

食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展

A review of the development in pretreatment methods for PCR detection of food-borne pathogens

白亚龙 索玉娟 周昌艳

BAI Ya-long SUO Yu-juan ZHOU Chang-yan

(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403)

(Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of
Agricultural Science, Shanghai 201403, China)

摘要:以 PCR(聚合酶链式反应)为代表的分子检测方法被广泛应用于食源性致病菌的快速检测,然而,在复杂的食品介质中实现微量致病菌的精确与快速检测,除了 PCR 体系构建之外,前处理方法也是快速检测的重要制约因素。文章对食源性致病菌 PCR 检测的前处理方法(包括离心、膜过滤、磁性分离等)进行了系统的综述,尤其较为深入地综述了磁性分离在 PCR 检测食源性致病菌前处理中的应用。

关键词:食源性致病菌;前处理;聚合酶链式反应;离心;膜分离;磁性分离

Abstract: Molecular detection methods based on PCR (polymerase chain reaction) are widely used in the rapid detection of food-borne pathogens. However, in practical applications pretreatment method is also a critical step in rapid detection except the optimization of PCR. In this review, the pretreatment methods (including the centrifugation, membrane filtration, magnetic separation) for PCR detection of food-borne pathogens were systematically summeried. In particular, the magnetic separation was emphatically reviewed in the PCR detection of food-borne pathogens.

Keywords: foodborne pathogens; pretreatment; PCR; centrifugation; membrane separation; magnetic separation

致病性微生物引起的食源性疾病是食品安全的首要问题。近年来,大规模的食源致病菌污染事件屡屡发生,已成

基金项目:国家农产品质量安全风险评估项目计划(编号: GJFP201701304);上海市科技兴农重点攻关项目[编号:沪农科攻字(2015)第 4-5 号];上海市农委(兴农推广-成长计划)[编号:沪农青字(2017)第 1-28 号]

作者简介:白亚龙,男,上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所助理研究员,博士。

通信作者:周昌艳(1971—),女,上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所研究员,博士。

E-mail: changyanz@sina.com

收稿日期:2017-10-05

为世界性公共卫生安全问题。据 2015 年 12 月 WHO 发布的《全球食源性疾病负担的估算报告》,每年 10 人中就有 1 人因被污染的食物生病,总人数约为 5.5 亿,并导致 42 万人死亡。其中,腹泻病占全球食源性疾病的 50% 以上,造成每年 23 万例死亡^[1]。腹泻病通常是因为食用被弯曲杆菌、非伤寒沙门菌、致病性大肠杆菌和诺如病毒等污染的生的或未煮熟的肉、蛋、新鲜农产品和乳制品等造成的。

目前,食源性致病菌检测的“金标准”依然是培养法^[2-4],但因耗时长,在实际应用中仍有一定的局限性。一般要经过前增菌、选择性增菌、选择性平板分离、生化鉴定、血清学鉴定 5 个步骤,往往需要 4~7 d,甚至更长时间才能做出最终鉴定^[5]。在食品行业,生产、加工、运输、贮藏等环节都应该进行行之有效的监控,传统的培养法无法满足这种快速需求,建立快速、灵敏的食源性致病菌检测方法来保证食品供应的安全性日渐需要。快速检测的灵敏度也可以满足一些致病菌(如金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌等)的限量标准,这使得快速检测更有用武之地。

在食源性致病菌的快速检测中,以 PCR 为代表的分子检测技术占有重要地位。遗传物质是生命物质的关键核心,随着基因组学、计算机技术等领域的发展,以 PCR 为代表的分子检测技术将在致病菌检测中发挥越来越强大的优势。通过比较基因组学,不但寻找到种属、血清型,甚至菌株特异性的靶点序列,还可以检测毒素基因、耐药基因等。不过,虽然 PCR 可以在 1 h 左右将目标序列从几个拷贝扩增到 10^8 倍,但是用 PCR 检测食源性致病菌时,食品成分对反应体系的干扰与微量的致病菌核酸的难以分离,导致分子检测的优势无法彻底发挥。所以,从复杂的食品介质中分离或富集目标致病菌(或核酸)是食源性致病菌分子检测的一个重要瓶颈,本文就食源性致病菌 PCR 检测方法的前处理方法展开综述。

1 培养增菌

致病菌是活的生物物质,为了得到大量的可检测致病菌,可以取一定量食品在培养基中进行培养增菌。培养增菌还可以简化介质,减少复杂食品介质对PCR的抑制影响。Yang等^[6]发现,食品样品本身以及其他非目标菌的核酸等会对PCR检测造成严重抑制,在生肉和火腿中即使单增李斯特菌残留量达到 10^7 CFU/g的水平,依然无法检测到。因此,增菌常常是PCR检测不可缺少的步骤。Zhou等^[7]经过18 h增菌处理,可以应用反转录荧光定量PCR检测鸡蛋或者牛奶中1 CFU/mL活的沙门氏菌残留。Lee等^[8]经过12 h增菌,用六重PCR同时检测沙门氏菌等6种食源性致病菌,检出限可达到1 CFU/mL的水平。

在生产、运输或者贮存过程中食品样品除了受目标检测菌污染之外,可能还含有大量杂菌,因此,对于这些样品除了用非选择性培养基(如缓冲蛋白胨水、胰蛋白胨大豆肉汤以及营养肉汤等)培养以外,还需要选择性培养基进行目标菌的特异性增菌。食品在生产、运输、贮存、销售等过程中,污染到的致病菌可能处于不同的状态,增菌培养不仅可以增加目标检测物的数量,还可以对目标菌的损伤和不良状态进行修复。然而一些选择性的培养基会对损伤或者不良状态的致病菌生长有抑制作用,所以通常在选择性培养之前需要非选择性培养^[9-10]。

多重PCR可以同时检测几种致病菌,但是每种培养基针对不同致病菌的培养速率是不一致的,所以,开发通用型预增菌培养液使其可应用于多种食源性致病菌的同时增菌培养也是致病菌检测中的一个研究热点。Suo等^[11]开发了一种SEL培养液可以同时用于损伤修复与培养 *Salmonella* spp.、*E. coli* O157:H7 和 *L. monocytogenes* 3种致病菌,而且这种培养液含有抑制其他菌生长的物质,因此可以使得这3种菌成为主要生长菌。

目前,对于分子检测食源性致病菌方法而言,广泛采用的前处理方式依然是培养增菌。优点是可以实现较低的食源性致病菌污染检测(如1 CFU/25 g的水平),这种检出限是非增菌培养的方法无法达到的,而且一般可以排除死菌干扰。此外,经过增菌培养的食源性致病菌核酸提取也更为容易与高效,但培养时间较长,而且也无法定量致病菌初始残留数目。

2 离心

2.1 普通离心

对于食品样品,常规离心并不能作为单独的浓缩方法,而是有效的辅助手段。对于一些液态食品,如饮用水、果汁、牛奶、饮料等,可以通过高速离心将菌体进行初步浓缩。对于复杂的固体或半固体食品介质(如肉、禽类、水产品等),可以在均质后先低速离心除去颗粒的食品介质,然后采用高速离心浓缩到目标菌体。对大多数食品样品而言,经过离心处理,虽然可以进行初步浓缩,但是仍然含有大量的杂质成分,并不适合直接提取核酸。往往还需要与其他分离手段相互

结合,如免疫磁珠分离、密度梯度离心等。

2.2 密度梯度离心

分子检测前处理的重要目的是:①有效浓缩目的菌体;②尽可能去除其他杂质。杂质的存在会影响后续核酸的分离纯化,还可能因为含有抑制剂而导致不能产生检测信号。密度梯度离心法是利用试剂在离心之后产生不同的密度梯度,大多数食品介质的颗粒物密度较轻,经过低速离心处于上层而优先被除去,而菌体往往处于特定的密度梯度范围,从而有效地将目标菌体进行富集。Wolffs等^[12]用密度梯度离心法处理鸡肉中的空肠弯曲杆菌,发现虽然不同生长状态的菌体密度有所不同,但是大都处于 $1.065\sim 1.109$ g/mL。最终结合qPCR的检测限为 8.6×10^2 CFU/mL,最低定量限为 2.6×10^3 CFU/mL。此外,Wolffs等^[13]也用密度梯度离心法检测了猪肉中的结肠炎耶尔森杆菌,结合qPCR的检测限为 4.2×10^3 CFU/mL,当存在 10^6 CFU/mL的杂菌时对检测结果没有影响。密度梯度离心操作简便,只需要反复离心,死菌的干扰也可以被有效去除^[12]。但是反复离心也可能会造成目标菌体的损失,最终收集到的菌体也会不可避免地掺杂一些密度相似的杂质,最终的检出限仍然偏高。

3 膜分离

膜过滤方法同样也是为了去除食品颗粒和浓缩目标菌体而进行的前处理方法。Wolffs等^[14]用两步过滤法处理碎鸡肉漂洗液和豆芽萌用水来检测其中的沙门氏菌,先用 $40\ \mu\text{m}$ 孔径以上的膜过滤去除大的食品颗粒,再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径的膜收集菌体,生理盐水洗脱目标菌体之后进行以SYBR Green为染料的qPCR检测,检测限可以达到 7.5×10^2 CFU/100 mL样品的水平。这种方法不需要前增菌也不需要提取核酸,时间大大缩短,可以在3 h之内完成检测。Rodríguez等^[15]用 $11\ \mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤食品均质物,再用Chelex-100提取DNA,最后用qPCR检测生猪肉、熏火腿、熏香肠等食品中的单增李斯特菌,检测限可以达到 10^3 CFU/mL的水平。膜分离技术虽然有了一定的研究,但操作复杂,不适合批量样品检测,而且还存在交叉污染的风险。

4 磁性分离

相对于其他分离手段而言,磁性分离具有一定的优势,可以较为彻底地去除食品介质中的一些抑制物,甚至可以只分离得到目标菌体(或目标菌的核酸)而弃掉其他杂质,所以,在食源性致病菌检测中得到高度的重视与广泛的探究。

4.1 磁性分离菌体

如果不进行增菌或者分离,直接对肉类样品进行处理后提取核酸进行PCR检测,达不到较好的灵敏度。众多报道^[16-17]表明,蛋白质、短肽、脂肪、多糖、氨基酸、金属离子、盐浓度、pH、酚类等物质,以及样品的黏稠度都会影响PCR的灵敏度。因为抽提核酸过程无法排除所有干扰物。磁性纳米粒子分离致病菌回收率并不是很高,但能有效减少PCR的干扰物,而理论上,PCR可以在极短时间内将几个拷贝的

靶 DNA 特异地扩增上百万倍。大多数应用于分离的磁性材料具有超顺磁性,即在通常情况下没有磁力,而在外加磁场下表现出磁性。在没有磁场的情况下可以充分地分散在溶液中,与目标物相互结合,之后在外加磁场下聚集于容器一侧,只需要弃去溶液和洗涤就可以最大限度地排除抑制物,而少量的磁性收集物就是高浓度的目标分离物。磁性材料只是载体,只有标记上能够识别菌体的生物分子才能进行捕获,目前能够充当识别材料的生物分子一般有抗体、适配体、小分子材料、核酸探针等。

4.1.1 免疫磁珠分离致病菌 免疫磁珠是指标记了抗致病菌抗体的磁珠,抗致病菌抗体与致病菌通过抗原抗体反应相互结合,利用磁性材料的磁性可以达到将致病菌分离与富集的目的。免疫磁珠分散于食品处理液中充分混合,然后用外加的磁铁将结合了致病菌的免疫磁珠吸附于容器一侧,弃去溶液,提取磁性富集之后致病菌中的核酸,就可以进行 PCR 检测。免疫磁珠和 PCR 技术联合应用既能实现快速检测,又具有较高的灵敏度。Chen 等^[18]用免疫磁珠分离婴幼儿奶粉中的阪崎肠杆菌,结合 PCR 检测,无需增菌灵敏度可以达到 5.2×10^2 CFU/mL。Amagliani 等^[19]用免疫磁珠分离检测乳制品中的单增李斯特菌,结合 PCR 检测,灵敏度可以达到 10 CFU/mL。Luo 等^[20]用免疫磁珠分离巴氏杀菌奶中的单增李斯特菌,结合 PCR 检测,检测限为 80 CFU/mL。

4.1.2 标记了适配子的磁性粒子分离致病菌 核酸适配子是一小段经体外筛选(SELEX 技术)得到的寡核苷酸序列,能与相应的配体进行高亲和力和强特异性的结合。在某种意义上来说,适配子和抗体的功能类似,都可以特异性地和目标物相互结合,不同的是:抗体是由氨基酸序列组成,而适配子是由核苷酸序列组成;抗体通过免疫动物机体得到,适配子通过体外多轮筛选获得。相对于抗体来说,适配子经过筛选之后就可以稳定地合成,可以最大限度地保证相应产品的批次误差最小化。Suh 等^[21]用适配体标记的磁珠结合 qPCR 检测空肠弯曲杆菌发现检测限比免疫磁珠结合 qPCR 低 1 个数量级。Suh 等^[22]还用标记了适配子的磁珠分离单核细胞增生李斯特菌结合 PCR 检测,检测限 < 60 CFU/500 μ L,回收率为 26%~77%,而免疫磁珠的回收率为 16%~21%。显然和免疫磁珠相比,磁性适配子分离致病菌更具潜力。

4.1.3 抗菌物质标记磁性粒子分离致病菌 除了用特异性的磁珠分离相应致病菌以外,可以同时分离多种致病菌的分离磁珠也是研究的热点之一。一些抗菌物质能够抗菌是因为能与致病菌表面的一些生物结构相互结合,因此,将其与磁性粒子结合可以起到捕获致病菌的作用。Kell 等^[23]研究发现万古霉素修饰的磁性纳米粒子对革兰氏阴性菌具有很好的分离效果。Meng 等^[24]用万古霉素修饰的磁珠捕获生菜中的单增李斯特菌,然后用 PCR 进行检测,检出限可以达到 30 CFU/g,在 4 h 之内可以得到检测结果。除了万古霉素之外,其他的能与菌体表面结合的抗生素或者抗菌物质是否也有这种分离能力,可作为后续致病菌分离的研究方向。

4.1.4 其他磁性粒子分离致病菌 除了上述这些类型的分

离磁珠之外,还有一些其他的经过改性或者生物标记的磁珠用于致病菌分离。Huang 等^[25]报道了用氨基修饰的硅包 Fe_3O_4 磁性纳米粒子分离水和饮料中的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等多种革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,分离效率可以达到 88.5%~99.1%;El-Boubbou 等^[26]用甘露糖标记磁性纳米粒子,结果表明这种磁珠可以在 5 min 之内分离到 88% 的大肠杆菌;Erin 等^[27]用载脂蛋白 H 标记磁性纳米粒子,用以分离单增李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌,用 qPCR 进行检测,分离效率 $> 10\%$ 。这些生物分子标记的磁珠易于质控,虽然它们不能像抗体那样特异性地区分某个特定的种属或者菌株,但是特异性可以由分子检测来进行保证,这种广泛性更是抗体等无法比拟的,因此,这类磁珠的研究与开发也会是未来的热点方向之一。

4.2 磁性分离核酸

4.2.1 非生物标记的磁性纳米粒子提取基因组核酸 用磁性纳米粒子提取致病菌核酸可以减少常规提取方法的一些步骤(如沉淀、晾干等),时间更短,也会减少有机试剂的应用。早在 1990 年,Boom 等^[28]发现核酸(包括 dsDNA、ssDNA 与 rRNA 等)在高盐与低 pH 条件下可以吸附于硅表面,而在低盐与高 pH 条件下释放核酸。带有磁性的硅包磁性纳米粒子则比硅珠更具有快速与简单分离核酸的优势^[29]。Li 等^[30]发现多孔的硅包材料具有更强的 DNA 吸附能力,硅是通过表面与核酸结合,多孔材料具有更大的总表面积。此外,Chiang 等^[31]发现硅包磁性纳米粒子也可以很好地分离质粒 DNA,仅仅 8 min 就可以完成分离,而且产量比其他方法更高,RNA 污染更少。此外,也有尝试将硅包磁性纳米粒子进行改性来提高核酸分离能力的。Kang 等^[32]报道改性的磁性纳米粒子显著提高了 DNA 的分离能力,比硅包磁性纳米粒子高 4~5 倍。羧基修饰的磁性纳米粒子也具有 DNA 分离能力,和硅包磁性纳米粒子类似,羧基修饰的磁性纳米粒子也是在高盐下吸附,在低盐下解吸附^[33]。也有一些研究者将硅包磁性纳米粒子吸附了 DNA 之后的复合物直接添加到 PCR 中,Tang 等^[34]用硅包磁性纳米粒子吸附铜绿假单胞菌基因组 DNA,经过漂洗之后,磁性复合物直接进行巢式 PCR,检测限可以达到 10 CFU/mL。Tang 等^[35]还用硅包磁性纳米粒子吸附绿脓杆菌基因组 DNA,漂洗之后磁性复合物进行 PCR,再结合化学发光检测,灵敏度也可以达到 10 CFU/mL。虽然磁性纳米粒子会对 PCR 造成一定的抑制作用,但通过调整 PCR 成分会减少这种抑制。与此同时,Bai 等^[36]发现氨基化硅包磁性纳米粒子吸附 DNA 更有独特的优势,在适合 PCR 的环境中,氨基化硅包磁性纳米粒子可以吸附微量的 DNA,将氨基化硅包磁性纳米粒子与 DNA 复合物直接添加进 PCR 体系可以保证更高的分离效率;将氨基化磁性纳米粒子吸附牛奶处理物中的沙门氏菌和单增李斯特菌的基因组 DNA,结合多重 PCR 检测,灵敏度均可以达到 10 CFU/mL。同时,Bai 等^[37-38]还发现过多的纳米粒子会抑制 PCR 主要是因为纳米粒子表面会吸附 PCR 成分,如果将纳米粒子表面进行封闭,可以消除这种抑

制作用。

4.2.2 标记了核酸捕获探针的磁性粒子分离致病菌的靶标序列 除了非生物标记的磁性纳米粒子提取核酸以外,还有进行了核酸序列标记的以杂交为基础的磁性分离方式,进行不同的标记既可以分离 DNA 还可分离 mRNA。

(1) 磁性杂交捕获探针分离 DNA:杂交捕获磁珠是在磁性纳米粒子上连接 20~30 个碱基长度的捕获序列,这段序列和致病菌目标序列互补,两者结合后进行磁性分离,得到的是致病菌的一段靶序列,可以对这段序列直接进行 PCR 检测。捕获序列与磁珠之间需要“间隔臂”连接,适当长度的“间隔臂”能保证较好的杂交分离率。Amaglini 等^[39]用氨基修饰的磁性纳米粒子连接 21 个碱基的捕获序列,其中,“间隔臂”为 6 个亚甲基和 6 个胞嘧啶,磁性分离靶序列,最终结合 PCR 检测。以牛奶中的单增李斯特菌进行检测为例,灵敏度为 10 CFU/mL。由于细菌基因组 DNA 过于庞大,纯化后结构也趋于复杂,即使经过热变性之后也很难确保目标杂交序列保持单链裸露状态,所以想杂交捕获 10 拷贝如此低的浓度存在一定的难度。

(2) 磁性杂交捕获探针分离 RNA:真核生物的 mRNA

的 3'端存在一段多聚 A 序列,所以可以通过在磁性粒子上标记一段多聚 T 序列,两者通过杂交相互结合,从而达到磁性分离的目的^[40]。但是对于细菌这样的原核生物,要么多聚 A 很短,要么没有多聚 A,因此,这种方法并不适合细菌的 mRNA 分离,不过也可以在磁珠上标记与目标 mRNA 互补的一段序列捕获目标 mRNA。Jacobsen 等^[41]将一段与沙门氏菌 mRNA 互补的寡核苷酸标记在磁性粒子上,以捕获沙门氏菌的 mRNA 序列,然后通过反转录 qPCR 进行定量检测,最低检测限可以达到 5×10^4 CFU/g 的水平。磁性核酸探针直接从食品样品的处理物中分离核酸,减少了核酸纯化的步骤,可以简化检测过程,缩短检测时间。这也是快速分离的一个方向,值得更深入的研究。

以上各种磁性分离方法的优缺点汇总见表 1,总的来说,磁性分离在致病菌前处理方面具有明显的优势,可以快速有效地去除干扰物与浓缩目标物,无论是与分子检测方法还是其他检测方法结合都具有巨大的潜力,是致病菌快速检测研究的一个重要方面。尤其是基于适配子的磁性分离方法,目前有大量的研究人员将注意力聚焦于此,极有希望基于此开发大量的商业化检测产品。

表 1 各种磁性分离方法的优缺点汇总

Table 1 The characteristics of the magnetic separation methods

目标物	方法	识别物	识别原理	优点	缺点
菌体	免疫磁珠	抗致病菌抗体	抗原抗体反应	特异性强	高性能抗体制备较难,成本较高
	适配子磁珠	适配子	适配子与配体识别	特异性强,制备相对简单,容易标准化	方兴未艾,需要更多的研究以便商品化产品开发
	标记抗菌物质	抗生素等	有些抗生素与细菌相互作用	制备简单,产品稳定,可以针对多种细菌	对一些菌种可能分离效率不高
	其他(以氨基修饰磁珠为例)	氨基	静电结合	制备简单,产品稳定,可针对多种菌	容易受环境介质干扰
		氨基	静电、氢键作用等	制备简单,产品稳定,可以进行微量检测	不能区别死菌和活菌
核酸	非标记的磁珠			制备简单,已经有大量的商业化产品	不适于微量检测
	标记的磁珠	ssDNA	杂交	可以分离 DNA,也可以分离 RNA	分离效率不高

5 结论与展望

PCR 具有极强的体外扩增能力,一般可以在 1 h 左右将几个拷贝的核酸分子扩增到 10^8 倍,所以,在生命物质的检测领域非常具有吸引力,如疾病诊断、法医鉴定、生物分类、甚至是考古等领域。但是,当 PCR 应用于食品样品中致病菌污染快速检测时,会遇到新的问题:食品样品极其复杂,往往含有大量的 PCR 抑制物,并且大多数致病菌污染限量又往往非常苛刻,要求不得检出,也就是说,如何从复杂的食品介质中得到极其微量而纯度又高的致病菌核酸是一个难题。所以,前处理在 PCR 检测食源性致病菌中具有极为重要的作用。目前大量的检测食源性致病菌的文章主要是针对

PCR 本身的优化与构建,对于前处理的研究还远远不够。从现有的研究来看,磁性分离在食源性致病菌前处理方面极具潜力,可以最大程度地弃去杂质及 PCR 抑制物,尽可能地捕获到微量的目标物。在今后的发展中,磁性分离食源性致病菌的高效化、自动化、标准化也是需要努力的方向。

参考文献

[1] WHO estimates of the global burden of foodborne diseases[R]. Geneva: World Health Organization, 2015.

[2] ROHDE A, HAMMERL J A, BOONE I, et al. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens[J]. Trends in Food Science & Technology,

- 2017, 62: 113-118.
- [3] COCOLIN L, RANTSIU K. Advances in the detection of food-borne pathogens using molecular methods[J]. Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques, 2016, 56(9): 1 519-1 531.
 - [4] CHEN Qi, LIN Jian-han, GAN Cheng-qi, et al. A sensitive impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for rapid detection of *Listeria monocytogenes* using an immobilization-free interdigitated array microelectrode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 74(12): 504-511.
 - [5] BRANDÃO D, LIÉBANA S, PIVIDORI M I. Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles[J]. New Biotechnology, 2015, 32(5): 511-520.
 - [6] YANG Hua, QU Liang-wei, WIMBROW A N, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 118(2): 132-138.
 - [7] ZHOU Min, YANG Jie-lin, ZHOU Xiu-juan, et al. Development of a sigDE-Based real-time reverse-transcriptase PCR for the detection of viable *Salmonella enterica* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 537-544.
 - [8] LEE N, KWON K Y, OH S K, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 574-580.
 - [9] JAMALI H, CHAI L C, THONG K L. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media[J]. Food Control, 2013, 32(1): 19-24.
 - [10] BANGE J, BRUMFIELD E, ELLISON A L. Recovery and enumeration of *Staphylococcus aureus* by the selective agar[J]. Fine Focus, 2016, 2(1): 51-59.
 - [11] SUO Biao, WANG Yue-xia. Evaluation of a multiplex selective enrichment broth SEL for simultaneous detection of injured *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44: 737-742.
 - [12] WOLFFS P, NORLING B, HOORFAR J, et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5 759-5 764.
 - [13] WOLFFS P, KNUTSSON R, NORLING B, et al. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 1 042-1 047.
 - [14] WOLFFS P F, GLENCROSS K, THIBAudeau R, et al. Direct quantitation and detection of *Salmonella* in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3 896-3 900.
 - [15] RODRÍGUEZ L D, JOFRÉ A, AYMERICH T, et al. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6 299-6 301.
 - [16] KIM J S, TAITT C R, LIGLER F S, et al. Multiplexed magnetic microsphere immunoassays for detection of pathogens in foods[J]. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, 2010, 4(2): 73-81.
 - [17] HU Qing-hua, LYU D, SHI Xiao-lu, et al. A modified molecular beacons-based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of eight foodborne pathogens in a single reaction and its application [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(3): 207-214.
 - [18] CHEN Qi-ming, LI Yuan-hong, TAO Ting-ting, et al. Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation-PCR detection method for *Cronobacter* spp[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(2): 961-969.
 - [19] AMAGLIANI G, BRANDI G, OMICCIOLI E, et al. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR[J]. Food Microbiology, 2004, 21(5): 597-603.
 - [20] LUO Dan, HUANG Xiao-Lin, MAO Yan, et al. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7 883-7 890.
 - [21] SUH S H, DWIVEDI H P, JAYKUS L A. Development and evaluation of aptamer magnetic capture assay in conjunction with real-time PCR for detection of *Campylobacter jejuni*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(2): 256-260.
 - [22] SUH S H, JAYKUS L A. Nucleic acid aptamers for capture and detection of *Listeria* spp[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(4): 454-461.
 - [23] KELL A J, STEWART G, RYAN S, et al. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. ACS Nano, 2008, 2(9): 1 777-1 788.
 - [24] MENG Xiang-yu, LI Fu-lai, LI Fan, et al. Vancomycin modified PEGylated-magnetic nanoparticles combined with PCR for efficient enrichment and detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 247: 546-555.
 - [25] HUANG Yan-feng, WANG Ya-fan, YAN Xiu-ping. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(20): 571-583.
 - [26] EL-BOUBBOU K, GRUDEN C, HUANG Xue-fei. Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(44): 13 392-13 393.
 - [27] ALMANDE A, GOULTER R M, JAYKUS L Ann. Capture and concentration of viral and bacterial foodborne pathogens u-

- sing apolipoprotein H[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 128: 88-95.
- [28] BOOM R C, SOL C J, SALIMANS M M, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(3): 495-503.
- [29] TAYLOR J I, HURST C D, DAVIES M J, et al. Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 890(1): 159-166.
- [30] LI Xu, ZHANG Ji-xi, GU Hong-chen. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles[J]. Langmuir, 2011, 27(10): 6 099-6 106.
- [31] CHIANG Chen-li, SUNG Ching-shan, CHEN Chuh-yeen. Application of silica-magnetite nanocomposites to the isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2006, 305(2): 483-490.
- [32] KANG K, CHOI J, NAM J H, et al. Preparation and characterization of chemically functionalized silica-coated magnetic nanoparticles as a DNA separator[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 113(2): 536-543.
- [33] KRÍŽOVÁ J, ŠPANOVÁ A, RITTICH B, et al. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 064(2): 247-253.
- [34] TANG Yong-jun, ALI Z, ZOU Jun, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* based on magnetic enrichment and nested PCR[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014, 14(7): 4 886-4 890.
- [35] TANG Yong-jun, ZOU Jun, MA Chao, et al. highly sensitive and rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* based on magnetic enrichment and magnetic separation[J]. Theranostics, 2013, 3(2): 85-92.
- [36] BAI Ya-long, SONG Ming-hui, CUI Yan, et al. A rapid method for the detection of foodborne pathogens by extraction of a trace amount of DNA from raw milk based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles and polymerase chain reaction[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 787: 93-101.
- [37] BAI Ya-long, CUI Yan, PAOLI G C, et al. Nanoparticles affect PCR primarily via surface interactions with PCR components: using amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles as a main model[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(24): 13 142-13 153.
- [38] BAI Ya-long, CUI Yan, PAOLI G C, et al. Synthesis of amino-rich silica-coated magnetic nanoparticles for the efficient capture of DNA for PCR[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 145: 257-266.
- [39] AMAGLIANI G, OMICCIOLI E, CAMPO A, et al. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(2): 375-383.
- [40] SARKAR T R, IRUDAYARAJ J. Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA[J]. Analytical Biochemistry, 2008, 379(1): 130-132.
- [41] JACOBSEN C S, HOLBEN W E. Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(2): 315-321.

信息窗

草甘膦在欧盟“涉险过关”可继续使用5年

备受争议的除草剂草甘膦11月27日在欧盟“涉险过关”，其使用期限被延长5年。

当日欧盟负责农药安全审批的委员会举行投票，表决结果为18国赞成，9国反对，1国弃权，最终批准将下月15日到期的草甘膦使用期限延长5年。

作为上世纪70年代由化工巨头孟山都公司研发的除草剂，草甘膦（商品名为农达、年年春等）多年来畅销全球，年销售额现居农药之首，但2015年世卫组织下属的国际癌症研究机构声称“草甘膦可能致癌”，自此便争议不断。

27日表决前，欧盟各成员国已争吵数月。英国、荷兰等国支持按惯例将草甘膦的使用期限延长10年，法国、意大利等国则坚决反对，要求缩短草甘膦使用期限直至逐出欧盟农药市场。

据路透社等媒体报道，11月27日草甘膦最终在欧盟过关，得益于德国在最后关头投出赞成票，令支持草

甘膦的成员过数量超过16国，代表的欧盟总人口超过65%，达到欧盟投票表决“双重多数”要求。

值得注意的是，欧盟投票表决前夕，美国国家癌症研究所11月9日公布研究论文，表示通过长期观察4万多名接触草甘膦的人群，可以证实“草甘膦与任何实体瘤和白血病毫无关联”。

此外，欧盟食品安全局、化学品管理局等也与世卫国际癌症研究机构的观点相左。今年5月，欧盟食品安全局曾公布评估过程，表示经分析9万多页科学证据和3 300多项研究，可以肯定草甘膦的安全性。

但一些地方政府和环保团体疑虑重重。2015年以来，美国加利福尼亚州数百名市民对孟山都公司发起集体诉讼，今年6月，加州环境健康危害评估办公室还将草甘膦列入“致癌”化学品清单。

（来源：中国新闻网）