

副溶血性弧菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立

王建昌, 胡连霞*, 段永生, 李 静, 王金凤

(河北出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 河北 石家庄 050051)

摘要: 以副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) *gyrB* 基因特异序列为靶序列, 设计 RNA-DNA 组合引物和链终止序列, 优化反应体系, 建立实时荧光单引物等温扩增(Real-time fluorescence single primer isothermal amplification, 实时荧光 SPIA)检测副溶血性弧菌的方法。实时荧光 SPIA 在 40 min 反应时间内, 对 3 株副溶血性弧菌和 16 株其他食源性致病菌进行实时荧光 SPIA 检测, 结果表明除 3 株副溶血性弧菌外, 其他细菌均未扩增出荧光曲线。进一步研究表明, 实时荧光 SPIA 检测副溶血性弧菌纯培养 DNA 的灵敏度为 8.2 fg/ μ L, 对副溶血性弧菌菌悬液的检测灵敏度为 13.5 CFU/mL; 对鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋等 4 种模拟样品中副溶血性弧菌的检出限均为 14.7 CFU/g。研究结果表明, 实时荧光 SPIA 检测副溶血性弧菌灵敏度高, 特异性强, 耗时短, 方法简便。

关键词: 实时荧光单引物等温扩增; 副溶血性弧菌; *gyrB* 基因

中图分类号: TS 254.7 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)11—1212—07

Real-Time Fluorescence Single Primer Isothermal Amplification Established for the *Vibrio parahaemolyticus* Detection

WANG Jianchang, HU Lianxia*, DUAN Yongsheng, LI Jing, WANG Jinfeng

(The Technical Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The RNA-DNA primers and blockers were designed and synthesized based on the *Vibrio parahaemolyticus gyrB* gene. The reaction system was optimized. The real-time fluorescence single primer isothermal amplification (real-time fluorescence SPIA) was established for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. The typical fluorescence curves were observed for only 3 strains of *Vibrio parahaemolyticus* in the real-time fluorescent SPIA detection of 3 strains of *Vibrio parahaemolyticus* and 16 strains of other food borne bacteria within 40 mins. Further studies showed that the sensitivity of real-time fluorescent SPIA for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* DNA in pure culture was 8.2 fg/ μ L, while 1.35×10^1 CFU/mL for *Vibrio parahaemolyticus* bacteria suspension and 14.7 CFU/g for *Vibrio parahaemolyticus* in four simulated sample of codfish, crab, oysters and salted duck egg.

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 国家质检公益性科研专项项目(201210128; 201310126)。

作者简介: 王建昌(1981—), 男, 山东临朐人, 农学博士, 高级兽医师, 主要从事动物疫病病原、食源性致病菌的分子生物学检测研究。

E-mail: jianchangwang1225@126.com

* 通信作者: 胡连霞(1972—), 女, 河北石家庄人, 高级工程师, 主要从事有害微生物检测控制研究。E-mail: huliianxia168@163.com

The real-time fluorescence SPIA detection was demonstrated as a convenient method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* with high sensitivity, strong specificity and time saving.

Keywords: real-time fluorescence SPIA, *Vibrio parahaemolyticus*, *gyrB* gene

致病性弧菌是一类重要的食源性病原菌^[1-2],广泛地存在于自然水环境,特别是海水中,对海产品有较严重程度的污染。在弧菌属中,危害较大或出现频率较高的是 O1 型霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌^[3-4]。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)最早是由 Fujino 等^[5]于 1953 年从日本一个食物中毒患者初次分离得到的,是一种革兰氏阴性嗜盐菌,常呈多态性,有鞭毛,无荚膜和芽孢。在含 3%~5% 的食盐培养基中, pH 7.5~8.5, 37 °C 条件下生长最为良好并且对酸敏感。人食用污染有该菌的海产品后可引起急性胃肠炎,严重时还可引起败血症^[6]。目前,在中国沿海地区的食物中毒病例中,副溶血性弧菌已成为微生物性食物中毒的首要病原菌^[7]。快速准确地从海产食品中鉴定副溶血性弧菌,具有重要的医学意义。

目前,食品中副溶血性弧菌检验主要依据 GB 4789.7-2013, SN/T 0173-2010^[8-9]对食品中的副溶血性弧菌进行检测,大约需要 3~7 d 的时间,且容易出现交叉污染和假阳性。分子生物学技术具有快速、直观、准确等优势,已在副溶血性弧菌检测中得到广泛应用^[10-12]。随着食品安全检测标准的提高,寻找更加快速、准确、便捷的检测技术显得至关重要。

编码促旋酶的 *gyrB* 基因是单拷贝的看家基因,全长约为 1.2~1.4 kb,平均碱基替换率为每 100 万年变化 0.7%~0.8%,比 16S rDNA 的每 5 000 万年变化 1% 的速度快^[13]。另外,由于其作为蛋白编码基因,其所固有的遗传密码子的兼并性使得 DNA 序列可以发生较多的变异而不改变氨基酸序列,尤其是密码子的第 3 位碱基,这就使得 *gyrB* 基因序列在区分和鉴定细菌近缘种方面^[14],比非蛋白编码基因 16S rDNA 具有更高的分辨率。

单引物等温扩增技术(Single primer isothermal amplification, SPIA)是近年报道的一种新型线性核酸等温扩增技术^[15]。该技术主要是通过一条 3' 端是 DNA 片段、5' 端是 RNA 片段的组合引物、RNase H 及具有强链置换活性的 DNA 聚合酶实现 DNA 的

体外线性等温扩增,经过 RNA 降解、新引物结合、链置换的循环过程,实现模板互补序列的快速扩增,最终扩增出大量的具有高度忠实性的 cDNA 单链^[16]。

作者在普通 SPIA 的基础上,以副溶血性弧菌 *gyrB* 为靶基因,设计 RNA-DNA 组合引物和链终止序列,在单引物等温扩增技术(SPIA)的基础上加入荧光染料 SYBER Green II,建立了实时荧光单引物等温扩增(Real-time fluorescence SPIA)检测副溶血性弧菌的方法。通过实时荧光分析仪对荧光信号进行实时检测,具有操作简单、耗时短、实时监控等优点。目前国内外关于 SPIA 方法的报道比较少,实时荧光单引物等温扩增方法更未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 3 株副溶血性弧菌和 16 株非副溶血性弧菌:分别购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)、中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC);菌株 2 为河北国际旅行卫生保健中心赠送;菌株 3 为参加 CNCA 能力验证时分离。具体信息如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂 BstDNA 聚合酶、RNase H、RNA 酶抑制剂、Mgcl2、dNTPs、SYBER Green II 等购自于上海生工生物工程有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒:购自北京天根生化科技有限公司;培养基:购自北京陆桥有限责任公司;鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋样品:购自当地超市。

1.1.3 主要设备 ABI7500 实时荧光 PCR 仪:美国 AB 公司产品;PCR 扩增仪(Whatman T Gradient 基因扩增仪):德国 Biometra 公司产品;核酸蛋白分析仪(Eppendorf Biophotometer plus):德国 Eppendorf 公司产品。

1.1.4 RNA/DNA 组合引物和 Blocker 的设计和合成 根据 Genbank 中副溶血性弧菌 *gyrB* 基因(基

表 1 试验用菌株
Table 1 Studied strains

菌株编号	菌株名称	来源
1	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	CICC21617
2	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	作者所在实验室保存
3	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	作者所在实验室保存
4	创伤弧菌(<i>Vibrio vulnificus</i>)	ATCC27562
5	霍乱弧菌(<i>Vibrio cholerae</i>)	ATCC14035
6	拟态弧菌(<i>Vibrio mimicus</i>)	ATCC33653
7	哈维氏弧菌(<i>Vibrio harveyi</i>)	ATCC33842
8	溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	ATCC17749
9	鳗弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)	ATCC19019
10	福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CICC21678
11	单核细胞增生李斯特氏菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC19114
12	鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	CICC22956
13	大肠杆菌 O157:H7(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	CICC21530
14	蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	CICC10468
15	小肠结肠炎耶尔森氏菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CICC21609
16	大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>)	CMCC44102
17	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC6538
18	弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC 10787
19	乙型溶血性链球菌(<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC10373

因号:KC542972.1) 已知序列, 对其进行同源性分析, 确定其保守序列, 用 Primer premier5.0 设计组合引物和相应链终止序列, 如表 2 所示。组合引物和 Blocker 由大连 TAKARA 公司合成。

表 2 实时荧光 SPIA 设计的引物
Table 2 Design of Real-time fluorescence SPIA primer

引物名称	序列(5'to3')	修饰
Pvm	GCGUGAA -GGTTTG ACTGCC	5'端 7nt 碱基为 RNA 序列, 3'端 12nt 碱基为 DNA 序列
Bv	CGGCCATGGGTG	3'端用生物素修饰, 中间随机加上四个 XNA 修饰

注: XNA, 即 LNA, 又称“锁核酸”(Locked nucleic acid, LNA), 是一种经过修饰的类寡核苷酸衍生物, 包括 A, C, G, T, U, mC 6 种碱基

1.2 试验方法

1.2.1 副溶血性弧菌的培养 取保藏的副溶血性弧菌在 CHROMID VIBRIO 弧菌显色培养基上进行划线, 恒温箱 36 ℃培养 12 h, 传代培养 2 次。挑取单菌落接种至新鲜无菌的 SPB 肉汤中, 36 ℃过夜培养。

1.2.2 副溶血性弧菌基因组 DNA 的提取 采用普

通热裂解法^[17]、蛋白酶 K 法^[18]、饱和酚提取法^[19]和天根试剂盒法对纯培养的副溶血性弧菌进行基因组 DNA 的提取, 并测定浓度。

1.2.3 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 反应体系和反应条件的建立 建立副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测 25 μL 反应体系, 优化反应体系中 RNA/DNA 组合引物以期确定各组分的最佳工作浓度, 建立副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 最佳反应体系。

将副溶血性弧菌基因组 DNA 模板、组合引物、Blocker 及反应缓冲液的混合液经 99 ℃, 90 s 处理后降温至 60 ℃, 迅速加入 RNase H 和 Bst DNA 聚合酶, 在 ABI7500 实时荧光 PCR 仪上 55~65 ℃, 反应 30~60 min (每循环 30 s), 反应过程中实时监测荧光信号, 以期确定最佳反应温度和时间, 建立副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法。

1.2.4 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析 取表 1 中 19 株过夜培养菌悬液 1 mL, 用热裂解法提取基因组 DNA 作为模板, 根据 1.2.3 中所建立的反应体系和条件进行检测, 对所建立的实时荧光 SPIA 方法进行特异性分析。

1.2.5 不同模板 DNA 提取方法对副溶血性弧菌实

时荧光 SPIA 检测结果的影响 使用 1.2.2 中 4 种方法提取副溶血性弧菌基因组 DNA,作为模板进行实时荧光 SPIA 检测,以分析不同的 DNA 提取方法对检测结果的影响。

1.2.6 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性分析 挑取显色培养基上 36 ℃ 培养 12 h 的单菌落,制备成一定浓度菌悬液。用生理盐水进行 10 倍系列稀释,采用稀释平板法,测定其纯培养物活菌数为 1.35×10^8 CFU/mL;同时取 1 mL 上述菌悬液直接用热裂解法提取副溶血性弧菌基因组 DNA,测得 DNA 质量浓度为 82 ng/ μ L,用灭菌 DEPC 水进行 10 倍系列稀释,进行 SPIA 灵敏性试验。

1.2.7 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法在模拟样品中检出限分析 在鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋样品中分别添加副溶血性弧菌作为模拟污染样品进行检出限分析。进行添加前,鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋样品已按 GB 4789.7-2013 常规检验法证实副溶血性弧菌阴性。挑取显色培养基上 36 ℃ 培养 12 h 的单菌落,制备成一定浓度菌悬液,用生理盐水进行 10 倍系列稀释后,选取系列稀释浓度

菌悬液 1 mL 分别添加到各个样品匀浆中(10 g

样品于 90 mL 质量分数 3%氯化钠碱性蛋白胨水中)。混匀,分别取 1 mL 模拟样品,采用稀释平板法,测定其活菌添加范围为 $1.47 \times 10^5 \sim 1.47 \times 10^{-2}$ CFU/mL。同时分别取 1 mL 模拟样品,直接用热裂解法提取副溶血性弧菌基因组 DNA,进行副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 方法对模拟污染鳕鱼样品的检出限分析。

2 结果与分析

2.1 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 反应体系和反应条件的建立

如图 1 所示,经过各种反应体系和条件的优化,设计合成的组合引物及 Blocker(Pvrn+Bv)对副溶血性弧菌出现扩增曲线,且最佳反应体系为:RNA/DNA 组合 Pirmer 5.6 μ mol/L、Blocker 1.0 μ mol/L、10 $\times$ Bst Buffer 2.5 μ L、Bst DNA polymerase 12 U、10 $\times$ RNaseH Buffer 2.5 μ L、RNaseH 5 U、dNTPs 0.2 μ mol/L、Mgcl₂ 5.0 μ mol/L、RNase Inhibitor 16 U、DNA 模板 1 μ L、SYBER Green II 0.5 μ L (300 $\times$ 稀释),其余用灭菌 DEPC 水补足体系;最佳反应条件为 57.0 ℃,反应 40 min。

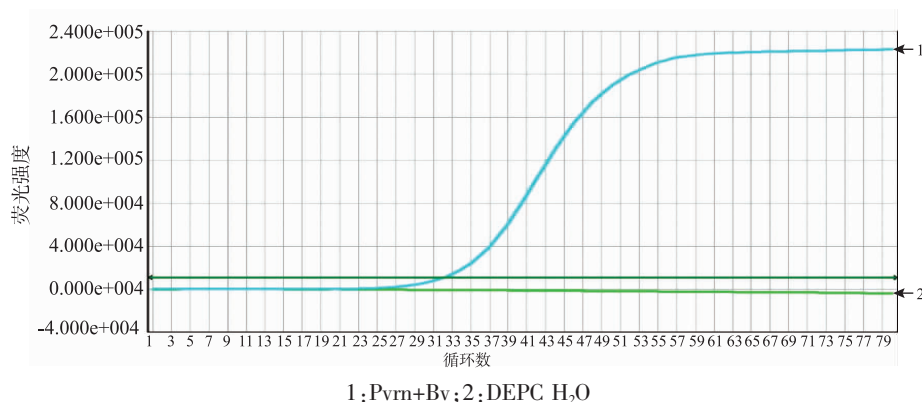


图 1 Pvrn 和 Bv 的副溶血弧菌实时荧光 SPIA 反应结果

Fig. 1 Real-time fluorescence analysis of SPIA with different Pvrn Primers and Bv

2.2 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析

特异性试验结果显示,仅副溶血性弧菌出现典型的荧光扩增曲线,其他细菌检测均未产生扩增曲线,结果如图 2 所示。结果表明作者建立的检测方法具有良好的特异性。

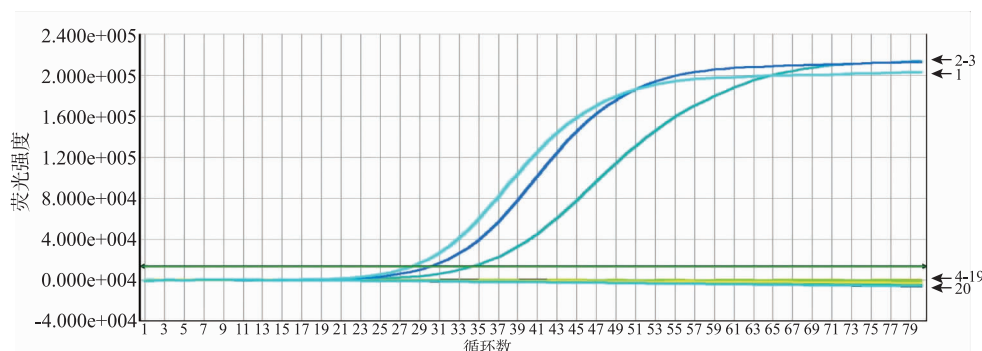
2.3 不同模板 DNA 提取方法对副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测结果的影响

如图 3 所示,使用所建立的副溶血性弧菌实时

荧光 SPIA 检测方法对 4 种不同方法提取的模板 DNA 进行检测,均出现典型的扩增曲线,Ct 值(起峰时间)没有明显差异。结果表明,该方法检测副溶血性弧菌时对模板质量要求不苛刻,能适应广大的基层和现场检测。

2.4 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性试验

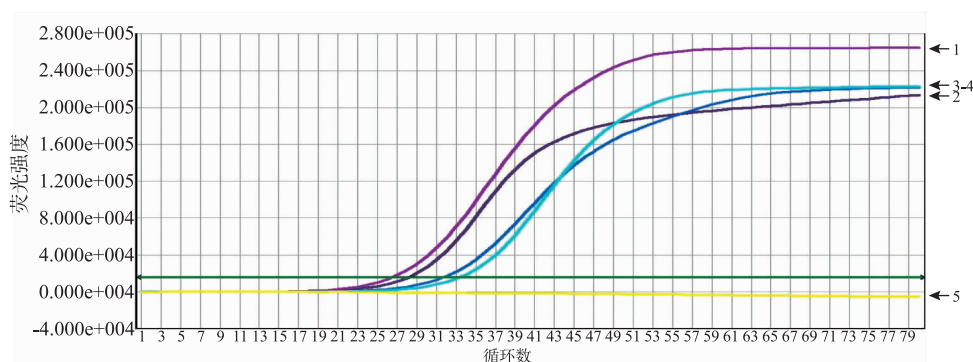
如图 4 所示,当 DNA 模板用量为 $8.2 \times 10^3 \sim 8.2$ fg/ μ L 时,即副溶血性弧菌浓度为 $1.35 \times 10^3 \sim 1.35$



1-3: 副溶血性弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 霍乱弧菌; 6: 拟态弧菌; 7: 哈维氏弧菌; 8: 溶藻弧菌; 9: 鳗弧菌; 10: 福氏志贺氏菌; 11: 单核细胞增生李斯特氏菌; 12: 鼠伤寒沙门氏菌; 13: 大肠杆菌 O157:H7; 14: 蜡样芽胞杆菌; 15: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 16: 大肠埃希氏菌; 17: 金黄色葡萄球菌; 18: 弗氏柠檬酸杆菌; 19: 乙型溶血性链球菌; 20: DEPC H₂O

图2 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 引物特异性检测结果

Fig. 2 Specificity of the Real-time fluorescence SPIA for *Vibrio parahaemolyticus*



1: 试剂盒法; 2: 蛋白酶 K 法; 3: 普通热裂解法; 4: 饱和酚提取; 5: DEPC H₂O

图3 不同模板 DNA 提取方法对副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测结果的比较

Fig. 3 Effects of four extraction methods of template DNA on the detection result of Real-time fluorescence SPIA for *Vibrio parahaemolyticus*

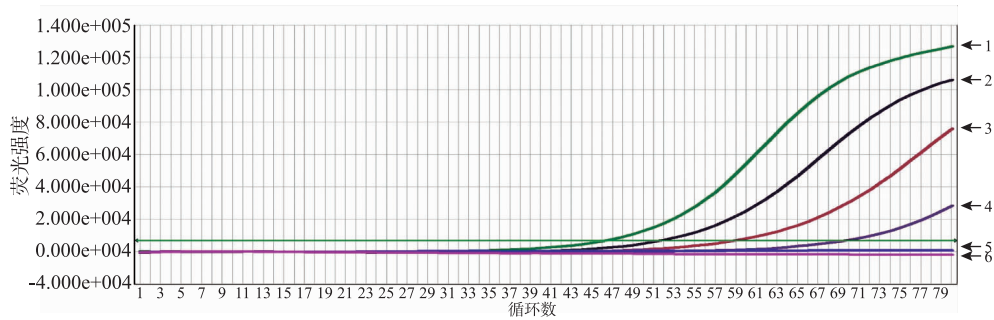
CFU/mL 时, 均出现典型的扩增曲线; 当模板用量为 0.82 fg/μL 时, 即副溶血性弧菌浓度为 1.35 CFU/mL 则无扩增曲线。该方法对副溶血性弧菌 DNA 的检测灵敏度为 8.2 fg/μL, 对菌液的检测灵敏度为 1.35 CFU/mL。

2.5 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法在模拟样品中的检出限试验

对鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋 4 种样品中人工添加的副溶血性弧菌进行了检测。当 4 种样品中副溶血性弧菌添加浓度为 $1.47 \times 10^3 \sim 1.47$ CFU/g 时, 均出现典型的扩增曲线, 其平均 C_t 值如表 3 所示; 当 4 种样品中副溶血性弧菌添加浓度为 1.47 CFU/g 时, 则均无扩增曲线。结果表明, 该方法在鳕鱼、海蟹、牡蛎和咸鸭蛋 4 种模拟样品中检出限均为 14.7 CFU/g。3 次重复试验结果一致。

3 结 语

侯晓丽等^[20]对霍乱弧菌和副溶血弧菌分离菌株 *gyrB* 基因的系统发育关系分析, 发现该区段的基因可以明显区别开不同的菌株。Venkateswaran 等^[21]通过对 1 258 bp 的 *gyrB* 基因序列分析发现, 副溶血性弧菌与溶藻弧菌的 *gyrB* 的相似率仅为 86.8%, 可以明显区分出这两种致病菌。Vuddhakul 等^[22]分析发现副溶血弧菌与霍氏弧菌 *gyrB* 基的相似率为 80%, 可明显看出两者不同, 而且用 PCR 方法便可从其他菌中将霍氏弧菌鉴别出来。Kumar 等^[23]使用创伤弧菌的 *gyrB* 基因序列, 设计特异引物可以快速准确地将该菌与其他种的弧菌或者非弧菌类微生物区分开, 为该菌的检测提供了便捷的方法。作者将副溶血性弧菌 *gyrB* 基因进行比对, 找到保守



1: 8.2×10^3 fg/ μ L; 2: 8.2×10^2 fg/ μ L; 3: 8.2×10^1 fg/ μ L; 4: 8.2×10^0 fg/ μ L; 5: 8.2×10^{-1} fg/ μ L; 6: DEPC H_2O

图 4 副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性试验

Fig. 4 Sensitivity of Real-time fluorescence SPIA detection of *Vibrio parahaemolyticus*

表 3 实时荧光 SPIA 检测模拟样品中各浓度副溶血性弧菌的平均 C_t 值

Table 3 Average C_t value of *Vibrio parahaemolyticus* for simulated samples with different concentration in Real time fluorescence SPIA detection

样品名称	$C_t/(CFU/g)$			
	1.47×10^3	1.47×10^2	1.47×10^1	1.47×10^0
鳕鱼	46	55	67	—
海蟹	53	57	65	—
牡蛎	51	59	73	—
咸鸭蛋	50	54	69	—

序列设计组合引物和链终止序列,将副溶血性弧菌从其它弧菌中鉴定出来,特异性强。

作者建立的副溶血性弧菌实时荧光 SPIA 方法

具有很好的敏感性和特异性,同时对模板 DNA 要求较低。

参考文献:

[1] HOLT J G, BERGEY D H. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed)[M]. Baltimore:Williams & WikinsCo, 1994:190-194.

[2] GARRITY G M, BELL J A, LILLBURN T G. Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. New York Berlin Heidelberg:Springer, 2004:109-112.

[3] 石磊,曾冰冰,曹以诚,等. 霍乱弧菌 O1 群和 O139 群基因分型方法[J]. 食品与机械, 2007, 23(3):132-134. SHI Lei, ZENG Bingbin, CAO Yicheng, et al. Identification and typing of *Vibrio cholera* O1 and O139 strains by sxt gene amplification coupled with restriction enzyme analysis[J]. Food and Machinery, 2007, 23(3):132-134. (in Chinese)

[4] 蒋鲁岩,蔡潭溪,邵景东,等. 应用双重Real-timePCR 同步定量检测食品中的副溶血性弧菌及金黄色葡萄球菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(3):205-209. JIANG Luyan, CAI Tanxi, SHAO Jingdong, et al. Duplex real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* in Foods[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2006, 18(3):205-209. (in Chinese)

[5] FUJINO T, OKUNO Y, NAHADA D, et al. On the bacteriological examination of Shirasu-food poisoning [J]. Medical January of Osaka University, 1953, 4:299-304.

[6] ALTEKRUSE S F, BISHOP R D, BALDY L M, et al. *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: the role of raw Ostraea[J]. Epidemiology and Infection, 2000, 124:489-495.

[7] 刘阳,孔繁德,徐淑菲,等. 副溶血弧菌检测技术的研究进展[J]. 经济动物学报, 2012, 16(1):49-54, 62. LIU Yang, KONG Fande, XU Shufei, et al. Advancement of detection techniques for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Economic Animal, 2012, 16(1):49-54, 62. (in Chinese)

- [8] 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[S].
- [9] SN 0173-2010, 进出口食品副溶血性弧菌检验方法[S].
- [10] CAI T, JIANG L, YANG C, et al. Application of realtime PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China[J]. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 2006, 46(2): 180-186.
- [11] YAMAZAKI W, ISHIBASHI M, KAWAHARA R, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **BMC Microbiol**, 2008, 8: 163.
- [12] ROBERT-PILLOT A, COPIN S, GAY M, et al. Total and pathogenic *vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2010, 143(3): 190-197.
- [13] LA Duc MT, SATOMI M, AGATA N, et al. GyrB as a phylogenetic discriminator for members of the bacillus anthracis-cereus-thuringiensis group[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2004, 56(3): 383-394.
- [14] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [15] KURN N, CHEN P, HEATH J D, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification system for highly multiplexed applications[J]. **Clinical Chemistry**, 2005, 51(10): 1973-1981.
- [16] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [17] SREENIVAS R K. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork[J]. **J Food Prot**, 2002, 6: 1470-1474.
- [18] 陈珊珊. PCR 技术检测婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [19] 邱阳, 王刚, 卢行安. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J]. 中国微生态学杂志, 2004, 2: 115-116.
- QIU Yang, WANG Gang, LU Xingan. Detection of the gene encoding *Staphylococcal enterotoxin B* by PCR[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2004, 2: 115-116. (in Chinese)
- [20] 侯晓丽, 曹清毅, 潘劲草, 等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 gyrB 基因系统发育分析 [J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 884-889.
- HOU Xiaoli, CAO Qingyi, PAN Jincan, et al. Classification and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on gyrB gene phylogenetic analysis[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2006, 46(6): 884-889. (in Chinese)
- [21] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 64(2): 681-687.
- [22] Vuddhakul V, Nakai T, Matsumoto C, et al. Analysis of gyrB and toxR gene sequences of *Vibrio hollisae* and development of gyrB and toxR-targeted PCR methods for isolation of *V. hollisae* from the environment and its identification [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(8): 3506-3514.
- [23] KUMAR H S, PARVATHI A, KARUNASAGAR I, et al. A gyrB-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2006, 111(3): 216-220.