG Y, GU X, et al. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1-13.
- [18] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 1-7.
- [19] POSTOLLEC F, FALENTIN H, PAVAN S, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology [J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 848-861.
- [20] EVELYN C D S, CATARINA D D O, LUCAS F M R, et al. *Salmonella* detection with LAMP and qPCR and identification of serovars of interest by multiplex qPCR in poultry carcasses [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2023, 54(3): 2173-2182.
- [21] HEYMANS R, VILA A, CAROLIENE A M, et al. Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* by multiplex quantitative PCR [J]. Plos One, 2018, 13(10): 1-15.
- [22] ANIS N, BONIFAIT L, QUESNE S, et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and quantification of *Campylobacter* spp. in a real-time duplex PCR: myth or reality? [J]. Pathogens, 2023, 12(2): 1-14.
- [23] GARRIDO M A, AZINHEIRO S, CARVALHO J, et al. Rapid and sensitive detection of viable in food products by a filtration-based protocol and qPCR [J]. Food Microbiology, 2018, 73: 254-263.
- [24] HODZIC E, GLAVINIC A, WADEMAN C. A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR [J]. Biomolecules and Biomedicine, 2023, 23(4): 640-648.
- [25] XU D, JI L, WU X, et al. Detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplexed real-time PCR [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(11): 809-815.
- [26] 吴清平,相欣然,叶青华,等.副溶血性弧菌特异性新分子靶标及其快速检测方法:中国,202010068269.9[P].2020-05-15.
- [27] 吴清平,李凡,叶青华,等.李斯特菌和6种常见李斯特菌特异性新分子靶标及其快速检测方法:中国,201911400110.6 [P].2020-04-24.
- [28] 张菊梅,尚玉婷,叶青华,等.鉴定沙门氏菌属的特异性新分子靶标及其快速检测方法:中国,201911394381.5[P].2020-04-24.
- [29] 谢晓倩,史梅梅,杨俊,等.单核细胞增生李斯特氏菌与副溶血性弧菌RPA-CRISPR/Cas12a检测方法的建立[J].中国口岸科学技术,2024,6(11):88-96.
- [30] 江凤玲.冷冻水产品中副溶血性弧菌的实时荧光PCR检测方法研究[J].福建轻纺,2023,3(3):6-16.
- [31] MARELIZE B, MICHÉLE D K, THOMAS E C. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 405(1): 91-108.