

文章编号: 1673 1689(2011)01-0084 06

食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究

徐晓可^{1, 2}, 吴清平^{* 1, 2}, 张菊梅^{1, 2}, 周艳红^{1, 2}, 杨小鹏^{1, 2}

(1. 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070; 2. 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070)

摘要: 以耐热核酸酶基因 *nuc*、纤维蛋白原结合蛋白基因 *clfA* 和 *SmaI* 限制性酶切片段特异序列为靶基因, 设计筛选引物, 建立并优化了检测金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)的多重 PCR 体系。采用 10 株 SA 和 46 株非 SA 验证了该多重 PCR 具有很好的特异性。PCR 检测的灵敏度在 DNA 水平上达到 1.197 3 ng。人工污染样品, 当起始污染量为 1.2 cfu/g 时, 37 °C 增菌培养 6 h 即可检出。一共检测了 43 份样品, 检出 3 份阳性样品, 其中有 2 份阳性样品与传统方法一致, 另外一份阳性样品用测序验证。作者建立的多重 PCR 方法可特异、快速地实现对 SA 的检测。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 多重 PCR; 食品

中图分类号: TS 20116

文献标识码: A

Studies on Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by Multiplex PCR

XU Xiaoke^{1, 2}, WU Qing-ping^{* 1, 2}, ZHANG Ju-mei^{1, 2},
ZHOU Yan-hong^{1, 2}, YANG Xiao-juan^{1, 2}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Provincial Public Laboratory of Microbial Application of New Technologies, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: In this manuscript, a multiplex PCR assay for detection of *S. aureus* was developed by designing three sets of primers that specifically amplify segments of the *nuc*, *clfA* and *SmaI* genes. Analysis of ten *S. aureus* strains and forty-six non-*S. aureus* strains demonstrated that this PCR system was specific. The detection limit of the PCR was 1.1973 ng with genomic DNA and 1.2 cfu/g in artificially contaminated bread after enrichment at 37 °C for 6 h. Forty-three foods were detected to confirm the accuracy of this method. Among of them, three were found to be positive, and two were consistent with that of the international standard method, and one was through verification by sequenced. The result proven that the specific multiplex PCR assay can be used for detection of *S. aureus* in foods.

Key words: *Staphylococcus aureus*, multiplex PCR, foods

收稿日期: 2010-02-05

基金项目: 科技型中小企业技术创新基金(09C26214402098), 广东省计划项目(2007B030601003)。

作者简介: 徐晓可(1980-), 女, 广东广州人, 农学硕士, 助理研究员, 主要从事食品微生物安全快速检测研究。

Email: xuxiaoke209@163.com

* 通信作者: 吴清平(1962-), 男, 广东广州人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事食品微生物安全快速检测与高效控制研究。Email: wuqp203@yahoo.com.cn

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA) 是引起细菌性食物中毒的重要病原菌之一, 国内外由 SA 引发的食物中毒屡屡发生。据美国疾病预防控制中心报告, 由 SA 引起的细菌性食物中毒居第二位, 占整个细菌性食物中毒的 33%。加拿大则高达 45%^[1-2]。近年来, 我国每年由 SA 引起的食物中毒事件已居第 4 位^[3]。

在检测手段上, 目前国内外检测机构仍主要采用传统的方法对 SA 进行检测, 整个过程一般需要 3~5 d, 且操作烦琐, 已不能满足微生物快速准确检测的现实需要。因此, 迫切需要建立新的快速检测技术和方法。PCR 技术以敏感、特异、简便和快速等优点被越来越多地应用。迄今, 已有文献介绍采用多重 PCR 方法检测 SA^[4-8]。然而, 这些方法大多侧重于耐药性相关基因和毒素基因, 并较少应用于实际样品的检测。因此, 建立适合于食品中特异性强且灵敏度高的多重 PCR 检测方法显得尤为重要。

在用 PCR 方法检测 SA 中, 除了上述的耐药性相关基因和毒素基因外, 同时也不断发现一些种属特异性靶基因。SA 会产生耐热核酸酶, 耐热核酸酶编码基因(*nuc* 基因) 不仅为 SA 所特有, 而且在不同菌株之间具有较高保守性, 因此, 很多研究者采用了 *nuc* 基因作为扩增的靶基因^[9]; 另外, 研究显示纤维蛋白原结合蛋白基因(*clfA*) 存在于所有 SA 的染色体中, 可以特异的检出 SA^[10]; 同时, 一段 44 kb 的 *SmaI* 序列被证实为 SA 特异性序列, 而其它葡萄球菌缺失这段序列^[11], Stepan J 等人的研究发现在所有的 SA 中均存在一段 2052 bp 的特异序列^[12]。因此, 作者在选择 SA 特异性基因 *nuc* 和 *clfA* 的基础上, 根据 *SmaI* 序列设计特异性引物, 建立了食品中 SA 特异灵敏的多重 PCR 检测方法, 并进行了食品中 SA 多重 PCR 检测方法的应用性研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 凝胶成像分析系统 UVI; PCR 仪 PE2400; 梯度 PCR 仪 PTC-200; 核酸蛋白分析仪 DU640。

1.1.2 主要试剂 Taq 酶、dNTP 购自晶美生物工程公司, 各种培养基购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.3 引物合成 以 *SmaI* 限制性酶切片断特异序列为靶基因, 根据网上 GeneBank 序列和 Prim-

er5.0 设计引物; 以耐热核酸酶基因 *nuc*、纤维蛋白原结合蛋白基因 *clfA* 为靶基因, 利用 Primer5.0 分析筛选文献引物, 委托上海英骏生物技术公司合成, 其序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

目标基因	引物序列(5' → 3')	PCR 产物 (bp)
<i>nuc</i> ^[9]	F: GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT R: AGC CAA GCC TTG ACG AACTAA AGC	279
<i>clfA</i> ^[10]	F: GCA AAA TCC AGC ACA ACA GGA AAC GA R: CTT GAT CTC CAG CCA TAA TTG GTG G	638
<i>SmaI</i>	F: TGC GAA ACA TCC ACG ACA TA R: CGT TTG TGC TGA TTT CCCTAC	426

1.1.4 菌株 56 株实验菌株分别是 10 株 SA (2 株标准株, 8 株分离株), 46 株非 SA。产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) CMCC 45103、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) CMCC51252、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) CMCC51572、宋内氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*) CMCC51592、甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi A*) CMCC 50093、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) CMCC 50071 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) CMCC 50115 由广东环凯微生物科技有限公司提供; 其余菌株均为广东省微生物研究所保存株。

1.1.5 样品 样品购自市场和超市。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 SA 和其它葡萄球菌用质量分数 7.5% NaCl 的营养肉汤 (NB) 培养基培养, 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和其它弧菌均用含质量分数 3.5% NaCl 的 NB 培养基培养, 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 用胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤 (TSB-YE) 培养基培养, 其他菌株用 NB 培养。

1.2.2 模板 DNA 制备 参照刘刚等 (2004) 的方法稍作修改提取模板 DNA^[13]。

1.2.3 多重 PCR 反应 优化后, 多重 PCR 体系总体积为 25 μ L, 其中包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 200 nmol/L 引物, 1.25 U Taq 酶, 1 μ L DNA 模板。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 35 个循

环; 72 °C 延伸 10 min; 于 4 °C 下保存。扩增后的 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像分析系统 UVI 观察结果并拍照。

1.2.4 PCR 特异性分析 包括 SA 在内的共 56 株菌, 按上述方法制备模板, 进行 PCR 特异性检测。

1.2.5 多重 PCR 检测灵敏度 用核酸蛋白分析仪 DU640 检测 DNA 的浓度, 做 10 倍梯度稀释, 将不同稀释度的 DNA 分别作 PCR 扩增。

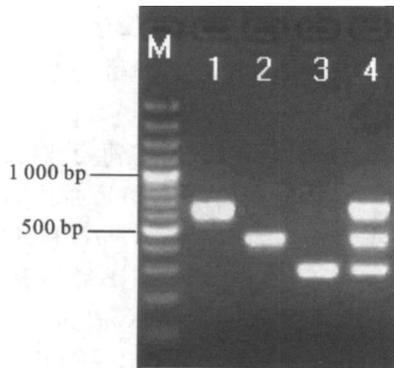
1.2.6 人工污染样品检测 将计数的 SA 菌液进行梯度稀释, 取 1 mL 菌悬液人工接种奶油面包, 每份 10 g 奶油面包样品接种菌液的稀释度为 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 奶油面包碎片中加入 90 mL 质量分数 7.5% NaCl NB, 混匀, 37 °C 培养, 在 6 h 和 10 h 后分别取 1 mL 增菌液, 提取 DNA 进行 PCR 检测。同时对含不同稀释度的菌液进行平板计数。

1.2.7 食品中 SA 检测 从超市购买样品 43 份, 无菌操作取 10 g 样品于 90 mL 质量分数 7.5% NaCl NB 中, 37 °C 培养一段时间, 取适量增菌液按 1.2.2 提取 DNA 为模板, 进行多重 PCR 检测。

2 结果

2.1 多重 PCR 反应

作者设计筛选了 SA 特异的 *nuc*、*clfA* 和 *SmaI* 基因引物, 在进行单重 PCR 检测的研究基础上, 对多重 PCR 各反应参数进行了优化, 从而确定了最佳反应体系(见图 1)。



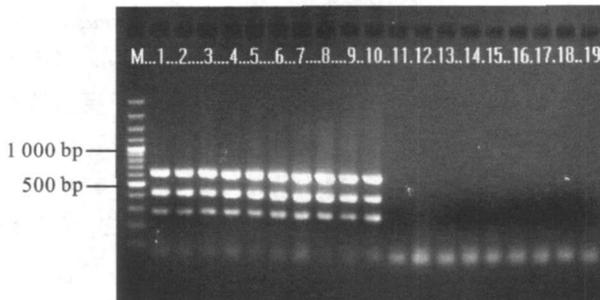
M: 100 bp DNA ladders; 1: *clfA* 基因扩增产物; 2: *SmaI* 基因扩增产物; 3: *nuc* 基因扩增产物; 4: *clfA*, *SmaI*, *nuc* 3 个基因同时扩增产物

图 1 SA 多重 PCR

Fig. 1 The multiplex PCR of SA

2.2 PCR 特异性

根据所设计筛选的 3 对特异性 PCR 引物对 56 株常见致病菌(表 2)进行 PCR 检测, 10 株 SA 均为阳性, 46 株其他菌株均为阴性, 部分结果见图 2。



M: 100-bp DNA ladders; 1: SA (CMCC26003); 2: SA (ATCC6538); 3: SA 分离株(a); 4: SA 分离株(b); 5: SA 分离株(d); 6: SA 分离株(i); 7: SA 分离株(k); 8: SA 分离株(T7); 9: SA 分离株(R8); 10: SA 分离株(T8 远); 11: 藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*; 12: 腐生葡萄球菌 *S. saprophyticus*; 13: 中间葡萄球菌 *S. intermedius*; 14: 溶血葡萄球菌 *S. haemolyticus*; 15: 科氏葡萄球菌 *S. cohnii*; 16: 猪葡萄球菌 *S. hyicus*; 17: 马胃葡萄球菌 *S. equorum*; 18: 人葡萄球菌 *S. hominis*; 19 空白对照

图 2 金黄色葡萄球菌特异性验证部分结果

Fig. 2 Specific detection of SA

表 2 SA 引物特异性供试菌株

Tab. 2 Specific detection of strains

+ = PCR amplification positive, - = no PCR product

菌株	来源/编号	<i>clfA</i>	<i>SmaI</i>	<i>nuc</i>
SA	CMCC26003	+	+	+
SA	ATCC6538	+	+	+
SA 分离株	a	+	+	+
SA 分离株	b	+	+	+
SA 分离株	d	+	+	+
SA 分离株	i	+	+	+
SA 分离株	k	+	+	+
SA 分离株	T7	+	+	+
SA 分离株	R8	+	+	+
SA 分离株	T8 远	+	+	+
藤黄微球菌	CMCC 28001	-	-	-
腐生葡萄球菌	DTB 80111	-	-	-
中间葡萄球菌	DTB 80121	-	-	-
溶血葡萄球菌	DTB 80101	-	-	-
科氏葡萄球菌	DTB 80116	-	-	-
猪葡萄球菌	DTB 80122	-	-	-
马胃葡萄球菌	DTB 80107	-	-	-
人葡萄球菌	DTB 80106	-	-	-
粪链球菌	ATCC 29212	-	-	-
白色葡萄球菌	ATCC 8032	-	-	-

续表 2

菌株	来源/编号	<i>clfA</i>	<i>SmaI</i>	<i>nuc</i>
大肠杆菌	CMCC 44113	-	-	-
大肠杆菌	8099	-	-	-
大肠杆菌	ATCC 8739	-	-	-
大肠杆菌	ATCC 25922	-	-	-
大肠杆菌	CMCC 44102	-	-	-
大肠杆菌 O157:H7	NCTC 12900	-	-	-
宋内氏志贺菌	CMCC 51592	-	-	-
福氏志贺菌	CMCC 51572	-	-	-
痢疾志贺菌	CMCC 51252	-	-	-
铜绿假单胞菌	ATCC 9027	-	-	-
副溶血性弧菌	VPL4-90	-	-	-
单核细胞增生李斯特氏菌	CMCC 54002	-	-	-
单核细胞增生李斯特氏菌	CMCC 54003	-	-	-
单核细胞增生李斯特氏菌	CMCC 54004	-	-	-
霍乱弧菌	Vb0	-	-	-
解藻朊酸弧菌	DTB 30103	-	-	-
枯草芽孢杆菌	CMCC 63501	-	-	-
阪崎肠杆菌	ATCC 51329	-	-	-
产气肠杆菌	CMCC 45103	-	-	-
小肠结肠炎耶尔森菌	广临检-52	-	-	-
亚利桑那沙门氏菌	CMCC 47001	-	-	-
乙型副伤寒沙门氏菌	CMCC 50094	-	-	-
副伤寒沙门氏菌	CMCC 50098	-	-	-
汤卜逊沙门氏菌	CMCC 50023	-	-	-
肠炎沙门氏菌	CMCC 50335	-	-	-
伤寒沙门氏菌	CMCC 50071	-	-	-
甲型副伤寒沙门氏菌	CMCC 50093	-	-	-
鼠伤寒沙门氏菌	CMCC 50115	-	-	-
空白对照		-	-	-

2.3 PCR 灵敏度

培养 SA, 抽提基因组 DNA, 用核酸蛋白分析仪 DU640 测定模板 DNA 含量, 按梯度稀释, 将不

同稀释度的 DNA 分别作 PCR 扩增, 结果表明, SA 多重 PCR 检测的灵敏度达到 1.197 3 ng, 结果见图 3。图中, M: 100 bp ladder Marker; 1: 1.197.3 ng; 2: 119.73 ng; 3: 11.973 ng; 4: 1.197.3 ng; 5: 0.119.73 ng; 6: 11.973 pg; 7: 1.197.3 pg; 8: 0.119.73 pg; 9: 空白对照

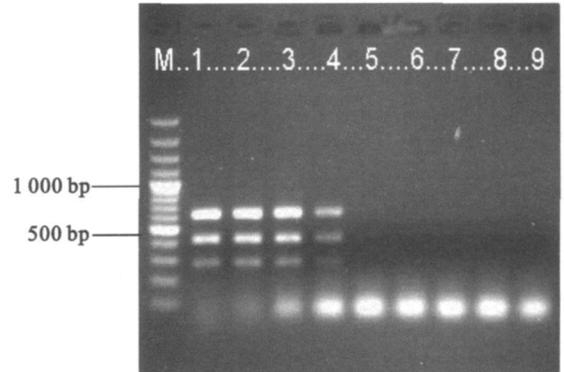


图 3 多重 PCR 检测 SA 的灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of the PCR for detecting SA

2.4 人工污染样品检测

培养 SA, 将计数的菌液进行梯度稀释, 取 1 mL 菌悬液人工污染奶油面包, 起始污染菌量为 $1.2 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^{-1}$ 个/g, 实验设空白(1 mL 生理盐水)对照; 增菌培养 6 h 和 10 h, 分别取菌悬液提取 DNA, PCR 检出情况见图 4。从图 4 可以看出, 当起始污染菌量为 1.2 个/g 时, 37 °C 增菌 6 h 即可检出。图中 1-5: 增菌 10 h, 1: 1.2×10^4 , 2: 1.2×10^3 , 3: 1.2×10^2 , 4: 1.2×10^1 , 5: 1.2×10^0 ; 6-10: 增菌 6 h, 6: 1.2×10^4 , 7: 1.2×10^3 , 8: 1.2×10^2 , 9: 1.2×10^1 , 10: 1.2×10^0 ; 11: 样品对照(未加菌), 12: 空白对照; M: DL2 000 Marker

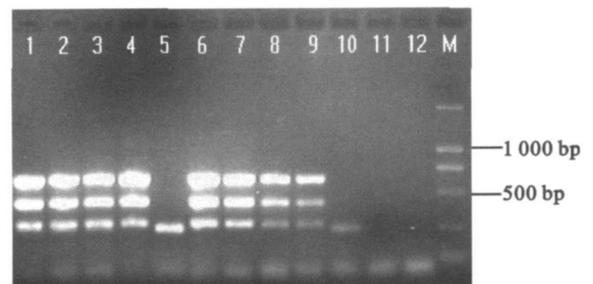


图 4 SA 人工污染奶油面包不同菌量不同培养时间对 PCR 敏感性的影响

Fig. 4 Effects of different levels and pre incubation times of artificially contaminated bread on sensitivity of the PCR detection of SA

2.5 食品中 SA 检测

从农贸市场和超市一共购买 43 份样品, 样品主要有热狗、生香肠(4 份)、披萨、时蔬、水果拼盘、蛋糕(4 份)、乌头鱼、鲜肉肠、酿四宝、寿司、基斯、小

西点、木瓜汤、猪肉(13份)、牛肉(7份)、鸡肉(2份)、禽内脏(2份)。采用多重PCR和传统方法同时进行SA。多重PCR检测结果显示有3份样品扩增出638 bp、426 bp和279 bp的目的片段,表明检出3份疑似样品(部分结果见图5);传统方法检出2份疑似样品。多重PCR检出的3份疑似样品中,有2份疑似样品(水果拼盘和蛋糕)与传统方法一致,用法国生物梅里埃细菌鉴定系统API STAPH生化试剂条对疑似的菌落进行最终鉴定,水果拼盘样品分离的SA符合率为97.8%,蛋糕样品分离的SA符合率95.5%;另外一份疑似样品(酿四宝)由于传统方法未检出,作者将阳性样品的PCR产物进行测序,对序列进行分析,结果证明与SA的同源性达到98%。图中M:2 000 bp Marker; 1:热狗; 2:生香肠(1); 3:披萨; 4:时蔬; 5:水果拼盘; 6:蛋糕(1); 7:乌头鱼; 8:鲜肉肠; 9:蛋糕(2); 10:生香肠(2); 11:蛋糕(2); 12:寿司; 13:生香肠(3); 14:基斯; 15:生香肠(4); 16:蛋糕(3); 17:小西点; 18:空白对照; 19:阳性对照

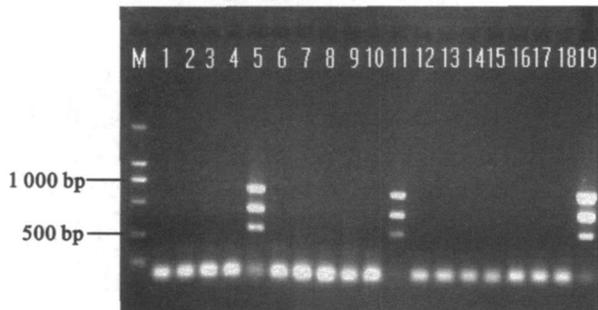


图5 食品中SA检测

Fig.5 Results of naturally contaminated samples by the multiplex PCR assay

3 结 语

近年来,人们对多重PCR检测的研究已越来越深入^[14]。目前,用于SA PCR检测的靶基因主

要包括耐药性相关基因 *mecA* 和 *femA*, 毒素相关基因 *SEA*、*SEB*、*SEC*、*SED*、*SEI* 和 *SEJ* 等, 特异性鉴别基因 *nuc*、*clfA*、*scpA*、*sspB* 和 *SmaI* 酶切片段等^[15]。

选择特异的靶基因并设计出合理的引物对多重PCR检测SA至关重要。作者在查阅和分析大量文献的基础上,通过研究和比较致病菌的分子特征和生理生化特性,确定了检测SA的特异靶基因为 *nuc*、*clfA* 和 *SmaI*。引物设计时首先将引物序列在GenBank上同源比对,对获得的同源序列进行分析,发现这3个目标片段的DNA序列与数据库上的SA具有100%的同源性,与其它葡萄球菌和非葡萄球菌没有同源性或同源性很低,理论上显示这3个片段能鉴定出SA,作者的特异性验证实验亦证明这3个片段能特异检出SA。另外,在引物设计和筛选时充分应用分子生物学软件进行分析,从而有效避免了引物退火温度的不同和引物间相互干扰等问题的发生;同时对多重PCR的反应条件进行了优化,通过调整 Mg^{2+} 、Taq酶和引物的浓度,使多重PCR具有很好的稳定性以及很高的敏感性。田静等(2007)建立了适用于牛奶、冰淇淋及肉中的SA检测的PCR方法,在3种食品中的检出限均为10个/g^[16]。郑华妮等(2009)建立了SA肠毒素A、E基因的PCR检测方法,敏感性达 1.2×10^2 个/g^[17]。作者的多重PCR体系可以检测到1.1973 ng的DNA;人工污染面包增菌培养6h的检测限为1.2个/g。实际样品检测时,采用选择性培养基培养,这样可以有效避免非目标菌的竞争,更有利于目标菌的检出。

研究检测了43份实际样品,多重PCR检出的3份阳性样品中,有2份与传统方法一致,另外一份用测序验证。结果表明,作者建立的多重PCR方法比传统方法灵敏,能够用于食品中SA的特异灵敏检测。

参考文献(References):

- [1] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等.食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J].中国食品学报,2008,8(3):88-93.
Suo Yur Juan, Yu Hong wei, Ling Wei, et al. Analysis on the Contamination of *Staphylococcus Aureus* in Food[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 8(3): 88-93. (in Chinese)
- [2] Post D E. Food pathogens (*Staphylococcus aureus*) Monograph[M]. England, 1999.
- [3] 刘秀梅.食源性疾病监控技术的研究[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):3-9.
Liu Xiur mei. Studies on the techniques for the monitoring and controlling foodborne illness[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2004, 16(1): 3-9. (in Chinese)
- [4] Costa A M, Kay I, Palladino S. Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in *staphylococci* by real time multiplex polymerase chain reaction[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 51(1): 13-17.

- [5] Rall V L, Vieira F P, Rall R, et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk[J]. **Veterinary Microbiology**, 2008, 132(3-4): 408-413.
- [6] Hwang S Y, Kim S H, Jang E J, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, 117(1): 99-105.
- [7] 牟晓峰, 陈文, 闰志勇, 等. 耐甲氧西林葡萄球菌的多重 PCR 快速检测[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(3): 203-206.
- MU Xiaofeng, CHEN Wen, YAN Zhiyong, et al. Multiple PCR in rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus* [J]. **Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis**, 2006, 42(3): 203-206. (in Chinese)
- [8] 杨玉军, 黄韦唯, 王志云, 等. 多重 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌四型肠毒素基因的研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(9): 1713-1715.
- YANG Yujun, HUANG Weiwai, WANG Zhiyun, et al. A study on fast detection of four kinds of *Staphylococcus aureus* enterotoxins genes with a multiplex PCR method[J]. **Modern Preventive Medicine**, 2009, 36(9): 1713-1715. (in Chinese)
- [9] Odd G B, Kjetill A, Johan A M. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [10] William J M, Jon S B, Karen B, et al. Multiplex PCR Protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001, 39(9): 3332-3338.
- [11] Pantucek R, Gotz F, Doskar J, et al. Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed field gel electrophoresis [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1996, 46(1): 216-222.
- [12] Stepan J, Pantucek R, Ruzickova V, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44 kb Sma I restriction fragment[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2001, 15(5): 249-257.
- [13] 刘刚, 翟朝阳. 一种通用的从少量培养液中快速提取细菌染色体 DNA 的方法[J]. 西部医学, 2004, 16(2): 111-113.
- LIU Gang, ZHAI Chaoyang. A current and speedy extraction method for bacterial chromosomal DNA from a trifle of broth[J]. **Medicine Journal West China**, 2004, 16(2): 111-113. (in Chinese)
- [14] 王娜, 陶妍. 水产品三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 397-402.
- WANG Na, TAO Yan. Establishment of a Multiplex PCR for Detection of Three Types of Pathogen in Aquatic Foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 397-402. (in Chinese)
- [15] 姜延龙, 张宇, 田波, 等. PCR 技术检测金黄色葡萄球菌进展[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 265-269.
- JIANG Yanlong, ZHANG Yu, TIAN Bo, et al. Review on Progress of *Staphylococcus aureus* Assay by PCR[J]. **Food Science**, 2006, 27(5): 265-269. (in Chinese)
- [16] 田静, 计融, 杨军, 等. PCR 方法快速检测食品中的金黄色葡萄球菌[J]. 卫生研究, 2007, 36(2): 183-186.
- TIAN Jing, JI Rong, YANG Jun, et al. *Staphylococcus aureus* in food determined by polymerase chain reaction[J]. **Journal of Hygiene Research**, 2007, 36(2): 183-186. (in Chinese)
- [17] 郑华妮, 何娅, 杨群英. PCR 检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A、E 基因[J]. 实用预防医学, 2009, 16(1): 246-248.
- ZHENG Huani, HE Ya, YANG Qunying. Detection of Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin A, E by PCR[J]. **Practical Preventive Medicine**, 2009, 16(1): 246-248. (in Chinese)