

多种食源性致病菌检测的多重 PCR 方法的研究 *

万志刚¹ 汤慕瑾¹ 吕敬章¹ 罗志军² 洪小柳¹ 马淑棉¹

(1 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心 广东 深圳 518045 ;2 深圳湾出入境检验检疫局 广东 深圳 518054)

摘要 目的 利用多重 PCR 技术,建立可以同时检测多种食源性致病菌的多重 PCR 方法。方法 分别选择沙门氏菌 invA 基因,志贺氏菌的 ipaH 基因,单核细胞增生李斯特氏菌的 hlyA 基因,大肠杆菌 O157:H7 的 eaeA 基因,副溶血弧菌的 toxR 基因,设计多重 PCR 引物,建立多重 PCR 检测体系,并对该体系进行特异性和灵敏度实验。结果 通过对 19 株菌株进行实验,所有的目标菌株均为阳性,而其余菌株为阴性。对多重 PCR 体系的灵敏度进行考察,沙门氏菌的灵敏度为 5000 CFU/mL,志贺氏菌的灵敏度为 5500 CFU/mL,单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度为 5200 CFU/mL,O157:H7 的灵敏度为 5000CFU/mL,副溶血弧菌的灵敏度为 6300 CFU/mL。结论 建立的多重 PCR 体系能实现多种致病菌同时检测。

关键词 多重 PCR,食源性致病菌

中图分类号 R378 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)11-2177-05

Study of A Multiplex PCR Method for the Detection of Foodborne Pathogen*

WAN Zhi-gang¹, TANG Mu-jin¹, LV Jing-zhang¹, LUO Zhi-jun², HONG Xiao-liu¹, MA Shu-mian¹

(1 Food Inspection Center Of CIQ Shenzhen, Shenzhen 518045, China;

2 Shenzhen Bay Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518054, China)

ABSTRACT Objective: To develop a multiplex PCR method to detect five food borne pathogenic microorganisms simultaneously.

Methods: Primers specific for invA gene of Salmonella spp., ipaH gene of Shigella spp., hlyA gene of Listeria monocytogenes, eaeA gene of Escherichia coli O157:H7 and toxR gene of Vibrio parahaemolyticus were designed, and the specificity and sensitivity of the developed method was further verified. **Results:** A collection of 19 strains was examined, all target strains were detected. In contrast, none of the non-target strains yielded the specific amplification product. The sensitivity of the multiplex PCR system was 5000 CFU/mL for Salmonella cultures, 5500 CFU/mL for Shigella cultures, 5200 CFU/mL for Listeria monocytogenes cultures, 5000 CFU/mL for Escherichia coli O157:H7 cultures and 6300 CFU/mL for Vibrio parahaemolyticus cultures. **Conclusions:** The multiplex PCR method in present study can be applied in practice.

Key words: Multiplex PCR; Food borne pathogen

Chinese Library Classification(CLC): R378 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)11-2177-05

前言

食源性致病菌已经被公认是造成食品污染的重要原因之一,建立食源性致病菌的多重快速检测体系,及时准确地检测出多种致病菌,对食品安全保障具有重大意义。常规的微生物学检测方法需要经过增菌、选择性平板分离、生物化学试验和(或)血清学分型鉴定多个步骤,针对不同致病菌需采用不同的增菌及检测方法,检测周期一般为 5~7 天,工作量大,样品处理量有限,无法满足快速检测的需要。PCR 方法具有特异性强、灵敏度高、简便快速的特点,因而广泛应用于致病菌的检测,但常规 PCR 一次检测只能针对一种细菌,而食品中可能同时存在多种致病菌的污染。多重 PCR(multiplex PCR)方法能通过同一 PCR 反应体系同时扩增出多个核酸片段,与普通 PCR 相比,多重 PCR 具有高效和简便的特点,可快速经济地一次性检测多种食源性致病菌。本研究建立多重 PCR 体系,实现特异性检测

沙门氏菌、志贺氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7 及副溶血性弧菌等 5 种食品中常见致病菌。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 沙门氏菌 3 株(ATCC 13314、9150、35640),志贺氏菌 3 株(ATCC 9199、9207、9290),单核增生细胞氏菌 3 株(ATCC 7644,其他两株为本实验室分离),大肠杆菌 O157:H7 3 株(NCTC 12900,其他两株为本实验室分离),副溶血弧菌 2 株(ATCC 17802,另一株为本实验室分离),阪崎肠杆菌 1 株(ATCC 51329),大肠杆菌 1 株(ATCC 11775),创伤弧菌 1 株(ATCC 27562),蜡样芽孢杆菌 1 株(ATCC 10876)和霍乱弧菌 1 株(ATCC 14035)。

1.1.2 仪器与试剂 PTC-200 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),VLBI-PROFIL3000 凝胶成像系统(法国 VILBER LOURMAT

* 基金项目 深圳出入境检验检疫局科技项目(SZ2007004)

作者简介 万志刚(1978-)男,硕士,主要研究方向 微生物检测

Tel 0755-82703784 E-mail: zazabix2000@163.com

(收稿日期 2011-12-06 接受日期 2011-12-31)

公司) KB240 恒温培养箱(德国 Binder 公司)。培养基均购自北京陆桥技术有限公司,分子生物学试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模板制备 水煮法制备模板:取 1mL 菌液,12 000 rpm 离心 2 min,弃上清,加入 100 μ L 超纯水悬浮沉淀,100 $^{\circ}$ C 10 min,离心取上清作为模板。

1.2.2 引物设计和合成 选择 *invA*^[2,3,5-7] 基因作为沙门氏菌检测

的靶基因,选择 *ipaH*^[4,6-9] 基因作为志贺氏菌检测的靶基因,选择 *hlyA*^[1,10] 基因作为单核增生李氏特氏菌检测的靶基因;选择 *eaeA*^[2] 基因作为 O157:H7 检测的靶基因,选择 *toxR*^[5,11] 基因作为副溶血弧菌检测的靶基因。选择各个基因的保守区,设计合适用于多重 PCR 的引物。为了减少因引物对之间竞争而产生的抑制,在每条引物的 5' 端加上一段通用序列,由此,可以使用通用的序列对所有的 PCR 产物进行相同效率的扩增。引物序列见表 1,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 多重 PCR 引物序列
Table 1 Primer design for multiplex PCR

	Gene	Amplicon length (bp)	Sequence5'->3'
Vibrio parahaemolyticus	<i>toxR</i>	150	AGGTGACACTATAGAATAAGCACCT- GTGGCTTCTGCTG GTACGACTCACTATAGGGAGGAACTGA- GATTCCGCTGGGTTTGT AGGTGACACTATAGAATACGGC- TAAAGCGGATAACGCCGA GTACGACTCACTATAGGGATGCCCAA- GAGTTGCAGTTCC
Escherichia coli O157:H7	<i>eaeA</i>	159	AGGTGACACTATAGAATACGGC- TAAAGCGGATAACGCCGA GTACGACTCACTATAGGGATGCCCAA- GAGTTGCAGTTCC
Salmonella spp.	<i>invA</i>	169	AGGTGACACTATAGAATACGC- CACGTTCCGGCAATTCG GTACGACTCACTATAGGGAAATCGGC- CGCAACTTCCGC AGGTGACACTATAGAATACGGCAAC- CTCGGAGACTTACGC GTACGACTCACTATAGGGAACGTATC- CTCCAGAGTGATCGATGTT AGGTGACACTATAGAATAAGATTAGCT CAGAATGCCTTCGTAA GTACGACTCACTATAGGAGCCAT- GCAGCGACCTGTT
Listeria monocytogenes	<i>hlyA</i>	204	AGGTGACACTATAGAATA GTACGACTCACTATAGGGA
Shigella spp.	<i>ipaH</i>	336	AGGTGACACTATAGAATAAGATTAGCT CAGAATGCCTTCGTAA GTACGACTCACTATAGGAGCCAT- GCAGCGACCTGTT
Universal primer		/	AGGTGACACTATAGAATA GTACGACTCACTATAGGGA

1.2.3 多重 PCR 反应体系的建立 PCR 体系总体积为 25 μ L,含 异性引物(每条)400nM 通用引物 0.2 mM dNTP,100 μ g/mL 5 μ L DNA 模板 2.5 μ L10 $\times$ PCR 缓冲液 2 mM MgCl₂ 50nM 特 BSA,15mM (NH₄)₂SO₄ 2U HotStart Taq(Takara)。

表 2 PCR 程序
Table 2 PCR programme

Step	Temperature	Time	Cycles
1	95 $^{\circ}$ C	3min	1
2	95 $^{\circ}$ C	30s	10
	60 $^{\circ}$ C	40s	
	72 $^{\circ}$ C	30s	
3	95 $^{\circ}$ C	30s	25
	55 $^{\circ}$ C	30s	
	72 $^{\circ}$ C	30s	
4	72 $^{\circ}$ C	7min	1

PCR 扩增完成之后,用 15%PAGE 对产物进行分析。

1.2.4 特异性实验 将 19 株目标菌株和非目标菌株先经增菌,后经平板划线分离,挑取菌落于生理盐水,制备成 0.5 个麦氏单位(相当于 10^8 CFU/mL)的菌悬液,生理盐水十倍稀释至 10^4 CFU/mL 梯度。取 100 μ L 菌液各涂布两个琼脂平板,37℃培养 48h 后进行平板计数。同步取原 10^8 CFU/mL 菌悬液 1 mL 通过水煮法制备模板,模板用超纯水稀释至 10^{-4} 数量级后,用建立的多重 PCR 方法检测目标菌株,不同的非目标菌株,考察其特异性。

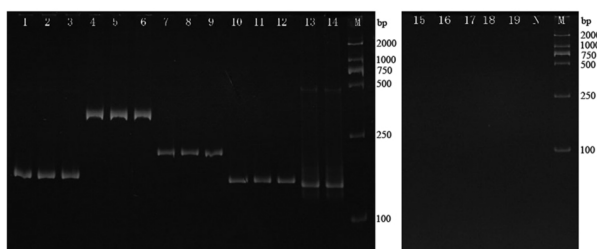
1.2.5 灵敏度实验 对于不同的目标菌株,分别选择 1 株菌株作为菌液灵敏度分析的代表。先经增菌,后经平板划线分离,挑取菌落于生理盐水,制备成 0.5 个麦氏单位(相当于 10^8 CFU/mL)的菌悬液,生理盐水十倍稀释至 10^3 CFU/mL 梯度。分别取 10^3 CFU/mL 和 10^4 CFU/mL 梯度的 100 μ L 菌液各涂布两个琼脂平板,37℃培养 48h 后进行平板计数。同步取原 10^8 CFU/mL 菌悬液 1 mL 通过水煮法制备模板,模板用超纯水进行十倍梯度稀释,用 PCR 方法进行检测。

对于混合样品,取 5 种目标菌株等比例混合,每种目标菌株均为 0.5 个麦氏单位(相当于 10^8 CFU/mL)的菌悬液,生理盐水十倍稀释至 10^3 CFU/mL 梯度。分别取 10^3 CFU/mL 和 10^4 CFU/mL 梯度的 100 μ L 菌液各涂布两个琼脂平板,37℃培养 48h 后进行平板计数。同步取原 10^8 CFU/mL 菌悬液 1 mL 通过水煮法制备模板,模板用超纯水进行十倍梯度稀释,用 PCR 方法进行检测。

2 结果

2.1 多重 PCR 体系特异性考察

为了考察多重 PCR 体系的特异性。我们用 19 株目标菌株和非目标菌株对所建立的多重 PCR 体系进行特异性实验,由 19 株菌株 PCR 产物电泳分析的结果,多重 PCR 体系的特异性良好。对于目标菌株,只有目的片段得到扩增;对于非目标菌株,均为阴性结果(图 1)。



1-3, *Salmonella* spp.; 4-6, *Shigella* spp.; 7-9, *Listeria monocytogenes*; 10-12, *Escherichia coli* O157:H7; 13-14, *Vibrio parahaemolyticus*; 15, *Enterobacter sakazaii*; 16, *Escherichia coli*; 17, *Vibrio vulnificus*; 18, *Bacillus cereus*; 19, *Vibrio cholerae*; N, negative control; M, DL2000 DNA Marker

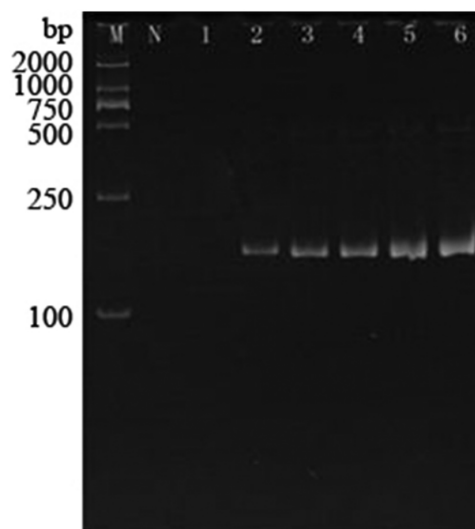
图 1 多重 PCR 特异性实验结果

Fig.1 Specificity of Multiplex PCR

2.2 多重 PCR 体系灵敏度考察

2.2.1 沙门氏菌的灵敏度考察 按 1.2.5 步骤对多重 PCR 体系的沙门氏菌检测进行灵敏度考察,沙门氏菌在 5×10^3 CFU/mL

时可以得到阳性结果,而在 5×10^2 CFU/mL 时,结果为阴性。以上结果表明,在多重 PCR 体系中,沙门氏菌的灵敏度为 5×10^3 CFU/mL(图 2)。

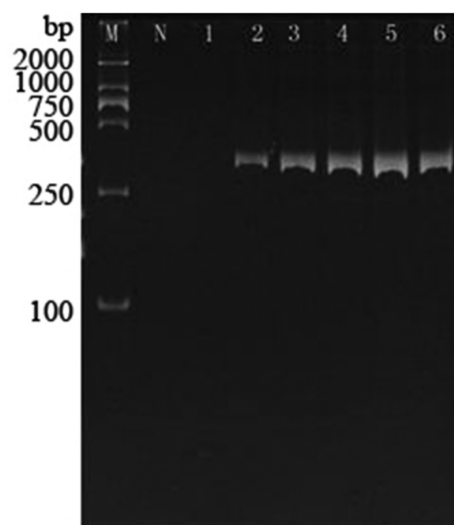


1, 5×10^3 CFU/mL; 2, 5×10^3 CFU/mL; 3, 5×10^4 CFU/mL; 4, 5×10^5 CFU/mL; 5, 5×10^6 CFU/mL; 6, 5×10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图 2 沙门氏菌灵敏度考察电泳图

Fig.2 Sensitivity result of *Salmonella* spp.

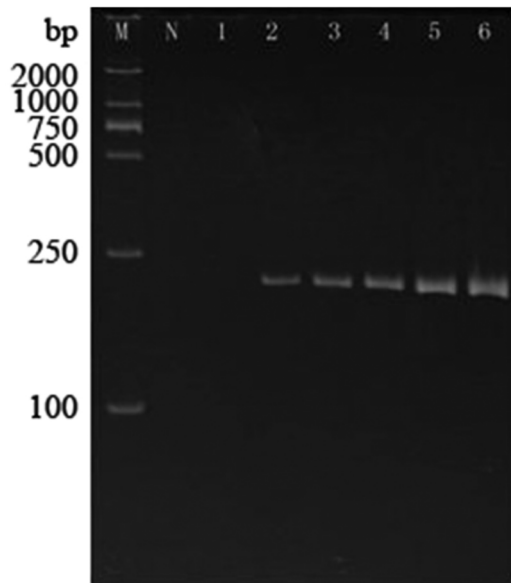
2.2.2 志贺氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、副溶血弧菌灵敏度考察 按 1.2.5 步骤分别对多重 PCR 体系的志贺氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、副溶血弧菌检测进行灵敏度考察,实验结果表明,在多重 PCR 体系中,志贺氏菌的灵敏度为 5.5×10^3 CFU/mL(图 3),单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度为 5.2×10^3 CFU/mL(图 4),大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度为 5×10^3 CFU/mL(图 5),副溶血弧菌的灵敏度为 6.3×10^3 CFU/mL(图 6)。



1, 5.5×10^2 CFU/mL; 2, 5.5×10^3 CFU/mL; 3, 5.5×10^4 CFU/mL; 4, 5.5×10^5 CFU/mL; 5, 5.5×10^6 CFU/mL; 6, 5.5×10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图 3 志贺氏菌灵敏度考察电泳图

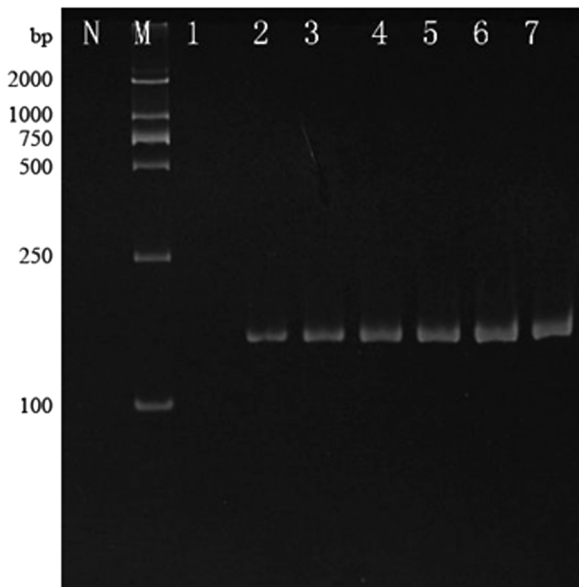
Fig.3 Sensitivity result of *Shigella* spp.



1, 5.2×10^2 CFU/mL; 2, 5.2×10^3 CFU/mL; 3, 5.2×10^4 CFU/mL; 4, 5.2×10^5 CFU/mL; 5, 5.2×10^6 CFU/mL; 6, 5.2×10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图4 单核细胞增生李斯特氏菌灵敏度考察电泳图

Fig.4 Sensitivity result of *Listeria monocytogenes*



1, 5×10^2 CFU/mL; 2, 5×10^3 CFU/mL; 3, 5×10^4 CFU/mL; 4, 5×10^5 CFU/mL; 5, 5×10^6 CFU/mL; 6, 5×10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图5 大肠杆菌 O157:H7 灵敏度考察电泳图

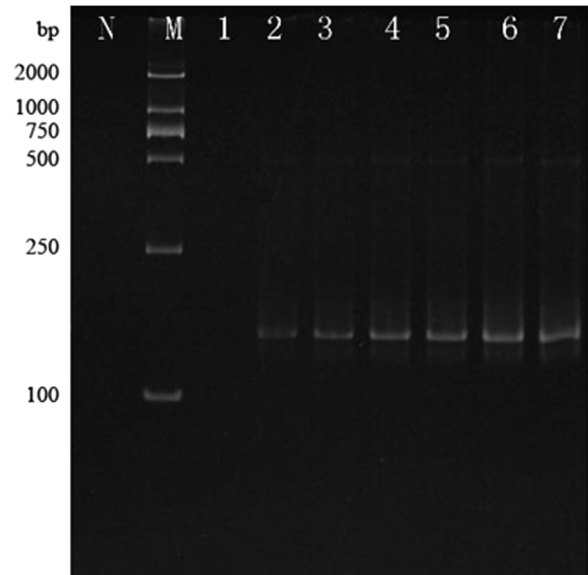
Fig.5 Sensitivity result of *Escherichia coli* O157:H7

2.2.4 PCR 体系对混合样品的灵敏度考察 按 1.2.5 步骤对混合样品多重 PCR 体系进行灵敏度考察,实验结果表明,对于等比例混合的样品,多重体系的灵敏度为 10^4 CFU/mL。

3 讨论

多重 PCR 检测方法的特异性主要取决于相应检测靶点的选择和特异性引物的设计,而其灵敏度主要取决于通用引物的

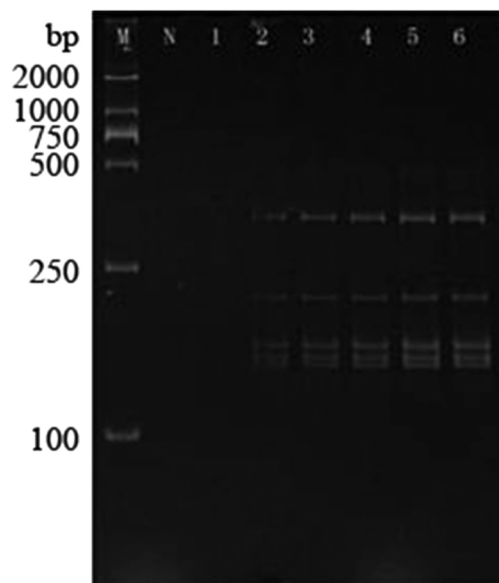
设计和 PCR 体系的优化。常见的食源性致病菌的特异性靶点一般是核糖体基因(rDNA/rRNA)或编码特殊功能的基因,以毒理基因为主。沙门氏菌的靶基因主要有 *ttrA*^[1]、*invA*^[2,3,5-7]、*oriC*^[3]、*fimY*^[5,6]、*sirA*^[20]等;志贺氏菌的靶基因主要有 *ipaH*^[4,6-9]和 *virF*^[10]等;单核细胞增生李斯特氏菌的靶基因主要有 *hlyA*^[1,12]和 *prfA*^[2]等;大肠杆菌 O157:H7 的靶基因主要有 *rfbE*^[1]、*εacA*^[2]和 *uidA*^[3]等;副溶血弧菌的靶基因主要有 *tlh*^[13, 16]、*gyrB*^[14-15, 17]、*toxR*^[7,18]和



1, 6.3×10^2 CFU/mL; 2, 6.3×10^3 CFU/mL; 3, 6.3×10^4 CFU/mL; 4, 6.3×10^5 CFU/mL; 5, 6.3×10^6 CFU/mL; 6, 6.3×10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图6 副溶血性弧菌灵敏度考察电泳图

Fig.6 Sensitivity result of *Vibrio parahaemolyticus*



1, 10^3 CFU/mL; 2, 10^4 CFU/mL; 3, 10^5 CFU/mL; 4, 10^6 CFU/mL; 5, 10^7 CFU/mL; N, Negative control; M, DL2000 DNA Marker

图7 混合样品灵敏度考察电泳图

Fig.7 Sensitivity result of mixed samples

pR72H^[19]。本研究参考以上文献报道,利用 GenBank 公用数据

库进行相应致病菌相关序列和引物的 BLAST 对比和初步筛选 并对其相关生物学评价。根据生物学评价中的特异性和灵敏度结果,最终选择 *invA* 基因作为沙门氏菌检测的靶基因,选择 *ipaH* 基因作为志贺氏菌检测的靶基因,选择 *hlyA* 基因作为单核增生李氏特氏菌检测的靶基因;选择 *eaeA* 基因作为 O157:H7 检测的靶基因,选择 *toxR* 基因作为副溶血弧菌检测的靶基因。针对已选定的不同致病菌的靶基因,设计可以进行多重 PCR 的特异性引物,同时在体系中加入了一对通用的扩增引物,使多重 PCR 体系能对所有的 PCR 产物进行相同效率的扩增,从而以有效的避免因引物的竞争性抑制而导致的假阴性。在多重 PCR 体系优化方面,主要针对体系中退火温度 T_m 值和 Mg^{2+} 浓度进行优化,最终实现了 5 种常用食源性致病菌的一次性同时检测,且其特异性和灵敏度都满足实际检测工作的要求。

本研究建立的多重 PCR 体系,可以在同一 PCR 反应管内同时检测出 5 种常见的食源性致病菌,将大大节省检测时间,同时减少试剂耗材的消耗,具有高效和经济简便的优点。该方法不需配置荧光定量 PCR 仪等昂贵的仪器设备,只需普通 PCR 仪和电泳仪,特别适合基层实验室使用,为食品安全检测以及临床标本的检测提供技术手段,在致病菌的检测中具有广阔的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Omiccioli Enrica, Amagliani Giulia, Brandi Giorgio, et al. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(6): 615-622
- [2] Andrea Germini, Annalisa Masola, Paola Carnevali, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR[J]. *Food Control*, 2009, 20(8): 733-738
- [3] Patricia Elizaquivel, Rosa Aznar. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(5): 705-713
- [4] Ingeborg Hein, Flekna G, Krassnig M, et al. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(3): 538-547
- [5] 李光伟,邱杨,肖性龙,等.沙门氏菌荧光实时定量 PCR 检测试剂的研制及应用[J]. *微生物学通报* 2007,34(3):496-499
Li Guang-wei, Qiu Yang, Xiao Xing-long, et al. Research and Application on Detection of *Salmonella* spp. by FQ-PCR[J]. *Microbiology*, 2007, 34(3): 496-499 (In Chinese)
- [6] 王晨,吴晖,肖性龙,等.沙门菌和志贺菌二联实时荧光定量 PCR 的临床检测应用研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(7): 1397-1399
Wang Chen, Wu Hui, Xiao Xing-long, et al. Study on application of two-link real-time quantitative PCR for clinical detection of *Salmonella* and *Shigella* [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(7): 1397-1399 (In Chinese)
- [7] 许如苏,林彩华,陈其生,等.沙门菌和副溶血性弧菌双重荧光 PCR 快速检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2008, 38 (06): 465-469
Xu Ru-su, Lin Cai-hua, Chen Qi-sheng, et al. Development of a dual real-time PCR assay for rapid simultaneous detection of *Salmonella* spp. And *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38 (06): 465-469 (In Chinese)
- [8] 石晓路,唐庆华,张佳峰,等.多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12):1053-1056
Shi Xiao-lu, Hu Qing-hua, Zhang Jia-feng, et al. Rapid simultaneous detection of *Salmonella* using modified molecular beacons and real-time PCR[J]. *Chin J Epidemiol*, 2006, 27(12):1053-1056 (In Chinese)
- [9] 于新芬,潘劲草,孟冬梅,等.多重实时 PCR 检测沙门菌志贺菌和致泻性大肠埃希菌[J]. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(6):461-465
Yu Xin-fen, Pan Jin-cai, Meng Dong-mei, et al. Multiplex real-time PCR detecting *Salmonella*, *Shigella* and diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. *Chin J Prev Med*, 2007, 41(6):461-465 (In Chinese)
- [10] Gomez-Duarte OG, Bai J, Newell E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 63(1): 1-9
- [11] Vu Dinh Thiem, Orntipa Sethabutr, Lorenz von Seidlein, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2004, 42(5):2031-2035
- [12] Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) [J]. *The Journal of Microbiology*, 2006, 44(1):92-97
- [13] Linda NW, Asim KB. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 2031-2042
- [14] 翁文川,焦红,王方金,等.食品中副溶血弧菌荧光定量 PCR 方法快速检测[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(11): 1359-1361
Weng Wen-chuan, Jiao Hong, Wang Fang-jin, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food by fluorescence quantitative PCR [J]. *China Public Health*, 2005, 21(11): 1359-1361 (In Chinese)
- [15] Cai T, Jiang L, Yang C, et al. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, 46(2): 180-186
- [16] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 36(3): 215-225
- [17] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 681-687
- [18] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 1173-1177
- [19] Lee CY, Pan SF, Chen CH, et al. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1311-1317
- [20] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(1):32