

多重 PCR 检测四种食源性病原弧菌

魏霜¹, 冼钰茵¹, 赵晖², 吴希阳^{1,3}

(¹暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广州 510632; ²湖北省出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 武汉 430022; ³广东省食品安全卫生应急技术研究中心, 广州 510632)

摘要:【目的】建立在扩增内标存在下同时快速检测溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 4 种食源性致病菌的五重 PCR 方法。【方法】以细菌 16S rRNA 基因为扩增内标靶序列, 针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因、副溶血弧菌 *collagenase* 基因、创伤弧菌 *vvhA* 基因、霍乱弧菌 *ompW* 基因, 分别设计特异性引物, 建立多重 PCR 体系, 对其灵敏度和特异性进行评价, 并将建立的五重 PCR 应用于弧菌的筛选。【结果】建立的多重 PCR 检测体系对混合模板中副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌的灵敏度达 10 CFU/mL, 霍乱弧菌的灵敏度达 10⁵ CFU/mL, 经特异性评价证实其特异性好, 并能有效指示 PCR 反应的假阴性, 将建立的多重 PCR 应用于 69 株疑似弧菌菌株的鉴定, 其结果与生理生化鉴定结果一致。【结论】该方法能够快速、灵敏、准确地检测溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌 4 种食源性致病菌, 灵敏度高, 并能有效指示 PCR 反应的假阴性, 适用于食品中常见致病性弧菌的快速筛选。

关键词: 弧菌; 检测; 多重 PCR

Simultaneous Detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* Using Multiplex PCR

WEI Shuang¹, XIAN Yu-yin¹, ZHAO Hui², WU Xi-yang^{1,3}

(¹Department of Food Science and Engineering, Ji 'nan University, Guangzhou 510632; ²Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Inspection and Quarantine Technology Center, Wuhan 430022; ³Food Safety and Health Emergency Technical Research Center of Guangdong Province, Guangzhou 510632)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to develop a multiplex PCR assay that can simultaneously detect *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in the presence of an internal amplification control (IAC). 【Method】Species-specific PCR primers were designed based on *gyrB* gene for *Vibrio alginolyticus*, *collagenase* gene for *Vibrio parahaemolyticus*, *vvhA* gene for *Vibrio vulnificus* and *ompW* gene for *Vibrio cholerae*, 16S rRNA gene of bacteria as IAC primers was used to indicate false-negative results. Multiple PCR method was developed after optimization reaction condition. 【Result】The multiple PCR method was proved to be rapid, high-throughput, sensitive and specific and the existence of IAC could successfully eliminate false-negative results. The multiplex PCR was validated with 69 suspicious *Vibrio* strains and the results were consistent with the physiological and biochemical experiments. 【Conclusion】The multiple PCR method is specific, stable and reliable for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae*.

Key words: *Vibrio*; detection; multiple PCR

0 引言

【研究意义】弧菌属为革兰氏阴性嗜盐菌, 广泛

存在于海水中, 是引起水产养殖鱼、虾、贝等疾病的重要病原菌^[1-2], 其中, 溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌又是重要的食源性病原菌^[3-4], 副溶血

收稿日期: 2012-10-26; 接受日期: 2013-01-16

基金项目: 公益性行业科研专项项目 (201110039)

联系方式: 魏霜, E-mail: weishuang2008@hotmail.com. 通信作者吴希阳, E-mail: tkentwu@jnu.edu.cn

弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌对人类的致病性引起了广泛的重视,而溶藻弧菌早在 1979 年就有报道称其对人类有致病性^[5],但目前针对它的研究主要集中在对水产养殖动物的危害上,导致在临床或食品风险评估等检测中容易忽略溶藻弧菌。因此,建立同时检测这 4 种食源性致病弧菌的检测方法有重要意义。【前人研究进展】传统的培养法和生理生化鉴定用于检测弧菌的方法周期长,且步骤繁琐,不能满足高通量、快速的检测要求。近年来国内外用于弧菌快速检测的主要方法是 PCR、多重 PCR、real-time PCR 等,其中多重 PCR 因其通量高、快速、便捷而得到重视,目前已经在许多食源性病原菌微生物的检测中得到应用^[6-9]。Neogi 等^[10]针对副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌建立了三重 PCR,灵敏度高达 10 CFU/mL。Halдар等^[11]针对副溶血弧菌、坎氏弧菌和哈维弧菌的溶血素基因建立了三重 PCR,灵敏度高达 10 CFU/mL。然而在实际检测过程中,许多 PCR 抑制因子会导致 PCR 结果假阴性的出现^[12],影响了结果的准确性,添加扩增内标(Internal Amplification Control, IAC)被视为指示 PCR 反应假阴性出现的重要手段^[13]。Nordstrom 等^[14]针对副溶血弧菌的 3 类溶血素基因,设计了添加扩增内标的多重荧光定量 PCR,很好地控制了 PCR 反应的假阴性问题,提高了检测的准确性。【本研究切入点】针对常见的食源性病原弧菌溶藻弧菌 *gyrB* 基因、副溶血弧菌 *collagenase* 基因、创伤弧菌 *vvhA* 基因和霍乱弧菌 *ompW* 基因,以及细菌 16S rRNA 基因保守区设计引物,建立多重 PCR 体系,既能够实现高通量检测,又能够指示 PCR 反应假阴性的出现,真

正达到高通量、准确、快速的检测要求。【拟解决的关键问题】本研究拟建立同时检测溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌的多重 PCR,并引入 IAC 以指示假阴性的出现,有效地应用于食品常见致病弧菌的筛选。

1 材料与方法

试验于 2012 年 3—8 月在暨南大学理工学院食品科学与工程系食品安全实验室完成。

1.1 材料

河流弧菌、最小弧菌由湖北省出入境检验检疫局馈赠。溶藻弧菌(ATCC17749)、副溶血弧菌(ATCC17802)、创伤弧菌(ATCC27562)、霍乱弧菌(ATCC14035)、单增李斯特菌(ATCC19111)、大肠杆菌(ATCC8739)、金黄色葡萄球菌(ATCC43300)、伤寒沙门氏菌(ATCC14028)、枯草芽孢杆菌(ATCC6633)

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中溶藻弧菌 *gyrB* 基因(GenBank ID: AF007288)、副溶血弧菌 *collagenase* 基因(GenBank ID: AF326572.1)、创伤弧菌 *vvhA* 基因(GenBank ID: AF376027.1)和霍乱弧菌 *ompW* 基因(GenBank ID: X51948.1)以及细菌 16S rRNA 基因的序列,在参考了大量文献已报道的特异性引物基础上,利用 Primer Premier V5.0 和 Oligo V6.22 软件进行引物的评价和筛选,筛选出引物之间相互干扰最小的引物组合,并对筛选出的引物做出适当的调整和修改,引物由上海生工生物技术有限公司合成(表)。

表 目的基因及引物序列

Table Target gene and primers sequence

目的基因 Target gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小 (bp) Products size (bp)	参考文献 Reference
ompW	上游(Forward): CACCAAGAAGGTGACTTTATGTG	427	[15]
	下游(Reverse): CGTTAGCAGCAAGTCCCAT		
gyrB	上游(Forward): GAGAACCCGACAGAAGCGAAG	337	[16]
	下游(Reverse): CCTAGTGCGGTGATCAGTGTG		
collagenase	上游(Forward): GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA	271	[17]
	下游(Reverse): GGTCAGAATCAAACGCCG		
vvhA	上游(Forward): TTCCAACCTCAAACCGAACTATGA	205	[18]
	下游(Reverse): ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG		
16S rRNA	上游(Forward): CCTGGTAGTCCACGCCGTAA	168	
	下游(Reverse): CGAATTAAACCACATGCTCCA		

1.3 细菌培养及基因组 DNA 的提取

将弧菌挑取单菌落接种于 3%NaCl 的 TSB 培养基中, 将非弧菌挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基中, 37℃ 下过夜培养后离心取菌体, 采用试剂盒法 (TIANamp Bacteria DNA kit, TIANGEN) 提取细菌基因组 DNA, 并用生物分光光度计 (ND-1000, NanoDrop) 测定 DNA 的浓度和纯度。

1.4 多重 PCR 体系的建立

根据多重 PCR 反应试剂盒 (Multiplex PCR Assay Kit, TaKaRa) 说明书, 反应体系为 50 μ L, 包括 Mix2 溶液 25 μ L、Mix1 溶液 0.25 μ L、各基因引物混合物 (引物终浓度 *ompW*、*gyrB*、*collagenase*、*vvhA*、16S rRNA 基因分别为 0.4 μ mol·L⁻¹、0.4 μ mol·L⁻¹、0.2 μ mol·L⁻¹、0.1 μ mol·L⁻¹、0.2 μ mol·L⁻¹) 和 DNA 模板。反应条件为 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 59℃ 90 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min (Mastercycler ep, Eppendorf)。

1.5 多重 PCR 体系的特异性评价

利用溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌的标准菌株进行特异性检测, 并选择几株非目标菌株的标准菌株进行 PCR 特异性验证。

1.6 多重 PCR 体系的灵敏度评价

取通过菌落计数后约 10⁸ CFU/mL 的菌液 1 mL, 使用试剂盒提取 DNA, 进行 10 倍梯度稀释后作为模板, 进行灵敏度的评价。

1.7 多重 PCR 体系的应用

采集湖泊水样、水产养殖水样和贝壳类水产品共计 21 个样本 (3 个湖泊水样, 9 个水产养殖水样和 9 个贝壳类水产品样本), 碱性蛋白胨水增菌 8 h 后利用 TCBS 培养基划线分离弧菌, 然后利用建立的多重 PCR 来鉴定分离到的疑似弧菌菌落。

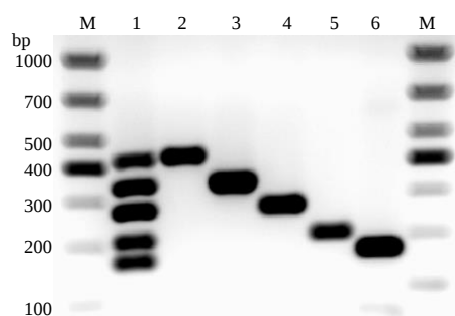
2 结果

2.1 多重 PCR 体系的建立

调整了多重 PCR 体系中各个引物浓度比、Mg²⁺ 浓度、退火温度。当引物终浓度配比为 4:4:2:1:2 时, Mg²⁺ 浓度为 3 mmol L⁻¹、退火温度为 59℃ 时, 4 个基因的条带亮度较一致, 多重 PCR 检测结果与单一 PCR 检测结果一致 (图 1)。

2.2 多重 PCR 体系的特异性评价

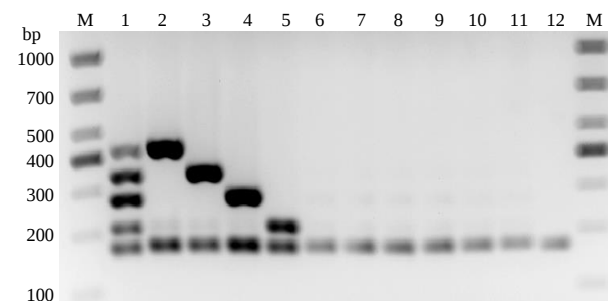
利用 4 种目标菌和 7 种非目标菌对五重 PCR 体系的特异性进行评价。结果显示, 4 种目标菌均出现了特异性条带, 而其它非目标菌均未出现特异性条带, 且所有菌均出现了 16S rRNA 内标片段 (图 2), 在检



M: DL1000; 1: 霍乱弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌; 2: 霍乱弧菌; 3: 溶藻弧菌; 4: 副溶血弧菌; 5: 创伤弧菌; 6: 扩增内标
M: DL1000 ; 1: *Vibrio cholera*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*; 2: *Vibrio cholera*; 3: *Vibrio alginolyticus*; 4: *Vibrio parahaemolyticus*; 5: *Vibrio vulnificus*; 6: IAC

图 1 多重 PCR 和单一 PCR 结果

Fig. 1 Results of the multiplex PCR and single PCR



M: DL1000; 1: 霍乱弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌; 2: 霍乱弧菌; 3: 溶藻弧菌; 4: 副溶血弧菌; 5: 创伤弧菌; 6: 河流弧菌; 7: 最小弧菌; 8: 大肠杆菌; 9: 单增李斯特菌; 10: 金黄色葡萄球菌; 11: 伤寒沙门氏菌; 12: 枯草芽孢杆菌
M: DL1000 ; 1: *Vibrio cholera*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*; 2: *Vibrio cholera*; 3: *Vibrio alginolyticus*; 4: *Vibrio parahaemolyticus*; 5: *Vibrio vulnificus*; 6: *Vibrio fluvialis*; 7: *Vibrio mimicus*; 8: *Escherichia coli*; 9: *Listeria monocytogenes*; 10: *Staphylococcus aureus*; 11: *Salmonella typhimurium*; 12: *Bacillus subtilis*

图 2 多重 PCR 特异性的评价

Fig. 2 Specificity test of the multiplex PCR

测的同时很好地指示了假阴性的出现。采用该方法对湖北省出入境检验检疫局提供的 35 株已知弧菌菌种 (经 API 生理生化鉴定) 进行检测, 符合率 100%。

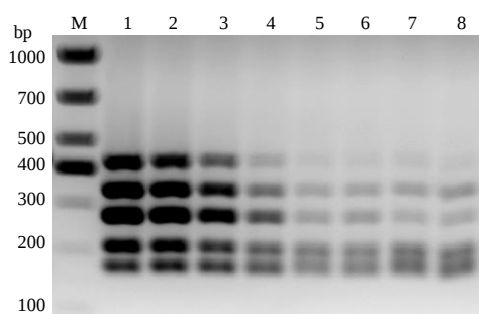
2.3 多重 PCR 体系的灵敏度评价

将约 10⁸ CFU/mL 菌液的 DNA 进行 10 倍梯度稀释后作为模板进行多重 PCR 灵敏度的评价, 从图 3 可以看出, 在 10⁸—10⁵ CFU/mL 之间均可扩增出明显 5 条带, *gyrB*、*collagenase*、*vvhA* 基因的灵敏度高达 10 CFU/mL, 且扩增内标能较好地指示 PCR 反应的假阴

性,在实际试验中发现,利用多重 PCR 进行单一菌种的检测时灵敏度更高,而且如果继续将循环数提高,灵敏度还可以得到提高。

2.4 多重 PCR 体系的应用

利用 TCBS 培养基共分离到 69 个疑似弧菌菌落,其中 42 个黄色菌落,27 个绿色菌落,并利用 API 生理生化进行鉴定,确定其中 22 个黄色菌落为溶藻弧菌,24 个绿色菌落是副溶血弧菌,1 个黄色菌落为创伤弧菌,没有分离到霍乱弧菌弧菌。然后利用建立好的五重 PCR 鉴定,PCR 鉴定结果与前期的 API 生理生化试验结果一致。



M: DL1000; 1—8: 4 种菌液浓度依次为 10^8 — 10^1 CFU/mL
M: DL1000; 1-8: Four kinds of bacteria of concentration gradient is 10^8 — 10^1 CFU/mL

图 3 多重 PCR 灵敏度的评价

Fig. 3 Sensitivity test of the multiplex PCR

3 讨论

本研究建立了溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌 4 种常见食源性病原弧菌并引入 IAC 以指示反应假阴性的多重 PCR 检测体系,该检测体系相对于 Neogi 等^[10]和 Izumiya 等^[19]建立的方法来说,增加了溶藻弧菌这一日渐关注的食源性病原弧菌,并引入了 IAC 指示反应假阴性的出现,增加了检测的准确性,且灵敏度相当。

在以 PCR 法为基础的病原菌检测中,靶基因的选择对 PCR 的特异性非常重要,以副溶血弧菌为例,目前针对副溶血弧菌检测的靶基因包括 *toxR*^[20]、*gyrB*^[21]、*pR72H*^[22]、*atpA*^[19]、*collagenase*^[17]、*tdh*^[23] 等,这些靶基因主要分为两类:一类是看家基因,一类是毒力基因,在实际选择过程中最好是以一些相对保守的看家基因作为靶序列,而且要求这些看家基因序列在种之间的同源性较低以避免漏检。如溶藻弧菌

和副溶血弧菌,16S rRNA 基因的同源性为 99.7%,*gyrB* 基因的同源性为 86.8%^[24],*collagenase* 基因的同源性为 77%^[17],因此本研究针对溶藻弧菌选择了 *gyrB* 基因、针对副溶血弧菌选择了 *collagenase* 基因作为靶基因,提高了检测的可信度。

引物的设计在多重 PCR 中至关重要,本研究在参考大量文献引物的基础上,利用 Primer Premier V5.0 的 Multiplex/Nested primer 功能,筛选出适用于构建多重 PCR 的引物组合,并利用 Oligo V6.22 评价引物并对引物进行微调,所有引物 *Tm* 值基本一致以保证在同一退火温度下的扩增效率一致,提高多重 PCR 引物设计的成功率。

虽然 PCR 技术不断得到改进、发展,但由于存在种种因素如 PCR 仪故障、DNA 聚合酶失活、PCR 抑制因子的存在等,PCR 反应假阴性问题一直影响检测结果的准确性。添加扩增内标被视为指示 PCR 反应假阴性的重要手段,本研究以细菌 16S rRNA 基因保守区设计引物作为扩增内标,引入多重 PCR 体系中,实现了高通量检测的同时指示假阴性的出现。吕淑霞等^[25]建立以细菌 16S rRNA 基因为扩增内标情况下同时检测副溶血弧菌的 *tlh* 基因和 *trh* 基因,在检测这些毒力基因的同时具有指示 PCR 反应假阴性的能力。

4 结论

建立了在扩增内标存在下同时快速检测溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌 4 种食源性致病菌的五重 PCR 方法,实现了高通量检测的同时指示 PCR 反应假阴性的出现,提高了检测准确度,对混合模板中副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌的灵敏度达 10 CFU/mL,霍乱弧菌的灵敏度达 10^5 CFU/mL,适用于食品中常见致病性弧菌的快速筛检。

References

- [1] Toranzo A E, Magarinos B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 2005, 246(1-4): 37-61.
- [2] Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Pianetti A, Campana R, Bruscolini F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. Isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001, 18(5): 479-488.
- [3] Zhang X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1011-1019.
- [4] Su Y C, Liu C C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood

- safety. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 549-558.
- [5] Schmidt U, Chmel H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 10(5): 666-668.
- [6] Vantarakis A, Komninou G, Venieri D, Papapetropoulou. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(2): 105-109.
- [7] Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala J L. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(11): 2864-2867.
- [8] Kong R Y C, Lee S K Y, Law W F, Law S H W, Wu R S S. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in mariner waters by multiplex PCR. *Water Research*, 2002, 36(11): 2802-2812.
- [9] Fratamico P M, Sackitey S K, Wiedmann M, Deng M Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(8): 2188-2191.
- [10] Neogi S B, Chowdhury N, Asakura M, Hinenoya A, Haldar S, Saidi S M, Kogure K, Lara R J, Yamasaki S. A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(3): 293-300.
- [11] Haldar S, Neogi S B, Kogure K, Chatterjee S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S. Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(2): 146-152.
- [12] Abualsoud W, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(2): 485-493.
- [13] Hoorfar J, Malomy B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5): 1863-1868.
- [14] Nordstrom J L, Vickery M C L, Blackstone G M, Murray S L, Depaula A. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(18): 5840-5847.
- [15] Nandi B, Nandy R K, Mukhopadhyay S, Nair G B, Shimada T, Ghose A C. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(11): 4145-4151.
- [16] Zhou S, Hou Z, Li N, Qin Q. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1897-1906.
- [17] Pinto A D, Ciccarese G, Tantillo G, Catalano D, Forte V T. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(1): 150-153.
- [18] Panicker G, Myers M L, Bej A K. Raped detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of mexico water by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 498-507.
- [19] Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamamoto S, Arakawa E, Ohnishi M. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25(4): 174-176.
- [20] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [21] Venkatesmwaran 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 681-687.
- [22] Lee C Y, Chen C H. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1311-1317.
- [23] Blackstone G M, Nordstrom J L, Vickery M C L, Bowen M D, Meyer R F, Depala A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2): 149-155.
- [24] Pascual J, Macian M C, Arahall D R, Garay E, Pujalte M J. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 154-165.
- [25] 吕淑霞, 祝儒刚, 刘月萍, 张喆, 胡英. 扩增内标在副溶血弧菌多重PCR检测方法中的应用. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(6): 701-705.
- Lü S X, Zhu R G, Liu Y P, Zhang Z, Hu Y. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in the presence of internal amplification control. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2010, 41(6): 701-705.(in Chinese)