

文章编号:1673-1689(2009)03-0397-06

水产品三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立

王娜, 陶妍*

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 根据副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的耐热直接溶血素基因(*tdh*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的耐热核酸酶基因(*nuc*)和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的侵入关联蛋白基因(*iap*)分别设计引物,进行 PCR 扩增及反应条件的优化,建立了对3种菌的多重 PCR 检测方法。结果表明:3对引物能特异性地扩增出 202 bp、484 bp 和 714 bp 的目的片段。优化后的多重 PCR 反应体系为:10×PCR buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L、200 μ mol/L dNTP、2 mmol/L Mg^{2+} 、模板 2 μ L、2.5 U Taq 酶,引物浓度分别为:副溶血弧菌 200 nmol/L、金黄色葡萄球菌 40 nmol/L、单增李斯特菌 320 nmol/L,总反应液 25 μ L。对贝类模拟样品的检测结果显示,应用多重 PCR 技术对3种菌的检测限分别为副溶血弧菌 2.3×10^2 CFU/mL、金黄色葡萄球菌 2.5×10^1 CFU/mL、单增李斯特菌 1.5×10^3 CFU/mL。作者通过多重 PCR 技术实现了对副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的同时检测,具有快速、灵敏度高、特异性强等优点。

关键词: 多重 PCR;副溶血弧菌;金黄色葡萄球菌;单增李斯特菌

中图分类号:TS 201.6

文献标识码:A

Establishment of a Multiplex PCR for Detection of Three Types of Pathogen in Aquatic Foods

WANG Na, TAO Yan*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, a multiplex PCR (MPCR) was carried using three pairs of primer, which were designed according to the genes encoding the thermostable direct hemolysin (TDH), the thermostable nuclease (TNase) and the invasion associated protein from *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, respectively. The reaction conditions for the MPCR were optimized to establish a rapid, sensitive and convenient method detecting pathogens in seafood. The results showed that MPCR using the three pairs of primer produced specific amplicons of expected sizes 202 bp, 484 bp and 714 bp for *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. The optimized reaction conditions followed as 10×PCR buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, 200 μ mol/L dNTP, 2mmol/L Mg^{2+} , template 2 μ L, 2.5 U Taq DNA polymerase, and the concentrations of primers were 200 nmol/L for *V. parahaemolyticus*, 40nmol/L for *S. aureus* and 320 nmol/L for *L. monocytogenes*, and the final volume was adjusted to 25 μ L with sterilized water. Meretrix meretrix were inoculated with

收稿日期:2008-05-21

基金项目:上海市科委国际合作项目(065407061)。

* 通讯作者:陶妍(1961-),女,上海人,教授,农学博士,硕士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。

Email: ytiao@shou.edu.cn

these three types of pathogens to prepare simulation samples. The MPCR assays for the simulation samples indicated that the detection limits were 2.3×10^2 CFU/mL for *V. parahaemolyticus*, 2.5×10^1 CFU/mL for *S. aureus* and 1.5×10^3 CFU/mL for *L. monocytogenes*. This MPCR offers an efficient way for high sensitive detection of *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* in aquatic foods.

Key words: multiplex PCR, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)被认为是3种重要的污染水产品的致病菌,由这些菌引起的食物中毒事件近年来呈上升趋势^[1]。通常,对这3种菌的传统的检测和鉴定方法依赖于分离培养和生化鉴定等,但这些方法烦琐费时、耗力,且特异性不强。因此,建立快速、灵敏、特异性强的病原微生物检测方法是食品安全的当务之急。

在对微生物致病机理的研究中,各种毒力因子的存在已被确认是重要的致病性因素^[2]。副溶血弧菌的致病性主要与该菌产生的耐热直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)和耐热相关溶血素(Thermostable direct related hemolysin, TRH)有关,并以TDH为主^[3];耐热核酸酶(Thermostable Nuclease, TNase)是金黄色葡萄球菌产生的一种细胞外酶,存在于被金黄色葡萄球菌感染的组织中,是鉴定金黄色葡萄球菌的重要指标之一^[4];单增李斯特菌的致病性与多种毒力因子有关,其中侵入关联蛋白(Invasion associated protein)为重要的毒力因子,可作为检测单增李斯特菌污染的指标^[5]。对上述毒力因子的检测方法通常有DNA杂交、免疫学方法和PCR技术等,其中以PCR方法最为简单易行。多重PCR(multiplex PCR, MPCR)是在一个反应体系里加入两对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,因其具有全面、系统、快速、高效和操作简单等诸多优点,已被逐步应用于核酸诊断的多个领域^[6-7],包括病原微生物的检测。

Soumet等^[8]根据伤寒沙门氏菌的fliC基因和肠炎沙门氏菌的sefA基因设计引物,应用多重PCR技术对1078份家禽样品进行检测,特异性地检出伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌,敏感性达到95%,高于常规细菌学的鉴定方法(92.5%)。国内焦豫良等^[9]通过多重PCR技术一次性地扩增到基于肠毒性大肠埃希菌、蜡样芽胞杆菌、伤寒沙门菌、万方数据

大肠埃希菌、福氏志贺菌和霍乱弧菌等6种致病菌的特异性片段。然而,迄今为止,关于食品尤其是水产品中病原微生物的多重PCR检测技术方面的研究报道较少。作者以编码副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的3种毒力蛋白的基因tdh、nuc和iap作为靶基因,设计3对特异性的引物,先进行单重PCR扩增,在此基础上,再对多重PCR的反应体系及条件进行调整和优化。另一方面,以人工接种上述3种菌的文蛤(*Meretrix meretrix*)作为检测对象,进一步考察多重PCR技术对实际样本中病原菌检测的效果,以期建立快速、灵敏、特异性强的水产品病原微生物的多重PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和DNA提取

实验菌共6株,其中金黄色葡萄球菌(ATCC6538)购自上海市工业微生物研究所;沙门氏菌(*Salmonella spp.*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、副溶血弧菌和单增李斯特菌为作者所在实验室保藏菌种。所有菌株接种营养肉汤,37℃振荡培养18h,采用天根公司提供的试剂盒,对菌体基因组DNA进行提取和纯化。

1.2 引物设计

选择副溶血弧菌的耐热直接溶血素基因(*tdh*)、金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因(*nuc*)和单增李斯特菌的侵入关联蛋白基因(*iap*)作为靶基因,参考基因数据库登录的序列(AY044108, V0128, AF532235)分别设计3对引物^[10-12]进行PCR扩增。引物由上海生工生物工程公司合成,序列见表1。

1.3 单重PCR的反应体系和条件

分别以副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的基因组DNA为模板,其反应体系的组成如下:10×PCR buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP

1.6 μL , DNA 模板 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL , 1 U Taq 酶, 加无菌水至总体积 20 μL 。反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s、最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 反应共进行 30 个循环。

表 1 引物名称及序列
Tab. 1 Names and sequences of primers

引物名称	序列
tdh-F	5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'
tdh-R	5'-CATCCAAATACATTTTACTTGG-3'
nuc-F	5'-AAAGGGCAATACGCAAAGAGGT-3'
nuc-R	5'-CTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC-3'
iap-F	5'-CAAACGTCTAACACAGCTACT-3'
iap-R	5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3'

1.4 多重 PCR 的反应体系和条件

在单重 PCR 结果的基础上, 将 3 种菌的基因组 DNA 混合后作为模板, 同时加入 3 对引物进行多重 PCR 反应, 并对 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度和延伸时间等反应参数进行调整和优化, 确定最佳反应条件, 同时对 3 对引物在多重 PCR 检测中的特异性进行检验。

1.5 序列分析

PCR 扩增的目的片段经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后, 进行割胶纯化, 与 pGM-T 按 1 : 1 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下用 T₄ DNA 连接酶连接过夜, 并转入感受态细胞 Top10。将转化菌接种于含 X-gal、IPTG、100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 琼脂皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取白色菌落, 通过 PCR 法进行插入检验, 分别挑选 2-3 个阳性克隆于 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 送上海生工生物工程公司测序。

1.6 模拟样品的制备及单重和多重 PCR 检测

将文蛤用灭菌的刀片撬开, 取出整个内容物, 称取 25 g 于灭菌的锥形瓶中, 接种不同浓度的混合

菌液, 加入 225 mL 的灭菌生理盐水, 均质, 混匀成稀释液; 采用天根公司的细菌基因组 DNA 试剂盒提取 DNA, 分别进行单重和多重 PCR 的检测。

2 结果与分析

2.1 3 种菌的单重 PCR 结果及其目的片段的 DNA 测序

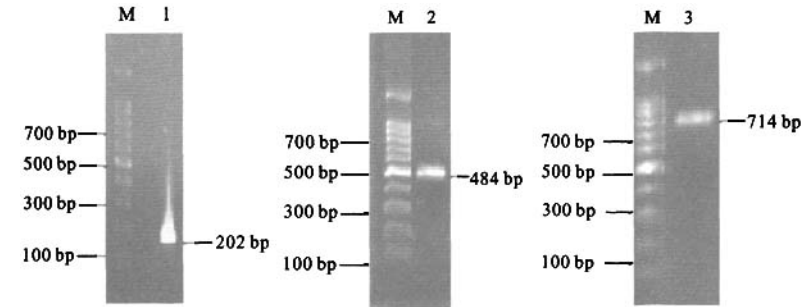
琼脂糖凝胶电泳结果显示, 利用合成的 3 对引物, 分别以副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的基因组 DNA 为模板, 采用 1.3 的 PCR 反应模式, 成功地扩增出 202 bp、484 bp 和 714 bp 的特异性条带, 见图 1。3 种目的片段的 DNA 序列经 BLAST 搜索, 与 GenBank 中序列比对后, 同源性分别达到 100%、100% 和 98%, 进而证实所克隆的 3 段基因分别为副溶血弧菌的耐热直接溶血素基因 (*tdh*)、金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因 (*nuc*) 和单增李斯特菌的侵入关联蛋白基因 (*iap*)。

2.2 引物特异性的考察结果

将金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血弧菌和单增李斯特菌分别接种营养肉汤, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 18 h 后, 分别提取基因组 DNA, 然后将这 6 种菌的 DNA 混合作为模板进行 PCR 扩增。结果显示: 加入副溶血弧菌引物的只扩增出一条 202 bp 的特异性片段; 加入金黄色葡萄球菌引物的只扩增出一条 484 bp 的特异性片段; 加入单增李斯特菌引物的, 只扩增出一条 714 bp 的特异性片段; 而同时加入 3 对引物的, 则扩增出 3 条预期的片段, 见图 2。上述结果证明了对应于 3 种菌的 3 对引物具有很好的特异性。

2.3 3 种菌的多重 PCR 结果及其反应条件的优化

在单重 PCR 结果的基础上, 反应体系中同时加入 3 对引物进行多重 PCR 扩增, 并对影响 PCR 扩增的 dNTP 浓度、 Mg^{2+} 浓度和延伸时间等因素进



M: 100 bp DNA Ladder; 1: 副溶血弧菌扩增产物; 2: 金黄色葡萄球菌扩增产物; 3: 单增李斯特菌扩增物

图 1 3 种菌的单重 PCR 结果

Fig. 1 Results of singleplex PCR for the three types of pathogen

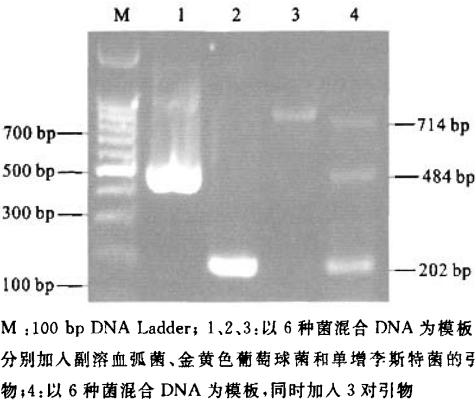


图 2 引物特异性的考察结果

Fig. 2 Specificity of primers for three types of pathogen

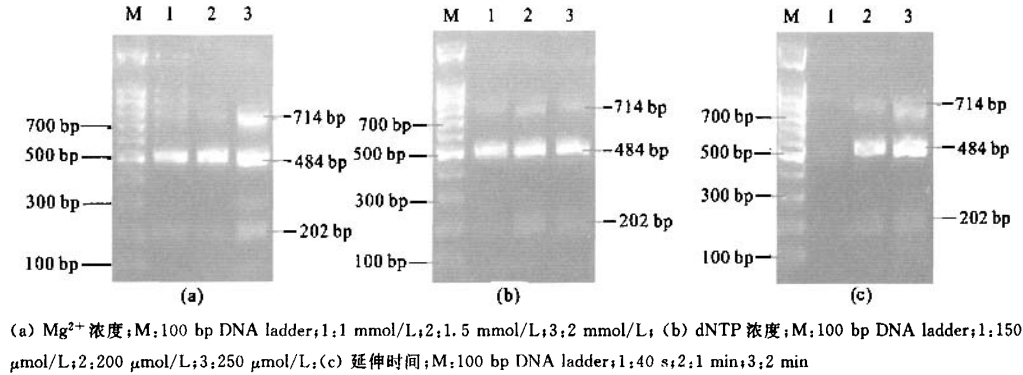


图 3 多重 PCR 反应条件的优化结果

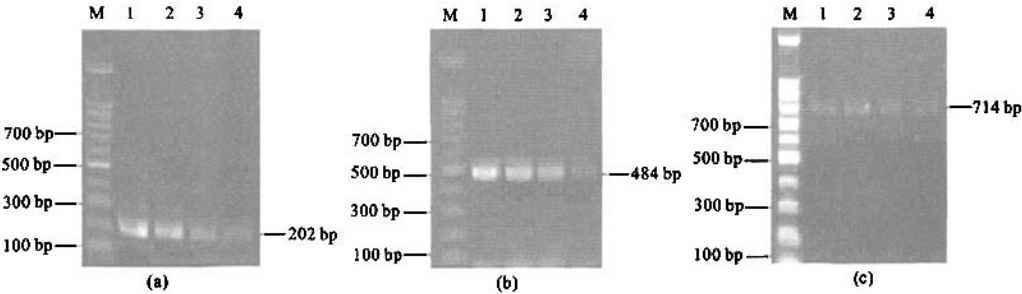
Fig. 3 Optimization of reaction conditions for multiplex PCR

2.4 贝类模拟样品检测限的测定结果

先对副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的培养液进行平板计数,再将 3 种菌的培养液混合,进行梯度稀释;对 10^5 、 10^6 、 10^7 和 10^8 倍 4 个稀释度的菌液各取 1 mL 接种到文蛤肉中,然后取样提取 DNA,按前述 PCR 方法进行单重和多重 PCR 检测,见图 4。单重 PCR 检测结果显示:3 种菌在 4 种稀释梯度下均能被检测到,检测限分别为:副溶血弧菌 2.3 CFU/mL (图 4a)、金黄色葡萄

行调整和优化,见图 3。结果显示: Mg^{2+} 浓度为 2 mmol/L 时扩增出的 3 个条带较其它两个浓度的条带更明显(图 3a);dNTP 浓度为 $200 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 时扩增出的 3 个条带较其他两个浓度的条带更亮(图 3b);延伸时间为 2 min 时扩增到的 3 个条带最明显(图 3c)。据此,优化后的多重 PCR 反应体系确定为: $10\times \text{PCR buffer}(-\text{Mg}^{2+}) 2.5 \text{ }\mu\text{L}$ 、 $200 \text{ }\mu\text{mol/L}$ dNTP、 2 mmol/L Mg^{2+} 、模板 $2 \text{ }\mu\text{L}$ 、 5 U Taq 酶,引物浓度分别为:副溶血弧菌 200 nmol/L 、金黄色葡萄球菌 40 nmol/L 、单增李斯特菌 320 nmol/L ,总反应液 $25 \text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s 、 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 40 s 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min ,共进行 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 15 min 。

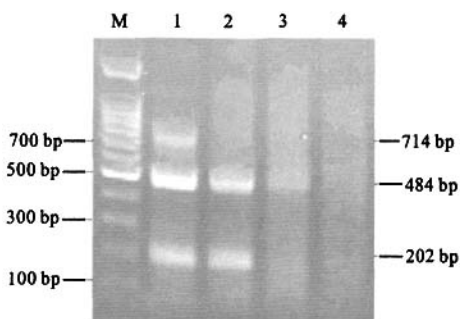
球菌 2.5 CFU/mL (图 4b)、单增李斯特菌 1.5 CFU/mL (图 4c)。多重 PCR 检测结果显示:在 10^5 倍稀释度下,可以同时检测到 3 种菌; 10^6 倍稀释度下可以检测到副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌; 10^7 倍稀释度下只有金黄色葡萄球菌被检测到,见图 5。据此,应用多重 PCR 技术对 3 种菌的检测限分别为:副溶血弧菌 $2.3\times 10^2 \text{ CFU/mL}$ 、金黄色葡萄球菌 $2.5\times 10^1 \text{ CFU/mL}$ 、单增李斯特菌 $1.5\times 10^3 \text{ CFU/mL}$ 。



(a) 副溶血弧菌;(b) 金黄色葡萄球菌;(c) 单增李斯特菌; M:100 bp DNA Ladder;1~4: 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍的稀释度

图 4 模拟样品的单重 PCR 检测结果

Fig. 4 Results detected by monoplex PCR for simulation samples



M: 100 bp DNA Ladder; 1~4: 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍的稀释度

图5 模拟样品的多重PCR检测结果

Fig. 5 Results detected by multiplex PCR for simulation samples

3 讨论

多重PCR实验设计较为复杂,除了对引物的特异性要求很高,其反应体系的组成如缓冲液的成分、dNTP的浓度和反应条件等都会影响实验的结果^[13-14],需要对反应体系和条件进行反复调整,才能提高多重PCR的效果。作者在对 Mg^{2+} 浓度、dNTP浓度和延伸时间等因素进行调整和优化后获得的多重PCR结果亦证明了这一点。作者在研究中还发现,采用多对引物的多重PCR可能发生一个

扩增片段对另一个片段的扩增产生抑制作用,在3对引物浓度相同的情况下,副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌都能成功扩增出相应片段,而单增李斯特菌的扩增受到了抑制,因此需要对引物的浓度进行适当的调整。首先增加单增李斯特菌引物的浓度,但效果不好;然后,减少扩增效率最好的金黄色葡萄球菌的引物浓度,使3种菌的相应片段都得到了同时扩增。黄留玉等^[15]亦提出降低扩增效率高的引物的浓度比增加扩增效率低的引物的浓度更有效。另外,模板纯度也是影响PCR结果的另一个重要因素。在对实际样本的检测中,由于水产品组成成分丰富,致使检测背景干扰因素增多,可能会破坏PCR的缓冲体系,进而干扰检测结果。因此,在DNA的提取时,一般需要进行预增菌,如果发现同时富集多种菌的效果不好时,可采用选择性培养基对各种菌分别培养,再混合后收集菌体以提取DNA。

作者通过多重PCR技术实现了对副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌3种菌的同时检测,将常规的细菌学鉴定中需要进行的复杂生化实验转化为几小时的一次性实验。该方法快速、简便、特异性强、灵敏度高,适合于批量样本的检测,具有很好的应用前景。

参考文献(References):

- [1] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992~2001年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网[J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 725-727.
- LIU Xiu-mei, CHEN Yan, WANG Xiao-ying, et al. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2004, 33(6): 725-727. (in Chinese)
- [2] Takeshi H, Toshio M, Yasunori Y, et al. Novel method to chemically immobilize antibody on nylon and its application to the rapid and differential detection of two *Vibrio parahaemolyticus* toxins in a modified enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995, 2(2): 177-181.
- [3] Bei A K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*[J]. *Microbiol Methods*, 1999, 36: 215-225.
- [4] 杨宏军,高运东,王长法,等. PCR扩增Nuc基因检测奶牛乳腺炎致病性金黄色葡萄球菌[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(6): 80-82.
- YANG Hong-jun, GAO Yun-dong, WANG Chang-fa, et al. Study on the application of polymerase chain reaction for Nuc gene to detect pathogenic *Staphylococcus aureus* in dairy cow mastitis [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2007, 28(6): 80-82. (in Chinese)
- [5] Bubert A, Hein I, Rauch M, et al. Detection and differentiation of *Listia spp.* by a single reaction based on multiplex PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(10): 4688-4692.
- [6] 蔡潭溪,蒋鲁岩,黄克. 用基于TaqMan探针的Real-time PCR技术定量检测副溶血弧菌[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 638-642.
- CAI Tan-xi, JIANG Lu-yan, HUANG Ke. Quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* by real-time TaqMan PCR [J]. *Acta. Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 638-642. (in Chinese)
- [7] 高正琴,李厚达,贺争鸣. 金黄色葡萄球菌nuc基因特异性核酸探针的制备及应用[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(5): 301-303.

- GAO Zheng-qin, LI Hou-da, HE Zheng-ming. Study on application of DNA Probe for detecting staphylococcus aureus in laboratory animals[J]. **Chinese Journal of Comparative Medicine**, 2004, 14 (5): 301-303. (in Chinese)
- [8] 吴清平, 王大鹏, 杨宁, 等. ELISA 和 GICA 在食源性致病菌检测中的应用[J]. **中国卫生检验杂志**, 2007, 17(3): 566-568.
- WU Qing-ping, WANG Da-peng, YANG Ning, etc. The application of ELISA and GICA in detection of food-borne pathogens[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2007, 17 (3): 566-568. (in Chinese)
- [9] Zhao G Y, Xing F F, Deng S P, et al. A disposable amperometric enzyme immunosensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food based on agarose/Nano-Au membrane and screen-printed electrode[J]. **Electrochemistry Communications**, 2007, 9: 1263-1268.
- [10] 王海艳, 刘中学, 刘虹, 等. 食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异 PCR 检测方法的建立[J]. **检验检疫科学**, 2006, 1(16): 3-6.
- WANG Hai-yan, LIU Zhong-xue, LIU Hong, etc. Establishment of applied sensitive and specific PCR detection method of *Listeria monocytogenes* in food[J]. **Inspection and Quarantine Science**, 2006, 1(16): 3-6. (in Chinese)
- [11] 王韶, 刘桂华, 乔凤, 等. 食品中金黄色葡萄球菌的 PCR 检测[J]. **吉林大学学报: 医学版**, 2006, 32(5): 933-936.
- WANG Shao, LIU Gui-hua, QIAO Feng, etc. Establishment of PCR method for detection of *Staphylococcus aureus*[J]. **Journal of Jilin University: Medicine Edition**, 2006, 32 (5): 933-936. (in Chinese)
- [12] 许一平, 成炜, 陈福生. 多重 PCR 技术在食源性病原细菌检测中的应用[J]. **食品科学**, 2007, 28(2): 355-359.
- XU Yi-ping, CHENG Wei, CHEN Fu-sheng. Application of multiplex PCR for detection of food-borne bacterial pathogens[J]. **Journal of Food Science**, 2007, 28(2): 355-359. (in Chinese)
- [13] Soumet C, Ermel G, Rose V, et al. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 1999, 29: 1-6.
- [14] 焦豫良, 张兴群, 李振勇, 等. 6 种食品致病菌的多重 PCR 检测[J]. **临床检验杂志**, 2005, 4(23): 256-258.
- JIAO Yu-liang, ZHANG Xing-qun, LI Zhen-yong, et al. Multiplex PCR for detection of six species of foodborne pathogens[J]. **Chinese Journal of Clinical Laboratory Science**, 2005, 4(23): 256-258. (in Chinese)
- [15] Yeung P S, Hayes M C, DePaola A, et al. Comparative phenotypic, molecular and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(6): 2901-2909.
- [16] Shortle D. A genetic system for analysis of *Staphylococcal nuclease*[J]. **Gene**, 1983, 22(23): 181-189.
- [17] Schmid M, Walcher M, Bubert A, et al. Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria spp.* and genotypes of *L. monocytogenes*[J]. **Fems Immunol Med Microbiol**, 2002, 35(3): 215-225.
- [18] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. **遗传**, 2003, 25(1): 65-68.
- HUANG Yin-hua, HU Xiao-xiang, XU Wei-zhuo, et al. The factors affecting the efficiency of multiplex PCR [J]. **Hereditas**, 2003, 25(1): 65-68. (in Chinese)
- [19] 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用[J]. **生物技术通讯**, 2007, 18(5): 863-865.
- ZHAO Hong-qing, YUAN Xi-tong, HUANG Liu-yu. Application of multiplex PCR in detection of pathogens[J]. **Letters in Biotechnology**, 2007, 18(5): 863-865. (in Chinese)
- [20] 黄留玉, 史兆兴, 苏国富, 等. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 336-339.

(责任编辑: 李春丽)