

论著

食品中 5 种致病菌多重 PCR 快速检测技术的建立与应用

遇晓杰¹ 薛成玉¹ 吕琦² 董锐¹ 谢平会¹ 闫军¹

(1. 黑龙江省疾病预防控制中心,黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学食品学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:目的 建立一种能同时检测食品中沙门氏菌、大肠杆菌 O157 H7、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽胞杆菌的多重 PCR 快速检测方法。方法 分别针对沙门氏菌侵袭基因 *invA*、大肠杆菌 O157 H7 肠溶毒素 A 基因 *HlyA*、金黄色葡萄球菌耐热性核酸酶基因 *nuc*、单核细胞增生李斯特菌李氏溶血素 O 基因 *hlyA* 和蜡样芽胞杆菌肠毒素 FM 基因 *entFM* 序列设计引物,进行 PCR 扩增及电泳检测。同时优化反应体系,测定特异性和灵敏性。结果 初步建立的多重 PCR 方法可简便、快速、灵敏地实现对 5 种致病菌的同时检测,整个检测过程少于 30 h,且检测灵敏度均可达 10² CFU/ml。结论 这种方法是对传统检测方法的有效改进,为食源性致病菌的快速高通量检测提供了理想手段,有良好的应用前景。

关键词:食源性致病菌;聚合酶链反应;快速检测

Construction and Application of Multiple PCR Rapid Detection for 5 Pathogenic Bacteria in Food

YU Xiao-jie, XUE Cheng-yu, LÜ Qi, DONG Rui, XIE Ping-hui, YAN Jun

(Heilongjiang Provincial Center for Disease Control, Heilongjiang Harbin 150030, China)

Abstract: Objective A multiple PCR method for rapid and sensitive detection was constructed, which can detect *salmonella*, *Escherichia coli* O157 H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeriosis monocytogenes* and *Bacillus cereus* simultaneously. **Method** This multiple PCR method was used for primers design, and PCR amplification and electrophoresis, which was aimed at *salmonella* invasion gene *invA*, *Escherichia coli* O157 H7 intestine hemolysin gene A *HlyA*, *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease gene *nuc*, *Listeriosis monocytogenes* hemolysin O gene *hlyA* and *Bacillus cereus* enterotoxin FM gene *entFM*. Besides, this method can optimize the reaction system and detect the specificity and sensitivity. **Results** The results indicated that with the convenient, rapid and sensitive method, the detection of the five pathogenic bacteria can be performed together in 30 h. Besides, the sensitivity can reach 10² CFU/ml. **Conclusion** The approach improves the traditional detecting methods, provides ideal means for the rapid and high-throughput detection of foodborne pathogenic bacteria, and has favourable application perspective.

Key words: Food-borne Pathogens; Polymerase Chain Reaction; Rapid Detection

沙门氏菌、大肠杆菌 O157 H7、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽胞杆菌是目前我国引起食源性疾病及食物中毒的重要致病菌。目前,包括我国在内的许多国家对这些致病菌的检验大多仍沿用传统的细菌培养、血清学及生化鉴定等方法^[1],其检测周期长、操作繁琐、灵敏度低,而且每次只能检测出一种致病菌。面对日益增加的食品病原菌多重混合污染,目前的实验室检测方法明显滞后。因此,建立快速敏感和特异的分子生物学检测方法对于尽快明确致病因素和采取有效的预防和治疗措施都是非常必要的。多重 PCR 技术可以在一个反应管中同时检测多个病原微生物,具有高效、低成本、速度快等优点。本研究针对致病菌传统检

测方法中存在的缺点,建立同时检测食品中 5 种致病菌的多重 PCR 检测方法,为食品质量安全监控、食源性疾病预防及口岸各类食品的检验检疫提供了良好的检测手段,具有较高的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 标准菌株:金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 13565)、沙门氏菌标准菌株(ATCC 14028)、单核细胞增生李斯特菌标准菌株(CMCC 54006)、蜡样芽胞杆菌标准菌株(ATCC 7064)购自中国药品生物制品检定所;大肠杆菌 O157 H7 标准菌株由东北农业大学微生物学教研室提供。

实验的 87 株目标菌为:金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、德尔比沙门氏菌、阿贡纳沙门氏菌、鸭沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、单

基金项目:黑龙江省卫生厅计划项目(2002—07);

黑龙江省科技攻关项目(GC04C42501)

作者简介:遇晓杰 女 主任医师



核细胞增生李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌 O157 H7;14株特异性验证菌为:变形杆菌、小肠结肠炎耶菌、溶血性链球菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌 O139、空肠弯曲菌、宋氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、格氏李斯特菌、产毒大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、铜绿假单胞菌。以上所用菌株除霍乱弧菌 O139 购自中国药品生物制品检定所外,其余均为黑龙江省疾病预防控制中心公共卫生检验检测所保藏菌株。

1.1.2 培养基及试剂 胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤(TSB-YE)、营养琼脂购自北京陆桥生物技术有限公司;引物,由上海英骏生物技术有限公司合成;Taq DNA聚合酶、dNTPS、100 bp DNA Marker 购自天根生化科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自百泰科公司;其他试剂均为市售分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器设备 ABI7300 PCR仪,美国ABI公司;凝胶成像系统,美国UVP公司;3-18K离心机,Sigma公司;DYY-12型电泳仪,北京六一仪器厂;CLASS生物安全柜,NUAR公司;ZHWHY-200B恒温摇床,上海智城分析仪器公司;低温水浴箱,宁波新芝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的选择及引物的设计 根据5种致病菌的具有毒力的特异性保守基因^[2-4],利用Primer5.0软件优化设计并分析出5对引物。引物确定后,使用BLAST程序,通过GenBank,对各引物及扩增产物同源性进行比对,以检测可能的重复序列,保证引物与靶基因结合的高度特异性。

1.2.2 菌株的培养与基因组DNA的提取 将致病菌的菌株(包括5种标准菌株)分别接种到TSB-YE培养基中^[5],37℃,200 r/min摇床过夜培养,使菌液终浓度达到 10^8 CFU/ml。取每种菌液1 ml放入各自离心管中10 000 g离心5 min获得菌体,利用细菌基因组DNA提取试剂盒提取各致病菌基因组DNA,并作为多重PCR阳性模板。

1.2.3 5种致病菌的多重PCR体系的建立 利用从5种标准菌株中所提取的基因组DNA作为模板,通过每对引物单独扩增其目的基因的常规PCR,尽量找出共同条件,统一条件后进行混合引物扩增多个模板的多重PCR,通过多次实验先确定变化较小的因素,对影响较大的因素进行局部微调。初次进行多重PCR时,各引物按相同物质的量添加^[6]。

1.2.4 多重PCR产物的测序 琼脂糖凝胶电泳检测5种致病菌多重PCR结果并将扩增的目的片段回收,回收片段与pMG19-T连接,反应体系按产品说明书建立,将载体转化至宿主菌大肠杆菌JM109

进行菌体培养,然后进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落进行培养后提交测序。

1.2.5 多重PCR的敏感性试验 将5种致病菌的标准菌株分别接种到TSB-YE培养基中,37℃,200 r/min摇床过夜培养,利用平板计数法计算5种致病菌培养液浓度,统一浓度(即相同浓度)等量进行混合,按10倍梯度稀释,然后将不同梯度的稀释液人工污染到含10 ml巴氏灭菌乳的90 ml TSB-YE中,培养过夜。用细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,进行多重PCR检测。

1.2.6 多重PCR特异性 除沙门氏菌、大肠杆菌O157 H7、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽孢杆菌标准菌株外,选取以往本实验室检测分离到的经国标方法确证的沙门菌27株、金黄色葡萄球菌21株、大肠杆菌O157 H7 8株、单核细胞增生李斯特菌26株、蜡样芽孢杆菌5株,另选取变形杆菌、小肠结肠炎耶菌、溶血性链球菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌O139、空肠弯曲菌、宋氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、格氏李斯特菌、产毒大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、铜绿假单胞菌等14种常见食源性致病菌菌株,均采用设计好的多重PCR引物进行扩增,以验证引物的特异性。另外,将5种标准致病菌株的培养液人工污染到巴氏灭菌乳中,经培养后提取DNA,进行多重PCR检测。

1.2.7 样品检测 生畜禽肉样品采自哈尔滨市各大农贸市场和超市,共67份,包括猪肉30份(猪肉、猪肝、猪肺)、牛肉10份、鸡肉10份(鸡胸脯、鸡肝、鸡翅、鸡中)、羊肉7份。随机取样10 g,加入到TSB-YE培养液中,37℃培养过夜,取1.5 ml培养物提取DNA,进行多重PCR检测。

2 结果

2.1 引物设计及产物测序

根据致病菌具有毒力的特异性基因所设计的5对引物均成功实现了对5种致病菌靶基因的扩增,各引物分别扩增目的菌株及多对引物同时扩增目的菌株均为特异性扩增,扩增产物与实际长度一致。将多重PCR扩增产物回收,经测序证明与扩增靶基因片段相符,说明各引物具有很强的忠实性、特异性和保守性,引物和产物大小详见表1。

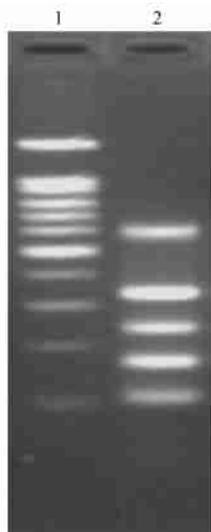
2.2 多重PCR体系的建立

退火温度对反应影响最大,首先加入等量各引物,在其他条件不变的情况下以不同的退火温度进行多重PCR,设定温度在52~60℃之间,最终在59℃时扩增效果最好。在此条件下,对各引物浓度进行优化,首先用5对等浓度的引物进行扩增,浓度

表1 5种致病菌多重PCR引物序列、靶基因扩增大小

菌株	扩增靶基因	引物序列(上游/下游5' to 3')	产物大小(bp)
大肠杆菌 O157 H7	肠溶血素 A 基因(<i>HlyA</i>)	F- AACAGGAGGTGTCAGTAGGGAAAGC R- GCACGTCATTGACGTATAGTC	240
单核细胞增生李斯特菌	李氏溶血素 O 基因(<i>hlyA</i>)	F- CACTGCACTCCGTGGTACTACTAA R- TGAGAGTCCATACAAAGCG	112
金黄色葡萄球菌	耐热性核酸酶基因(<i>nuc</i>)	F- AAGGGCAATACGCAAAAGAGGT R- AATGCACCTTGATCCGGAGCATT	334
蜡样芽胞杆菌	肠毒素 FM 基因(<i>entFM</i>)	F- TGGCAAACACTCAAACACGAC R- TGCTACTCTACTGCTGTCACCGT	610
沙门氏菌	吸附和侵袭上皮细胞表面蛋白基因(<i>invA</i>)	F- ACTCTGCCGGATCCCACT R- GAGTATTCACGGAGACTCATCT	168

分别采用了 75、125、250 和 500 nmol/L, 最佳扩增是在 125 nmol/L 时, 但扩增产物量不均匀, 再根据条带的亮暗来调整各引物的浓度, 即又增加了扩增条带弱的引物浓度量, 对结果有所改善, 最后在此基础上优化酶的用量, 分别加入酶的含量为 10、7.5、5 和 2.5 U, 发现在 10 和 7.5 U 时扩增产物不均匀, 在 2.5 U 时扩增产物量相对减少, 而在 5 U 时扩增效果最好, 扩增产物量最均匀。多重 PCR 后用 2% 凝胶电泳及凝胶成像系统分析, 见图 1。



注:泳道 1, 100 bp DNA Marker, 自上至下条带为 1500、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; 泳道 2, 优化后 5 对引物对致病菌标准菌株模板所扩增的多重 PCR 条带。

图1 经优化后的多重PCR结果

本研究所建立的多重 PCR 体系和条件最终为:

(1) 优化的多重 PCR 反应体系: 10 × PCR buffer: 5 μl, dNTPs: 600 μmol/L, 单增李斯特氏、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 H7 和蜡样芽胞杆菌的引物浓度分别为: 250、125、250、125 和 250 nmol/L, Taq 酶: 5 U, DNA 模板: 4 μl, 反应体系 50 μl。

(2) 扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 59 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s; 此步

循环数为 40; 最后 70 °C 延伸 10 min; 4 °C 下保存。

2.3 多重 PCR 的特异性试验

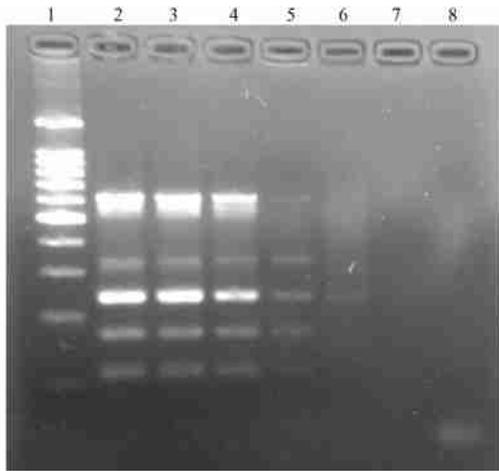
采用表 1 的 5 对引物对 87 株实验目标菌株和 14 株特异性验证菌株, 共 101 株实验菌株进行 PCR 扩增, 以分析引物的特异性。结果显示, 依据 *hlyA* 基因设计的引物对本实验所有单核细胞增生李斯特菌 PCR 扩增结果均为阳性, 其他菌株均为阴性; 依据 *nuc* 基因设计的引物对本实验所有金黄色葡萄球菌的 PCR 扩增结果均为阳性, 其他菌株均为阴性, 同样, 依据 *entFM* 基因、*HlyA* 基因和 *invA* 基因设计的引物分别对所有蜡样芽胞杆菌、大肠杆菌 O157 H7 和所有沙门菌的 PCR 扩增结果均为阳性, 而对其他菌为阴性。因此本实验所设计的引物特异性良好。

2.4 多重 PCR 的敏感性试验

5 种致病菌标准菌株的培养液平板计数结果均达到 10^9 CFU/ml。将 5 种致病菌标准菌株的培养液等量混合后, 按 10 倍梯度稀释, 然后将不同梯度的稀释液人工污染到含 10 ml 巴氏灭菌乳 (所用的巴氏灭菌乳经过平板计数法检测, 在平板上未见菌落生长) 90 ml TSB- YE 中, 取其最终污染梯度分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10 CFU/ml 的肉汤进行 37 °C、200 r/min 摇床过夜培养。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 然后进行多重 PCR 检测, 再用 2% 凝胶电泳鉴定, 最终结果即为原料乳中 5 种致病菌快速富集后多重 PCR 检测的灵敏度。电泳结果图 2 显示, 5 种致病菌检测灵敏度均可达到 10^2 CFU/ml 以上。

2.5 样品检测结果

进行了 67 份生畜禽肉实际样品检测。对检测结果采用了传统培养鉴定方法和测序验证进行比较: 多重 PCR 检出沙门氏菌阳性的样品 8 份、金黄色葡萄球菌阳性的样品 7 份, 与传统方法一致; 多重 PCR 检出单核细胞增生李斯特菌阳性的样品 15 份, 而传统方法只检测到 13 份阳性样品; 多重 PCR 检出大肠杆菌 O157 H7 阳性的样品 3 份, 而传统方法



注:泳道 1, 100 bp DNA Marker, 自上至下条带为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200 和 100 bp;泳道 2~6 为 $10^5 \sim 10^{10}$ CFU/ml, 泳道 7 为阴性对照。

图 2 原料乳中 5 种致病菌的多重 PCR 检测灵敏度

只检测到 1 份阳性样品;多重 PCR 检测蜡样芽孢杆菌全部样品均为阴性,传统方法也是阴性结果。将阳性样品的扩增产物进行测序,结果显示与 GenBank 中标准菌株的同源性达到 99%、100%、100%、98%。

3 讨论

本研究中的 4 对引物都是根据其各自目的菌株具有毒力的特异性保守基因所设计,但就现在对大肠杆菌 O157 H7 的研究而言^[7],还没有一种既可以证明其具有毒性又可以区别于其他种属的特异性基因,因此本研究选择了大肠杆菌 O157 H7 的溶血素 (*hlyA*) 基因,该溶血素基因位于一个 60 MD 的大质粒上,而几乎所有的大肠杆菌 O157 H7 致病菌株都有一个这样的质粒。但其他几种血清型的大肠杆菌也含有此基因,所以在以后的样品检测时如果大肠杆菌 O157 H7 的检测为阳性则要通过一些其他手段进一步佐证。

引物设计还应遵循加入多重 PCR 体系中的每对引物都应当满足单引物对 PCR 体系的引物设计原则,但由于多重 PCR 体系中同时有多对引物,因而还应注意一些特别的问题^[8]。首先,所有引物的最适退火温度要尽可能相同,这样有助于多重 PCR 选择的退火温度能够保证每对引物都能在同一温度下进行扩增,并且具有相同的扩增效率。其次,应尽量确保设计的所有引物间没有任何形式的相互作用。最后,不同引物对所扩增产物的大小要能通过电泳或其他方法区分开^[6]。多重 PCR 影响因素很多,不同的引物、模板、引物浓度、Taq 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、循环参数等会产生复杂的综合效应^[9]。本研究在多重 PCR 体系优化中,经过大量实验摸索,优

化出 5 种致病基因引物间的最佳合适配比、最有效率的酶浓度、最适的扩增效率及最高的退火温度。

本研究建立的多重 PCR 对人工污染样品中菌体的增菌富集到多重 PCR 及电泳检测,整个过程少于 30 h 就可以完成(传统方法需要一周以上),且灭菌乳中 5 种致病菌的检测灵敏度都可达到 10^2 CFU/ml 以上,这与 KONG RYC 等^[10] 建立的检测水中 6 种治病菌灵敏度为 10^2 CFU/ml 的多重 PCR 技术相当。有报道表明,大多数致病菌的感染剂量大于 10^3 CFU/ml (g)^[10],而本研究建立的多重 PCR 技术的检测灵敏度的下限低于大多数致病菌的最低感染剂量,因此,本检测技术的应用对实现食源性致病菌的监测具有重要意义。

本研究发现,对于细菌量较少的检测样品,采用本研究建立的多重 PCR 方法有可能出现假阴性结果,本研究通过增加增菌培养时间(TSB- YE 过夜培养),来提高样品中致病菌的含量,避免假阴性的发生。

本研究将建立的多重 PCR 快速检测技术与传统的培养、生化鉴定和血清的方法作对比,对 67 份样品进行了 5 种常见食源性致病菌检测,检测结果表明,多重 PCR 的阳性检出率高于传统方法。5 种常见食源性致病菌多重 PCR 快速检测技术,具有操作简单、检测时间短、特异性和灵敏度高等优点,能在少于 30 h 内同时快速检测食品中的 5 种致病菌,具有较强的实际应用价值和良好的应用前景,值得在建立完善标准化检测程序后进一步推广应用。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.1—2008 食品卫生微生物学检验总则[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [2] PARK Y S, LEE S R, KIM Y G. Detection of *Escherichia coli* O157 H7, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) [J]. Journal of Microbiolog February, 2006, 44(1): 92-97.
- [3] SETTANNI L, CORSETTI A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69: 1-22.
- [4] GRAY KM, BANADA P P, O'NEAL E, et al. Rapid Ped-2E9 Cell-Based Cytotoxicity Analysis and Genotyping of *Bacillus* Species[J]. Journal of clinical Microbiology, 2005, 43(12): 5865-5872.
- [5] WANG R F, CAO W W, CERNICLIA C E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 83: 727-736.
- [6] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. BioTechniques, 1997, 23: 504-511.
- [7] WANG G H, CLARK C G, RODGERS F G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes

论著

不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测

马 聪 朱海明 严纪文 宋曼丹 赖蔚葵 何冬梅 王海燕 王 建 杨 冰 邓小玲 柯昌文
(广东省疾病预防控制中心微生物检验所,广东 广州 510300)

摘 要:目的 研究受污染海产品、海产品养殖水及食物中毒临床分离的副溶血性弧菌的生化特性、种特异性基因片段检测方法的应用和毒素基因携带情况。方法 66 株副溶血性弧菌采用全自动微生物鉴定、MPN 值定量、氯化物含量(离子色谱法)、R72H 基因片段和 *tdh*、*trh* 毒素基因 PCR 检测等方法进行研究。结果 定性定量分析方面,98.5% 的菌株不发酵阿拉伯糖;牡蛎样本 MPN 值均为 24 000/100 g,并检出 2 株携带 *trh* 毒素基因;23/30 份养殖水检出副溶血性弧菌,其中海丰监测点 6 份阳性水样的氯化物含量均值仅为 3 160 mg/L,显著低于实验室培养的 30 g/L 的含量。基因检测方面,VITEK 鉴定 R72H 基因片段结果与检测相符;13 株食物中毒临床分离株均携带 *tdh* 毒素基因;6.7% 的海产品分离株、15.4% 食物中毒临床来源株同时携带两种毒素基因。结论 通过从海产品和养殖水的检出情况以及分离株的生化特性、毒素基因资料,为副溶血性弧菌食物中毒溯源提供重要的数据源。

关键词:弧菌,副溶血性;食源性致病菌;毒性基因检测

Qualitative and Quantitative Analysis and Toxin Genes Detection of

Vibrio parahaemolyticus Isolated from Different Resources

MA Cong, ZHU Hai-ming, YAN Ji-wen, SONG Man-dan, LAI Wei-dong, HE Dong-mei,
WANG Hai-yan, WANG Jian, YANG Bing, DENG Xiao-ling, KE Chang-wen
(Institute of Microbiology, Center for Disease Control and Prevention of
Guangdong Province, Guangdong Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To carry out the *Vibrio parahaemolyticus* isolated from marine products, cultured water and clinical patients by phenotyping qualitative and quantitative analysis combined with toxin genes detection. **Method** By means of VITEK identification, MPN methods, chlorine iron concentration (IC) analysis, R72H gene fragment and *tdh*、*trh* toxin genes detected by PCR. **Results** On the side of qualitative and quantitative results, Datum manifested that 98.5% of *Vibrio parahaemolyticus* isolates didn't ferment arabinose, which differed from guidance of USFDA manual. Two isolates contained *trh* gene had been detected from Oyster that contaminated in high MPN (24 000/100 g). Positive rates of cultured water were 23/30, 6/8 samples were positive whose means of concentration of chlorine iron were 3 160 mg/L, collected from certain region, were remarkably lower than concentration 30 g/L that cultured in vitro. On the other side of gene detection results, R72H gene fragment detection results VITEK identification results correspond with. Total 13 of isolations came from clinical resource contained *tdh* gene. Rates of which contained *tdh*、*trh* toxin genes of marine products, cultured water and clinical isolation were 6.7%、0%、15.4%, respectively. **Conclusion** Investigation of above characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from marine products

defining the O157 H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 40(10):3613-3619.

- [8] 许一平,成炜,陈福生,等. 多重 PCR 技术在食源性病原菌检测中的应用[J]. 食品科学,2007,28(2):355-359.
- [9] LEE S R, CHUNG J M, KIM Y G. Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease (STD) and

prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR) [J]. The Journal of Microbiology, 2007,10:453-459.

- [10] KONG R Y C, LEE S K Y, LAW T W F, et al. Rapid detected of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR[J]. Water Res, 2002, 36(11):2802-2812.

[收稿日期:2009-05-28]

中图分类号:R155.5;TS207.4 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)05-0398-05

基金项目:广东省“十一五”医学重点专科研究项目(粤卫[2008]50号);广东省自然科学基金团队项目(06201654)。

作者简介:马 聪 男 检验技师

