

Establishment and Primary Application of Multiplex PCR for the Detection Method of Three Food-Borne Pathogenic Bacteria*

Yu Zhou^{1,3}, Qiong Chen², Fande Kong^{3#}, Defeng Wu¹, Ran Zhao², Shufei Xu³, Yuhua Lian², Tao Yang²

¹Animal Science College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou

²Xiamen Agricultural Product Quality and Safety Testing Center, Xiamen

³Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen

Email: #kfd67@sina.com

Received: Apr. 12th, 2013; revised: May 8th, 2013; accepted: May 16th, 2013

Copyright © 2013 Yu Zhou et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Three pairs of specific Primers were designed according to the gene fimA of *Salmonella spp.*, the gene idsC of *Proteus mirabilis* and the gene fimA of *Edwardsiella tarda*. They are used to establish multiplex PCR method for diagnosing three species food-borne pathogenic bacteria synchronous. In the system, the detection sensitivity of *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis* and *Edwardsiella tarda* was 8 CFU, 53 CFU and 72 CFU respectively. The reaction conditions on the multiplex PCR were optimized and assembled into a rapid detection kit. Through the detection of the samples, such as the feed, meat and aquatic product, the detection results showed that the multiplex PCR method has the advantages of high sensitivity, high specificity and convenience. The coincidence rate was 100 percent with isolation and identification method. It provides an important technical support for the development of rapid detection kit of the above three kinds of food-borne pathogenic bacteria.

Keywords: Multiplex PCR; *Salmonella enteica*; *Proteus mirabilis*; *Edwardsiella tarda*

三种肠道致病菌多重 PCR 方法的建立与初步应用*

周 昱^{1,3}, 陈 琼², 孔繁德^{3#}, 吴德峰¹, 赵 冉², 徐淑菲³, 连玉华², 杨 涛²

¹福建农林大学动物科学学院, 福州

²厦门市农产品质量安全检验检测中心, 厦门

³厦门出入境检验检疫局, 厦门

Email: #kfd67@sina.com

收稿日期: 2013 年 4 月 12 日; 修回日期: 2013 年 5 月 8 日; 录用日期: 2013 年 5 月 16 日

摘 要: 本研究根据沙门菌(*Salmonella spp.*)的 fimA 基因, 奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)的 idsC 基因, 迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)的 fimA 基因设计合成了三对特异性引物, 建立一种同时检测三种食源性肠道致病菌的多重 PCR 方法, 体系中检测到沙门氏菌的灵敏度为 8 CFU; 体系中检测到奇异变形杆菌的灵敏度为 53 CFU; 体系中检测到迟缓爱德华氏菌的灵敏度为 72 CFU。对多重 PCR 的反应条件进行优化并组装成快速检测试剂盒。通过对采集的饲料、肉品和水产品等样品的检测, 结果表明建立的多重 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、方便快捷等优点, 与分离鉴定方法符合率 100%, 为研发快速检测以上三种食源性肠道致病菌的试剂盒提供了重要技术保障。

*基金项目: 厦门市科技计划资助项目(3502Z2012016)。

#通讯作者。

关键词: 多重 PCR; 沙门菌; 奇异变形杆菌; 迟缓爱德华菌

1. 引言

沙门菌、奇异变形杆菌和迟缓爱德华菌在自然界分布广泛,在人和许多动物(包括哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类)的肠道中常有发现,也常见于粪便材料或被粪便污染的地方,常被作为环境和食品等的粪源性污染的卫生细菌学指标^[1,2]。这三种菌均可引起食物中毒^[3-6]。其中,奇异变形杆菌还是重要的医院内感染菌,常引起尿道逆行性感染和呼吸道感染和其他术部感染^[7],迟缓爱德华菌可感染二十多种鱼类,引起相关的病害,还可导致两栖类和爬行类的病害,给全球的水产养殖业造成很大损失^[8]。

目前,我国对以上致病菌的检验仍多用分离鉴定方法,鉴定过程复杂,检验周期长,耗费大量人力物力,检验灵敏度也不高。鉴于上述,建立高效灵敏的检验方法对于采取有效的预防和防治措施是很有意义的。本研究选用了负责编码沙门氏菌菌毛蛋白的 *fimA* 基因,它是一种重要的毒力因子^[9];奇异变形杆菌的自我识别基因 *idsC*^[10],是该菌特有的 *identity* 基因簇中的一部分;以及负责编码迟缓爱德华氏菌菌毛蛋白主要亚基 *FimA* 的 *fimA* 基因^[11]作为检测体系的靶基因,应用 Primer Premier 5.0 软件设计了三对引物,通过 NCBI 网站的在线比对验证了所选基因以及引物的特异性,建立一种能快速检测三种细菌的快速检测体系。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株

本试验所用标准菌株为:沙门菌、弗氏枸橼酸杆菌、布氏枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌和溶藻弧菌。以上菌株均为厦门出入境检验检疫局技术中心动物检验检疫实验室保存(表 1)。

2.1.2. 主要试剂和仪器

25 mmol/L MgCl₂, 10 × PCR buffer, 5 u/μL Taq DNA 聚合酶, 10 mmol/L dNTP, DL-1500 DNA Marker, 购于宝生物工程(大连)有限公司; TE 缓冲液 (pH 8.0)购于上海生工生物工程有限公司;营养肉汤培

Table 1. Reference strains used in this work
表 1. 试验用标准菌株

菌名 Name of strains	缩写 Abbreviation
沙门氏菌 <i>Salmonella spp</i>	SS
弗氏枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	CF
奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	PM
迟缓爱德华菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	ET
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	VA
副溶血弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	VP
铜绿假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	EC
布氏枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter braakii</i>	CB

培养基, LB 培养基, 碱性蛋白胨培养基, 营养琼脂培养基, 购于北京陆桥技术有限责任公司。其余试剂均为国产分析纯。

稳压稳流电泳仪, PCR 扩增仪(型号为 PTC200)和凝胶成像仪 GelDocXR 购于美国 BIO-RAD 公司。

2.2. 试验方法

2.2.1. 模板 DNA 的制备^[12]

采用煮沸裂解法,将实验菌株在营养琼脂平板上划线分离,之后在平板上挑取单个菌落接种于营养肉汤增菌液中,于 37℃, 120 r/min 摇床过夜。取增菌后的菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液,将沉淀用 TE 缓冲液洗涤两次,洗净培养液。于离心管中加入 100 μL TE 缓冲液, 100℃水浴 10 min, 立即冰浴 5 min, 彻底振荡破裂细菌细胞壁,以便释放核酸, 13000 r/min 离心 10 min, 取上清分装后-20℃保存以作为实验模板。

2.2.2. 引物设计

根据 GeneBank 上公布的沙门菌的 *fimA* 基因 (M18283), 奇异变形杆菌的 *idsC* 基因(EU635876), 迟缓爱德华菌的 *fimA* 基因(AF491964)序列,使用 Primer Premier 5.0 软件分析设计了三对引物,由宝生物工程(大连)有限公司合成。见表 2

2.2.3. 多重 PCR 引物特异性试验

分别取本实验室保存的沙门菌、奇异变形杆菌和迟缓

Table 2. Primers of Multiplex PCR
表 2. 多重 PCR 引物

病原菌 Bacteria	引物序列(5'-3') Primer(5'-3')	Tm (°C) Tm	目的片段长(bp) Length (bp)
沙门氏菌 (<i>Salmonella spp</i>)	ATTGCGAGTCTGATGTTTGTCT CGGCGGATTAAGTGCTG	59 60	133
奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)	GGTGATGACCGTAGCAGGTACAAGT TTGCCCTCACGGTAATGAA	60 55	271
迟缓爱德华菌 (<i>Edwardsiella tarda</i>)	CAGGTGAGTGGTGATTCAAAAA GTAACCGTATCGGCGTAAGAGC	53 57	371

爱德华菌(表 1 所示)作为阳性对照模板, 大肠杆菌、弗氏枸橼酸杆菌、布氏枸橼酸杆菌、铜绿假单胞杆菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌作为阴性对照模板。用包含所设计的三对引物的混合引物进行 PCR 反应, 测试引物的特异性。

PCR 反应体系为 12.5 μL , 其中包含模板 DNA 1 μL , 混合引物(浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的三对上、下游引物各 0.5 μL 混合而成)3 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.0 μL , 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} free)1.25 μL , 10 mmol/L dNTP 1.0 μL , 5 u/ μL Taq 酶 0.075 μL , 双蒸水补足。PCR 扩增条件: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s、58 $^\circ\text{C}$ 退火 40 s、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 扩增 35 循环, 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 7 min。产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳判断试验结果。

2.2.4. 多重 PCR 反应条件优化^[13-15]

对影响 PCR 结果的几个主要反应要素, 如退火温度、 Mg^{2+} 浓度、各引物间的比例、混合引物的浓度、dNTP 浓度进行优化, 从而确定本检测体系的最优反应条件。

1) 退火温度

PCR 反应体系中各成分浓度不变, 设计梯度退火温度: 52 $^\circ\text{C}$ 、54 $^\circ\text{C}$ 、56 $^\circ\text{C}$ 、58 $^\circ\text{C}$ 、60 $^\circ\text{C}$ 、64 $^\circ\text{C}$, 从中选择扩增效果最佳的温度作为最佳退火温度。

2) Mg^{2+} 浓度

PCR 反应体系各成分浓度不变, 退火温度选用之前最优温度, 设计加入体系中的 25 mmol/L MgCl_2 体积梯度为 0.5 μL 、0.75 μL 、1.0 μL 、1.25 μL 、1.5 μL 、1.75 μL 、2.0 μL , 从中选择扩增效果最佳的浓度作为最佳 Mg^{2+} 添加浓度。

3) 各引物间的比例和混合引物的浓度

使用混合模板 DNA(将三种目的菌隔夜培养后, 各取 1 mL 菌液, 参照国标法(GB/T4789.2-2003)计算

细菌个数, 用水煮沸法提取 DNA, 等量混合作为模板), 根据单引物扩增效率进行相应调整。

4) dNTP 浓度

PCR 反应体系中退火温度、镁离子浓度以及各引物对添加量为上述确定, 设计 dNTP 添加体积梯度为 0.5 μL 、1.0 μL 、1.5 μL 、2.0 μL 、2.5 μL 、3.0 μL 。

2.2.5. 多重 PCR 反应灵敏度试验

将三种目的菌隔夜培养后, 各取 1 mL 菌液, 参照国标法(GB/T4789.2-2003)计算细菌个数, 用水煮沸法提取 DNA, 等量混合作为模板, 按 $10^0\sim 10^6$ 梯度将混合模板稀释后用已优化的 PCR 体系扩增, 测定 PCR 反应的敏感性。

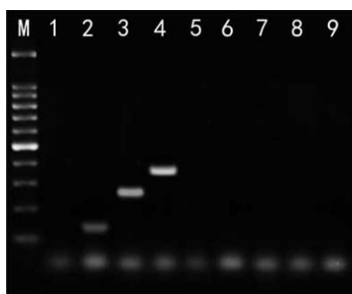
2.2.6. 人工染菌试验

分别将隔夜培养的沙门氏菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌的菌液梯度稀释 $10^5\sim 10^8$ 倍, 使最大稀释度下的菌液浓度为每毫升所含的菌体数目为个位数。在相同稀释度的混合菌液中加入 10 g 冻肉样品, 将样品进行预培养, 时间为 10 h, 后分别提取培养菌液的核酸进行多重 PCR 检测, 观察结果。

3. 结果与分析

3.1. 多重 PCR 引物特异性分析

将表 1 所列菌株的模板 DNA, 加入多重 PCR 反应体系, 使用包含表 2 所列三对引物的混合引物进行反应, 通过琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。通过结果可知, 只有沙门菌、奇异变形杆菌和迟缓爱德华菌三种模板出现与目的条带大小相符的亮带, 其余模板均未出现扩增条带, 见图 1。这说明本实验设计的三对引物具有良好的特异性, 可以进行之后的优化。



M: DL1500; 1: 弗氏枸橼酸杆菌; 2: 沙门菌; 3: 奇异变形杆菌; 4: 迟缓爱德华菌; 5: 铜绿假单胞杆菌; 6: 大肠杆菌; 7: 溶藻弧菌; 8: 副溶血弧菌; 9: 布氏枸橼酸杆菌; M: DL1500; 1: CF; 2: SS; 3: PM; 4: ET; 5: PA; 6: EC; 7: VA; 8: VP; 9: CB.

Figure 1. The detection of specificity in multiplex polymerase chain reaction

图 1. 多重 PCR 反应引物特异性试验

3.2. 多重 PCR 反应条件的确定

3.2.1. 退火温度优化

设计梯度退火温度：52℃、54℃、56℃、58℃、60℃、62℃，从中选择扩增效果最佳的温度作为最佳退火温度。见图 2，结果显示，54℃、56℃和 58℃的时候扩增效果较好，考虑到反应特异性和扩增效率，最终选定 56℃为最佳退火温度。

3.2.2. Mg²⁺浓度的优化

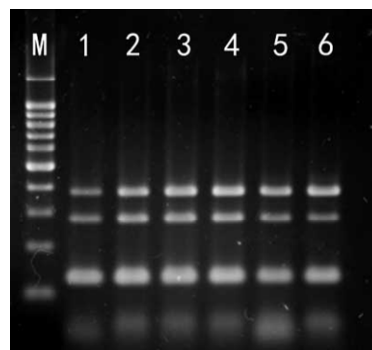
PCR 反应体系各成分浓度不变，退火温度选用 56℃，设计 Mg²⁺体积梯度为 0.5 μL、0.75 μL、1.0 μL、1.25 μL、1.5 μL、1.75 μL、2.0 μL，从中选择扩增效果最佳的浓度作为最佳 Mg²⁺浓度。见图 3，结果显示，Mg²⁺加入体积为 1.25 μL 的时候，扩增效果最好。

3.2.3. 各引物间的比例和混合引物的浓度

通过比较单引物两两组合的扩增效率，发现沙门菌的引物和迟缓爱德华菌的引物扩增效率差别不大，奇异变形杆菌的引物效率较优。于是设置奇异变形杆菌引物梯度为 0.1 μL，0.15 μL，0.2 μL，0.25 μL，0.3 μL 分别与 1.0 μL 沙门氏菌和 1.0 μL 迟缓爱德华氏菌引物组合，其中沙门菌引物体积为 0.8 μL；迟缓爱德华菌引物为 1.2 μL。最终确定各引物组分浓度如下：沙门菌上下游引物添加量为 0.8 μL，在体系中浓度为 1.28 pmol/μL；奇异变形杆菌上下游引物添加量为 0.3 μL，在体系中浓度为 0.48 pmol/μL；迟缓爱德华菌上下游引物添加量为 1.2 μL，在体系中浓度为 1.92 pmol/μL。见图 4。

3.2.4. dNTP 优化

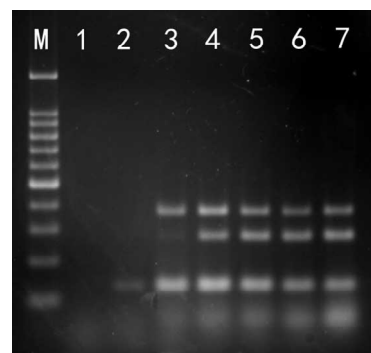
PCR 反应设计 dNTP 体积为 0.5 μL、1.0 μL、1.5



M: DL1500; 1: 52°C; 2: 54°C; 3: 56°C; 4: 58°C; 5: 60°C; 6: 62°C.

Figure 2. The optimization of annealing temperature in multiplex polymerase chain reaction

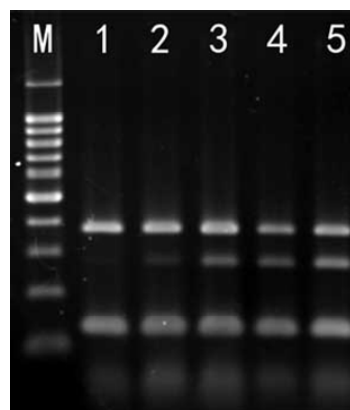
图 2. 多重 PCR 反应退火温度优化



M: DL1500; 1: 0.5 μL; 2: 0.75 μL; 3: 1.0 μL; 4: 1.25 μL; 5: 1.5 μL; 6: 1.75 μL; 7: 2.0 μL.

Figure 3. The optimization of Mg²⁺ concentration in multiplex polymerase chain reaction

图 3. 多重 PCR 反应镁离子优化



M: DL1500; 1: 0.1 μL; 2: 0.15 μL; 3: 0.2 μL; 4: 0.25 μL; 5: 0.3 μL.

Figure 4. The optimization of primer ratio in multiplex polymerase chain reaction

图 4. 多重 PCR 引物比例优化

μL、2.0 μL、2.5 μL、3.0 μL，从中选择扩增效果最佳的浓度作为最佳 dNTP 浓度。结果可知，1.5 μL 为最佳加入体积。见图 5。

3.3. 多重 PCR 敏感性测定

经过细菌计数已知，沙门氏菌浓度为 8.4×10^8 CFU/mL，奇异变形杆菌浓度为 5.3×10^8 CFU/mL，迟缓爱德华菌浓度为 7.2×10^8 CFU/mL。通过电泳图可以得知，沙门菌的检测限为 8 CFU，奇异变形杆菌的检测限为 53 CFU，迟缓爱德华菌的检测限为 72 CFU，见图 6。

3.4. 体系稳定性测定

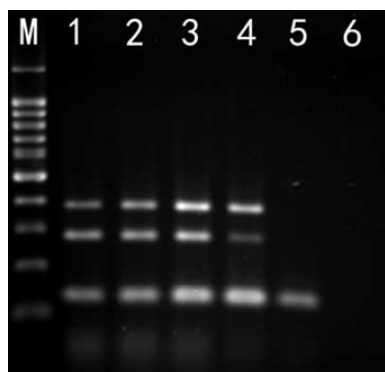
为了测定本体系检测性能的稳定性，将除模板以外的体系组分预先混合后分装与 PCR 管中，于 -70℃ 保存，每隔 30 天取出进行反应。9 个月内未发现扩增条带有明显减弱，说明本体系具有稳定性好的优点。

3.5. 人工染菌试验

结果显示，添加了猪肉样品的 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 这四个稀释度的菌液的检测结果都为阳性，见图 7。说明本体系结果可靠。通过预先增菌 10 小时，可以检测到的菌体浓度小于 10 CFU/mL，具有广泛的应用价值。

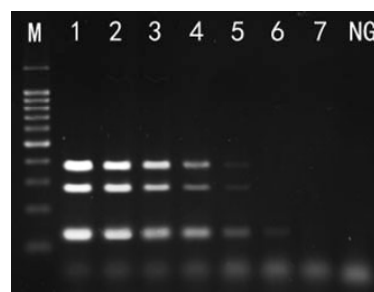
4. 讨论

多重 PCR 技术是在单重 PCR 技术的基础上发展起来的，它所具有的优点非常明显，即可以减少劳动



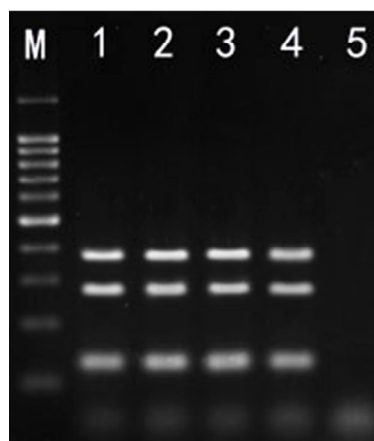
M: DL1500; 1: 0.5 μL; 2: 1.0 μL; 3: 1.5 μL; 4: 2.0 μL; 5: 2.5 μL; 6: 3.0 μL.

Figure 5. The optimization of dNTP in multiplex polymerase chain reaction
图 5. 多重 PCR 体系 dNTP 优化



M: DL1500; 1~6: 模板核酸 10^{-1} ~ 10^{-6} 倍稀释; 7: 阴性对照。M: DL1500; 1~6: 10^{-1} ~ 10^{-6} times dilution of template DNA.

Figure 6. The optimization of sensitivity in multiplex polymerase chain reaction
图 6. 多重 PCR 反应灵敏度优化



M: 100bp ladder maker; 1: 使用 10^{-5} 倍稀释的菌液污染的样品; 2: 使用 10^{-6} 倍稀释的菌液污染的样品; 3: 使用 10^{-7} 倍稀释的菌液污染的样品; 4: 使用 10^{-8} 倍稀释的菌液污染的样品; 5: 阴性对照。M: 100bp ladder maker; 1: the contaminated sample using 10^{-5} times dilution of bacteria; 2: the contaminated sample using 10^{-6} times dilution of bacteria; 3: the contaminated sample using 10^{-7} times dilution of bacteria; 4: the contaminated sample using 10^{-8} times dilution of bacteria; 5: Negative control.

Figure 7. The detection results in artificial bacterial contamination
图 7. 人工染菌检测结果

强度并缩短检测时间^[1]。当前已广泛应用于病原微生物检测中。

靶基因的选择直接决定了检测结果的可靠性，本研究选择编码沙门氏菌菌毛结构蛋白的 *fimA* 基因，奇异变形杆菌的自我识别基因 *idsC* 以及编码迟缓爱德华氏菌菌毛蛋白的 *fimA* 基因，通过 NCBI 在线比对得知它们具有很好的特异性，适合作为检测体系的靶基因，并在特异性试验中得到了证实。

多重 PCR 体系中由于加入了两对以上的引物，反应条件变得复杂。引物与模板的结合程度的强弱，不

同引物之间是否会形成二级结构, 都会对扩增效率造成极大的影响。由于多个引物对之间是共享一个反应体系的, 还会相互竞争反应原料。引物设计的优劣以及各引物对的添加比例不仅关系到体系的检测灵敏度, 还决定了能否达到单管多重检测的目的。

在多重 PCR 的反应条件中, Mg^{2+} 浓度、退火温度和 dNTP 浓度也起了重要作用。 Mg^{2+} 浓度过低会阻碍 PCR 产物扩增, 浓度过高又会降低 PCR 反应的特异性, 在非常高的镁离子环境下, PCR 反应甚至不能进行。退火温度过低, PCR 反应的特异性会减低, 结果出现非特异性条带。退火温度过高, 又会降低引物的结合效率。所以退火温度的设定要根据实际情况来判断。如果样品中模板的量太少, 可以在 PCR 反应的前几个循环采用低退火温度, 促进模板的扩增, 增加反应的模板量。之后的循环采用高退火温度, 保证最终产物的特异性。dNTP 是作为产物扩增的原料添加的, 添加量要求能够满足反应需求, 但是又不能过量, 否则会抑制反应进行。研究中通过对三者分别优化, 最终确定最佳反应条件为退火温度 $56^{\circ}C$ 下, 反应进行 35 个循环, 体系总体积为 $12.5 \mu L$, 包含待检模板 DNA $3 \mu L$, 浓度为 $20 \mu mol/L$ 的三对引物加入量分别为沙门氏菌 $0.8 \mu L$, 奇异变形杆菌 $0.3 \mu L$, 迟缓爱德华菌 $1.2 \mu L$, $25 mmol/L MgCl_2$ $1.0 \mu L$, $10 \times PCR$ Buffer (Mg^{2+} free) $1.25 \mu L$, $10 mmol/L$ dNTP Mixture $1.5 \mu L$, $5 u/\mu L$ Taq 酶 $0.075 \mu L$, 双蒸水补足。PCR 扩增条件: $94^{\circ}C$ 预变性 4 min, $94^{\circ}C$ 变性 30 s、 $58^{\circ}C$ 退火 40 s、 $72^{\circ}C$ 延伸 45 s, 扩增 35 循环, 最后 $72^{\circ}C$ 延伸 7 min。产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳判断试验结果。

本研究建立的多重 PCR 检测体系检测灵敏度为: 沙门氏菌 8 CFU, 奇异变形杆菌 53 CFU, 迟缓爱德华菌 72 CFU。由于 PCR 法检测病原菌的一般程序都要

经过样品前增菌, 所以本检测体系的灵敏度足以满足日常检测。在实际检测中应用, 从样品制备到得到结果只需要 5 个小时, 若把预先增菌时间也考虑在内, 也不用超过一天, 这极大提高了检测效率, 很符合当前入境口岸快速检验的要求, 具有实际应用价值。

参考文献 (References)

- [1] 周有森. 35 例细菌性食物中毒分析[J]. 临床医学工程, 2009, 16(9): 95-96.
- [2] 彭海滨, 孔繁德, 陈琼等. 我国沙门氏菌分布污染概况[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(2): 125-128.
- [3] F. T. Jones, K. E. Richardson. Salmonella in commercially manufactured feeds. Poultry Science, 2004, 83(3): 384-391.
- [4] 王勇, 张辉. 一起由奇异变形杆菌引起的食物中毒调查[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(1): 91.
- [5] 陈和周, 陈尚文. 一起缓慢爱德华菌引起食物中毒的调查报告[J]. 预防医学情报杂志, 2004, 20(2): 197.
- [6] 肖克宇, 黄志坚, 舒新华等. 牛蛙爱德华氏菌病原菌的鉴定和致病因素的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 316-321.
- [7] 李欣南, 夏欣, 李永才等. 奇异变形杆菌研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2011, 12(3): 73-75.
- [8] C. Nucci, W. D. Da Silberia, S. Da Silva Correa, et al. Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. Veterinary Microbiology, 2002, 89(1): 29-39.
- [9] J. H. Cohen, M. S. Mechanda and W. Lin. PCR amplification of the *fimA* sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(12): 4303-4308.
- [10] K. A. Gibbs, L. M. Wenren, et al. Identity gene expression in *proteus mirabilis*. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3286-3292.
- [11] 江云, 李寿崧, 王寿昆等. 致病性迟钝爱德华菌毒力基因的 PCR 检测[J]. 中国食品学报, 2008, 8(4): 123-129.
- [12] 马新红, 亢娟娟, 康相涛等. 鸡基因组 DNA 不同提取方法的比较研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 181-184.
- [13] 李岩, 崔洪斌, 刘玉红. PCR 技术检测沙门氏菌反应条件的优化[J]. 肉类研究, 2010, 133(3): 58-61.
- [14] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1): 65-68.
- [15] 张玉霞, 黄鸣. 食品检验中多重 PCR 技术的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 958-960.