

多种致病菌同步检测方法的研究进展

孙秀兰^{1,2}, 张芳^{1,2}, 张银志¹

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 概述了致病菌检测的对象, 包括细菌菌群的形态及细菌本身、细菌的 DNA、细菌的代谢物; 同时介绍了可同步检测多种致病菌的方法, 主要有电化学 DNA 传感器、适配体电化学传感器、免疫传感器检测技术、多重 PCR 检测、表面增强拉曼光谱检测; 最后总结检测方法未来的发展方向。

关键词: 多种致病菌; 同步检测

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0449-06

Research Advance Study of the Synchronous Detection of Multiplex Foodborne Pathogens

SUN Xiu-lan^{1,2}, ZHANG Fang^{1,2}, ZHANG Yin-zhi¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiang Nan University, Wu Xi 214063, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this review, the detection targets such as bacteria colonies, bacteria cell i, DNA and bacteria metabolic products are firstly introduced. Then the detection methods which can synchronously identify Multiplex Food-borne Pathogens electrochemical DNA biosensor, Aptamer biosensor, Electrochemical immunosensor, Surface plasmon resonance biosensor and Multiplex PCR were summarized. Based on the above progress, the challenge and perspective of detection method were put forward.

Key words: detection targets, multiplex foodborne pathogens, synchronous detection

多种致病菌相互混合存在于食品中, 他们数量相差很大, 难以分离, 检测困难。并且由于营养成分的不同, 适宜生长的致病菌的种类也不同, 如海产品中容易生长副溶血性弧菌。传统致病菌检测主要检测食品中的主要致病菌, 但是食品中数量极少的致病菌也可能对人体健康造成很大影响。牛奶中的主要致病菌是金黄色葡萄球菌^[1], 但是 2012 年 2 月 17 日, 在美国 76 人因饮用生奶感染弯曲杆菌^[2]。因此, 检测食品中的主要致病菌已经不

能保障食品安全, 多种致病菌的同步检测提上日程。目前多种致病菌同步检测的方法主要有: 多重 PCR 检测、生物传感器检测、表面拉曼光谱检测等方法。本文对多种致病菌同步检测方法进行归纳, 并对未来检测技术的研究提供一定的参考^[3-4]。

1 致病菌检测的对象

致病菌是指能引起疾病或能造成损伤的微生物, 一般所说的致病菌指的是病原微生物中的细

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20806033), 2010 年度公益性行业(农业)科研专项项目(201003008-08)。

作者简介: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面研究。

E-mail: sxlzzz@yahoo.com.cn

菌。常见致病菌有沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和致泻大肠埃希氏菌,副溶血弧菌、李斯特菌等等。一般的检测方法的检测对象是细菌菌群的形态及细菌本身、细菌的 DNA、细菌的代谢物^[5]。

1.1 致病菌菌群的形态及细菌本身

单个细菌细胞在电镜下的形态会有一些的差异,不同细菌形成的菌落也会形成不同的形状。利用他们之间的不同可以对细菌进行初步的鉴定,其中按形态划分有球菌、杆菌、弧菌等;在不同的培养基上培养,又会出现透明或不透明菌落,甚至产生不同颜色。如金黄色葡萄球菌在电镜下,直径约 $0.8\ \mu\text{m}$ 左右,显微镜下排列成葡萄串状,无芽胞、鞭毛,大多数无荚膜^[6]。

1.2 致病菌的 DNA

脱氧核糖核酸(DNA)是遗传物质,以引导生物发育与生命机能运作,主要功能是长期性的信息储存,同时指导细胞内其他的化合物,如蛋白质的合成;也指导其他代谢产物如各种细菌毒素的合成。以 DNA 为检测目标物的方法,主要的依据是碱基互补配对原理,A-T,C-G。一般细菌都具有种属 DNA,也可检测编码特定代谢产物的碱基序列,如编码金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的基因^[7-8]。

1.3 致病菌的代谢物

致病菌的代谢物有很多种,如分泌的毒素、蛋白质、酶类等。细菌的大多数产物具有抗原特性,有特定的抗体。代谢产物都具有一定的特性,能根据这些特性来检测。如金黄色葡萄球菌分泌的凝血酶会产生凝血现象;适配体能与代谢分子特异性结合,如已经筛选出与黄曲霉毒素特异性结合的适配体^[9-10]。

2 多种致病菌同步检测的检测方法

2.1 电化学传感器

最早的电化学传感器可以追溯到 20 世纪 50 年代,电化学传感器主要是将各种信号转化为电信号,通过检测电流、电阻等的变化来反映检测物的量。目前检测致病菌的电化学传感器主要有:DNA 传感器、适配体传感器、免疫传感器^[11-12]。

2.1.1 DNA 电化学传感器 DNA 电化学传感器是将单链 DNA 作为敏感元件固定在电极表面,加入可指示杂交信息的电活性物质,通过检测修饰电

极在待测溶液中电化学信号的变化,以确定靶 DNA 的浓度。主要过程: ssDNA 的固定、杂交、杂交指示剂、电化学检测^[13]。

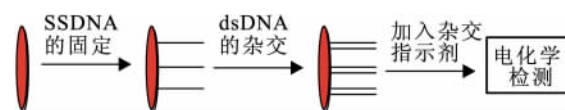


图 1 DNA 电化学传感器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of electrochemical DNA biosensor

Elaine Spain^[14]等利用 DNA 传感器成功的建立了检测金黄色葡萄球菌的方法。成功的检测了能引起奶牛发生乳房炎的金黄色葡萄球菌的基因。Xue-Mei Li^[15]等建立的金纳米离子修饰的电极可检测 2 个 DNA,2 个 DNA 的检出限浓度都超过 $10\sim 11\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Deng Zhang^[16]等建立的传感器能检测 2 种来自不同细菌的 DNA,磁性纳米粒子修饰致病菌巯基探针能够识别目标 DNA 的一端,用金纳米粒子修饰致病菌巯基探针能识别目标 DNA 另一端,并将金纳米粒子探针与 NTs(硫化铅、硫化镉)结合,NTs 的羧基与纳米探针的氨基结合,通过磁场吸附,NTs 游离,通过 SWASV 进行检测。

DNA 传感器随着 ssDNA 的不同,指示剂的不同就可检测多种致病菌。DNA 电化学传感器具有快捷、灵敏度高、特异性强等优^[17],但电化学 DNA 传感器还存在一定的局限,比如如何在电极表面固定多个不同探针,构建复杂基质环境使能够同时检测多个 DNA,DNA 的空间结构的变化,碱基错配,同源致病菌 DNA 的相似性对检测准确性的影响^[18]。

2.1.2 适配体电化学传感器 电化学适配体传感器是由固定了适配体的电极和电化学活性识别元素构成。首先在适当条件下将适配体固定到电极表面,将待测目标物加入与适配体作用,从而导致电极表面结构的变化;然后通过检测电化学信号的变化来检测目标物^[19]。

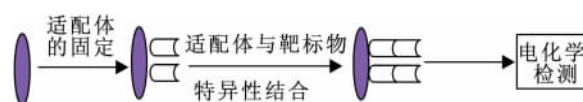


图 2 适配体电化学传感器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of electrochemical aptamers biosensor

Gustavo^[20]组成员设计的适配体传感器,适配体和靶分子的结合使电势发生变化,能有效地准确

检测检测大肠杆菌 O157:H7, 检测下限 26 cfu/mL, 检测时间短。曹晓晓^[21]等利用获得的一组能够与金黄色葡萄球菌特异性结合的适配体, 通过流式细胞仪和共聚焦显微镜检测发现, 组合适配体相对于单一的适配体能够更好地区分金黄色葡萄球菌细菌和消减靶细菌及大肠。在电极表面固定一组适配体, 可能会提高检测的特异性。在电极表面固定不同的适配体, 检测不同的致病菌, 是一个可行实验方案^[22]。

细菌细胞可以筛选到适配体, 细菌的代谢物如毒素, 也可筛选到特异性适配体。作为一类分子识别元件, 适配体对其靶标具有严格的识别力和高度的结合力。因此适配体电化学传感器具有特异性和选择性, 可实现对多种细菌的定性定量检测。电化学适配体生物传感器有一定的局限性, 如筛选过程复杂, 易于被剪切降解空间结构稳定性有待提高等, 一般可对筛选出来的核酸适配体进行修饰。筛选的核酸适配体对靶标物的特异性还没有达到 100%, 一个细胞由于表面的不均一性, 可能具有多个适配体, 对于检测的特异性和准确性都会造成很大的干扰^[23-24]。

2.1.3 免疫学传感器检测技术 电化学免疫传感器是生物技术和电化学技术相结合的产物, 免疫学检测技术利用了抗体与抗原的特异性结合的原理。1990 年 Henr^[25-26]等提出了免疫传感器的概念: 将高灵敏的传感技术与特异性免疫反应结合起来, 用以监测抗原-抗体反应的生物传感器称作免疫传感器。有三个主要元件: 感受器、转换器和检测器。

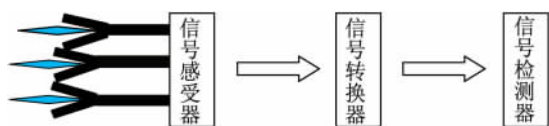


图3 电化学免疫传感器示意图

Fig. 3 Schematic diagram of electrochemical immunosensor

周焕英, 高志贤^[27]制成的酶免疫传感器, 针对葡萄球菌肠毒素 C 检测灵敏度可达到 10 $\mu\text{g/L}$, 20 min 即可完成。Tahir^[28]等采用电化学免疫传感器技术检测大肠杆菌 O157:H7, 可以在 10min 内完成分析, 检测精度可达 10 cfu/mL。Faridah^[29]等以辣根过氧化酶为标记酶, 使用电化学免疫传感器检测鼠伤寒沙门氏菌, 检出下限为 20 cfu/mL, 表明该方法具有较高的灵敏性。

在表面固定不同的抗体, 就可检测不同的抗原。但有的细菌会分泌共同抗原, 特别是同源的致病菌如肠道菌群, 这种方法只能检测区分分泌不同抗原的致病菌。来源于不同致病菌的抗体他们的活性的保持, 在小小的表面需要注意抗体之间的相互影响, 检测溶液环境的确定都会造成结果的差异很大。免疫学电化学传感器检测方法具有制样简单, 测试时间短, 成本低, 灵敏度高的优点。应用电化学免疫传感器对致病菌产生的抗原进行测定, 需要解决的主要问题是: 抗体的标记、抗体的活性保持、假阳性的排出、信号测定有一定难度等^[30]。

2.2 表面增强拉曼检测技术

当单色光照射至物质上, 物质分子发生散射现象, 出现与入射光频率不同的散射光, 所形成的光谱称拉曼光谱。拉曼光谱较微弱, 表面增强拉曼 (SERS) 就应运而生^[31]。表面增强拉曼光谱要与其他技术结合, 如与 DNA、适配体技术的结合, 才能更准确的检测致病菌。SERS 是将敏感元件固定在某表面, 与修饰了量子点的靶标物结合, 利用拉曼光谱照射产生的不同的光谱信号, 以确定靶标物的量和种类。主要过程: 敏感元件的固定、特异性和选择性结合、拉曼光谱检测^[32]。



图4 SERS检测示意图

Fig. 4 Schematic diagram of surface plasmon resonance biosensor

Nam Hoon Kim^[33]等介绍了一种方法, 适配体与 SERS 结合来检测, 检测后可除去靶标物, 可以反复使用。Do Kyun Kim^[34]等建立的方法, DNA 和拉曼光谱的结合, 可检测多个 DNA 序列, 检测下限达 10 fmol/L (50 zmol)。Taejoon Kang^[35]等把金粒子固定在金属丝上, 与 DNA 结合, 在进行 SERS 分析, 可检测多个致病菌, 并能在电镜下观察到。

目前 SERS 检测细菌细胞的研究很少, 主要原因是细胞的表面不均一性, 表面积较大, 所得的谱图太复杂, 没有特异性。表面增强拉曼光谱具有方便快捷、检测灵敏度高、多组分同时检测等特点, 这使得其在检测样品中致病菌含量较传统方法有明显的优势, 但是拉曼光谱的发生本身对待测物就有一定的要求, 不是每种物质都适用^[36]。

2.3 多重 PCR 检测技术

多重 PCR 检测技术的基本原理就是在体外适宜条件下,以提取得到的 DNA 为模板,以人工设计与合成的寡核苷酸为引物,特异性地扩增 DNA 片段。最后通过电泳技术与阳性对照进行比对,来判断阴阳性结果^[37]。PCR 由加热变性——退火加引物——升温延伸,三个基本反应步骤构成^[38]:



图 5 多重 PCR 技术检测示意图

Fig. 5 Schematic diagram of detection of multiplex PCR

余以刚,何秋彤^[39]等以两种食源性致病菌(沙门氏菌、单增李斯特菌)为模板,通过对多重荧光 PCR 缓冲液的成分、扩增所用酶、添加剂等进行研究,建立适用细菌 DNA 检测的多重荧光 PCR 反应体系。Sharma^[40]等建立了能在 3~4 h 内检测出毒素基因多重 PCR 体系。

多重 PCR 技术在实际的检验工作还存在一些问题:提取得到的 DNA 的裂解得到的不完整 DNA 片段,多重 PCR 技术中多组引物之间相互干扰、高浓度模板对低浓度模板产生竞争性抑制等问题^[41-42]。相对于传统检测方法,多重 PCR 检测技术极大地缩短了检测时间,提高了检测灵敏度,且操作简单、快速,特异度和敏感度较高,是快速检测

和鉴定常见致病菌的一种有效的手段^[43]。

3 展望

DNA 传感器、多重 PCR 技术是以 DNA 为检测目标的方法,他们的检测限低、灵敏度高、时间短、花费少、劳动量少,是发展前景非常好的检测方法。但是 DNA 的错配,特异性检测受到环境的干扰,同种属细菌的基因序列的同源性,容易出现假阳性的结果。适配体传感器与免疫传感器相比,各有所长。适配体的廉价易得,易保存的优点,在检测致病菌上,有明显的优势。致病菌可以有共同抗体,但是基本没有共同的适配体。致病菌细胞可能有一组适配体。这两原因对检测的特异性和准确性造成很大影响。抗体和抗原结合的假阳性的出现。表面增强拉曼光谱检测技术重复性强,敏感度高,不同结构的分子产生的拉曼光谱强弱差异很大,甚至有的分子不产生拉曼光谱现象,降低了表面增强拉曼光谱检测方法的适用范围。

目前多种致病菌同步检测的方法还仅限于实验室,繁杂前处理过程以及数据处理的复杂性是他们的缺点。研究宜携带的试纸条,在生产过程能检测,提高检测的时效性和方便性,不损坏产品的,降低食品损坏成本,检测结果为不同颜色及颜色深浅,检测过程的简单化,是未来一段时间的研究发展方向^[44]。

参考文献(References):

- [1] Bieke Van Dorst, Jaytry Mehta, Karen Bekaert, et al. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors : A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26 :1178—1194 .
- [2] James Andrews. 76 ill with campylobacter from raw milk dairy[N]. <http://www.foodsafetynews.com>, 2012-02-15.
- [3] Riikka M Karkka, inen, Mette Ryun Drasbek, et al. Aptamers for safety and quality assurance in the food industry: detection of pathogens [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46:445—454 .
- [4] Lin Tang, Guangming Zeng, Guoli Shen, et al. Sensitive detection of lip genes by electrochemical DNA sensor and its application in polymerase chain reaction amplicons from phanerochaete chrysosporium [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24 :1474—1479.
- [5] 鞠慧萍,宋白薇,石建华,葛晴颖,王伟. PCR 技术在常见食源性致病菌检测中的研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2010, 3:12—13.
JU Hui-ping, SONG Bai-wei, SHI Jian-hua, et al. Research advance study of detection of multiplex foodborne pathogens by PCR[J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 3:12—13. (in Chinese)
- [6] 杨蓉生,王小玲,唐俊妮. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2011, 32:459—461.
YANG Rong-sheng, WANG Xiao-ling, TANG Jun-ni. Research progress on detection method of staphylococcus aureus in food[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32:459—461. (in Chinese)
- [7] Zelada-guillen G A, Bhosales V, Riu J, et al. Realtime potentiometric detection of bacteria in complex samples [J]. *Ana-*

- lytical Chemistry, 2010,82 :918—926 .
- [8] 苏明权,杨柳,马越云,等. 实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌方法的实验研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31:794—796.
- SU Ming-quan ,YANG Liu,MA Yue-yun, et al. Real-time fluorescence quantitative PCR detection of staphylococcus aureus in experimental study[J]. *Int J Lab Med*, August, 2010,31:794—796. (in Chinese)
- [9] Gergel Y L,Zsofia B,Viola B,et al . Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging [J] . *The Analyst*, 2010,135:918—926 .
- [10] Farabullinif F, Lucarellf ,Palchethi ,et al . Disposable electrochemical gensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants[J]. *Biesenc Binelectmn*, 2007,22 :1544—1549.
- [11] 毛 斌, 韩根亮,马莉萍,等. DNA 电化学生物传感器的原理与研究进展[J]. 化学传感器,2010,29:9—15.
- Mao Bin, Han Gen-liang, Ma Li-ping, et al. Fundamenttals and progresses of DNA electrochemical biosensor[J]. *Chemical Sensor*, 2010,29:9—15. (in Chinese)
- [12] Katherine J, O dental, Justin Gooding . An introduction to electrochemical DNA biosensors [J]. *Analyst*, 2007, 132:603—610.
- [13] 张爱春,周 存. 电化学生物传感器的研究进展[J]. 天津工业大学学报,2010,29:66—70.
- ZHANG Ai-chun, ZHOU Cun. Progresses of DNA electrochemical biosensor [J]. *Journal of Tianjin Polytechnic University*, 2010,29:66—70. (in Chinese)
- [14] Elaine Spain, Robert Kojima, Richard B. et al. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalized polyaniline nanofibres[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011 26:2613—2618.
- [15] Xue-Mei Li, Pei-Yu Fu, Jin-Ming Liu, et al. Biosensor for multiplex detection of two DNA targate sequences using enzyme-functionalized Au nanoparticles as signal amplification[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010,637:133—138 .
- [16] Deng Zhang, Michael C Huarng, Evangenlyn V Alocilja . A multiplex nanoparticle-based bio-barcode DNA sensor for the simulataneous detection of multiple pathogens[J]. *Biosensors and Bioelecteioics*, 2010,26:1736—1742 .
- [17] Xinghua Ding, Hua Li, Le Deng, et al. A novel homogenous detection method based on the self-assmebled DNAzyme labeled DNA probes with SWNT conjugates and its application in detecting pathogen [J]. *Biosensors and Bioeletronic*s, 2011,26:4596—4600 .
- [18] 刘 萍,任有良,狄燕清. DNA 生物传感器研究综述[J]. 商洛学院学报,2011,25:35—41.
- LIU Ping, REN You-liang, DI Yan-qing. A review on DNA binsensors study[J]. *Journal of Shangluo University*, 2011,25:35—41. (in Chinese)
- [19] Sara, Tombelli, Maria Minunni, et al. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysity [J]. *Biomolecular Engineering*, 2007 , 24 :191—200 .
- [20] Alan K H Cheng, Dipankar Sen, Hua-Zhong Yu. Design and testing of aptamer-based electro-chemical biosensors for proteins and small molecules[J]. *Bioelectrochemistry*, 2009,77:1—12.
- [21] CAO X X, LI S H, CHEN L C, et al . Combining use of a panel of ssDNA aptamer in the detection of staphylococcus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009,37:4621—4628 .
- [22] Juan Zhang, Lihua Wang, Hua Zhang, et al. Aptamer-based multicolor fluorescent gold nanoprobe for multiplex detection in homogeneous solution[J]. *Small*, 2010, 6:201—204 .
- [23] FARABULLINI F, LUCARELLF, PALCHETH I, et al. Disposable electrochemical gensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants[J]. *Biesenc Binelectmn*, 2007,22:1544—1549.
- [24] GERGELY L, ZSOFIA B, VIOLA B, et al. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging [J]. *The Analyst*, 2010,135(5):918—926.
- [25] 刘继超,姜铁民,陈历俊,等. 电化学免疫传感器在食品安全检测中的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2010,1 :216—222.
- LIU ji-chao, JIANG Tie-min, CHEN Li-jun, et al. Research advance study of electrochemical immunosensor and its application in food safety[J]. *China Food Additives*, 2010,1 :216—222 . (in Chinese)
- [26] William E Lee, H Gail Thompson, John G Hall, et al. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000,14: 795—804.
- [27] 周焕英,高志贤. 免疫传感器在葡萄球菌肠毒素检测中的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17:177—180.

- Huan-ying Zhou, Zhi-xian Gao. Research advance study on detection of Staphylococcus aureus enterotoxin by electrochemical immunosensor[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2007, 17: 177—180. (in Chinese)
- [28] Tahir Z M, Aleilja E C. A disposable membaane strip immunasensor [C]. New York: Proceedings of Ieee Sensors, 2002. 12—14.
- [29] Faridah S, Ibtisam E T, Detection of Salmonella typhimurium using an electrochemical immunosensor [J]. **Biosensor and Bioeletronica**, 2009, 24: 2630—2636.
- [30] Ciszowska M, Stojek Z. Voltammetric and amperometric detection without added electrolyte[J]. **Anal Chem**, 2000, 72: 755—760.
- [31] Taejoon Kang, Seung Min Yoo, Ilsun Yoon. Patterned multiplex pathogen DNA detection by au particle-on-wire SERS sensor[J]. **Nano Lett**, 2010, 10: 1189—1193.
- [32] Christina Boozer, Jon Ladd, Shengfu Chen, et al. DNA-Directed protein immobilization for simultaneous detection of multiple analytes by surface plasmon resonance biosensor[J]. **Anal Chem**, 2006, 78: 1515—1519.
- [33] Nam Hoon Kim, Seung Joon Lee, Martin Moskovits. Reversible tuning of SERS hot ppots with aptamers [J]. **Advanced Materials**, 2011, 23: 4152—4156.
- [34] Do-Kyun Kim, Seung Min Yoo, Tae Jung Park, et al. Plasmonic properties of the multispot copper-capped nanoparticle array chip and its applicaton to optical biosensors for pathogen detection of multiplex DNAs[J]. **Analytical Chemistry**, 2011, 83: 6215—6222.
- [35] Taejoon Kang, Seung Min Yoo, Ilsun Yoo, et al. Patterned multiplex pathogen DNA detection by au particle-on-wire SERS sensor[J]. **Nano Lett**, 2010, 10: 1189—1193.
- [36] Rebeeca J, Riehard N. Analysis of biomoleeular interaaction using a miniaturized surface plasma resonnanee sensor[J]. **Analytical Chemistry**, 2002, 74 : 4570—4576.
- [37] 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: 1713—1715.
- Yang Yu-jun, Huang Wei-wei, Wang Zhi-yun, 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 : 1713—1715. (in Chinese)
- [38] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. 食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2011, 30 : 84—89.
- XUXiao-kel, WUQing-ping, ZHANGJu-meil, et al. Studies on detection of staphylococcus aureus in foods by multiplex PCR [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30 : 84—89. (in Chinese)
- [39] 余以刚, 何秋彤, 刘千根, 等. 食源性致病菌通用型多重荧光 PCR 快速 检测体系的建立[J]. **现代食品科技**, 2010, 26 (8) : 880—883.
- YU Yi-gang, HE Qiu-tong, LIU Qian-geng, et al. Development of universal multiplex real-time PCR reaction system for rapid detection of foodborne pathogens[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2010, 26 (8) : 880—883. (in Chinese)
- [40] Sharma N K, Rees C E, Dodd C E. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for staphylococcus aureus strains[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66(4) : 1347—1353.
- [41] R Osalees, R Asmussenhellber. Interlaboratory evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction method for i-identification of salmon and trout species in commercial products [J]. **Food Chem**, 2011, 59: 876—884.
- [42] X S Qu, L A Wanner, B J Christ. Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay for the simultaneous detection and discrimination of potato powdery and common scab diseases and pathogens [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2011, 110: 1364—5072.
- [43] N H Kwona, S H Kim, K T Park, et al. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxintyping of staphylococcus aureus isolates in south Korea[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2004, 97: 137—145.
- [44] Mohamed A, Robert H, Afroz M S, et al. Detection of staphylo-coccus aurues enteretoxin A and B genes with PCR-EISLA and ahandheld electrochemical sensor[J]. **Mol Cell Probes**, 2004, 18: 373—377.