

金黄色葡萄球菌活的非可培养状态复苏及 PMA-qPCR 检测

田聪¹, 余以刚¹, 肖性龙¹, 吴晖¹, 赖富饶¹, 杨锡洪²

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2.广东温氏佳润食品有限公司, 广东云浮 527400)

摘要: 为研究金黄色葡萄球菌活的非可培养 (VBNC) 状态的复苏问题, 采取温度、盐度和酸度 3 个因素复合诱导制备 VBNC 菌, 尝试四种复苏方法, 并以荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 技术结合的方法进行检测。结果证明: 8% 无菌 Tween80 可以使 VBNC 状态金黄色葡萄球菌 48 h 后复苏, 同时 PMA-qPCR 能够有效检出 VBNC 状态金黄色葡萄球菌, 克服传统平板计数法对于 VBNC 菌的漏检。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 活的非可培养状态; 复苏; PMA; 荧光定量 PCR

文章编号: 1673-9078(2013)6-1390-1394

Resuscitation and PMA-qPCR Detection of *Staphylococcus aureus* in the Viable but Non-culturable State

TIAN Cong¹, YU Yi-gang¹, XIAO Xing-long¹, WU Hui¹, LAI Fu-rao¹, YANG Xi-hong²

(1.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Guangdong Wen's Caren Food Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: In order to study the resuscitation of *Staphylococcus aureus* in the viable but non-culturable state (VBNC), three factors (temperature, salt concentrations and pH) were investigated to induce VBNC *Staphylococcus aureus*. Four different resuscitation methods were attempted and a new detection method using qPCR and PMA in combination with qPCR was established to detect *Staphylococcus aureus*. The results showed that the VBNC samples could resuscitate in 48 h after disposed in 8% Tween80. In addition, PMA-qPCR was an effective method for detection of VBNC *Staphylococcus aureus*, which efficiently overcome the shortcomings of plate counts.

Key words: *Staphylococcus aureus*; viable but nonculturable state; resuscitation; PMA; qPCR

微生物在自然环境中以多种生理状态存在: 可培养的活菌, 活的非可培养状态, 具有完整结构但无生物活性的死菌以及细胞膜损伤死菌。徐怀恕等[1]通过对霍乱弧菌和大肠杆菌存活规律的研究, 发现细菌存在一种“活的非可培养状态”(viable but nonculturable state, VBNC)。当细菌处于不良环境条件下时, 用常规方法培养不能生长繁殖, 但仍然具有一定的活性。处于 VBNC 状态的细菌, 仍具有毒性, 在适宜的条件下有可能复苏[2]。

不同菌种甚至同一菌种的不同菌株之间进入 VB

收稿日期: 2013-02-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目资助课题 (31101279); 中央高校基本科研业务费 (2011ZM0101); 高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题 (20110172120034); 广东省省部产学研结合项目 (2012B091100113)

作者简介: 田聪 (1988-), 女, 硕士, 主要从事食源性致病菌活菌检测

通讯作者: 肖性龙, 男, 博士, 讲师, 研究方向为食品安全与检测

NC 的特征和复苏存在差异。自然环境中的各种因素, 如温度、渗透压、营养成分、氧气指数甚至光照强度若发生改变都可以诱导细菌进入 VBNC 状态, 通常这些变化均是向着不利于正常细胞存活的方向的[3]。在实验室条件下, 可以通过控制金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的培养条件诱导其进入 VBNC 状态。曹小红等[4]将金黄色葡萄球菌分别在低温和重金属条件下成功诱导使其进入 VBNC 状态, 并且利用过氧化氢酶和吐温 20 使 VBNC 状态金黄色葡萄球菌在短时间内实现复苏。目前对于金黄色葡萄球菌的 VBNC 状态研究较少, 并且缺乏快速有效的检测方法。

国内对金黄色葡萄球菌的检测主要参照国家标准检测方法进行[5]。虽然对样本中有无活菌的存在提供确切而直接的证据, 但检出时间较长, 步骤较为繁琐, 不适用于快速检测。而且, 标准难以检出处于 VBNC

状态的细菌。而荧光染料作为前处理手段,结合 qPCR (fluorescence quantitative, 荧光定量 PCR) 技术用于活菌检测已经取得大量的研究进展,并且具有广阔的潜在应用空间。PMA (propidium monoazide, 叠氮溴化丙锭) 是一种选择性核酸交联染料,可以透过死细胞而不能透过活细胞的细胞膜,进入细胞后,PMA 与 DNA 共价结合,从而阻碍了死细胞中目标 DNA 的扩增,结合荧光定量 PCR 技术检测活菌数,可以有效检测出样本中的活菌含量。VBNC 菌是一种细胞膜没有损伤的活菌,理论上用 PMA-qPCR 方法检测可行^[6]。

尝试在实验室环境下利用低温、低盐、低 pH 等不良生长条件,体外诱导金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态的基础上,对 VBNC 状态的金黄色葡萄球菌进行复苏实验,同时验证 PMA-qPCR 法对 VBNC 状态的金黄色葡萄球菌检测的适用性和可行性,从而构建一种准确、快速检测食源性致病性活菌的方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及培养条件

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), 菌株为实验室保存。金黄色葡萄球菌采用营养肉汤液体培养基(蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏粉 3 g/L, 氯化钠 5 g/L, 最终 pH 7.4±0.2)培养, 培养基经过 121 °C, 20 min 灭菌后使用。金黄色葡萄球菌接种到 30 mL 营养肉汤液体培养基中于 37 °C 下 180 r/min, 当 OD₆₀₀ 接近 1 时, 停止培养。营养肉汤液体培养基中添加 1.8% 的琼脂粉, 用于平板法检测可培养菌数。

1.2 主要试剂和仪器

吖啶橙, 苏丹黑购自 Amresco 公司(美国); 萘啶酮酸、环丙沙星、酵母膏、二甲基亚砜 (DMSO)、Tween80 购自 Sigma 公司(美国); 甘露醇氯化钠琼脂培养基 (Mannitol Salt Agar) 购自广东环凯微生物科技有限公司; PMA (1 mg) 购自 biotium 公司(美国); 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; TaqDNA 聚合酶购自 Ferments 公司; PCR AmpLification Kit 购自 TaKaRa 公司。

SPX-250B 生化培养箱, 高压蒸汽灭菌锅购自上海博讯实业有限公司; ESCO 生物安全柜购自浩瀚有限公司; 台式高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司(德国); 水浴锅购自雷蒙特实验设备公司; Olympus CX-31 落射荧光显微镜(日本); 卤钨灯(650 W)购自 OSRAM 公司(德国); ABI7500 荧光定量 PCR 仪器购自应用生物系统公司(美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 VBNC 状态金黄色葡萄球菌的诱导

活化培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌, 取 30 mL 菌悬液至无菌 50 mL 离心管中, 8000×g 离心 5 min, 弃上清, 用灭菌生理盐水洗菌体 2 次, 加入无菌水调整细菌浓度达到 2.5×10⁷ CFU/mL。根据金黄色葡萄球菌的最适培养条件, 以逆向调整为原则, 选择对细菌生长不利的条件作为诱导 VBNC 状态的因素。金黄色葡萄球菌的最适生长温度为 37 °C, 最适生长 pH 为 7.4, 同时金黄色葡萄球菌的生长对盐存在一定程度的依赖性, 过低的盐浓度不适宜于金黄色葡萄球菌生长^[7]。在充分考虑温度、营养成分、pH 值、盐浓度的基础上, 最终确定金黄色葡萄球菌的 VBNC 状态诱导方案为: 含有 15% (m/V) NaCl 和 0.3% (V/V) 乙酸的营养肉汤培养基于 4 °C 条件下诱导。

然后将金黄色葡萄球菌在诱导方案条件下培养。每隔 24 h 取样 100 μL 平板计数检查可培养菌数的变化, 同时设立于普通营养肉汤培养基中正常培养的细菌作为对照组。当可培养细菌数降到 0 时, 再加大接种量, 即每个平板接种 1 mL, 连续测定 3 d 可培养细菌数仍然为 0 时, 即认为实验中的细菌不可培养^[8]。

1.3.2 试验菌株 VBNC 状态的确认

对于 VBNC 菌的诱导实验, 需要检测细菌总数、活菌总数和可培养菌数三个指标, 当可培养菌数为 0, 但是活菌总数不为 0 时, 认为细菌进入到 VBNC 状态。

VBNC 检测经典方法即吖啶橙荧光显微镜计数法 (Acridine Orange Direct Count, AODC) 和活菌直接计数法 (Direct Viable Count, DVC) 及平板计数法 (Plate Count, PC) 三者结合法, 是由 Fouge 于 1975 年建立的^[9]。吖啶橙能与 RNA 或单螺旋 DNA 结合发出红色荧光, 与双螺旋 DNA 结合发绿色荧光, 并且能使染色的细胞与背景分开, 用于测定总菌数^[10]; DVC 法中使用的萘啶酮酸对于革兰氏阳性菌有抗性, 采用环丙沙星代替抑制 DNA 的合成, 可刺激 VBNC 细胞不分裂, 只吸收营养长大, 能检出具有代谢活性的活菌数。

1.3.2.1 AODC 法观察细菌总数

将微孔滤膜浸泡于 0.2% 苏丹黑溶液 24 h 备用。取出金黄色葡萄球菌菌体, 放入无菌箱中, 用缓冲液以 10 倍倍比稀释至适宜浓度。取 1 mL 稀释菌液, 滴加 0.1% 的吖啶橙 0.1 mL 染色 5 min, 染色后的样品滴加到孔径为 0.2 μm、直径为 25 mm 的微孔滤膜上。将滤膜置于载玻片上, 盖上盖玻片, 用手动压片方式排净滤膜与盖玻片间存在的空气。用落射荧光显微镜观察。观察时随机选择 10 个不同视野, 对视野中细菌计数, 并取平均值。

1.3.2.2 DVC 法观察活菌

适宜浓度样品稀释液中加入环丙沙星和 10% 的大

豆蛋白胨^[11], 置黑暗条件下 37 °C 培养 6 h, 然后按 AODC 法直接镜检。视野中变大的细菌为活菌。环丙沙星和大豆蛋白胨作为改良的 DVC 法可以有效的抑制革兰氏阳性菌的细胞分裂, 用于活菌的直接计数, 并且解决了背景的荧光问题^[21]。实验同时取对数生长期的正常活菌作为对照组。

1.3.3 VBNC 状态的复苏

取 3 mL 的 VBNC 状态菌液加入 10 mL 无菌离心管, 以无菌水重悬 2 次, 按以下方法进行复苏。

1.3.3.1 直接升温复苏法

VBNC 状态菌液加入在营养肉汤液体培养基内, 于 37 °C 下培养, 每隔 24 h 平板涂布在甘露醇氯化钠琼脂培养基上, 于 37 °C 培养, 24 h 后计数。

1.3.3.2 添加化学物质复苏法

VBNC 状态菌液加入含有体积分数为 8% 无菌 Tween80 的营养肉汤液体培养基内, 并将 pH 调至 7.2~7.6, 于 37 °C 下培养, 每隔 24 h 平板涂布在甘露醇氯化钠琼脂培养基上, 于 37 °C 培养, 24 h 后计数。

1.3.3.3 热激复苏法

VBNC 状态菌液在 45 °C 下 10 s 热激, 加入营养肉汤液体培养基内, 37 °C 下培养 24 h 后平板涂布在甘露醇氯化钠琼脂培养基上, 于 37 °C 培养, 24 h 后计数。

1.3.3.4 逐步升温复苏法

VBNC 状态菌液于 25 °C 培养 24 h, 转入 37 °C 培养 24 h, 平板涂布在甘露醇氯化钠琼脂培养基上, 37 °C 培养, 24 h 后计数。

同时以灭菌的生理盐水做阴性对照。复苏实验同时作为 VBNC 状态诱导成功的佐证。

1.3.4 荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 检测

以荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 方法分别检测 VBNC 细菌、四种方法复苏处理后的菌、热灭活的死菌以及正常培养的活菌。以荧光定量 PCR 计数检测不同状态下的总菌数, PMA-qPCR 计数检测不同状态下的活菌数。

1.3.4.1 PMA 处理

1 mg PMA 溶解于 200 μ L 20% 的 DMSO 溶液中, 得到 5 μ g/ μ L 的储备液, 于 -20 °C 避光保存。菌液中加入 PMA 储备液至终浓度为 10 μ g/mL, 充分混匀后于暗处常温孵育 5 min。离心管盖子打开, 距离 650 W 卤钨灯 18 cm 照射 5 min。离心管置于碎冰上, 防止光照过程中温度上升过高^[13]。

1.3.4.2 DNA 提取以及荧光定量 PCR 检测

取样本增菌液 500 μ L 加到 1.5 mL 无菌离心管中, 10000 \times g 离心 5 min, 按照细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒说明操作提取基因组 DNA, 作为荧光定量 PCR

反应模板。

针对金黄色葡萄球菌的 sa442 基因^[14], 用 DNASTar Seqman 模块(DNASTAR, Inc.)进行基因序列比对和 Primer Express 2.0 (Applied Biosystems)设计引物和探针。

前引物: 5'-TTC TTC ACG ACT AAA TAA ACG CTC A-3'; 后引物: 5'-GGT ACT ACT AAA GAT TAT CAA GAC GGC T-3'; 探针: FAM-5'-CAGAACACAAT GTTTCCGAT GCAACGT-3'-BHQ1。

荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ L, 其中含 10 \times (NH₄)₂SO₄ 缓冲液 2.5 μ L, 25 mM Mg²⁺ 3.5 μ L, 25 mM dNTPs 1 μ L, 前后引物各 1 μ L, 探针 0.5 μ L, 模板溶液 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, DEPC 水 14.5 μ L。反应程序: 95 °C 3 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 40 s, 同时收集荧光, 共进行 40 个循环。反应结束后 40 °C 保温 1 min。每个荧光定量 PCR 反应重复三次, 计算平均 Ct 值和样本标准差 SD 值。

2 结果与分析

2.1 诱导结果

采用 3 种不利于金黄色葡萄球菌生长的因素复合诱导, 金黄色葡萄球菌在诱导的第 12 d 不可培养。用 AODC 和 DVC 法检测, 结果显示在诱导结束时刻, 诱导环境中的总菌和活菌数均有所下降, 但是下降幅度较小, 并且活菌数不为 0。结果说明, 金黄色葡萄球菌进入 VBNC 状态(图 1)。

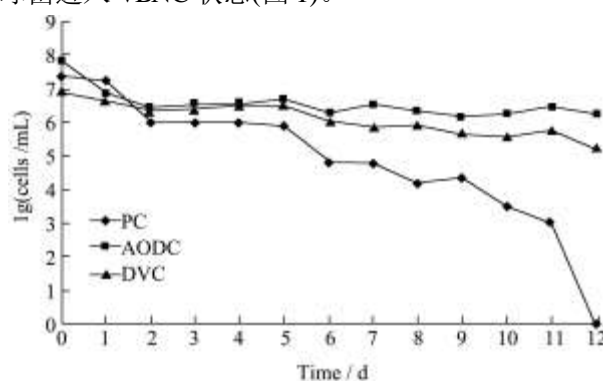


图 1 金黄色葡萄球菌在诱导环境中的菌数变化

Fig.1 Changes of cell counts of *Staphylococcus aureus* in inductive environment

2.2 复苏结果

取刚进入 VBNC 状态的金黄色葡萄球菌立即进行复苏试验。常规的复苏方法是尝试诱导过程的逆过程, 即去除环境中的不利因素。

为了防止复苏过程中引入杂菌导致平板计数结果呈假阳性, 利用甘露醇氯化钠琼脂培养基选择性分离培养金黄色葡萄球菌, 作为选择性培养基可以抑制其

他菌的生长,一定的含盐量又适宜金黄色葡萄球菌生长。添加化学物质复苏后以甘露醇氯化钠琼脂培养基平板培养后的菌落呈大小一致的黄色单菌落,其他复苏方法平板上无菌落产生。

直接升温复苏法是恢复正常的培养温度 37 °C 和适宜金黄色葡萄球菌生长的培养基环境,采用平板涂布法检测结果无菌落产生,不能使 VBNC 菌恢复可培养性。热激复苏和逐步升温复苏法同样不能使 VBNC 菌恢复可培养性。重复三次结果相同。说明单纯依赖去除诱导因素并不能使 VBNC 菌复苏。然而,在适宜的培养环境下添加非离子表面活性剂 Tween80 进行复苏试验时,48 h 后平板计数显示可培养菌数达到 2.95×10^5 CFU/mL,比诱导前的菌液浓度 (2.5×10^7 CFU/mL) 低 2 个数量级(表 1),成功使 VBNC 状态金黄色葡萄球菌复苏。Tween80 能使复苏成功的原因可能是其通过降低细菌表面张力而增大细菌活性,有利于细胞内酶释放。复苏是 VBNC 状态菌的一个重要特征,复苏的成功证明金黄色葡萄球菌存在 VBNC 状态,同时说明 VBNC 状态诱导成功。

表 1 金黄色葡萄球菌的 VBNC 状态复苏结果

Table 1 Resuscitation of VBNC *Staphylococcus aureus* by different methods

	平板涂布计数/[lg(CFU/mL)]			
	升温	添加化学物质	热激	逐步升温
VBNC 菌液	0	5.47	0	0
阴性对照	0	0	0	0

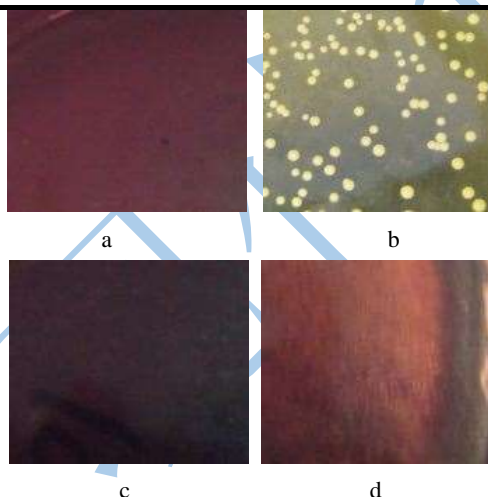


图 2 VBNC 状态金黄色葡萄球菌复苏菌落照片

Fig.2 Conial morphology of VBNC *Staphylococcus aureus* after resuscitation

注: a-升温复苏法; b-添加化学物质复苏法; c-热激复苏法; d-逐步升温复苏法。

2.3 荧光显微镜观察金黄色葡萄球菌复苏细胞

图 3 和 4 为正常状态下和成功复苏后的金黄色葡

萄球菌的荧光显微照片。取培养至对数生长期的菌悬液经过吖啶橙染色后,按照吖啶橙荧光显微镜计数法步骤操作,经落射荧光显微镜观察,发现正常菌体为球状,菌体相对聚集。成功复苏后的金黄色葡萄球菌经过吖啶橙荧光显微镜计数法处理后,菌体形态和大小与正常菌体基本相同,但是菌体相对分散。图 3、图 4 中黄色标尺为 10 μm。

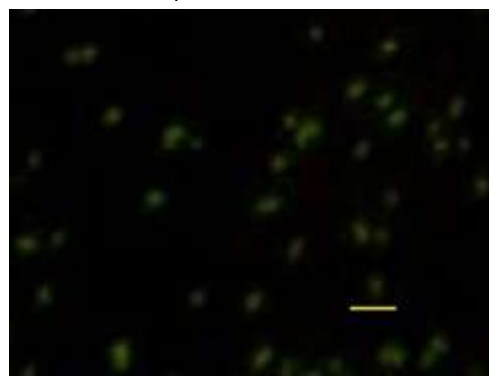


图 3 AODC 法观察正常状态金黄色葡萄球菌的荧光图像

Fig.3 Fluorescence images of normal state of *Staphylococcus aureus* by AODC

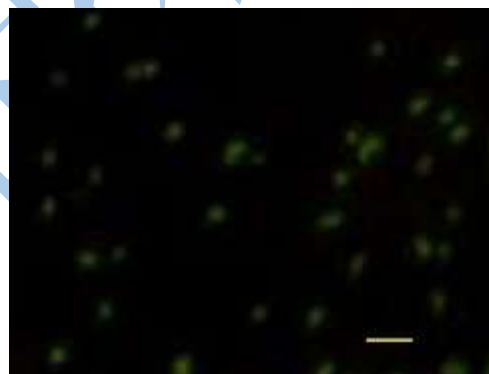


图 4 AODC 法观察复苏状态金黄色葡萄球菌的荧光图像

Fig.4 Fluorescence images of resuscitation state of *Staphylococcus aureus* by AODC

2.4 不同状态的荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 检测

普通 PCR 技术不能用于区分活菌和死菌,检测到的是细菌的总菌数。而 PMA 可以与膜破损的死菌 DNA 发生反应,形成沉淀,从而在随后的荧光定量 PCR 阶段只扩增活菌 DNA,达到区分死菌和活菌的目的。对于不同阶段的金黄色葡萄球菌,分别采用荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 技术检测总菌和活菌数。其中细胞膜损伤的死菌,采用热灭活的方法制备,取处于对数生长期浓度为 2.95×10^5 CFU/mL 的菌液在沸水浴中处理 90 s 后取出,平板计数显示无菌落产生。热处理死菌于常温下提取基因组 DNA。各个状态下的荧光定量 PCR 检测的 Ct 值相差不大,即样本中的总菌变化不大。

VBNC 状态金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 和

PMA-qPCR 检测结果的 ΔCt 值为 2.28, 而相同浓度的死菌和活菌的 ΔCt 值分别为 7.95 和 0.56(图 3)。 ΔCt 值越小表示样本中的活菌数越接近总菌数, 即活菌比例越大。结果显示 VBNC 状态金黄色葡萄球菌样本中同时含有活菌和死菌, 与 AODC 和 DVC 检测结果相似。平板计数法无法检测出的活菌数可以用 PMA-qPCR 和 DVC 技术检测出来, DVC 法操作繁琐, 同时对于革兰氏阳性菌检测不成熟, PMA-qPCR 是一种较为理想的替代方法。

四种方法复苏后金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 检测结果的 ΔCt 值分别为 2.96、2.36、5.96 和 4.05。对于直接升温复苏和添加化学物质复苏两种方法, 样本中的活菌比例基本相同, 升温法平板计数无菌落产生, 而添加化学物质法菌落数为 2.95×10^5 CFU/mL, 说明升温法中 VBNC 状态菌仍然保持活性, 并且活菌数保持在诱导结束时的 10^5 CFU/mL 数量级。对于热激复苏和逐渐升温两种复苏方法, 活菌比例下降, 热激后 ΔCt 值甚至达到 5.96, 说明温度骤然升高可能导致部分菌体死亡, 温度的改变对于金黄色葡萄球菌的生长影响较大。

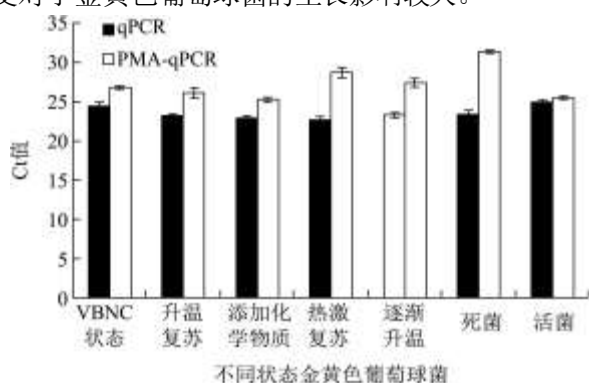


图5 不同状态下的金黄色葡萄球菌的荧光定量PCR和PMA-qPCR检测

Fig.5 qPCR and PMA-qPCR detection of *Staphylococcus aureus* in different states

3 结论

金黄色葡萄球菌在 4 °C、15% NaCl 和 0.3% 乙酸的中诱导 12 d 可以进入 VBNC 状态, 营养肉汤培养基中添加非离子表面活性剂 Tween80 可以使 VBNC 状态金黄色葡萄球菌 48 h 后成功复苏。荧光定量 PCR 和 PMA-qPCR 相结合的技术应用在 VBNC 菌检测尤其是革兰氏阳性菌 VBNC 状态检测中, 具有快速、准确率高、重现性好的优势, 有效克服平板计数法造成的漏检缺陷。

参考文献

- [1] Xu H S, Roberts N, Singleton F L, et al. Survival and Viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. [J] *Microbiol Ecol*, 1982, 8: 313
- [2] 许兵,徐怀恕,纪伟尚,等.活的非可培养状态霍乱弧菌的复苏[J].青岛海洋大学学报,1994,24(2):187
- [3] 郑桂丽,廖绍安,翟俊辉,等.环境中“活的非可培养(VBNC)”细菌的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2004,32(4):58-66
- [4] 曹小红,杨政,鲁梅芳,等.两种卫生指标菌在瓶装水中“活的非可培养状态”的研究[J].食品科学,2009,30(11):197-201
- [5] SN 0172-92.中华人民共和国进出口商品检验行业标准-进出口食品金黄色葡萄球菌检验方法[S]
- [6] Andreas Nocker, Alberto Mazza, Luke Masson, et al. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76:253-261
- [7] 陈俊,张惠萍,朱希贵,等.金黄色葡萄球菌耐盐生长的形态观察及机理的初步研究.[J]云南农业大学学报,2010,25(4): 517-534
- [8] Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1979, 25(3): 415-420
- [9] Hobbie J, Daley R J, Jasper S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy [J]. *Appl. Environ. Microbiol*, 1977, 33(5): 1225-1228
- [10] Thusitha S Gunasekera, Anders Sorensen, Paul V Attfield, et al. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 1988-1993
- [11] Wong H C, Wang P. Induction of viable but non-culturable state in *Vibriopara haemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses [J]. *Appl. Microbiol*, 2004, 96, 359-366
- [12] Besnard V, Federighi M, Cappelier J M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC State in *Listeria monocytogenes* [J]. *Letters in applied Microbiology*, 2003, 31(1): 77-81
- [13] 李聪聪,余以刚,邱杨,等.PMA-qPCR 方法用于监测超声波灭菌效率的适用性及其应用[J].现代食品科技,2012,28(4): 409-411
- [14] Nabin K Shrestha, Marion J Tuohy, Geri S Hall, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the light cycler system [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 7: 2659-2661

现代食品科技