

toxR 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌

覃倚莹¹, 吴晖¹, 肖性龙^{1,2}, 杨晓泉¹, 张经纬², 余以刚¹, 李惠芳²

1 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640

2 深圳太太基因工程有限公司, 深圳 518057

摘要: 以 *toxR* 基因为靶基因, 通过优化反应条件建立了快速检测副溶血弧菌的 TaqMan 实时荧光 PCR 方法。特异性试验表明, 该方法能选择性检测副溶血弧菌, 而与金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单增李斯特杆菌等多种常见的食源性病原菌没有交叉反应; 灵敏度试验表明, 该方法最少可检测到 25 个拷贝的 *toxR* 基因重组质粒, 对纯培养物和模拟食品样品直接检测的灵敏度分别为 21 cfu/mL 和 210 cfu/g; 重复性试验表明, 同一样品于试验内及试验间的变异系数分别为 0.9% 和 1.3%; 所制作的标准曲线在 $2.5 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^6$ 拷贝数之间有较好的线性关系, 能对副溶血弧菌进行准确的定量分析。结果表明, 本研究所建立的副溶血弧菌实时荧光 PCR 检测方法具有特异性好、灵敏度高、重复性好的特点, 能进行定量检测, 而且检测时间从核酸抽提到出实验结果仅需要 3 h, 是快速检测副溶血弧菌的有效手段。

关键词: 副溶血性弧菌, 实时荧光定量 PCR, *toxR* 基因, TaqMan 探针, 检测

Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by TaqMan-based Real-time PCR Assay Targeting the *toxR* Gene

Yiying Qin¹, Hui Wu¹, Xinglong Xiao^{1,2}, Xiaoquan Yang¹, Jingwei Zhang², Yigang Yu¹, and Huifang Li²

1 College of Light Industry & Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2 Shenzhen Taitai Genomics Inc, Shenzhen 518057, China

Abstract: We designed a pair of specific primers and a TaqMan fluorescent probe targeting the *toxR* gene of *Vibrio parahaemolyticus* (VP). After optimizing the conditions, the specialty, sensitivity and reproducibility of the detection method were evaluated. Results: (1) the developed real-time PCR assay protocol detected only VP and was not affected by other normal food pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*. (2) the limit of detection was 25 copies of *toxR* gene in the detected samples, and the sensitivity of pure cultures and simulated food samples was 21cfu/mL and 210 cfu/g. (3) the developed protocol of real-time PCR assay had a high reproducibility, and the sample's variation was 0.9% and 1.3% within the same sample and between tests. (4) the standard curve had a good linearity when the gene quantity was between 2.5×10^1 and 2.5×10^6 copies. The developed detection assay targeting the *toxR* gene can quantitatively detect VP in only 3 hours, and thus is an efficacious method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*.

Received: March 28, 2008; **Accepted:** May 27, 2008

Supported by: Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCEF06-0746), Cooperation Project between Guangdong Province and Hongkong (No. 2005A20301002), Manufacturing Studying & Researching Project of Guangdong Province (Nos. 2007B090400068, 2007B090400113).

Corresponding author: Xinglong Xiao. Tel: +86-013828797202; E-mail: redtreer@163.com

新世纪优秀人才支持计划(No. NCEF06-0746), 粤港招标项目(No. 2005A20301002), 2007 年省部产学研合作专项资金项目(Nos. 2007B090400068, 2007B090400113)资助。

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, real-time PCR, *toxR* gene, TaqMan-based probe, detection

进食被副溶血弧菌污染的食物易导致腹痛、腹泻,甚至休克、昏迷而死亡^[1]。目前副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)占细菌性食物中毒的第一位,在近年来沿海地区的食物中毒病例中,该菌已成为首要病原^[2],而且我国是水产品出口大国,副溶血性弧菌则是我国出口头足类水产品的必检项目,因此在饮水、食品检测和食物中毒源调查、传染病源调查等工作中,经常要检测副溶血弧菌。传统的副溶血弧菌检测法包括增菌培养、分纯、镜检和生化试验等步骤,耗时长、操作繁琐。荧光定量PCR检测技术具有快速、简便、直观、定量准确等优势,在病原菌检测中已得到广泛应用^[3,4]。文献已报道的副溶血性弧菌荧光PCR检测方法一般是以*gyrase*基因^[5]、TLH和TDH基因^[6,7]为靶基因设计引物探针,这些基因的同源性较低,易造成假阳性现象。本研究采用TaqMan荧光探针技术,以*toxR*为靶基因建立快速检测副溶血弧菌的实时荧光PCR(Real-time PCR, RT-PCR)方法,通过特异性试验、敏感度试验、重复性试验证实该方法特异性好、灵敏度高、稳定性好、检测耗时短,是快速检测副溶血弧菌的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品

7株副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)标准菌株由深圳出入境检验检疫局的实验室提供,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、伤寒杆菌(*Salmonellatyphiurium*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、单增李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)、志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、阴沟肠杆菌

(*Enterobacter cloacae*)等16株阴性对照菌株由深圳太太基因工程有限公司提供。临床检测的135份食品样本均为深圳检验检疫局2007年11~12月份送检的鲜活海产品样本。

1.1.2 主要试剂

PMD18T载体、T4 DNA连接酶、细菌基因组DNA抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;Taq酶为MBI公司产品。

1.1.3 主要仪器

ABI7500荧光定量PCR仪、Biophotometer分光光度计(Eppendorf)、PTC-100TM自动热循环PCR仪(MJ Research)、Sigma低温微量超速离心机、水浴锅、涡旋振荡器等。

1.2 方法

1.2.1 *toxR*基因特异性分析和引物、探针的设计

从GenBank上获得副溶血弧菌的*toxR*基因的DNA序列,登录号为AB029908,采用DNASTar软件中的Seqman进行同源性分析,确定在副溶血弧菌菌株内保守、其他菌株间特异的片段,利用生物软件Primer Express2.0对该保守片段设计引物和探针。通过对GenBank数据库中所有生物核苷酸序列进行BLAST同源性比较分析,证实所选设计的引物与探针对VP具有高度特异的,其序列和特征如下(表1)。

1.2.2 *toxR*标准质粒的构建

对副溶血弧菌*toxR*基因进行PCR扩增,将含有目的扩增片段的PCR产物回收、纯化,连接到PMD18-T载体中制备重组质粒,转化到感受态大肠埃希菌DH5 α ,经TaKaRa质粒小提试剂盒回收、纯化后进行测序,利用分光光度计测定重组质粒的浓度和纯度。

表1 引物与探针的序列与特征

Table 1 Nucleotide sequences of the primers and probe for RT-PCR

Name	Sequence (5'-3')	Length (bp)	T _m value
Primer vp1231	GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT	27	61.6
Primer vp1286	CATTCGCGTGGCAAACATC	19	60.4
Probe vp1259	FAM-5'-CGCACAAGGCTCGACGGCTGA-3'-TAMRA	21	71.1

The primers and probe are synthesized by Shanghai Sangon Biological Engineering Technology & Services Co., Ltd

1.2.3 副溶血弧菌实时荧光 PCR 的建立与优化

参照 MBI 公司产品 *Taq* 酶(#EP0402)说明书, 将荧光定量 PCR 上游引物、下游引物和探针同时加入反应体系中, 于 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 扩增。对荧光定量 PCR 反应体系中各组分浓度和反应程序进行优化, 特别是对引物和探针浓度进行筛选, 以获得最低的 Ct 值和较高的荧光强度增加值(ΔRn)。选用 0.2、0.4、0.6、0.8、1 $\mu\text{mol/L}$ 的引物终浓度和 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的探针终浓度, 采用矩阵法检测阳性病毒核酸, 筛选引物和探针的最佳浓度。

1.2.4 定量标准曲线的建立

利用构建好的 PMD18-*toxR* 重组质粒作为副溶血弧菌定量标准品, 对定量标准品进行 10 倍梯度稀释 6 个梯度, 利用优化好的荧光 PCR 反应体系检测各梯度标准品的 Ct 值, 建立质粒拷贝浓度与 Ct 值对应关系的定量标准曲线。

1.2.5 荧光定量 PCR 的特异性

以黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、变形杆菌、沙门氏菌、单增李斯特杆菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌等 16 株食物中常见的细菌作为阴性对照菌株, 并用高纯水作为无模板空白对照(No template control, NTC)验证荧光 PCR 法检测副溶血弧菌的特异性。

1.2.6 荧光定量 PCR 的灵敏度

对已知拷贝数的含有目的扩增片段的 PMD18-*toxR* 重组质粒进行 10 倍梯度极限稀释, 对各稀释度进行荧光 PCR 检测, 从而确定该方法对靶基因的最低检出限。

为评价该方法对细菌纯培养物的检测灵敏度, 将副溶血弧菌标准菌液利用平板计数, 测定原始菌液浓度, 再按 10^{-1} ~ 10^{-6} 倍数梯度稀释, 对每个梯度菌液各取 1 mL 分别提取细菌基因组 DNA 后进行荧光 PCR 检测。

为评价该方法对实际食品样品的检测灵敏度, 选取国标法预检为副溶血弧菌阴性的鱼肉、虾肉 10 g 与 90 mL 碱性蛋白胨水制成匀浆, 取 10 mL 鱼虾肉匀浆 7 份, 分别接入 1 mL 上述倍数梯度稀释的副溶血弧菌菌液, 混匀作为模拟食品样品, 各取 1 mL 提取细菌基因组 DNA, 进行荧光 PCR 检测。

1.2.7 荧光定量 PCR 的重复性

通过在同一试验内和不同试验间对同一样品检测的 Ct 值变异系数(标准偏差/重复值的平均数)来初步评估该方法的重复性。

1.2.8 检测方法的初步应用

利用本研究建立的 VP RT-PCR 方法, 对 135 份海产品样本进行检测并与国标法作比较。

2 结果

2.1 定量标准品的制备

纯化后的 *toxR* 基因重组质粒经测序结果表明重组质粒所含的 *toxR* 序列与我们选取的 *toxR* 基因靶序列完全一致。经分光光度计测定后, 确定其浓度为 65 ng/ μL , OD_{260}/OD_{280} 为 1.823, 证明该重组质粒的纯度很高。根据阿弗加德罗常数换算出每 μL 重组质粒的拷贝数为: 2.5×10^{10} copy。用双蒸水将上述已知拷贝数的重组质粒稀释到 2.5×10^7 copy/ μL 作为定量标准品原液保存。

2.2 副溶血弧菌 RT-PCR 反应条件的优化

引物和探针浓度筛选试验结果表明, 采用 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的探针浓度进行检测, 获得的 Ct 值最小且荧光增加值(ΔRn)较大, 确定引物和探针的最佳浓度分别为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。对荧光定量 PCR 反应体系中其余各组分浓度进行优化, 最终确定优化后的 VP 荧光 PCR 反应体系配制如下(表 2)。优化后的反应程序为: 95°C 变性 2 min, 以 95°C 15 s, 60°C 1 min(收集 FAM 荧光信号)扩增 40 个循环, 反应时间为 1.5 h。

表 2 筛选优化后的荧光定量 PCR 反应体系
Table 2 Optimized Real-time quantitative PCR reaction system

Component	Volume (μL)	Final concentration
<i>Taq</i> enzyme	0.5	2.5 u
10 × PCR buffer(Mg ²⁺ Plus)	2.5	1 ×
dNTP mixture (2.5 mmol/L each)	2.0	0.4 mmol/L
Primer vp1231(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Primer vp1286(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Probe vp1259(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
Template	5.0	
Total volume	25.0	

2.3 定量标准曲线的建立

利用优化好的副溶血弧菌 RT-PCR 反应体系对 6 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测, 建立质粒拷贝浓度的对数值与 Ct 值对应关系的定量标准曲线(图 1)。实验结果显示, 所制作的标准曲线在 $2.5 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^6$ 拷贝数之间有较好的线性关系, 相关系数为 0.998 623, 斜率约为 -3.413 194, 截距为 38.919 460, 得出细菌拷贝数与 Ct 值的线性方程为: $Ct = -3.413 194 \text{Log concentration} + 38.919 460$ 。在对样品进行检测时, 根据其 Ct 值和线性方程就可获得该样品 DNA 拷贝数。

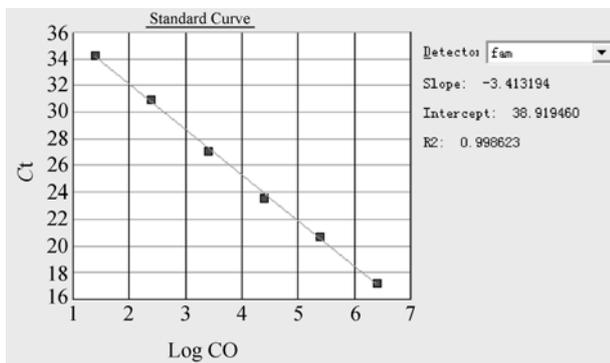


图 1 定量标准曲线

Fig. 1 Standard dilution series of quantitative

2.4 VP FQ-PCR 的特异性检测

利用本研究建立的副溶血弧菌 FQ-PCR 检测方法对 7 株副溶血性弧菌标准菌株和金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、变形杆菌、沙门氏菌、单增李斯特杆菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌等 16 株阴性对照菌株进行检测, 结果显示只有副溶血性弧菌标准菌株出现典型的扩增曲线, 而其他 16 株菌株和空白对照均为一平直的线, Ct 值无法读取(Undet.), 判为阴性(表 3)。该检测结果与传统的生化检测方法结果完全一致。

2.5 VP RT-PCR 的灵敏度

2.5.1 重组质粒检测灵敏度

用双蒸水将已知拷贝数的 *toxR* 基因重组质粒作十倍系列稀释, 取各个稀释度作荧光 PCR 检测确定其最低检出限, 结果表明该检测方法至少能检测到 25 个 DNA 拷贝数(图 2)。

2.5.2 细菌纯培养物和模拟食品样品直接检测灵敏度

经平板计数, 原始菌液浓度为 2.1×10^7 cfu/mL,

按 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 倍数梯度稀释菌液后取 1 mL 提取细菌基因组 DNA 进行荧光 PCR 检测, 实验结果表明, 该法至少能检测到的细菌纯培养物浓度为 21 cfu/mL, 根据 Ct 的读数 and 绝对定量线性方程换算, 最低检出限的实际浓度相当于 17 cfu/mL。

表 3 副溶血弧菌荧光 PCR 检测方法特异性实验结果
Table 3 Results of VP RT-PCR specificity

Microorganissms	Number	Ct Value	Detection of tradition
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 4242	20	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 4237	28	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 4443	18	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 6371	19	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 7093	18	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 8056	16	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SZCIQ 7156	25	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 5621	Undet.	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	SZCIQ 6538	Undet.	-
<i>E. coli O157:H7</i>	SZCIQ 13813	Undet.	-
<i>E. coli JM109</i>	SD 8410	Undet.	-
<i>Salmonella</i> spp.	SZCIQ 8385	Undet.	-
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC9089	Undet.	-
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC14028	Undet.	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	SZCIQ7644	Undet.	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19115	Undet.	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	SZCIQ 4376	Undet.	-
<i>Shigella flexneri</i>	SZCIQ 2973	Undet.	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	SZCIQ 0013	Undet.	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	SZCIQ 45301	Undet.	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	SZCIQ 45103	Undet.	-
<i>Vibrio cholerae O1</i>	SZCIQ 7326	Undet.	-
<i>Vibrio cholerae O139</i>	SZCIQ 5144	Undet.	-

^aresults of FQ-PCR; +: positive result; -: negative result

将上述倍比稀释的菌液加入鱼虾肉匀浆制作成模拟食品样品, 然后再抽提核酸进行荧光 PCR 检测, 发现其能够检测的最低菌液浓度为 2.1×10^2 cfu/mL, Ct 读数为 32.87, 根据绝对定量标准曲线换算, 其实际浓度相当于 59 cfu/mL(表 4)。

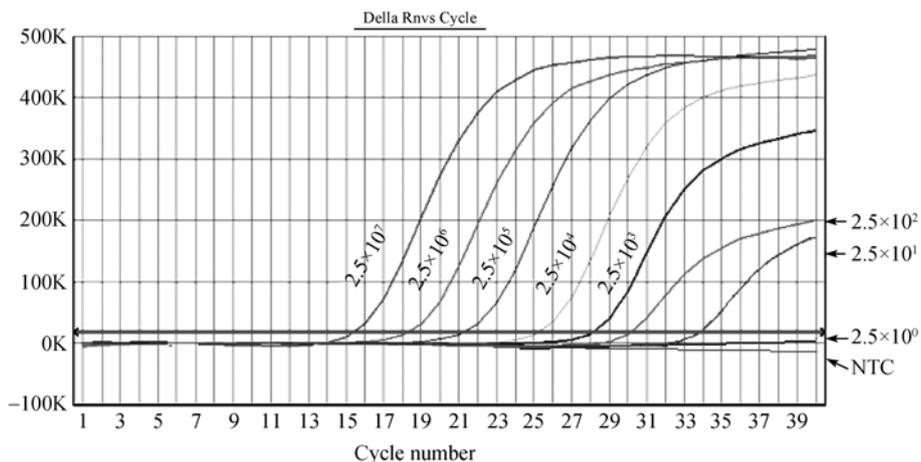


图 2 VP 荧光定量 PCR 灵敏度实验
Fig. 2 Sensitivity for detection of VP by real-time quantitative PCR

表 4 副溶血性弧菌荧光 PCR 检测灵敏度
Table 4 Sensitivity for detection of VP by real-time quantitative PCR

Gradient concentration	Bacteria concentration (cfu/mL)	Detect of pure culture of bacteria		Detect of simulated food sample	
		Ct Value	Measured concentration (cfu/mL) ^a	Ct value	Measured concentration (cfu/g) ^a
10 ⁻¹	2.1 × 10 ⁶	17.89	1.4 × 10 ⁶	18.36	1.1 × 10 ⁶
10 ⁻²	2.1 × 10 ⁵	21.18	1.6 × 10 ⁵	22.07	8.6 × 10 ⁴
10 ⁻³	2.1 × 10 ⁴	24.21	2.0 × 10 ⁴	24.62	1.5 × 10 ³
10 ⁻⁴	2.1 × 10 ³	28.29	1.3 × 10 ³	29.05	7.8 × 10 ²
10 ⁻⁵	2.1 × 10 ²	31.36	1.6 × 10 ²	32.87	5.9 × 10 ¹
10 ⁻⁶	2.1 × 10 ¹	34.68	1.7 × 10 ¹	Undet.	
10 ⁻⁷	2.1 × 10 ⁰	Undet.		Undet.	

a: convert to measured concentration according to Ct value and quantitative linear formula

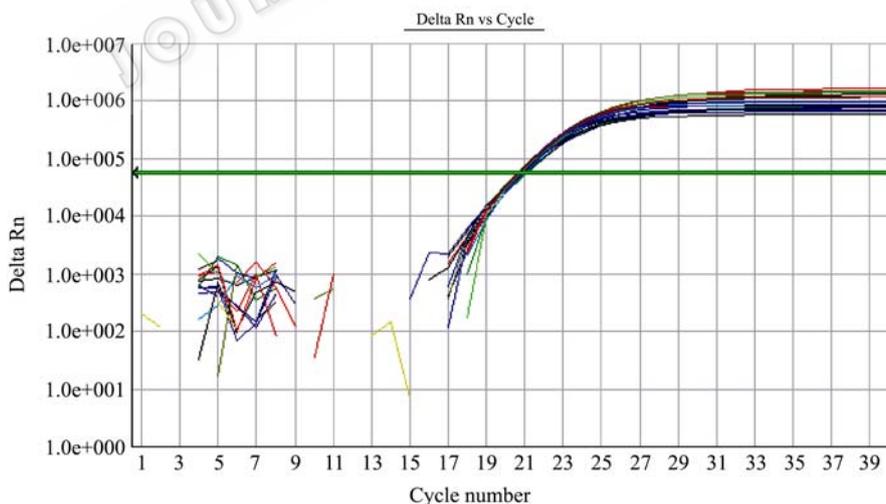


图 3 同一样品重复 30 次的检测结果
Fig. 3 Results of 30 repetitious detections by the same samples

2.6 VP RT-PCR 稳定性和重复性实验细菌

为评估该检测方法的重复性, 本研究对同一阳性样品在同一次实验和不同实验间获得的 Ct 值进行

了统计, 结果显示, 同一次实验内 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上是重合的(图 3), Ct 值读数范围为 20.75~21.18, 标准偏差为 0.126, 变异

系数为 0.9%；同一样品在 30 次不同实验内所获的 Ct 值也基本一致，Ct 值读数范围在 20.75~21.97 之间，标准偏差为 0.245，变异系数为 1.3%。以上统计表明本研究所建立的副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法重复性好，可对副溶血弧菌进行稳定、可靠的检测。

2.7 副溶血弧菌荧光 RT-PCR 方法的临床检测

利用本研究建立的 VP RT-PCR 方法，对 135 份海产品样本进行检测，结果显示有 12 份成阳性反应，与国标法检测结果符合率为 100%，实验结果表明，该荧光 PCR 方法具有广泛而良好的适用性。

3 讨论

本研究根据副溶血性弧菌中的特异性基因 *toxR* 基因,选取其中保守片断作为荧光 PCR 扩增的靶基因,由于 *toxR* 基因和引物、探针的高度特异性的三重保证,使其对副溶血性弧菌的检测具有高度特异性,实验结果也证明了基于 *toxR* 基因的 RT-PCR 检测特异性为 100%。常用的副溶血性弧菌快速检测方法存在着假阳性或交叉污染等问题,特异性无法达到 100%,而荧光 PCR 方法不存在上述问题,所以研究建立的实时荧光 PCR 在特异性上具有较大优势。

本研究所建立的荧光 PCR 的灵敏度达到 25 个 DNA 拷贝数,对纯培养物和模拟食品样品直接检测的灵敏度分别为 21 cfu/mL 和 210 cfu/g,已经接近灵敏度的极限,与常用的快速检测方法的 $10^2\sim 10^3$ cfu/mL 相比较,具有很大的优势。

重复性试验结果表明,同一样品在组内及组间的 Ct 值变异系数分别为 0.9%以及 1.3%,良好的重复性好保证了对样品进行稳定、可靠的检测。同时由于无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了试验人员的安全,而且在检出时间上要比传统检测方法大大缩短,从细菌基因组提取到荧光 PCR 反应完成只需要 3 h 的时间,常用的快速检测方法需要 3~6 h,因此本实验建立的方法检测效率有所提高,特别适合大规模的样品快速检测^[8,9]。

因此,与常用的快速检测副溶血性弧菌方法相比,本研究所建立的荧光 PCR 检测方法具有较大的优势,不仅灵敏度高、特异性强、操作简单、需时短,而且不受假阳性、交叉污染等干扰,将为副溶血性弧菌进行流行病学调查提供有力的工具,适用于

进出口检验检疫、食品安全检测、病原体的临床诊断(疾病的临床早期诊断,病原微生物的含量分析等)、基础理论研究(SNP 筛查,基因分型等)等领域,应用前景广阔。

REFERENCES

- [1] Dun YH, Xu JS, Wu H, *et al.* Separation and verification of *Vibrio parahaemolyticus* from imported iced inkfish. *Port Health Contr*, 2007, **2**(3): 23-25.
顿玉慧, 徐建设, 吴海, 等. 进境冻墨鱼中副溶血性弧菌的分离及鉴定. 口岸卫生控制, 2007, **2**(3): 23-25.
- [2] Cheng SY, Luo Y, Ye JL, *et al.* Study on rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Dis Surv*, 2007, **22**(9): 642-645.
程苏云, 罗芸, 叶菊莲, 等. 副溶血性弧菌快速检测方法研究. 疾病监测, 2007, **22**(9): 642-645.
- [3] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *CMR*, 2006, **19**(1): 165-256.
- [4] Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 2005, **29**: 151-159.
- [5] Weng WC, Jiao H, Wang FJ, *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food by fluorescence quantitative PCR. *Chin J Public Health*, 2005, **21**(11): 1359-1361.
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. 中国公共卫生, 2005, **21**(11): 1359-1361.
- [6] Chen L, Zhang HH, Cao HF. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by the fluorescence quantitative PCR assay targeting *TLH* and *TDH* gene. *Lab Med*, 2007, **22**(4): 450-454.
陈丽, 张红河, 曹海芬. 荧光聚合酶链反应检测副溶血弧菌 TLH 与 TDH. 检疫医学, 2007, **22**(4): 450-454.
- [7] Wang XY, Feng JW, Wu XL, *et al.* Study on the detection of *Vibrio parahaemolyticus* using real-time PCR method. *Food Res Dev*, 2007, **28**(6): 135-138.
王小玉, 冯家望, 吴小伦, 等. 实时荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的研究. 食品研究与开发, 2007, **28**(6): 135-138.
- [8] Dou Y, Ning XB, Hu PH. The Application of ELISA in the analysis of aquatic microorganism. *Food Res Dev*, 2006, **27**(8): 143-146.
窦勇, 宁喜斌, 胡佩红. ELISA 在水产微生物检测中的应用. 食品研究与开发, 2006, **27**(8): 143-146.
- [9] Li MX, Jiang YL. Pollution situation and quickly examination of *vibrio parahaemolyticus*. *Port Health Contr*, 2007, **12**(2): 55-57.
李铭新, 姜义霖. 副溶血性弧菌污染现状及快速检测. 口岸卫生控制, 2007, **12**(2): 55-57.