

综述

食源性致病菌检测方法研究进展
—— . 分子生物学检测方法

焦振泉 郭云昌 裴晓燕 刘秀梅

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要: 为方便对食品生产和流通的整个过程进行卫生监督和管理,就以核酸为分析对象的各种分子生物学食品微生物快速检测方法进行了综述。

关键词: 食源性致病菌;食品;聚合酶链反应;基因芯片

Current Progress in Methods for Detection of Foodborne Pathogens

Part : Molecular Biological Detection Methods

JIAO Zhen-quan, GUO Yun-chang, PEI Xiao-yan, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: To facilitate supervision and management of food production and circulation, various nucleic acid-based methods for detection of foodborne pathogens were reviewed.

Key word: Foodborne Pathogen; Food; Polymerase Chain Reaction; Microarray

近 10 多年来,分子生物学研究的日益发展,在微生物的分离、早期鉴定、特性描述和计数方面不断有新的发展。本文主要对食源性致病菌的分子生物学检测方法进行综述。

1 DNA 杂交

在微生物诊断和鉴别方面一个重要的发展就是核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA) 探针的引进。使用抗体检测的特异性问题可以通过应用 RNA 和 DNA 探针来解决,后者可以和特定微生物的核酸相结合,所以阳性杂交结果和特定微生物的存在是一致的。尽管可以利用克隆的探针,但现在应用的大部分探针是合成的寡核苷酸。有关这些探针在食品微生物领域应用的综述有很多^[1,2]。杂交方法的一个主要不利方面是需要相对大量的样本量(典型的 $10^4 \sim 10^5$ 细菌)才能获得明确的结果,因为样品中含大量的非特定微生物会干扰杂交结果,所以,在食品微生物方面主要是利用琼脂平板上的细菌菌落进行杂交。早期的杂交方法是利用同位素来标记探针,但是不利于实验室的安全,现在主要利用液相杂交方法通过化学发光法或比色法进行检测。

2 PCR

在 19 世纪 80 年代后期,聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 作为生物技术的一个里程碑受到了科研人员的青睐。这是一种灵敏度很高的技术,理论上可以检出单个 DNA 拷贝。PCR 往往从单个的 DNA 或 RNA 序列开始,通过扩增可以合成 10 亿以上的 DNA 序列。DNA 的定量可以通过琼脂糖凝胶电泳。上溴化乙锭染色的条带进行检测。以 PCR 为基础的技术,如复合 PCR、嵌套式 PCR、RT-PCR、PCR 为基础的指纹图、定量 PCR 和其他扩增技术,如以核酸序列为基础的扩增,已经成功地应用于食源性致病菌的筛选和鉴定。其中,一些以 PCR 为基础的常见食源性致病菌的检测已经商品化,如 Bio-rad 公司的 Probelia 系统、Applied Biosystems 公司的 TaqMan 系统和杜邦 Qualicon 公司的 BAX 系统。

利用 PCR 来鉴定特异性的细菌主要依赖于它所在的分类单元中的不一致性及他和其他分类单元之间的遗传进化距离。尽管 16S rRNA 和 23S rRNA 的高度保守区域已经被用来研究关系较远的细菌之间的关系,但他们中的可变区域可以用来鉴别细菌的属和种,用做细菌属甚至种的特异性 PCR 扩增片段^[3]。作为同源关系相近的种特异性探针,常常选择 16S rRNA 和 23S rRNA 的间区作为引物设计部位,因为这些部位没有 16S rRNA 和 23S rRNA 特异

基金项目:国家自然科学基金项目(30400357)

作者简介:焦振泉 男 副研究员 课题负责人

功能,在细菌进化过程中没有受到较大的选择压力。在最近几年中,16S rRNA 和 23S rRNA 的间区已经成功地作为特异性 DNA 探针的来源^[4]。以细菌鉴定为目的选择相应的靶基因,首先要考虑的是质粒上的毒力因子,但是这些因子很不稳定,在实验室操作过程中容易丢失,所以利用质粒上编码的基因进行 PCR 检测可能导致假阳性结果。例如,许多检测病原性小肠结肠炎耶尔森菌的 PCR 方法都是利用不稳定质粒 pYV 上的毒力因子基因。遗传因子往往重复地被不同的研究人员作为特异性 PCR 反应的引物设计部位,例如,布鲁菌的 IS711、沙门菌的 IS200 和弯曲杆菌的 *Flagellin* 基因。对于大肠杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌,因为只有产毒的菌株才被认为是致病的,所以利用它们的毒力基因设计 PCR 引物来进行检测是唯一的方法。

利用 PCR 对食品进行常规检测的一个问题是该方法的过程比较复杂并且需要相当洁净的环境条件。近几年来 PCR 技术的发展已经使这种技术可以用于常规检验,这些发展包括有创新性的实验试剂运载系统,例如,BAX 系统中包含 PCR 试剂和阳性对照;Probelia PCR 系统被分为 2 个模块:第一个模块包括用于样品处理和直接扩增的试剂,第二个模块包括在微孔板上扩增产物进行三明治杂交所需的微孔板、过氧化物酶标记的探针和反应液。常规 PCR 技术的另一个缺点是由于检测的是细菌的核酸序列,而不是完整的活性细菌,所以它不能区分有活性和没有活性的细菌,而作为食物中致病菌的检测,需要检测的是有活性的细菌,可以通过在 PCR 检测之前对食物样品进行富集来克服上述缺点。另外,PCR 反应是一种灵敏度很高的酶学反应,但是在检测食品中的致病微生物时,食物的成份、培养基和 DNA 提取液都可能降低它的灵敏度^[5,6],所以他主要是用来对琼脂平板上的纯细菌培养物或菌落进行鉴定。

为了提高 PCR 的使用范围,相应的食物样品的制备和前增菌液的研究也得到了很大的发展。为了防止由于食物样品中聚合酶抑制物的存在导致的假阴性结果,可以通过对样品进行合理的稀释、离心和/或过滤的方法去除了大的食物颗粒,选择合适的 DNA 聚合酶^[7],在提取 DNA 之前利用差速离心、免疫磁珠分离(immunomagnetic separation,IMS)、稀释和加入牛血清白蛋白将细菌从食品基质中分离出来。另外,由于细菌 RNA 中 mRNA 适用于检测细菌的活性,以 mRNA 为模板的 RT-PCR 在这方面也有了应用。作为检测有活性的细菌最安全的方法是通过短时间的样品富集,然后稀释除掉没有活性的细菌,再

通过 DNA 方法进行检测。如果不能对样品进行富集,可以考虑 RT-PCR 方法。有关这方面的报道比较局限。

并非在国际文献中提及的 PCR 所有引物都完全进行了特异性评价,他们中许多在应用于常规实验室之前都需要通过一系列的相关细菌进行检验。作为一个成功的检测方法,必须具有阳性对照,从而保证 PCR 反应操作的准确性和 PCR 反应的正确性。另外,也可以设立一个 PCR 反应的内部对照。由于 PCR 反应的高度灵敏性,在进行 PCR 操作时,要特别小心,防止污染。可以通过不同操作区域的分开方式减少污染,也可以用尿嘧啶糖苷酶(UNG)和 dUTP 代替 dTTP。因为 UNG 可以促进去除 dUTP 存在时合成的尿嘧啶,含 dUTP 的 PCR 产物随后在碱性条件下和高温条件下裂解。另外,在反应体系的表面加矿物油或者减少循环参数同样有利于减少污染。

3 定量 PCR

常规的 PCR 方法只能得出定性的结果,从而限制了他的应用。随后发展的是定量 PCR 技术的发展,他包括和 MPN 相结合的非直接定量 PCR 和直接定量 PCR。MPN-PCR 方法是将传统的 MPN 计数方法和 PCR 方法相结合,对样品中的靶细菌进行半定量^[8]。由于该方法在样品稀释、DNA 提取过程中目的 DNA 的丢失和 PCR 扩增过程中抑制物存在的限制,只能给出保守的估计,也可以说是一种半定量方法。在 MPN-PCR 中,可以在一个反应管中检测基因的多个拷贝,多拷贝的基因,如 rDNA,可以提高反应的敏感性,和传统的方法相比检测限低,但往往由于可以检测到死细菌的 DNA 而得出高估的结果。低拷贝的基因,则往往由于样品中细菌的不完全裂解而得出低估的结果。相对而言,环境污染物对于低拷贝的目的 DNA 样品的 MPN-PCR 检测影响较大^[9]。非直接定量 PCR 还包括非竞争性定量 PCR,他是通过对同一反应管中的靶基因和另一段无关的内标序列(如管家基因)同步扩增进行的,通过内标产物对靶序列产物进行校正,从而得出相对的定量值。这种方法往往是检测靶基因在处理前后的含量变化。

直接定量 PCR 包括内部(定量竞争 PCR)和外部(定量动力 PCR)两种方法,前者往往通过加入一个和靶基因含有相同的引物结合位点和同样的扩增效率仅探针结合位点不同的内标或竞争基因,在同一个反应管中靶基因和内标与引物竞争性结合,同步扩增,如果靶基因和竞争基因的扩增效率相等,那

么这两种扩增产物的比值和起始状态时两种模板分子数的比值是一致的,通过靶基因扩增片断和竞争基因扩增片断的比率结合已知量的竞争基因模板,得出样品中靶基因的量。往往竞争基因扩增片段和靶基因扩增片断通过大小相区分。竞争性 PCR 的有效范围是靶基因和竞争基因的比率在 10^1 和 10^{-1} 之间。所以为了达到这点,需要测定不同稀释度的靶基因和竞争基因。定量竞争 PCR 是 PCR 定量方法中比较准确的方法,但如何构建内标和竞争基因是关键。目前常用的方法有靶基因扩增产物的突变、限制性片段的插入或缺失、含靶基因引物结合位点的非同源性 DNA 序列等,其中通过 PCR 方法构建的探针结合位点核苷酸直接突变的竞争基因或内标是目前应用最多最方便的方法。另外,可以通过 CLONTECH 公司的 PCR MIMIC 构建试剂盒构建 PCR MIMICS(随机序列标准)^[10]。定量 PCR 不需要增菌直接作用于样品,在食物致病菌的检测方面很有用^[11,12],但是需要相对烦琐的试样处理过程和敏感度非常高的 PCR 方法。

4 实时 PCR

与定量竞争 PCR 不同,定量动力 PCR 应用的是外部标准。PCR 产物随着循环数的增加而增加,根据比较标准和靶基因反应动力学斜率进而获得试样中靶基因的数量。这方面应用比较多的是实时 PCR (Real Time PCR)。实时 PCR 可以监测 PCR 反应过程中每个循环扩增产物的量,和传统的 PCR 监测反应的平台期不同,他可以监测 PCR 的整个过程,包括指数期。他的定量数据来自于整个 PCR 反应曲线中呈现对数线性关系的那几个循环(30~40 个循环中的 4~5 个)。该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,而且与常规 PCR 相比,具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点,目前已得到广泛应用。

所谓实时荧光定量 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过校正曲线对未知模板进行定量分析的方法。在荧光定量 PCR 技术中,有一个很重要的概念是 C_t 值。 C 代表 Cycle, t 代表 threshold, C_t 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。研究表明,每个模板的 C_t 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多, C_t 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出校正曲线,其中横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表 C_t 值。因此,只要获得未知样品的 C_t 值,即可从校正曲线上计算

出该样品的起始拷贝数。

荧光定量 PCR 所使用的荧光物质可分为 2 种:荧光染料和荧光探针。荧光染料法是指 SYBR Green I 法,荧光探针法包括 Taqman 探针法、LightCycler 法和分子信标(Molecular beacon)法。

SYBR Green I 法是在 PCR 反应体系中加入过量 SYBR 荧光染料,SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后,发射荧光信号,而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。扩增产物序列特异性通过反应后变性分析来确证。在反应的最后阶段,反应体系的温度逐渐升高,双链 DNA 慢慢地变成单链,从而 SYBR Green I 染料释放出来,导致荧光强度的慢慢降低,测定整个过程的荧光强度,可以获得 PCR 产物的变性温度,因为每一种 PCR 产物都有不同的长度和 GC 百分比,所以也具有特征性的变性温度。通过变性曲线得到的产物大小可以和 PCR 产物的电泳结果相比较。相应的商品化的试剂在 Applied Biosystems 和 Roche Diagnostics 有售。这种方法在检测禽肉中的沙门菌和干冻食品中的细菌活性方面已有报道^[13]。

荧光探针法的原理是根据荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)现象,从激发荧光基团激发的能量被以 70~100 Å 的距离转移到淬灭接受基团,结果荧光基团的发射被熄灭。

Taqman 探针法是利用 Taq DNA 聚合酶的 5'-3' 核酸酶活性来酶切和降解标记报告荧光基团和淬灭荧光基团的探针,所以称为 Taqman 探针。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。PCR 扩增产物的指数增加和荧光强度的增加是相对应的。这个系统现在已经商品化,TaqMan 系统已经被用来检测食物或者纯培养物中的单核增生李斯特菌^[14]、大肠杆菌 O157 H7^[15]和沙门菌^[16]。

Lightcycler 法是将 2 个特异性的探针分别结合不同的荧光素(荧光基团和淬灭基团),产生发光探针和淬灭探针。发光探针的 5 端连接荧光基团,淬灭探针的 3 端连接淬灭基团。由于两探针设计时可与模板同一条链相邻的序列杂交,杂交时两探针的荧光基团和淬灭基团便紧密相邻,从而发生能量传递而使荧光淬灭。荧光淬灭的程度与起始模板的量成正比,以此进行 PCR 定量分析。该方法的特点

是淬灭效率高,但由于 2 个探针与模板结合因此影响扩增效率。研究^[17,18]证明 LightCycler 是一种快速、可信的方法。

分子信标探针是一种具有茎和环状结构的单链核酸分子,探针分子中环状部分的序列和靶核酸的主要已知序列互补,茎部是通过探针序列任何一侧的 2 个互补臂序列退火形成。臂序列和靶序列没有关系,一个荧光基团贴附在一个臂的终端,一个非荧光基团贴附在另一个臂的终端。茎部使得这 2 个基团紧紧地贴在一起。从而使得荧光团释放出来的荧光被 FRET 淬灭。荧光团 - 淬灭对的原理是荧光团接受到的荧光转移到淬灭物上,消散为热而不是光,结果荧光团不能释放荧光。但是当探针遇到靶分子时,形成的杂交物比通过臂序列形成的杂交物长并且稳定,因为核酸的二级螺旋结构相对坚硬,探针和靶序列的杂交就排除了同时存在臂序列杂交的可能。这样,探针就经过自然结构的改变而使臂序列分开,进而使荧光团和淬灭物相互分离。因为荧光团和淬灭物不再紧密地连接在一起,所以在紫外灯照射下能够产生荧光。Tyagi 和 Kramer^[19]之所以命名这种探针为分子信标,是因为他们只有在和靶序列杂交时才能发射荧光,没有结合的分子信标是黑色的,所以没有必要去除他们。这种方法对致病性逆转录病毒的检测、沙门菌^[20]和大肠杆菌 O157^[21]的检测都有应用。近几年上述方法都有了一定的改进,如 AmpliDet RNA, Scorpions 技术和 Applied Biosystems 公司改良的 TaqMan 系统等。

实时 PCR 所需要的仪器主要有 Applied Biosystems 公司的 ABI Prism 7700 和 7900 序列测定系统, Roche 公司的 LightCycler 系统, Bio-Rad 公司 iCycler Thermal Cycler 和 Organon Teknica 公司的 NucliSensEasyQ 分析仪。Taqman 系统经过小的改进就可以应用在 LightCycler 上,而 LightCycler 和 ABI 7700 系统是不兼容的。iCycler Thermal Cycler 和其他的系统都不兼容。

5 Microarray

基因芯片 (Microarray) 分析作为一种新兴的技术,很有可能在食源性致病菌的鉴定方面引起新的变革。在过去的 10 年中,已经有 37 种微生物的基因组序列被获得,还有 128 种微生物的序列正在测序中^[22]。随之而来的是快速筛选技术如 DNA 基因芯片技术,这种技术利用从细菌中扩增到的序列标记荧光作为探针,与固定在玻片上成千上万的 DNA 序列进行杂交。结果可以通过直接的荧光扫描或酶学方法进行测定。这些固定在玻片上的 DNA 序列

往往是根据特异性 PCR 扩增得到的片段 (500 ~ 5 000 bp)、细菌基因组的随机片段或者是人工合成的代表不同基因的单链核酸序列 (20 ~ 70 bp)。该方法的主要优点是可以同时鉴定多种细菌的混合污染。现在这种技术主要用来检测致病菌的基因表达水平,同时也可以快速鉴定致病菌基因。常规的 PCR 检测方法只能够检测一种基因,而只是通过一个基因进行菌种鉴定的检测方法在特异性方面存在一定的不足。如大肠杆菌 O157 H7 的 *slt* - I 和 *slt* - II 基因、*eae* 基因、*fliC* 基因和 *fliC* 基因,只有同时检测到这些基因才能够鉴定为大肠杆菌 O157 H7。现在应用较多的是复合 PCR,但是这种方法有一定的缺点,例如同一个 PCR 反应中由于引物间的相互作用而使检测基因的数量有一定的限制,还会因非特异性扩增和扩增片段的大小相近而不易区分。DNA 基因芯片技术由于利用的是 DNA - DNA 杂交而克服了上述缺点,PCR 扩增的产物必须能够和相应的基因序列杂交才能确定为阳性,而不是仅仅依靠扩增片段的大小进行确定,而且可以利用随机六聚体引物 (hexamers) 对全基因组序列进行扩增。这既解决了非特异性扩增的问题又解决了通过 DNA 片段大小进行确定的问题。

基因芯片技术可以利用相关细菌的特异性基因 (如毒力基因、抗生素耐受基因) 和基因库中的 rDNA 序列设计玻片上的片段,这种方法可以快速、准确地检测和鉴定食物中的病原菌,从而保证食物安全。Call 等^[23]利用基因芯片和复合 PCR 检测大肠杆菌 O157 H7,芯片上点有大肠杆菌 O157 H7 的 4 个毒力基因的寡核苷酸序列 (intimin, Shiga-like toxins I, II 和 hemolysin A),复合 PCR 扩增产物和芯片进行杂交,明显地增强了反应的特异性和敏感度。Small 等^[24]利用细菌的 16S rDNA 序列设计芯片对土壤中的细菌进行检测。CHO 等^[25]利用细菌基因组的随机片段设计芯片进行杂交对细菌进行鉴定,可以同时鉴定多种细菌,并且可以形成杂交图谱进行交流和为以后的研究打下基础。

基因芯片技术像其他的新兴技术一样,也有一定的缺点。例如背景干扰比较大、2 个染料与 DNA 标记时效果不同、从不同细菌中分离出来的 RNA 的完整性不同、实验费用高和结果分析方法的不一致等等。但是作为分子生物学领域的一个崭新技术,他在食源性致病菌的检测和鉴定方面必定会带来新的革命。他可以在一种食品中同时鉴定大量的、不同的病原菌,并且检测他们的毒力基因和抗生素耐受基因等。基因芯片技术必将在食品加工领域、实验室和食物安全监测方面起到越来越大的作用。

参考文献

- [1] LAMPEL K A, FENG P, HILL W E. Molecular approaches to improving food quality and safety[M]//Bhatnagar D, Cleveland T E. Van Nostrand Reinhold. New York, NY, 1992:151-188.
- [2] FENG P, LAMPEL K A, HILL W E. Diagnostic nucleic acid probe technology[M]//Dangler C, Osburn B, Hauser, New York, NY, 1996:13.
- [3] WANG R F, CAO W W, FRANKLIN W, et al. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food[J]. *Mol Cell Probes*, 1994, 8(2):131-137.
- [4] RIJSENS N P, JANNES G, HERMAN L M F. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by PCR and line probe assay hybridization[J]. *J Food Prot*, 1997, 60:548-550.
- [5] ROSSEN L, NORSKOV P, HOLMSTROM K, et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions[J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 17(1):37-45.
- [6] LANTZ P G, TIERNEL F, BORCH E, et al. Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(9):3416-3418.
- [7] KATCHER H L, SCHWARTZ I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol[J]. *Biotechniques*, 1994, 16(1):84-92.
- [8] MANTYNEN V, NIEMELA S, KAJALAINEN S, et al. MPN-PCR-quantification method for staphylococcal enterotoxin c1 gene from fresh cheese[J]. *Int J Food Microbiol*, 1997, 36(2-3):135-143.
- [9] MILLER D N, BRYANT J E, MADSEN E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(11):4715-4724.
- [10] ALI S A, SARTO I, STEINKASSERER A. Production of PCR mimics for any semiquantitative PCR application[J]. *Biotechniques*, 1997, 22(6):1060-1062. Erratum in: *Biotechniques*, 1997, 23(4):672.
- [11] WANG C, HONG C. Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes* with colorimetric detection[J]. *J Food Prot*, 1999, 62(1):35-39.
- [12] HUBNER P, WAIBLINGER H U, PIETSCH K, et al. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food[J]. *J AOAC Int*, 2001, 84(6):1855-1864.
- [13] DE MEDICI D, CROCI L, DELIBATO E, et al. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect salmonella enterica serotype enteritidis in poultry[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6):3456-3461.
- [14] LUNGE V R, MILLER B J, LIVAK K J, et al. Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection[J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 51(3):361-368.
- [15] SHARMA V K. Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction[J]. *J Food Prot*, 2002, 65(9):1371-1380.
- [16] KAWASAKI S, KIMURA B, FUJII T. Comparison of TaqMan salmonella amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of salmonella in meat samples[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2001, 42(1):33-39.
- [17] O MAHONY J, HILL C. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler[J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 51(3):283-293.
- [18] SCHROTER M, ZOLLNER B, SCHAFER P, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA by light cycler PCR and comparison with two different PCR assays[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2):765-768.
- [19] TYAGI S, KRAMER F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(3):303-308.
- [20] CHEN W, MARTINEZ G, MULCHANDANI A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting salmonella[J]. *Anal Biochem*, 2000, 280(1):166-172.
- [21] MCKILLIP J L, DRAKE M. Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. *J Food Prot*, 2000, 63(7):855-859.
- [22] TIGR Microbial Database [EB/OL]. <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>.
- [23] CALL D R, BROCKMAN F J, CHANDLER D P. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157 H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays[J]. *Int J Food Microbiol*, 2001, 67(1-2):71-80.
- [24] SMALL J, CALL D R, BROCKMAN F J, et al. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10):4708-4716.
- [25] CHO J C, TIEDJE J M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8):3677-3682.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;Q9333 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2007)02-0153-05