

EMA 结合实时荧光 PCR 方法检测 单核细胞增生李斯特氏菌

吴海江¹, 孙玉萍², 范田丽¹, 赵建勇¹, 张煌涛¹, 张晓波², 杨珊珊²

(1. 新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院/国家农副产品质量监督检验中心, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学基础医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 建立叠氮溴化乙锭(EMA)结合实时荧光 PCR(qPCR)方法检测单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)活菌。以李斯特溶血素 O(LLO)基因 *hly* 设计引物、TaqMan 探针, 用李斯特氏菌典型菌、沙门氏菌等 56 株致病菌株验证特异性, 不同质量浓度 EMA 处理进行 qPCR 检测。尝试脱氧胆酸钠溶液(SD)强化抑制效果, 73 份不同的人工污染食品、环境样本(卤鸡肉、牛奶、肉馅、垃圾渗滤液)测试实用性。结果表明, 引物探针准确检测 *L. monocytogenes*, 对其他菌株无特异性扩增。EMA 最适质量浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 经过 15 min 光激活与死菌 DNA 共价结合明显抑制了扩增, 方法检出限为 150 CFU/mL。SD 处理 *L. monocytogenes* 活菌 *Ct* 值增加。与传统培养法比较, EMA-qPCR 方法检测 100 %准确, 操作简单、省时高效, 在食品、环境方面应用前景广阔。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; *hly* 基因; 叠氮溴化乙锭; 实时荧光 PCR

中图分类号: R 446.5 文章编号: 1673-1689(2020)11-0065-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.009

Detection of Live *Listeria monocytogenes* by EMA-qPCR

WU Haijiang¹, SUN Yuping², FAN Tianli¹, ZHAO Jianyong¹,
ZHANG Huangtao¹, ZHANG Xiaobo², YANG Shanshan²

(1. Xinjiang Product Quality Supervision and Inspection Institute / National Quality Supervision and Inspection Center of Agricultural Byproducts, Urumqi 830011, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: An ethidium monoazide in combination with real-time PCR method (EMA-PCR) was newly developed for selective detection of live *Listeria monocytogenes* cells from dead cells. The primers and TaqMan probes were designed using the *hly* gene which encoded listeriolysin O (LLO). The sensitivity and specificity of the assay were confirmed by intensive validation tests with a large number of *Listeria monocytogenes* strains and other pathogenic bacteria strains ($n=56$). A qPCR assay was detected with EMA of different concentrations. Sodium deoxycholate solution (SD) was used to strengthen the inhibitory effect. In addition, 73 various artificial contaminated food and environmental samples (braised chicken, milk, minced meat and garbage leachate) were investigated

收稿日期: 2019-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960169, 81760169); 新疆市场监督管理局项目(201610); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C219, 2017D01C234)。

作者简介: 吴海江(1983—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事食品、化妆品致病微生物检验方面的研究。E-mail: wuhaijiang2010@sina.com

for *L. monocytogenes*. The primer probe accurately detected *L. monocytogenes* without specific amplification for other strains. EMA could penetrate dead cells resulting in the covalent links of DNA upon 15 min light exposure and therefore inhibition of amplification under an optimal concentration of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ with a detection limit of 150 CFU/mL. The C_t value of live Lm increased under SD treatment. The diagnostic accuracy of EMA-qPCR method was up to 100 % compared to the traditional culture method. This method with simple operation, time-saving and high efficiency has a promising application on accurate microbiological monitoring of food safety and environmental source.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *hly* gene, EMA, real-time PCR

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种食源性致病菌,可在冰箱冷藏室生长繁殖^[1-2]。人感染后引起脑膜炎、流产、败血症等疾病,致死率达 20%~30%,美国每年近 300 人死亡^[3]。我国非常重视 *L. monocytogenes* 污染,要求预包装食品检出率为零,因此准确快速检测成为研究热点^[4-5]。

目前,*L. monocytogenes* 检测方法有生理生化^[6]、酶联免疫方法^[7]等,操作繁杂、试剂成本高,确定阳性样品需要 5~8 d^[8]。实时荧光 PCR 检测具有高效准确、操作简单、减少交叉污染等优点^[9]。利用核酸荧光染料叠氮溴化乙锭(EMA)与死菌 DNA 共价结合阻断 PCR 反应^[10-11],通过 qPCR 循环次数(C_t 值)增加区分死菌。Casini 等^[12]监测医院直饮水中军团菌(*Legionella*)。有研究表明,脱氧胆酸钠溶液(SD)处理受损细胞,增强 EMA 渗入。Wang 等^[13]用 0.1% SD 处理肠出血性大肠埃希氏菌 O157,抑制效果增强。

TaqMan 荧光水解探针特异性强、高通量^[14-15]。*hly* 基因编码李斯特溶血素 O (LLO) 是 *L. monocytogenes* 重要的致病物质,导致细菌在巨噬细胞、上皮细胞中传播^[16]。作者设计引物、TaqMan 探针检测 *hly* 基因,将 EMA 与 qPCR 结合鉴别活菌,尝试 SD 强化抑制效果,人工污染样品测试实用性。本方法操作简单、准确可靠,为食品、环境中检测 *L. monocytogenes* 提供了新途径。

1 材料与方法

1.1 菌种

56 株标准菌株:购自美国种质保藏中心(ATCC)、英国典型菌种保藏中心(NCTC)、中国工业

微生物菌种保藏管理中心(CICC)、中国医学细菌保藏管理中心(CMCC),分离株由国家农副产品质量监督检验中心(新疆)分离保存。

1.2 主要试剂和仪器

EMA:购自美国 Sigma 公司;细菌 DNA 提取试剂:购自上海生工公司;qPCR 反应试剂 Premix Ex Taq(含 TaKaRa Ex Taq HS,dNTP Mixture, Mg^{2+} 等):购自日本 Takara 宝生物公司;SD:购自北京雷根生物技术有限公司;微生物培养基:购自北京陆桥有限公司。

Dry Block Heater 2 金属干浴器:德国 IKA 公司;ROTINA 420 离心机:德国 Hettich 公司;VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪:法国生物梅里埃公司;LED 光照装置(等效于卤素灯 600 W):日本 Takara 宝生物公司;CFX96 荧光定量 PCR 仪:美国伯乐 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 微生物的培养 将 *L. monocytogenes*、沙门氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌(O-157:H7)等标准菌株、实验室分离株用脑心浸出液肉汤(BHI)复苏,VITEK 2 Compact 确认。将单菌落接种于 10 mL 缓冲蛋白胨水(Buffered peptone water,BPW)试管中,36 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养至对数期。

1.3.2 热致死方法 取培养至对数期 *L. monocytogenes* 的新鲜菌液,调整菌悬液为 0.5 麦氏浊度(约 1.5×10^8 CFU/mL),取 1 000 μL 至 1.5 mL 离心管中,金属干浴 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,冷却至室温。活菌置于冰盒中避免繁殖扩增。吸取菌液 300、300、400 μL ,涂布于显色培养基,36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 观察生长情况,计算菌落数量。

1.3.3 最适 EMA 质量浓度及 DNA 提取 将 EMA

溶解制成质量浓度 2.5 mg/mL 母液, -20 ℃ 避光保存。将 EMA 加入菌液, 用涡旋振荡器混匀, 每管终质量浓度为 0、2.5、5.0、7.5、10.0 μg/mL。暗处避光、室温静置 15 min, 过程中每隔 2~3 min 用手轻弹混匀。暗反应后, 用 LED 装置光照 15 min (或 500 W 卤素灯, 距离 20 cm, 光照 15 min)。细菌 DNA 通过上海生工试剂提取, 4 ℃ 保存备用。

1.3.4 qPCR 引物探针设计 以 *L. monocytogenes* 溶血蛋白基因 *hly* (Genbank accession no. M24199) 为目的基因, 使用 Primer Express 3.0 软件设计引物、TaqMan 探针, 美国 Thermo Fisher 赛默飞世尔科技(中国)有限公司合成。

qPCR 反应体系 (25 μL): 12.5 μL Premix Ex Taq; 10 μmol/L 上、下游引物、探针各 0.5 μL; DNA 模板 2.0 μL; 用 ddH₂O 补至 25 μL。反应程序: 95 ℃ 30 s、95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s (收集 FAM 荧光), 40 个循环。通过 Bio-rad 伯乐 CFX Manager Software 软件分析实验数据。

表 1 引物探针序列

Table 1 Sequences of primers and probe

目的基因	名称	类型	序列
<i>hly</i>	<i>hlyF</i>	上游引物	5'-CAT GGC ACC ACC AGC ATC T-3'
	<i>hlyR</i>	下游引物	5'- ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA -3'
	<i>hlyP</i>	探针	5'-FAM-CGC CTG CAA GTC CTA AGA CGC CA-TAMRA-3'

1.3.5 EMA-qPCR 方法检出限 将 0.5 麦氏浊度的 *L. monocytogenes* 活菌 (约 1.5×10^8 CFU/mL) 进行 10 倍梯度稀释, 制得浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 CFU/mL 菌液, EMA 处理和未处理菌液同时进行 qPCR 检测, 确定方法检出限。

1.3.6 SD 增强 EMA-qPCR 效果 将体积分数 1% SD 分别加入热致死、活 *L. monocytogenes* 培养液中, 使 SD 终体积分数为 0.01%、0.03%、0.1%。充分混匀后, 暗处避光、室温静置 20 min, 过程中每隔 6~7 min 用手轻弹混匀后, 后续按 1.3.3 处理, 选择最适质量浓度 EMA 处理进行 qPCR 检测。

1.3.7 人工污染样品检测 从超市、商场、垃圾处理站采集食品、环境样品 73 份, 包括卤鸡肉、牛奶、肉馅、垃圾渗滤液。经高温灭菌后, 25 g 样品分别加

入 *L. monocytogenes* 死菌、活菌, 增菌液至 0.3~0.5 麦氏浊度时, 食品安全国家标准 GB 4789.30-2016^[17] 定性法和 EMA-qPCR 方法检测 *L. monocytogenes*。

2 结果与分析

2.1 实验原理

EMA 进入热致死 *L. monocytogenes* 细胞经可见光曝光, 所带的光敏性基团 (-N₃) 脱去 (-N₂) 转化为高活性的氮宾中间体, 与 DNA 链上碳氢化合物结合形成不可逆的共价键 (-NH-CH₂-), 造成 DNA 永久修饰抑制 PCR 反应^[18]。EMA 处理死菌 *C_t* 值增加, 实现消除“假阳性”特异性检测活菌, 见图 1。

前增菌采用非选择 BPW 培养基, 适用于 *L. monocytogenes*、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲菌等食品致病菌在食品加工热处理及防腐剂添加过程中的损伤恢复和增菌培养。本研究可同时检测多种致病菌, 细菌 DNA 提取全过程在一个离心管中完成, 裂解液直接 qPCR 检测, 操作简单, 防止交叉污染。

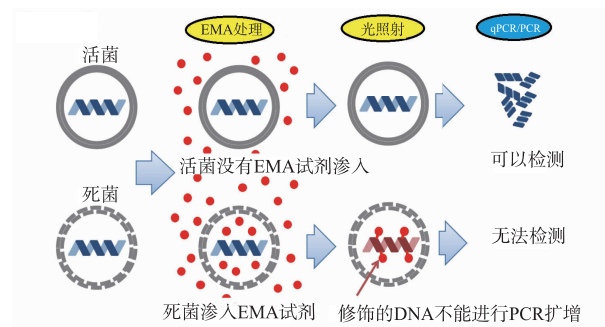


图 1 检测单增李斯特氏菌活菌示意图

Fig. 1 Overall process of EMA-qPCR assay for detection of live *Listeria monocytogenes*

2.2 qPCR 检测特异性

实验重要因素是引物、TaqMan 探针对编码李斯特溶血素 O (LLO) 基因 *hly* 灵敏性和特异性。通过检测 56 株常见的致病菌, 包括 *L. monocytogenes*、李斯特菌属、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌 O157、蜡样芽胞杆菌等, 结果仅有 *L. monocytogenes* 准确扩增检测, 其他菌株的 *C_t* 值均大于 35 或无 *C_t* 值 (无信号), 无交叉反应, 表明方法有高度特异性, 见表 2。

2.3 最适 EMA 质量浓度

随着 EMA 质量浓度的增大, 热致死

表2 验证 qPCR 方法检测 *L. monocytogenes* 特异性菌株
Table 2 Strains used for validation in qPCR assay for identification of *Listeria monocytogenes*

菌种名称	菌株编号	数量	实验结果
单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC 19115	2	+
	CMCC 54002	1	+
	分离株	8	+
斯氏李斯特氏菌	ATCC 35967	1	—
	CICC 21671	1	—
伊氏李斯特氏菌	ATCC19119	1	—
	CICC 21663	1	—
英诺克李斯特氏菌	ATCC33090	1	—
	CICC 10417	1	—
威氏李斯特氏菌	ATCC 35897	1	—
伤寒沙门氏杆菌	ATCC 14028	1	—
	CMCC50071	1	—
	分离株	4	—
金黄色葡萄球菌	ATCC 35967	1	—
	CMCC 26003	1	—
	分离株	5	—
大肠埃希氏菌 O157:H7/NM	NCTC 12900	1	—
	ATCC35150	1	—
肠道致病性大肠埃希氏菌	CICC 24189	1	
肠道侵袭性大肠埃希氏菌	CICC 24188	1	—
肠道出血性大肠埃希氏菌	CICC 24187	1	—
肠道集聚性大肠埃希氏菌	CICC 24186	1	—
产肠毒素大肠埃希氏菌	CICC 10667	1	—
产志贺毒素大肠埃希氏菌	CICC 10668	1	—
铜绿假单孢菌	CICC21636	1	—
	ATCC9721	1	—
	分离株	5	
大肠杆菌	ATCC 25922	1	—
阪崎肠杆菌	ATCC 29544	1	—
	分离株	5	—
蜡样芽孢杆菌	ATCC51189	1	—
	CMCC63301	1	—
枯草芽孢杆菌	ATCC6633	1	—
总计		56	

注:ATCC: 美国种质保藏中心;NCTC: 英国典型菌种保藏中心;CICC: 中国工业微生物菌种保藏管理中心;CMCC: 中国医学细菌保藏管理中心。

L. monocytogenes 的 C_t 值增加。当 EMA 质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 有效抑制热致死菌 DNA 扩增, EMA 无法进入活菌细胞内, C_t 值增幅可以忽略, 与未处理的热致死菌相比, C_t 值相差 6。EMA 质量浓度大于 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 死菌 C_t 值增幅不明显, 影响效果接近饱和; EMA 进入活菌影响结果, 活菌 C_t 值增加。选取最适质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 经过 EMA 处理样品菌液 qPCR 结果增加 5 以上, 判定含有 *L. monocytogenes* 死菌, 见图 2—3。

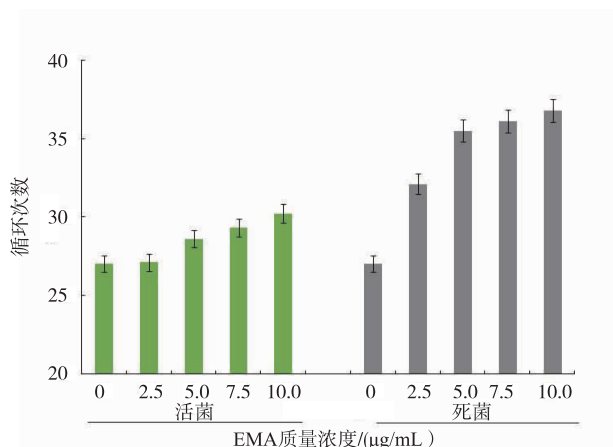


图2 不同质量浓度 EMA 对活及热致死 *L. monocytogenes* 影响

Fig. 2 Effect of different EMA concentrations on qPCR signals of live and heat-killed *Listeria monocytogenes*

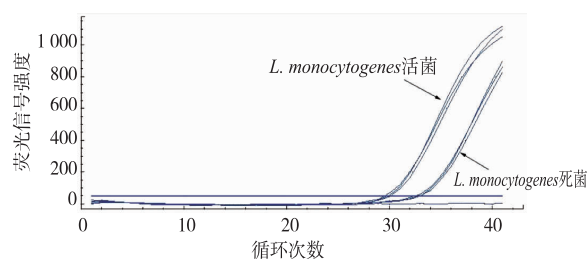


图3 比较 EMA 质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 对活及热致死 *L. monocytogenes* 的 qPCR 扩增

Fig. 3 Comparison of DNA amplification of live and heat-killed *Listeria monocytogenes* treated with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ EMA in the qPCR assay

2.4 检出限

将 0.5 麦氏浊度 *L. monocytogenes* (约 1.5×10^8 CFU/mL) 活菌 10 倍梯度稀释, 用质量浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$ EMA 处理菌液, 与未处理菌液进行 qPCR 实验。结果显示, EMA 处理与未处理 qPCR 结果近似, 低质量浓度 EMA 影响较小, 标准曲线 $R^2=0.991$ 。菌液浓

度为150 CFU/mL时,实验结果 C_t 值为 34.7。EMA-qPCR 方法检测 *L. monocytogenes* 的检出限为 150 CFU/mL,见图 4。

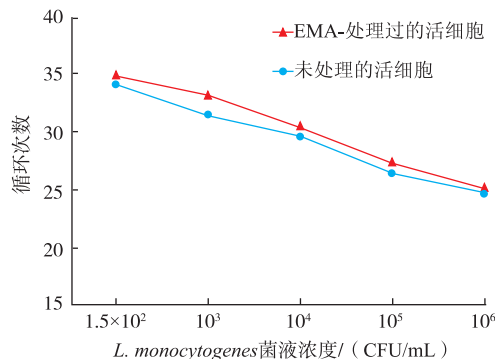


图 4 *L. monocytogenes* 活菌 10 倍梯度稀释 2.5 μ g/mL EMA 处理和未处理 qPCR 检测结果

Fig. 4 A serial of 10-fold-diluted live *Listeria monocytogenes* cell dilutions were treated with EMA or without EMA

2.5 SD 增强 EMA-qPCR 效果

当 SD 体积分数由 0.01% 增至 0.1%, EMA-qPCR 检测结果显示, *L. monocytogenes* 活菌 C_t 值增加。SD 体积分数为 0.1% 时, 活菌 C_t 值为 31。分析原因, *L. monocytogenes* 属于革兰氏阳性菌, 对胆盐敏感, 胆盐通常作为分离革兰氏阴性菌抑制剂, 如沙门氏菌、肠出血性埃希氏菌分离培养时使用^[19]。高体积分数 SD 导致活 *L. monocytogenes* 细胞膜受损, EMA 进入菌体, 影响 qPCR 检测。结果说明 SD 不适合 *L. monocytogenes* 作为 EMA-qPCR 方法的前处理, 见图 5。

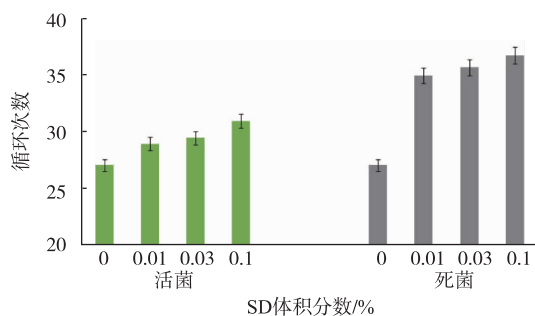


图 5 不同体积分数 SD 处理对 *L. monocytogenes* 活菌、热致死菌 EMA-qPCR 检测影响

Fig. 5 Effect of exposure of live and heat-killed *Listeria monocytogenes* to EMA in the presence of different concentrations of sodium deoxycholate (SD)

2.6 人工污染样品

人工污染样品包括 18 份卤鸡肉、19 份牛奶、29 份肉馅和 8 份垃圾渗滤液, 共计 73 份。阴性样本加入热致死 *L. monocytogenes*, EMA-qPCR 方法快速鉴别与传统培养法一致, 共计 42 份阳性样本, 30 份阴性样本, 结果准确率 100%, 表明本方法良好的实用性和可靠性, 见表 3。

表 3 EMA-qPCR 方法和传统培养法检测人工污染 *L. monocytogenes* 样品结果

Table 3 Result of EMA-qPCR method compared to the traditional culture method for identification of *Listeria monocytogenes* in artificial contaminated samples

样品种类	样品数量	传统培养法 (GB4789.30-2016)		<i>L. monocytogenes</i> EMA-qPCR		准确性 / %
		阳性	阴性	假阴性	假阳性	
卤鸡肉	18	12	6	0	0	100
牛奶	19	11	8	0	0	100
肉馅	28	15	13	0	0	100
垃圾渗滤液	8	5	3	0	0	100
总数	73	43	30	0	0	100

3 结 语

近年来, 国家市场监督管理总局组织食品安全抽检显示, 微生物污染问题占比较大, 许多产品不合格由微生物造成, 餐饮领域、环境污水检测致病菌都缺少高效方法。因此, 建立快速准确的检测方法对食品安全和环境保护有重要意义。王静等^[20]应用 PMA-ddPCR 方法检测食品中 106 CFU/mL 灭活沙门氏菌。本研究可直接用 qPCR 方法检测 *L. monocytogenes*, 也可以结合 EMA 处理检测 *L. monocytogenes* 活菌, 打消 PCR 方法无法检测活菌的疑虑。与传统培养法 5~8 d 相比, EMA-qPCR 检测方法 24 h 完成 (包括前增菌、DNA 提取、EMA 处理和 qPCR 实验), 期待可成为标准检测方法, 未来应用于批量检测样品的自动化仪器。

参考文献:

- [1] ALLENDE A, BEATRIZ M, VICTORIA S, et al. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce[J]. **Food Microbiology**, 2005,24(7):759-66.
- [2] VIVIAN L Y, VALERIA R P, JEFFREY M F. Current understanding and perspectives on *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods[J]. **Current Opinion in Food Science**, 2019, 26: 18-24.
- [3] SARA L, DANIELE N, VIRGINIA F. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States [J]. **Infection, Genetics and Evolution**, 2015, 35: 172-183.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 29921-2013 食品安全国家标准 - 食品中致病菌限量 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [5] ANAIS A, NATHALIE G B. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food[J]. **Food Microbiology**, 2016, 2 (53B):135-149.
- [6] MAGALHAES R, CRISTINA M, VANIA F, et al. Traditional methods for isolation of *Listeria monocytogenes* [J]. **Methods of Molecular Biology**, 2014, 11: 15-30.
- [7] ANNA- LIISA V, TILSALA-TIMISJARVI A, ELINA V. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain[J]. **Food Control**, 2015, 55(9): 103-114.
- [8] LIU A P, XIONG Q, SHEN L, et al. A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment[J]. **Food Control**, 2017, 79: 156-161.
- [9] LE MONNIER A, ERIC A, JEAN-LUC B, et al. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by Real-Time PCR for the *hly* gene[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2011, 49(11): 3917-3923.
- [10] BRANDON R, THANDO N, KHAN S, et al. Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017, 101(19): 7371-7383.
- [11] GERARD A C, MESCHKE J S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80 (19): 5884-5891.
- [12] CASINI B, BAGGIANI A, TOTARO M, et al. Detection of viable but non-culturable legionella in hospital water network following monochloramine disinfection[J]. **Journal of Hospital Infection**, 2018, 1(98):46-52.
- [13] WANG L J, LI P, ZHANG Z H, 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.
- [14] PAOLA C, LAURA F P, CRISTINA L, et al. Development of 23 individual TaqMan real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions[J]. **Food Microbiology**, 2014, 43: 35-40.
- [15] RODRIGUEZ-LAZARO D, MARTA H N, MARIELA S, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin* 02483 targets and ampli fluor technology[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004: 1366-1377.
- [16] MELANIE A, RIBET D, FABRIZIA S, et al. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*[J]. **Trends in Microbiology**, 2012, 8(20):360-368.
- [17] 中华人民共和国国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [18] BRANDON R, THANDO N, KHAN S, et al. Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017, 101(19): 7371-7383.
- [19] MARGOTA H, ZWIETERINGB M H, JOOSTENCE H, et al. Evaluation of different buffered peptone water (BPW) based enrichment broths for detection of Gram-negative foodborne pathogens from various food matrices[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2015, 214 (2): 109-115.
- [20] 王静, 秦燕, 张慧敏, 等. PMA 结合 ddPCR 检测食品中沙门氏菌[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(10): 1059-1063.