

# Taqman 探针荧光 PCR 法检测食品中的大肠埃希氏菌 O145

游淑珠, 唐食明, 蔡教英, 姚丽锋, 王小玉, 冯家望, 丁琦, 符家忍  
(珠海出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东珠海 519000)

**摘要:** 针对大肠埃希氏菌 O145 的 O 抗原基因簇的 *wckD* 基因的特异性序列设计引物和 Taqman 探针, 建立检测大肠埃希氏菌 O145 的荧光 PCR 方法, 对其灵敏度、特异性进行验证, 并将其用于食品样品的检测。结果表明, 本研究中的方法可实现对大肠埃希氏菌 O145 的特异性扩增, 其它 27 株非 O145 大肠埃希氏菌和 20 株非大肠埃希氏菌细菌的菌株均无扩增; 检测的灵敏度可达 165 拷贝/反应; 339 份食品样品 EC 肉汤增菌后用本荧光 PCR 法进行检测, 检出大肠埃希氏菌 O145 阳性 31 份, 阳性率为 9.1%。实验结果表明, 本研究成功建立了可用于食品中大肠埃希氏菌 O145 的 Taqman 探针荧光 PCR 方法, 食品样品采用 EC 肉汤增菌 24 h、热裂解法提取核酸, 增菌后检测所需时间由至少 3 d~7 d 缩短为仅需 2 h~3 h, 食品检测全过程仅需约 28 h, 经证实本方法特异性强、操作简便, 为食品中大肠埃希氏菌 O145 提供了一种快速检测手段。

**关键词:** 大肠埃希氏菌; O145 血清型; Taqman 探针; 荧光 PCR; 食品; 检测

文章编号: 1673-9078(2018)03-191-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.028

## Detection of *Escherichia coli* O145 in Food by TaqMan probe Real-time PCR

YOU Shu-zhu, TANG Shi-ming, CAI Jiao-ying, YAO Li-feng, WANG Xiao-yu, FENG Jia-wang, DING Qi, FU Jia-ren

(Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519000, China)

**Abstract:** The primers and a TaqMan probe were designed to amplify the specific sequences of *wckD* gene in O-antigen gene group of *Escherichia coli* O145, and real-time PCR method was developed to detect *Escherichia coli* O145. The sensitivity and the specification of the method were verified, and the method was applied to the food detection. The results showed that *E. coli* O145 could be amplified specifically by the method, while the other 27 different strains of non-O145 *E. coli* and 20 different strains of non-*Escherichia coli* had not shown any amplification curve, and the test sensitivity could reach 165 copies for each reaction mixture. A total of 339 samples had been detected by the real-time PCR method after enrichment in EC broth, and 31 samples showed positive results with the positive ratio of 9.1%. Therefore, the TaqMan probe real-time PCR method for detection of *E. coli* O145 in food was successfully established. Food samples were enriched with EC broth for 24 h and heat-lyse treatment was selected for the nucleic acid extraction, and the detection time was reduced from 3 d~7 d to only 2 h~3 h for post-enrichment samples, and the whole time for food detection only needed about 28h. The method provides a rapid detection of *E. coli* O145 in food for its specificity and easy operation verified in this study.

**Key words:** *Escherichia coli*; Serotype O145; TaqMan probe; Real-time polymerase chain reaction; food; detection

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 为人和温血动物肠道正常栖居菌, 绝大部分大肠埃希氏菌在正常栖居条件下不致病, 若侵入组织或血液时可引起化脓性炎症或败血症, 可引发体弱或免疫力低下人群或动物感染。

收稿日期: 2017-09-29

基金项目: 国家质检总局科研项目 (2010IK174、2013IK191)

作者简介: 游淑珠 (1977-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 冯家望 (1965-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品安全

染。有些大肠埃希氏菌为食源性致病菌, 能引起人类以腹泻症状为主的病症, 这些大肠埃希氏菌被统称为致泻性大肠埃希氏菌 (diarrheagenic *E. coli*, DEC)。致泻性大肠埃希氏菌可分为: 肠道致病性大肠埃希氏菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、肠道侵袭性大肠埃希氏菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、产肠毒素大肠埃希氏菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、肠道集聚性大肠埃希氏菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAaggEC)、扩散附着大肠埃希氏菌 (diffusely adherent

*E. coli*, DAEC) 和产志贺毒素大肠埃希氏菌为 (shigatoxin-producing *E. coli*, STEC) 六大类<sup>[1]</sup>。部分产志贺毒素大肠埃希氏菌属于肠道出血性大肠埃希氏菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) 可引起人类出血性结肠炎或出血性腹泻、溶血性尿毒综合症等临床症状。

致泻性大肠埃希氏菌与特定血清型有一定相关性,《伯杰氏系统细菌学手册》列出了已发现的 EPEC、ETEC、EIEC、EAggEC 和 STEC 五种致泻大肠埃希氏菌的所有相关血清型,其中大肠埃希氏菌 O145 血清型与 EPEC、STEC 相关<sup>[1,2]</sup>。从临床病人和温血动物中均有分离大肠埃希氏菌 O145 的致病性菌株的相关报道<sup>[3-7]</sup>,1984 年日本首次报道大肠埃希氏菌 O145 导致的食源性疾病暴发事件以来,美国、德国、比利时等许多国家都报道过大肠埃希氏菌 O145 引起的食源性疾病暴发事件<sup>[6-8]</sup>,其中 2010 年美国密歇根、俄亥俄和纽约等 5 个州暴发的因食用被污染长叶生菜的重大食源性疾病事件的病原体也被认定为大肠埃希氏菌 O145<sup>[7]</sup>。

大肠埃希氏菌的抗原成分复杂,可分为菌体抗原(O)、鞭毛抗原(H)和表面抗原(K),其中 O 抗原是血清分型的基础,共有一百七十多种<sup>[1]</sup>。由于分型用血清售价高、保质期短,加上大肠埃希氏菌污染较普遍等特点,导致传统分离、生化和血清分型鉴定方法存在检测时间长、鉴定过程工作量大、检测费用居高不下等无法避免的缺点,在实际应用中大大受限。O 抗原由 O 抗原基因簇编码,随着对 O 抗原基因簇编码基因研究的深入,以为 PCR 代表的现代分子生物学新技术以其无可取代的优势被广泛用于微生物检测领域,也同样被成功应用大肠埃希氏菌 O145 血清型的检测<sup>[8-11]</sup>。Taqman 探针荧光 PCR 法是利用 PCR 反应延伸过程中, Taq 酶的 5'核酸外切酶活性切割与靶序

列结合的寡核苷酸探针,使得 Taqman 探针的报告基团与淬灭基团分离而产生荧光强度变化的一种 PCR 技术,与 SYBR green 染料荧光 PCR 法以及传统的 PCR 扩增电泳检测相比, Taqman 探针的引入提升了反应的特异性,该技术实行完全闭管式操作,不仅避免了传统 PCR 开盖引起的产物污染问题,减少了假阳性现象的出现,还避免了对环境的污染<sup>[12]</sup>,扩增反应全程动态实时可见,是一种高特异性、高灵敏度、快速高通量的现代分子生物学检测技术,本世纪以来已被逐步推广应用于生物学研究、食品检测、环境监测、医学检测与诊断等行业。

本研究以大肠埃希氏菌 O145 为检测对象针对其 O 抗原基因簇的 *wckD* 基因建立了 Taqman 荧光 PCR 检测方法,验证了方法的灵敏度和特异性,并将其用于食品中大肠埃希氏菌 O145 的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

28 株大肠埃希氏菌细菌和 20 株非大肠埃希氏菌细菌,分别来源于美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),英国国家典型菌株保藏中心(National Collection of Type Cultures, NCTC),中国医学微生物菌种保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collection, CMCC),中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, 简称 CCTCC),中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),黑龙江出入境检验检疫局和珠海出入境检验检疫局。

表 1 实验用菌株

Table 1 Strains used in the experiment

菌株名称	菌株编号	O 血清型	菌株名称	菌株编号	O 血清型
大肠埃希氏菌	ATCC BAA-2216	O145	大肠埃希氏菌	STECO157-1	O157
大肠埃希氏菌	ATCC 12795	O26	大肠埃希氏菌	STECO157-2	O157
大肠埃希氏菌	ATCC BAA-2469	O45	大肠埃希氏菌	ETEC O8	O8
大肠埃希氏菌	ATCC 23982	O103	大肠埃希氏菌	ETEC O78	O78
大肠埃希氏菌	ATCC 43887	O111	空肠弯曲菌	ATCC 33291	/
大肠埃希氏菌	ATCC 29552	O111	阪崎肠杆菌	ATCC 51329	/
大肠埃希氏菌	ATCC 33780	O111	嗜酸乳杆菌	CGMCC 1.1878	/
大肠埃希氏菌	ATCC BAA-2190	O121	单核细胞增生李斯特氏菌	CCTCC AB 97021	/
大肠埃希氏菌	ATCC 35401	O78	金黄色葡萄球菌	CCTCC AB 91053	/

转下页

接上页

大肠埃希氏菌	ATCC 43893	O124	金黄色葡萄球菌	CMCC(B)26003	/
大肠埃希氏菌	ATCC 35150	O157	表皮葡萄球菌	CMCC(B)26069	/
大肠埃希氏菌	ATCC 700078	/	藤黄微球菌	CMCC(B)28001	/
大肠埃希氏菌	ATCC 10798	/	铜绿假单胞菌	CCTCC AB 91095	/
大肠埃希氏菌	ATCC 13706	/	肺炎克雷伯氏菌	CMCC 46101	/
大肠埃希氏菌	ATCC 15597	/	肠炎沙门氏菌	CCTCC AB 94018	/
大肠埃希氏菌	ATCC 11229	/	福氏志贺氏菌	CMCC 51571	/
大肠埃希氏菌	NCTC 12900	O157	宋内氏志贺氏菌	CMCC 51334	/
大肠埃希氏菌	CCTCC AB 200051	O157	副溶血性弧菌	ATCC 17802	/
大肠埃希氏菌	CCTCC AB 200068	/	乙型溶血性链球菌	CMCC(B) 32210	/
大肠埃希氏菌	CMCC(B)44102	/	枯草芽孢杆菌	CMCC(B)63501	/
大肠埃希氏菌	EC O4	O4	产气荚膜梭菌	ATCC 13124	/
大肠埃希氏菌	EC O104	O104	粪肠球菌	CMCC(B) 32220	/
大肠埃希氏菌	ECO157-1	O157	小肠结肠炎耶尔森氏菌	CMCC(B) 52204	/
大肠埃希氏菌	ECO157-2	O157	变形杆菌	CMCC(B) 49027	/

### 1.1.2 培养基、试剂与溶液

离子柱型DNA提取试剂盒：天根生化科技(北京)有限公司；DEPC水：生工生物工程(上海)股份有限公司；EC肉汤：北京陆桥技术股份有限公司；Premix Ex Taq (Probe qPCR) 试剂盒、DNA Marker：宝生物工程(大连)有限公司；DNA裂解液：珠海科登生物工程有限公司。

### 1.1.3 引物和探针

在 NCBI 网站上检索的不同菌株来源的大肠埃希氏菌 O145 的 O 抗原基因簇序列 (GenBank 序列号: AY863412、AY647260、JN850039~JN850044)，DNAMAN 软件比对，根据 *wckD* 基因高保守区的基因序列，通过 Oligo7.0 软件设计引物、Taqman 探针。上游引物：5'-CTGTGATTCAGA ACTAGAAG-3'；下游引物：5'-GCCACTACTACATTGTCA-3'；探针：5'-FAM-TCACGAATAACTACAGAACCAGAACCA-BHQ1-3'；上海英潍捷基公司合成。引物对和探针分别用 DEPC 水稀释至储备浓度 100 μmol/L，-20 °C 保存，临用时用 DEPC 水稀释至工作浓度 10 μmol/L。

### 1.1.4 食品样品

畜肉 196 份、水产品 46 份、禽产品 43 份、可生食蔬菜 54 份；部分购自珠海本地集贸市场、超市；部分为本单位受理的委托检验样品。

## 1.2 主要仪器设备

NanoDropND-1000 核酸浓度测定仪：美国赛默飞世尔公司；Minispin Plus 离心机：德国艾本德公司；7500Fast 荧光 PCR 仪：美国美国应用生物系统公司；AES easyMIX 拍击式均质器：法国生物梅里埃公司；

1565-2E 恒温培养箱，美国 SHELLAB 公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 细菌 DNA 模板的制备、浓度和纯度测定

各菌株指数生长期新鲜培养物，用 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备 DNA 模板。核酸浓度测定仪测定出 DNA 浓度与纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.6~1.9 之间表明 DNA 纯度较高，可用于 PCR 扩增。

### 1.3.2 荧光 PCR 反应体系和反应条件

反应体系：总体积 25 μL：Premix (2×) 12.5 μL、引物对 (10 μmol/L) 1 μL、探针 (10 μmol/L) 1 μL、50×ROX Reference Dye II(50×)0.5 μL、DEPC 水 8 μL、模板 2 μL。每个反应管均设置双平行管。空白对照以 DEPC 水代替模板。

反应条件：95 °C 预变性 2 min；95 °C 变性 15 s，60 °C 退火 1 min，收集荧光，40 个循环。

### 1.3.3 特异性试验

各菌株 DNA 模板均按 1.3.2 进行荧光 PCR 扩增，验证荧光 PCR 方法的特异性。

### 1.3.4 灵敏度试验

将大肠埃希氏菌 O145 的 DNA 进行 10 倍梯度稀释至 10<sup>-7</sup> 浓度，将 DNA 原液和核酸梯度稀释液相同条件进行荧光 PCR 扩增，确定荧光 PCR 方法的灵敏度。

### 1.3.5 食品样品的检测

#### 1.3.5.1 样品制备和均质

无菌称取样品 25 g 至有滤网的拍击式均质袋，加入 225 mL 无菌 EC 肉汤，拍击式均质器均质 2 min。

1.3.5.2 样品增菌

36 °C恒温培养箱培养 24 h。

1.3.5.3 样品核酸提取

拍击式均质袋中取 1 mL 增菌液的滤过液, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀加 50 μL DNA 裂解液, 100 °C 金属浴 5 min, 冷却, 12000 r/min 离心 5 min, 上清用于荧光 PCR 检测。

1.3.5.4 样品荧光 PCR 检测

同 1.3.2 中的条件进行荧光 PCR 检测。

2 结果与讨论

2.1 Taqman 探针荧光 PCR 检测方法的建立

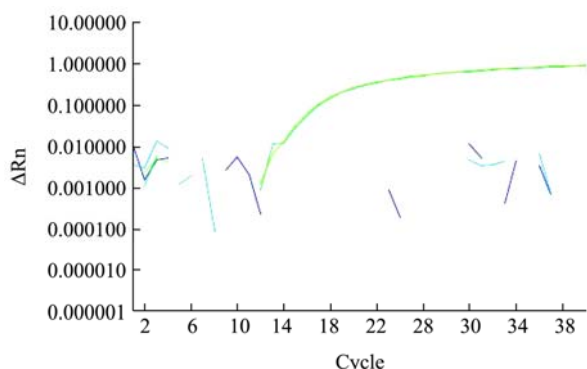


图 1 大肠埃希氏菌 O145 扩增曲线

Fig.1 Amplification plot of *Escherichia coli* O145

选择大肠埃希氏菌 O145 的 O 抗原基因簇中 *wckD* 基因为靶基因, 设计引物、探针, 通过反应体系和反应条件优化, 建立了大肠埃希氏菌 O145 的 Taqman 探针荧光 PCR 检测方法, 大肠埃希氏菌 O145 菌株呈现出典型的荧光 PCR 扩增曲线 (见图 1), 表明该反应体系适用于大肠埃希氏菌 O145 的扩增。

2.2 特异性试验

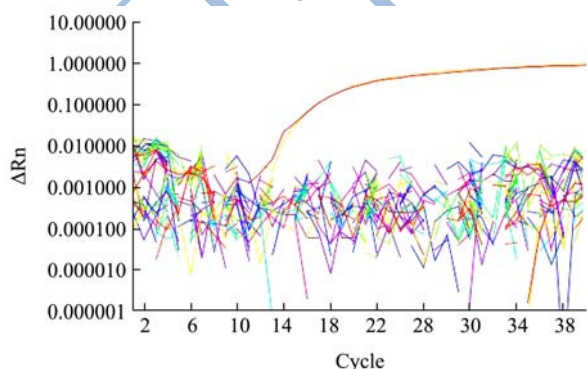


图 2 大肠埃希氏菌 O145 特异性试验扩增曲线

Fig.2 Amplification plot of specificity test of *Escherichia coli* O145

表 1 所列菌株用建立的 Taqman 探针荧光 PCR 法

进行扩增, 以验证方法的特异性, 验证结果表明, 仅大肠埃希氏菌 O145 菌株呈现出典型的荧光 PCR 扩增曲线 (见图 2), 其它 27 株大肠埃希氏菌和 20 株非大肠埃希氏菌菌株的 DNA 样本的检测结果均为阴性。据此可判断, 本研究中针对大肠埃希氏菌 O145 的引物和 Taqman 探针特异性良好。

2.3 灵敏度试验

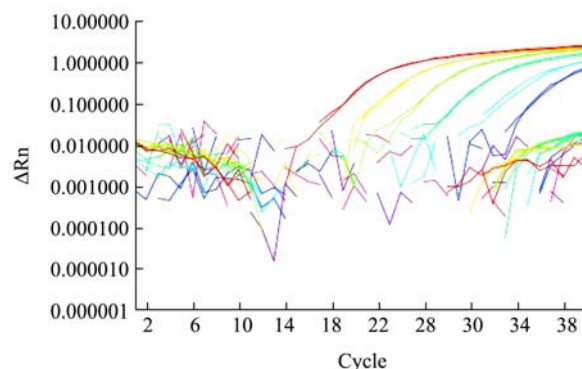


图 3 大肠埃希氏菌 O145 灵敏度试验扩增曲线

Fig.3 Amplification plot of sensitivity test of *Escherichia coli* O145

核酸浓度测定仪测定大肠埃希氏菌 O145 菌株的 DNA 浓度为 33 ng/μL, 菌株 DNA 原液和 10 倍递增稀释液扩增曲线见图 3, 每个反应模板加入量为 2 μL, 图中可见大肠埃希氏菌 O145 菌株的 DNA 原液 (66 ng/反应)、 $10^{-1}$  稀释液 (6.6 ng/反应)、 $10^{-2}$  稀释液 (660 pg/反应)、 $10^{-3}$  稀释液 (66 pg/反应)、 $10^{-4}$  稀释液 (6.6 pg/反应)、 $10^{-5}$  稀释液 (0.66 pg/反应) 均有明显扩增曲线出现, 且各稀释度平行试验重复性良好, 因此可计算、判断本方法检测灵敏度为 0.66 pg/反应, 大肠埃希氏菌基因组为 0.004 pg/拷贝, 灵敏度折算即 165 拷贝/反应。

2.4 食品样品污染调查

所检 339 份食品样品中检出大肠埃希氏菌 O145 阳性 31 份, 阳性率 9.1%, 各类型样品阳性率见表 2。由表 2 结合样品来源分析可知, 生畜肉均为购自市场和超市的生猪肉和生牛肉, 未经过食品深加工, 196 份样品检出样品大肠埃希氏菌 O145 阳性样品 27 份, 阳性率最高达 13.8%; 水产品、禽产品和可生食蔬菜多数为经过加工的产品, 特别是部分水产品 and 禽产品为深度加工的鲜、冻产品, 阳性率较低, 46 份水产品、禽产品 43 份各检出样品大肠埃希氏菌 O145 阳性 1 份, 阳性率分别为 2.2% 和 2.3%; 54 份可生食蔬菜检出大肠埃希氏菌 O145 阳性 2 份, 阳性率为 3.7%。检测结果表, 食品基质营养越丰富、未经过加工或只经过初加工的产品阳性率相对较高, 经深加工的产品阳性率

相对较低, 样品检出阳性率与食品基质类型及其加工程度存在一定相关性。

表2 食品样品污染调查结果统计分析

Table 2 Statistics analysis of food samples pollution survey

样品类型	样品数	阳性样品数	阳性率/%
生畜肉(猪肉和牛肉)	196	27	13.8
鲜、冻禽产品(鸡和鸭)	43	1	2.3
鲜、冻水产品(鱼和贝类)	46	1	2.2
可生食蔬菜	54	2	3.7
合计	339	31	9.1

### 3 结论

3.1 Taqman 探针荧光 PCR 技术具有快速、简便、灵敏等优点, 与 SYBR green 染料荧光 PCR 法以及传统的 PCR 扩增加电泳检测相比, Taqman 探针的引入提升了反应的特异性, 使其特异性更强、自动化程度更高, 扩增反应全程动态实时可见, PCR 扩增过程无需对 PCR 扩增产物进行后处理, 完全闭管式操作, 可有效解决 PCR 产物污染导致的假阳性等问题, 已成为检测领域重要的快速高通量检测手段。

3.2 本研究中设计的引物和 Taqman 探针可实现对大肠埃希氏菌 O145 菌株的特异性扩增, 其它 27 株非 O145 大肠埃希氏菌和 20 株非大肠埃希氏菌细菌菌株均无扩增, 说明引物和探针具有高度特异性。为确定该方法检测灵敏度, 对已知浓度的大肠埃希氏菌 O145 核酸进行 10 倍梯度稀释, 进行实时荧光 PCR 检测, 结果显示, 原始菌液稀释至  $10^{-5}$  时仍能检出, 表明本方法对检测灵敏度为 0.66 pg/反应(即 165 拷贝/反应)。

3.3 食品中食源性致病菌往往含量不高, 食品样品采用 EC 肉汤增菌培养物进行实时荧光 PCR 进行检测, 其原理是利用细菌在指数增长期遵循的数学指数模型以提高检测的灵敏度、准确度和可靠性, 便于简化 DNA 提取步骤、减少非活致病菌的干扰, 避免死的目标菌导致的假阳性产生, 样品增菌并用增菌液的滤过液进行实时荧光 PCR 检测可避免肉类等复杂基质可能导致的假阴性产生。食品样品 DNA 的提取采用的热裂解法操作简便、快速、经济节约, 便于大批量样品的检测。

3.4 本研究建立的 Taqman 探针荧光 PCR 方法全过程(包括样品增菌、核酸提取、荧光 PCR 扩增反应和结果分析)用于食品中大肠埃希氏菌 O145 的检测仅需约 28 h, 样品增菌后的核酸提取和检测所需时间仅 2 h~3 h, 与传统细菌分离鉴定方法增菌后分离、生化和血清鉴定至少需 3 d~7 d 相比显著缩短了检测时间。

综上所述, 方法的特异性、灵敏度和实际样品污

染调查试验表明, 本研究建立的荧光 PCR 快速检测方法特异性强、灵敏度高、快速、操作简便, 可用于食品中大肠埃希氏菌 O145 的快速检测。

### 参考文献

- [1] Don J Brenner, Noel R Krieg, James T Staley, et al. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria [M]. New York: Springer, 2005
- [2] GB 4789.6-2016, 食品安全国家标准食品微生物学检验致泻大肠埃希氏菌检验[S]  
GB 4789.6-2016, National Food safety Standard Microbiological Examination of Food-Examination of Diarrheogenic *Escherichia coli*. [S]
- [3] Kaftyreva L A, Makarova M A, Konovalova T A, et al. Characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 isolated from a patient with hemolytic-uremic syndrome [J]. Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii, 2013, 5: 100-104
- [4] Rumi M V, Irino K, Deza N, et al. First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145: NM from a domestic cat [J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2012, 6(4): 358-363
- [5] Sonntag A K, Prager R, Bielaszewska M, et al. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 954-962
- [6] De Schrijver K, G Buvens, B Posse, et al. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of icecream produced at a farm, Belgium [J]. Euro. Surveillance, 2008, 13(7): 61-64
- [7] Taylor E V, Nguyen T A, Machesky K D, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010 [J]. Journal of Protection, 2013, 76(6): 939-944
- [8] Fratamico P M, Deb Roy C, Miyamoto T, et al. PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the shiga toxin 1 and shiga toxin 2 genes [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2009, 6(5): 605-611
- [9] Cooper K K, Mandrell R E, Louie J W. Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7 [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 17
- [10] Perelle S, Dilasser F, Grout J, et al. Development of a

- 5'-nuclease PCR assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145 based on the identification of an 'O-island 29' homologue [J]. *Journal of Apply Microbiology*, 2003, 94(4): 587-594
- [11] Feng L, Senchenkova S N, Tao J, et al. Structural and genetic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145O antigen and development of an O145 serogroup-specific PCR assay [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(2): 758-764
- [12] 姜文灿,岳素文,江洪,等.TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展.[J]临床检验杂志,2015,4(1):797-805  
JIANG Wen-can, YUE Su-wen, JIANG Hong, et al. Application and research progress of TaqMan probe real time PCR [J]. *Clinical Laboratory Journal*, 2015, 4(1): 797-805

现代食品科技