

基于 TaqMan 探针双重荧光 PCR 检测食品中肠道沙门氏菌和肠炎沙门氏菌

袁慕云¹, 许龙岩¹, 刘二龙², 曹际娟³, 陈碧玲¹

(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东广州 510623)(2. 黄埔出入境检验检疫局, 广东广州 510530)
(3. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁大连 116001)

摘要: 建立基于 TaqMan 探针双重实时荧光 PCR 检测肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*, SP) 和肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, SE) 的方法。根据 SP 的 *aceA* 基因 (GenBank: U43344.1)、肠炎沙门氏菌特异序列 *SEP* (GenBank: AF370707.1), 分别设计引物和探针, 在 *aceA* 探针的 5'端标记 FAM 和 *SEP* 探针的 5'端标记 VIC, 建立基于 TaqMan 探针双重荧光 PCR 检测方法。试验结果, 58 株 29 种不同血清型肠道沙门氏菌均扩增出 *aceA* 基因扩增曲线, *SEP* 特异性地扩增出 15 株 SE, 而 28 种不同血清型沙门氏菌和 17 株变形杆菌等阴性对照株扩增结果均为阴性。*aceA* 和 *SEP* 的双重荧光 PCR 扩增效率分别为 100% 和 104%, R^2 分别为 0.999 和 0.998, 最低检测浓度分别达到 280 cfu/mL 和 260 cfu/mL。建立的方法特异性好、灵敏度高, 整个试验可在 31 h 完成, 是快速检测 SP 和 SE 的有效方法, 可用于食品中 SP 和 SE 的特异性检测。

关键词: 肠道沙门氏菌; 肠炎沙门氏菌; TaqMan 探针; 双重荧光 PCR; 检测; 食品

文章编号: 1673-9078(2017)1-248-252

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.038

Development of a Duplex Real-time PCR Method with TaqMan-based

Probes for Detecting *Salmonella enterica* and *Salmonella enteritidis*

YUAN Mu-yun¹, XU Long-yan¹, LIU Er-long², CAO Ji-juan³, CHEN Bi-ling¹

(1. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

(2. Huang Pu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510530, China)

(3. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

Abstract: In order to detect *Salmonella enterica* (SP) and *Salmonella enteritidis* (SE) using a Taqman-based duplex real-time PCR method, primers and Taqman probes were designed based on the *aceA* (GenBank: U43344.1) sequence of SP and the *SEP* sequence (GenBank: AF370707.1) of SE. Probes were separately labeled with FAM and VIC. The results showed that all 58 *Salmonella* strains, with 29 different serotypes, could be amplified with the *aceA* sequence. Only 15 SE strains could be amplified with the *SEP* primers and probe, while the other 28 strains, with 29 different serotypes of *Salmonella*, the 17 strains of *Proteus*, as well as the negative control strains showed negative results. The amplification efficiency of *aceA* and *SEP* were 100% and 104%, respectively. R^2 values were estimated to be 0.999 and 0.998, respectively. The detection limits of *aceA* and *SEP* for this method were 280 cfu/mL and 260 cfu/mL, respectively. The duplex real-time PCR assay developed in this study showed high sensitivity and specificity, and could be used as a rapid and effective method for detecting SP and SE in foods.

Key words: *Salmonella enterica*; *Salmonella enteritidis*; TaqMan-based probe; duplex real-time polymerase chain reaction; detection; food

根据 DNA 同源性沙门氏菌属分为两个种, 肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*, SP) 和邦戈尔沙门氏菌。肠道沙门氏菌又分为 6 个亚种, 即肠道亚种、萨

收稿日期: 2015-11-19

基金项目: 广东省科技项目计划 (2013B040402004)

作者简介: 袁慕云 (1983-), 女, 工程师, 研究方向: 食源性病原菌分子检测

通讯作者: 许龙岩, 男, 研究员, 研究方向: 食品安全

拉姆亚种 II、亚利桑那亚种 IIIa、双相亚利桑那亚种 IIIb、豪顿亚种 IV 以及因迪卡亚种 VI。这些种和亚种均属于对应的 DNA 同源群。目前, 沙门氏菌血清型有 2500 种以上, 其中少数罕见血清型属于邦戈尔沙门氏菌 V 外, 其余属于肠道沙门氏菌, 而且能感染人类的约 1400 多种血清型沙门氏菌均属于肠道亚种 I, 只有极少数属于亚利桑那亚种 IIIa 和双相亚利桑那亚种 IIIb^[1,2]。肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, SE)

感染是一种重要的人畜共患病,在全球流行的15种最常见的感染人类的沙门菌血清型中,肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌和伤寒沙门菌排在前三位^[3,4]。目前,对沙门氏菌或各亚种成员的鉴定主要根据生化试验,而血清型分型可作为一项亚种水平以上的鉴定内容^[5,6]。然而不同血清型之间发生的交叉反应会干扰血清学诊断的准确性。如肠炎沙门菌凝集试验常与鸡沙门氏菌等发生交叉凝集^[7,8]。Camila等^[9]针对 *ompC*、*Sdf I*、*ViaB* 和 *Spy* 为目的基因设计引物,建立了多重PCR检测肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*, SP)、SE (*Salmonella Enteritidis*, SE)、伤寒沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的方法,应用于鸡肉中的肠道沙门氏菌检测,但上述方法需通过凝胶电泳判定结果,操作较为繁琐。Edel O'Regan等^[10]用 *flic*、*sefA*、*sdf* 和 *aceA* 基因设计引物探针,用多重荧光PCR方法检测 *Enteritidis*、*Gallinarum*、*Typhimurium*、*Kentucky* 和 *Dublin* 沙门氏菌,60株26种不同血清型肠道亚种沙门氏菌均扩增出 *aceA* 扩增曲线,但 *sefA* 为目的基因无法准确区分 SE, 鸡伤寒沙门氏菌和都柏林沙门氏菌。本研究用 SP 菌属共有的 *aceA*(异柠檬酸脱氢酶激

酶)基因 (GenBank: U43344.1)、SE 特异序列 (GenBank: AF370707.1), 分别设计引物和探针,建立了基于 TaqMan 探针双重荧光PCR检测方法,可通过一次荧光PCR扩增检测SP的同时判定所检测SP是否为SE。另外,本研究还评价了荧光PCR扩增体系的特异性、敏感性、扩增效率以及与传统检测方法的符合性,以期实际应用于食品中沙门氏菌的检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

29种不同肠道沙门氏菌SP59株,其中SE15株,鼠伤寒沙门氏菌等不同肠道沙门氏菌SP44株,非沙门氏菌菌株17株,菌株信息见表1。上述菌株来自中国普通微生物菌种保藏管理中心、广东省疾病预防控制中心、中国检验检疫科学研究院和广东出入境检验检疫局技术中心。所有菌株均经API试剂条和血清学试验进行确证。

表1 试验用菌株信息

Table 1 Bacterial strains tested in this study

菌株编号	血清型	菌株编号	血清型	菌株编号	血清型
CMCC50042	都柏林沙门氏菌	ATCC13076	SE	CMCC50002	甲型副伤寒沙门氏菌
CMCC50316	乙型副伤寒沙门氏菌	IQCC10527	丙型副伤寒沙门氏菌	IQCC10502	猪霍乱沙门氏菌
SP1	阿贡钠沙门氏菌	SP2	德尔卑沙门氏菌	SP3	里森沙门氏菌
SP4	鸭沙门氏菌	SP5	列克星敦沙门氏菌	SP6	乌普沙拉沙门氏菌
SP7	蒙得维的亚沙门氏菌	SP8	非丁伏斯沙门氏菌	SP9	布利丹沙门氏菌
SP10	伊斯坦布尔沙门氏菌	SP11	罗米他沙门氏菌	SP12	奥里翁沙门氏菌
SP13	山夫登堡沙门氏菌	SP14	渥兴顿沙门氏菌	SP15	明斯特沙门氏菌
SP16	田纳西沙门氏菌	SP17	奥胡斯沙门氏菌	SP18	利物浦沙门氏菌
SP19	列克星敦沙门氏菌	SP20	鲁齐齐II沙门氏菌	SP21	托尔诺沙门氏菌
ATCC14028	鼠伤寒沙门氏菌	ST1-ST15	鼠伤寒沙门氏菌	CMCC 50770	鸡伤寒沙门氏菌
SE1-SE14	SE	NICPB49005	变形杆菌	ATCC 25405	枸橼酸杆菌属
ATCC6538	金黄色葡萄球菌	ATCC29544	阪崎肠杆菌	ATCC25922	大肠杆菌
CMCC51582	鲍氏志贺氏菌	CMCC51334	宋内氏志贺氏菌	NICBP51252	痢疾志贺氏菌
CMCC52221	小肠结肠炎耶尔森氏菌	CMCC53510	假结核耶尔森氏菌	CMCC46102	肺炎克雷伯氏菌
ATCC14802	副溶血性弧菌	CMCC1.2712	哈夫尼菌	CMCC 1.1626	蜡样芽孢杆菌
ATCC19115	单增李斯特菌	AS10120	铜绿色假单胞菌	CMCC 1.646	沙雷氏菌

注: SP1-SP21为21株不同食品中分离的肠道沙门氏菌; ST1-ST15为15株不同食品和食物中毒患者中分离的鼠伤寒沙门氏菌; SE1-SE14为14株不同食品和食物中毒患者中分离的肠炎沙门氏菌。

1.1.2 主要仪器和试剂

实时荧光PCR仪ABI7900, 美国ABI公司; 核酸提取仪, 日本PSS公司; 拍打式无菌均质机BILON-08, 上海比朗仪器有限公司。PCR用Buffer、dNTP、

ROX和Taq酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 缓冲蛋白胨水和TTB增菌液, 北京陆桥有限公司。

1.1.3 引物和探针设计

根据GenBank公布的SP的*aceA*基因(序列号

GenBank: U43344.1), SE特异序列 (GenBank: AF370707.1), 用Oligo 7.0软件设计引物和TaqMan探针, *aceA*引物和探针序列, F: 5'-TCACCGAAAGACC AACAGAAG-3', R: 5'-GAACTCGCTGAAATG AGCA G-3', P: FAM-5'-TGGCAGGAGAAGTACCCA CAGG -3'/TAMARA, 扩增片段大小77 bp; *SEP*引物和探针序列, F: 5'-CTCATTCTGACCTCTAAGCCG-3', R: 5'-CTGGTACTTACGATGACAACCTTC-3', P: VIC-5'-CTGGCGAATGGTGAGCAGACAAC-3'/TAMARA, 扩增片段大小141 bp。引物和TaqMan探针委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 模板制备

所有菌株均用BP缓冲蛋白胨水37℃培养10h, 取10mL接种于TTB增菌液, 44.5℃培养18h, 取1mL菌悬液移入离心管, 12000 r/min离心5min去上清, 用1mL去离子水漂浮沉淀, 12000 r/min离心5min去上清, 重复两次, 最后加200μL去离子水在核酸提取仪上提取DNA, 用于荧光PCR扩增。

1.2.2 引物和探针特异性试验

建立单重实时荧光PCR反应体系, 分别进行*aceA*、*SEP*引物和探针的特异性试验。反应体系30μL, 模板DNA 1μL、10×TaqMan缓冲液4μL、5mmol/L MgCl₂ 2μL、2.5mmol/L dNTPs 3μL、TaqMan探针20μmol/L 1μL、引物20μmol/L各1μL(共2μL)、UNG酶0.55U 0.2μL、Taq聚合酶2.5U/μL 3μL、去离子水13.8μL。实时荧光PCR反应参数为95℃、30s、95℃、5s和60℃、34s, 40个循环。

*aceA*基因特异性试验用29种SP菌株58株, *SEP*特异性试验用15株SE(标准菌株1株, 菌号为ATCC13076; 14株分离株, 编号为SE1-SE14), 不同血清型SP菌株43株, 两个特异性实验均用非沙门氏菌菌株17株。

1.2.3 双重荧光PCR扩增体系评价

1.2.3.1 双重荧光PCR反应体系

以都柏林SP和SE标准菌株为模板, 在单一实时荧光PCR基础上优化反应体系, 建立双重荧光PCR扩增体系。反应体系30μL, 模板DNA 3μL(都柏林SP和SE模板各1.5μL)、10×TaqMan缓冲液4μL、5mmol/L MgCl₂ 2μL、2.5mmol/L dNTPs 3μL、TaqMan探针20μmol/L各1.5μL(共3μL)、引物20μmol/L各1.5μL(共6μL)、UNG酶0.55U 0.2μL、Taq聚合酶2.5U/μL 3μL、去离子水5.8μL。荧光PCR反应参数为95℃、30s, 95℃、5s和60℃、34s, 40个

循环。

1.2.3.2 敏感性试验及标准曲线制作

经平板菌落计数, 原始浓度分别为 2.8×10^7 cfu/mL、 2.6×10^7 cfu/mL的都柏林SP和SE的标准菌株培养液, 分别进行10倍梯度稀释, 从每个稀释度中取1mL培养液, 按1.2.1提取DNA, 按照双重荧光PCR反应体系和单重荧光PCR体系进行敏感性试验。在荧光PCR仪上选择标准品模式, 仪器自动绘制标准曲线。

1.2.4 荧光PCR结果判断

实时荧光PCR扩增曲线指数期明显, Ct值小于35可直接判定为阳性。Ct值在35~37之间判断为可疑, 需要加大模板量进行重复实验, 如出现指数期明显的扩增曲线方可判定为阳性, 否则为阴性。

1.2.5 模拟样品检测

分别称取25g冻鸡肉、罗非鱼、鱼粉和冻虾各两份, 置于均质袋中, 一份样品中添加浓度为28cfu/mL的都柏林SP菌悬液1mL, 另一份中添加浓度为26cfu/mL的SE菌液1mL, 制成8份模拟样品。每份样品中加入225mL缓冲蛋白胨水, 用拍打式无菌均质机拍打2min, 37℃培养10h, 取10mL移入90mL TTB增菌液, 44.5℃培养18h, 取增菌液按1.2.1提取DNA用于荧光PCR扩增, 与此同时, 每份样品按文献^[1]同步进行检测。

2 结果与讨论

2.1 特异性试验结果

本研究用肠道沙门氏菌SP共有的异柠檬酸脱氢酶激酶*aceA*基因设计引物和TaqMan探针, 检测肠道沙门氏菌, 用SE特异序列(GenBank: AF370707.1)设计*SEP*引物和探针特异性的检测SE。*aceA*特异性试验结果, 58株29种SP的荧光PCR扩增曲线指数期明显、Ct值在10~25之间。*SEP*特异性试验结果, 不同来源的15株SE也扩增曲线指数期明显, Ct值在10~30, 43株SP和17株非沙门氏菌扩增结果阴性, 表明*aceA*引物和探针能扩增出不同SP, *SEP*引物和探针可特异性的检测SE。

2.2 荧光PCR扩增体系评价结果

本研究根据*aceA*基因和SE特异序列分别设计引物和TaqMan探针, 反复优化反应体系, 建立了基于TaqMan双重荧光PCR检测肠道沙门氏菌和SE的检测方法。基于TaqMan探针的荧光PCR体系中, 引物和探针设计是一个关键环节, 如能在引物设计这一关键环节避免非特异扩增反应的发生, 就有可能显著提高实验

效率,而且理想的荧光PCR扩增体系特异性强外,反应体系的扩增效率在90%~105%,线性相关系数 R^2 大于0.98,若不满足上述条件要重新设计引物探针^[12,13]。梯度稀释都柏林SP和SE进行双重荧光PCR扩增,图1观察到,*aceA*和*SEP*扩增曲线指数期明显,两条扩增曲线之间互不干扰,最低检测灵敏度分别达到280 cfu/mL和

260 cfu/mL。从表2观察扩增体系评价试验结果,模板浓度与Ct值有良好的线性关系,*aceA*和*SEP*双重荧光PCR体系线性相关系数 R^2 均大于0.998,扩增效率分别为100%和104%,与单重荧光PCR扩增体系相比毫无逊色,表明设计的引物探针序列匹配较佳,扩增体系的优化理想,充分满足肠道沙门氏菌和SE的检测。

表2 单重荧光PCR与双重重荧光PCR扩增体系比较

Table 2 Comparison of single RT-PCR with duplex RT-PCR

扩增片段	单荧光PCR反应体系			双重荧光PCR反应体系		
	表达式	扩增效率	R^2	表达式	扩增效率	R^2
SP(<i>aceA</i>)	$y=-3.38X+38.09$	97.6%	0.999	$y=-3.32X+37.51$	100%	0.999
SE (<i>SEP</i>)	$y=-3.40X+41.45$	96.8%	0.998	$y=-3.22X+37.64$	104%	0.998

注:表达式为菌液浓度(cfu/mL)与Ct值之间线性关系表达式,式中y为对应的Ct值,x为模板起始浓度的对数; R^2 为菌液浓度与Ct值的相关系数。

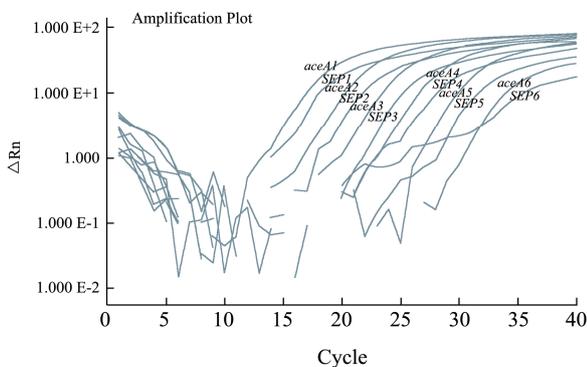


图1 SP(*aceA*)和SE(*SEP*)梯度稀释双重荧光PCR扩增图

Fig.1 Amplification graph of SP (*aceA*) and SE (*SEP*) duplex RT-PCR dilution gradients

注:*aceA*1: 2.8×10^7 cfu/mL; *aceA*2: 2.8×10^6 cfu/mL; *aceA*3: 2.8×10^5 cfu/mL; *aceA*4: 2.8×10^4 cfu/mL; *aceA*5: 2.8×10^3 cfu/mL; *aceA*6: 2.8×10^2 cfu/mL。 *SEP*1: 2.6×10^7 cfu/mL; *SEP* 2: 2.6×10^6 cfu/mL; *SEP* 3: 2.6×10^5 cfu/mL; *SEP* 4: 2.6×10^4 cfu/mL; *SEP* 5: 2.6×10^3 cfu/mL; *SEP* 6: 2.6×10^2 cfu/mL。

2.3 模拟样品检测结果

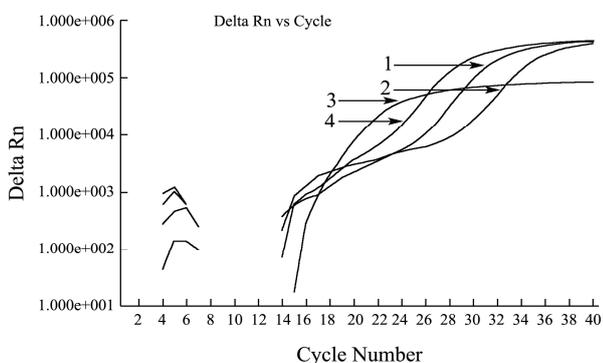


图2 添加都柏林SP的样品荧光PCR扩增图

Fig.2 Amplification graph of RT-PCR for samples with duplex SP added

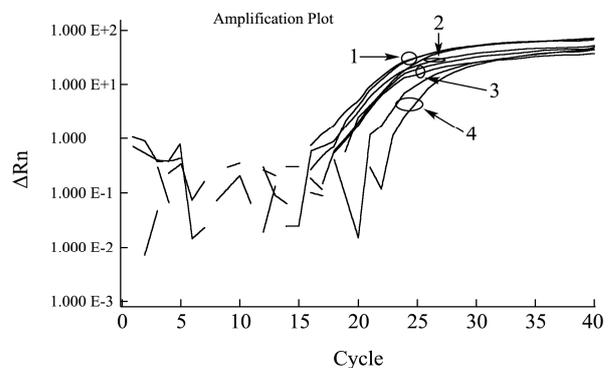


图3 添加SE模拟样品荧光PCR扩增图

Fig.3 Amplification graph of RT-PCR for samples with SE added

本研究建立的双重荧光PCR扩增体系,对沙门氏菌纯培养物的灵敏度达到 10^2 cfu/mL,但实际用于食品检测时,食品成份复杂,还可能加入食品添加剂等,这些复杂的成分会抑制Taq酶活性、影响扩增效率。因此,能找到一种样品处理方法,对荧光PCR方法应用与食品微生物检测具有重要意义。沙门氏菌为需氧兼厌氧性菌,在TTB增菌液中培养会观察到是均匀浑浊生长,而且培养16 h后产生絮状沉淀。鉴于此,取样时先轻轻摇动培养瓶,待静止2 min~3 min后取培养液,可增加提取的DNA菌量又可以稀释样品中对荧光PCR产生干扰的成分,还可以避免取死亡菌体的DNA而出现的假阳性,大大提高检出率,提高灵敏度,得到较好的效果。本研究从日常经常检测沙门氏菌的粉剂、海产品、肉制品和淡水产品中,选择鱼粉、冻虾、冻鸡肉和罗非鱼,制成8份模拟样品,添加都柏林SP的4份样品扩增出*aceA*扩增曲线(图2),添加SE的4份样品扩增出*aceA*和*SEP*扩增曲线(图3)。与荧光PCR方法同步,按照文献^[13]检测的模拟样品中,均分离鉴

定出与添加菌株相符合的都柏林SP和SE,其检测结果与荧光PCR结果相同,表明建立的方法可应用于实际检测中。但在检测时间上荧光PCR法增菌28 h、提取DNA 2 h、扩增1 h,整个实验31 h完成,简便快捷。图2和图3中,1为鱼粉;2为冻虾;3为冻鸡肉;4为罗非鱼。

3 结论

本研究针对肠道沙门氏菌SP共有序列和SE的特异序列,分别设计引物和探针,建立基于TaqMan探针的双重荧光PCR检测方法,用*aceA*基因扩增检测SP,用*SEP*的扩增检测SE,可经过一次荧光PCR扩增判断样品是否受到SP的污染,同时判定污染的SP是否为SE。设计的引物和探针特异性强,扩增体系优化理想,简便快捷,适用于多种样品的检测,可推广应用于食品中肠道沙门氏菌和肠炎沙门氏菌的检测。

参考文献

- [1] 曾明. 也议沙门氏菌的中文译名[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(8): 695-696
ZENG Ming. Further discussion about Chinese name of *Salmonella* [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2009, 29(8): 695-696
- [2] F W Brenner, R G Villar, F J Angulo, et al. *Salmonella* nomenclature [J]. J. Clin. Microbiol., 2000, 38(7): 2465-2467
- [3] Deng S X, Cheng A C, Wang M S, et al. Study on the gastrointestinal tract distribution of *Salmonella enteritidis* in orally infected mice with a species-specific fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. World J. Gastroenterol, 2007, 13: 6568-6574
- [4] 邓树轩,程安春,汪铭书,等. 肠炎沙门菌种特异性PCR及对感染鸭快速检测[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(2): 153-157
DENG Shu-xuan, CHENG An-chun, WANG Ming-shu, et al. Development and application of species specific PCR assay for detection of *Salmonella enteritidis* infections in ducks [J]. Chin J. Vet. Sci., 2009, 29(2): 153-157
- [5] 盘宝进,韦梅良,汪文龙,等. 食品沙门氏菌实时荧光PCR快速检测方法建立[J]. 现代食品科技, 2010, 26(2): 197-199
PAN Bao-jin, WEI Mei-liang, WANG Wen-long, et al. Rapid detection of *Salmonella* in foodstuffs by real-time PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(2): 197-199
- [6] 战晓微,傅俊范,郑秋月,等. 沙门氏菌MALDI-TOF-MS检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 595-597
ZHAN Xiao-wei, FU Jun-fan, ZHENG Qiu-yue, et al. Establishment of a MALDI-TOF-MS method for *Salmonella* detection [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(5): 595-597
- [7] Cooper G L, Nicholas R A, Bracewelle D. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis* [J]. Vet. Rec., 1989, 125(23): 567-572
- [8] Rajashekara G, Wanduragala D, Halvorson D A, et al. A rapid strip immunoblot assay for the specific detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 53-60
- [9] Camila Guimarães de Freitas, Ângela Patrícia Santana, Patrícia Helena Caldeira da Silva, et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella enteritidis*, typhi and typhimurium and occurrence in poultry meat [J]. Int. J. Food Microbiol., 2010, 139: 15-22
- [10] Edel O'Regan, Evonne McCabe, Catherine Burgess, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples [J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 156-159
- [11] GB 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验[S]
GB 4789.4-2010 National food safety standard food microbiological examination *Salmonella* [S]
- [12] 袁慕云,许龙岩,曹际娟,等. 基于TaqMan探针双重荧光PCR检测鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌[J]. 卫生研究, 2013, 42(3): 491-496
YUAN Mu-yun, XU Long-yan, CAO Ji-juan, et al. Detection of foodborne *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* by duplex real-time PCR using TaqMan probe [J]. Journal of Hygiene Research, 2013, 42(3): 491-496
- [13] 许龙岩,袁慕云,曹际娟,等. TaqMan探针双重荧光PCR法检测副溶血性弧菌[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 263-266
XU Long-yan, YUAN Mu-yun, CAO Ji-juan, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* using duplex fluorescence Real-Time PCR with TaqMan Probe [J]. Food sci., 2013, 34(18): 263-266