

基于单碱基延伸标签反应的常见食源性致病菌基因芯片检测方法的建立

陆长勇¹, 施春雷¹, 张春秀², 陈婧¹, 史贤明^{1,3}

1 上海交通大学农业与生物学院食品科学系 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240

2 生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203

3 上海食品安全工程技术研究中心, 上海 201203

摘要: 针对 8 种常见的食源性致病菌(金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、志贺氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和空肠弯曲杆菌), 建立了基于单碱基延伸标签反应原理的基因芯片检测方法。筛选和整合 8 种食源性致病菌基因组中的特异性序列和相应 PCR 引物, 致病菌靶 DNA 片段被扩增和纯化作为单碱基延伸标签反应的模板, 反应产物在 DNA 芯片上与探针进行杂交反应, 然后通过扫描基片的荧光强度进行判断。实验结果表明, 可采用基于单碱基延伸标签反应的基因芯片方法同时特异性检测 8 种食源性致病菌, 基因组 DNA 多重检测灵敏度可达到 0.1 pg, 以鼠伤寒沙门氏菌为单一检测对象的细菌纯培养物灵敏度可达到 5×10^2 CFU/mL。本方法可以快速灵敏地检测食源性致病菌, 为食源性疾病的诊断和防治提供了一个有效的方法。

关键词: 食源性致病菌, 单碱基延伸标签, 基因芯片

Development of single base extension-tags microarray for the detection of food-borne pathogens

Changyong Lu¹, Chunlei Shi¹, Chunxiu Zhang², Jing Chen¹, and Xianming Shi^{1,3}

1 Department of Food Science and Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203, China

3 Shanghai Engineering Research Center of Food Safety, Shanghai 201203, China

Abstract: We developed single base extension-tags (SBE-tags) microarray to detect eight common food-borne pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Enterobacter sakazaki*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni*. With specific PCR primers identified and integrated for eight food-borne pathogens, target sequences were amplified and purified as template DNA of single base extension-tags reaction. The products were hybridized to microarrays and scanned for fluorescence intensity. The experiment showed a specific and simultaneous detection of eight food-borne pathogens. The system limits is 0.1 pg for a genomic DNA and 5×10^2 CFU/mL for *Salmonella typhimurium* cultures. The single base extension-tags assay can be used to detect food-borne pathogens rapidly and accurately with a high sensitivity, and provide an efficient way for diagnosis and control of disease caused by food-borne pathogens.

Keywords: food-borne pathogens, single base extension-tags (SBE-tags), microarray

Received: December 23, 2008; **Accepted:** February 19, 2009

Supported by: Ministry of Science & Technology of China (No. 2006BAK02A14), Shanghai Municipality (No. 07dz19508), National Natural Science Foundation of China (No. 30771792).

Corresponding author: Xianming Shi. Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

国家科技支撑计划(No. 2006BAK02A14), 上海市重大科技专项(No. 07dz19508), 国家自然科学基金项目(No. 30771792)资助。

由食品污染而引起的食源性疾病是当今世界上最广泛的卫生问题之一, 美国每年的食源性疾病多达 7600 万例, 其他发达国家每年估计也有 1/3 以上的人群感染食源性疾病^[1]。国家食源性疾病预防网一份关于中国食源性疾病的监测资料表明, 微生物引起的食源性疾病起数和涉及人数最多, 其中副溶血弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和近年来引起广泛重视的单核细胞增生李斯特菌为主要致病菌^[2]。另外, 我国加入 WTO 以来, 食品安全问题已成为开展农产品和食品对外贸易、获得国际市场准入的重要制约因素。所以, 提高我国的食品安全性尤其是加强对食源性致病菌的监测势在必行。

当前, 我国食品质检部门大多仍采用传统的培养方法来检测食源性致病菌, 操作步骤繁琐而且耗时长达 4~5 d, 不能满足市场快速检测的需求。近年来广泛应用的 PCR 技术、酶联免疫分析和生物传感器等检测方法, 也存在检测靶点少、假阳性问题严重、检测通量低等诸多瓶颈, 不适应当前高通量食品的大规模同时检测的发展趋势^[3, 4]。

基因芯片技术近年来广泛应用于基因序列分析、杂交^[5]、基因突变检测及多态性分析^[6]、基因组文库图型分析^[7]以及疾病的基因诊断^[8]等领域。2002 年由 Hirschhorn 等^[9]创建了一种基于单碱基延伸标签反应(Single base extension-tags, SBE-tags)的基因芯片方法, 主要用于检测单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)^[10, 11]。本实验将 SBE-tags 方法用于食源性致病菌的基因芯片检测, 通过基因组比对的方法整合和筛选用于芯片检测的特异性靶点和引物, 并对芯片检测系统的特异性、灵敏度等参数进行生物学评价, 尝试建立一个常见食源性致病菌的快速、准确、灵敏、高通量的检测平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

Thermo Sequence DNA Polymerase(GE Health, UK Limited), *Taq* DNA 聚合酶(上海晶美生物技术有限公司), 100 bp DNA Ladder(北京天根生化科技有限公司), PCR 扩增仪(MJ Research Minicycle PTC 200), 电泳仪(Amersham Biosciences RAD 300), NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop

Technologies, Wilmington, DE), UVP HB-1000 Hybridizer 杂交炉(UVP, Upland, CA, USA), Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪(GeneMachines, USA), 化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司(Shanghai, China)。

1.1.2 实验菌株

标准菌株购买于中国科学院微生物研究所和中国医学微生物菌种保藏中心, 部分分离菌株由上海出入境检验检疫局提供, 其余菌株为上海交通大学食品安全与微生物研究室保存(表 1)。

表 1 实验菌株及其编号

Table 1 Bacterial strains used in this study

Bacterial species	Strain No.	Number of strains
<i>Salmonella typhi</i>	CMCC50098	1
<i>Salmonella choleraesuis</i>	AS1.1190	1
<i>Salmonella paratyphi A</i>	CMCC50001	1
<i>Salmonella paratyphi B</i>	CMCC50004	1
<i>Salmonella hirschfeldii</i>	CMCC50017	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	CMCC50335	1
<i>Salmonella gallinarum</i>	CMCC50770	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	AS1.1174	1
<i>Salmonella</i> spp.	Laboratory strain	70
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC8095/6538/13565/ 27664/12600/25923/ 27661/29213	8
<i>Staphylococcus</i> spp.	Laboratory strain	45
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC7644/27708/ 13313/13932/BAA-751	5
<i>Listeria murrayi</i>	AB97017	1
<i>Listeria seeligeri</i>	AB97018	1
<i>Listeria grayi</i>	AB97019	1
<i>L. monocytogenes</i> spp.	Laboratory strain	12
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802/ 33846	2
<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC33863	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC27562	1
<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC33842	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC33810	1
<i>V. parahaemolyticus</i> spp.	Laboratory strain	36
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC51334	1
<i>Shigella dysenteriae</i>	AS1.1869	1
<i>Shigella flexneri</i>	AS1.1868	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC29544/ 50205	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC51816	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC13048	1
<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC43889	1
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922/ 51813	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC29428	1
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC7709	1
<i>Bacillus cereus</i>	OX10D C1220	1
<i>Bacillus subtilis</i>	OX10D C1221	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC27729	1

spp.: separated strains.

1.2 检测靶基因的扩增和标记

1.2.1 引物设计

普通 PCR 反应根据基因组本地 Blast 比对方法得到特异性片段, 设计和筛选相关引物。同时整合和验证文献报道引物, 最终筛得 8 种食源性致病菌的特异性扩增引物, 并设计了 8 种对应 SBE-tags 荧光标记反应引物。SBE-tags 引物设计的原理是位于设计引物位

点的上游, 具有双重功能: 其 5'端为一段引物特异性序列, 3'端为等位基因特异性序列且止于某一特定定位点。只有引物的 3'端等位基因特异性位点与这一位点碱基互补结合时, 引物才得以延伸一个碱基。延伸引物的 5'端尾序列与固定在芯片上的互补序列(Zipcode)杂交, 通过检测芯片上的荧光判断产物类型。引物由上海生工生物技术公司合成, 序列见表 2。

表 2 PCR 扩增和荧光标记引物序列
Table 2 Primer sequences for PCR amplification and fluorescence labelling

Bacteria	Primers	Primer sequences (5'-3')	GenBank Accession No.	Length of PCR product (bp)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Prs-f	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	EF110565	370
	Prs-r	CAAAGAAACCTTGGATTTCGG		
	Prs-SBE	ttgacgtacaggtgacgattgattgttcacgactcttgcctt		
<i>Salmonella</i>	C20-f	ACCGCTGGTGAAACGACA	AE008786	307
	C20-r	GCGACGGCAGTGCTTATT		
	C20-SBE	ctgaatcctccatccgtgttacggacgacccgcgtctttaacg		
<i>Staphylococcus aureus</i>	nuc-j-f	ATCATTATTGTAGGTGIATTAGC	BA000017	223
	nuc-j-r	CAGGCGTATTTCGGTTTC		
	nuc-j-SBE	gacgagtatatgcatctgcgcgctttctggcgatatcaaccctat		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vp2-f	AACTGACGCTTGTGAGG	BA000031	344
	Vp2-r	AAACTCCTGCCTGACGAT		
	Vp2-SBE	aacgggatacagttctcggttaggcagcaagtgtggttcaaaggaag		
<i>Campylobacter jejuni</i>	hipO-f	GGCAATGATAGAAGATGG	Z36940	424
	hipO-r	ATTAGCCTGTGCAAGACC		
	hipO-SBE	gatgatgcctctacgtgacacaccccttccaataacttcaatgct		
<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> O157:H7	hly-A-f	CAGTAGGGAAGCGAACAGAG	AY495950	363
	hly-A-r	AAGCTCCGTGTGCCTGAAGC		
	hly-A-SBE	cgttgccgagtttccatgtatcaattatcgtttccactaccacc		
<i>Enterobacter sakazakii</i>	SG-f	GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA	AY702093	282
	SG-r	GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG		
	SG-SBE	tcagtcacatctgtctacaggtgcagcagcatgtctgtttcaatttc		
<i>Shigella</i>	Ial-f	CTGGATGGTATGGTGAGG	AY206439	320
	Ial-r	GGAGGCCAACAAATTATTCC		
	Ial-SBE	gtttcagcatatgtcgagacgaaatgtccatcaaaccctctt		

1.2.2 普通 PCR 反应

普通 PCR 反应体系: 10×PCR Taq 酶缓冲液 2.5 μL, MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL, 引物(10 μmol/L)1 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)0.2 μL, DNA 模板 1 μL, 用灭菌双蒸水补足至 25 μL。PCR 反应参数: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 SBE-tags 荧光标记反应

荧光标记反应体系: 10×Reaction Buffer 1.5 μL, SBE-tags 引物 (25 μmol/L)0.2 μL, Cy3-ddATP (10 μmol/L)0.5 μL, Sequencing 多聚酶(5 U/μL) 0.2 μL, 5 μL 普通 PCR 纯化产物, 用双蒸水补足至 15 μL。PCR 反应参数: 96℃ 预变性 5 min; 96℃ 变性 30 s, 66℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环。

1.3 基因芯片的制备与杂交

1.3.1 芯片制备

实验所用基因芯片片基, 晶芯多样品芯片围栏购自北京博奥生物有限公司, 杂交探针由上海生物芯片有限公司设计和点制, 芯片点阵见图 1。

P	P	P
P	1	2
P	3	N
P	4	N
P	N	5
P	6	7
P	8	9
P	N	H

图 1 食源性致病菌检测芯片探针排布
Fig. 1 Diagram of the positions and probes of microarray for eight food-borne pathogens. P: positive control; N: negative control; H: water control; 1-9: *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella*, *Enterobacter sakazaki*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, 16S rDNA and *Salmonella*.

1.3.2 芯片杂交

杂交体系含 15 μL 标记的 PCR 产物和 1 nmol/L 荧光质控探针。杂交液于 95°C 变性 5 min 后, 立即置于冰上冷却。15 μL 杂交液加入到芯片矩阵上, 50°C 杂交 1.5 h。杂交后, 芯片分别用洗脱液 2 \times SSC + 1% SDS、1 \times SSC + 0.2% SDS 50°C 洗涤 6 min, 0.5 \times SSC 洗液于室温洗涤 3 min, 最后在去离子水中洗涤 1 min 后取出甩干。

1.3.3 杂交结果扫描与分析

通过 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片检测荧光信号。使用 532 nm 绿色荧光、10 μm 分辨率扫描, 根据信号点的饱和程度调节 PMT(光电倍增管)值, 调节范围在 PMT550-PMT700, 扫描结果用 GenePix Analysis 6.0 软件进行分析。

1.4 特异性实验

按照上述操作分别检测表 1 中列出的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺氏菌、空肠弯曲杆菌、阪崎肠杆菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 等 8 种食源性致病菌的所有标准菌株。

1.5 灵敏度实验

基因组 DNA 灵敏度评价^[12]: 提取 8 种食源性致病菌的基因组 DNA 并测定其浓度。取原始 DNA 浓度分别为 9.5、1.4、2.3、1.7、1.1、1.7、2.1、6.3 ng/ μL , 做 10 倍系列梯度稀释, 每个浓度各取 1 μL 分别进行 2 组四重检测。细菌纯培养物灵敏度评价: 以鼠伤寒沙门氏菌 AS1.1174 为研究对象, 取 6 h 培养的标准菌株, 制备 10 倍系列稀释菌液, 每个稀释度分别取 200 μL 菌液做平板计数, 取不同稀释度的菌液各 1 mL 用水煮法提取 DNA 进行芯片检测。

1.6 食品样品分离菌株的检测

选取上海出入境检验检疫局提供的 61 株实际检测工作中分离得到的致病菌株进行芯片检测, 同时进行 GB/T 4789-2003 食品卫生微生物学检验方法鉴定与之比较。

2 结果

2.1 荧光标记反应退火温度的优化

SBE-tags 荧光标记反应退火温度是影响芯片检测结果的一个重要因素, 选取 60°C、66°C、72°C 三个退火温度进行杂交实验。以福氏志贺氏菌为例,

结果表明, 60°C 时出现许多非特异性信号, 66°C 时杂交信号清楚且无非特异性结果, 72°C 时几乎没有信号(图 2)。综合 8 种食源性致病菌的类似杂交结果, 判断本体系最适荧光标记反应退火温度为 66°C。

2.2 特异性评价

为了能有效地区分阳性和阴性杂交信号, 在反复实验的基础上归纳出本系统的阳性判定标准, 即通过 GenePix 4000B 扫描识别的信噪比大于 20 的信号为阳性信号。通过 8 种食源性致病菌的单一和四重检测结果(图 3)可以看出, 8 种食源性致病菌特异性阳性信号很强, 阴性菌检测无特异性信号。同时背景信号值、定位信号值、特异信号值都比较稳定, 检测结果准确可靠。

2.3 灵敏度评价

根据阳性判定标准, 基因组 DNA 四重检测的灵敏度(图 4)可以达到 10^{-4} ng/ μL 数量级, 引物 nuc-j、Vp2、prs、C20、SG、ial、hly-A 和 hipO 的基因组 DNA 检测灵敏度分别为 9.5×10^{-4} 、 1.4×10^{-4} 、 2.3×10^{-4} 、 1.7×10^{-4} 、 1.1×10^{-4} 、 1.7×10^{-4} 、 2.1×10^{-4} 、 6.3×10^{-4} ng/ μL , 即对 8 种食源性致病菌进行四重检测时系统检测下限为 0.1 pg。细菌纯培养物灵敏度实验结果如图 5 所示, 对于鼠伤寒沙门氏菌 AS 1.1174, 在菌液浓度为 5×10^1 CFU/mL 时, 基因芯片杂交信号极其微弱, 根据阳性判定标准, 其信号值与非特异性的杂交信号值比较相近, 认为此浓度的杂交结果属于阴性结果; 而当菌液浓度为 5×10^2 CFU/mL 时, 芯片杂交结果满足阳性判定标准。因此, 本芯片系统的最低检出菌液浓度为 5×10^2 CFU/mL。

2.4 食品样品分离菌株的检测结果

应用基因芯片方法检测 61 份上海出入境检验检疫局提供的食品样品分离菌株, 结果分别为 24 株沙门氏菌, 26 株金黄色葡萄球菌, 6 株单核细胞增生李斯特菌和 5 株阪崎肠杆菌(表 3), 与 GB/T 4789-2003 食品卫生微生物学检验方法鉴定结果一致, 准确率达到 100%, 说明本研究建立的食源性致病菌基因芯片检测方法稳定性强, 特异性高, 适用于实际检测工作。

3 讨论

本研究整合了 8 种食源性致病菌的检测靶点, 将其片段和引物序列分别进行本地和在线 Blast 比

对, 并通过生物学验证了特异性和灵敏度。最终, 在经过大量筛选同时满足四重检测特异性的基础上, 选择了表 2 中 8 对具有高特异性和灵敏度的引物作为基因芯片的检测靶点。8 对 PCR 引物 T_m 值均为 56°C , 8 对 SBE-tags 荧光标记引物 T_m 值为 66°C , 保证两步反应中 8 对引物都可以在同一条件下进行扩增, 为基因芯片的高通量多重检测奠定了基础。

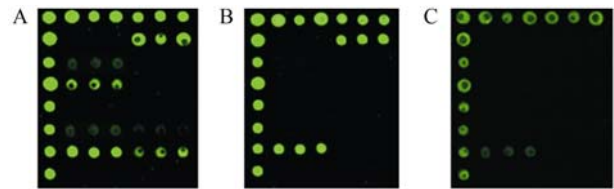


图 2 不同荧光标记反应退火温度的芯片杂交结果
Fig. 2 Results of hybridization with different annealing temperature. (A) 60°C . (B) 66°C . (C) 72°C .

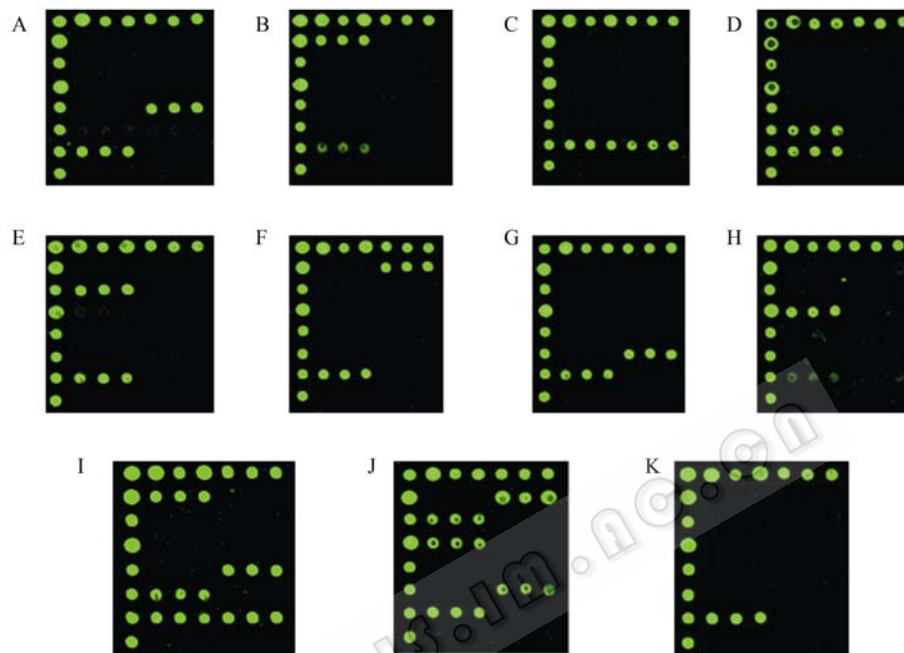


图 3 八种食源性致病菌的典型芯片杂交结果

Fig. 3 Typical hybridization results of 8 food-borne pathogens. A–K: *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Enterobacter sakazaki*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, ABCD quadplex, EFGH quadplex and negative food-borne pathogens.

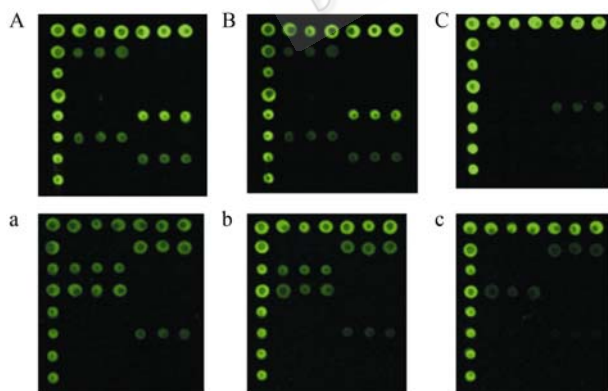


图 4 基因组 DNA 四重检测灵敏度评价

Fig. 4 Sensitivity of quadplex detection for genome DNA. Quadplex detection of *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*: ($9.5, 1.4, 2.3, 1.7 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (A), $10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (B), $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (C)); Quadplex detection of *Enterobacter sakazaki*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter jejuni*: ($1.1, 1.7, 2.1, 6.3 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (a), $10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (b), $10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (c).

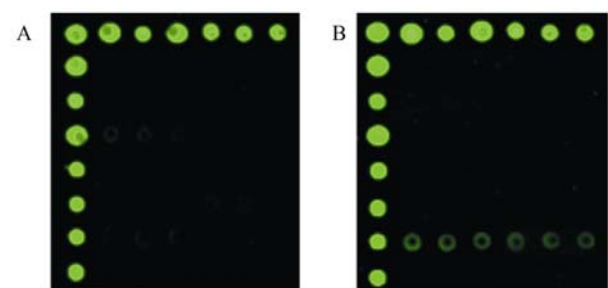


图 5 鼠伤寒沙门氏菌纯培养物灵敏度评价

Fig. 5 Detection sensitivity of *Salmonella typhimurium* cultures. (A) $5 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{mL}$. (B) $5 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{mL}$.

与单碱基延伸(SBE)方法相比, 单碱基延伸标签(SBE-tags)方法的不同在于基因芯片进行单碱基延伸反应时, 使用了具有双重功能的引物, 既有扩增产物特异性的序列, 又另有一段具有特定序列的标签 (tag)。除了具有 SBE 方法高灵敏度和分辨率、

表 3 上海出入境检验检疫食品样品分离菌株基因芯片检测结果
Table 3 Result of gene chip for detection of separated strains from SH CIQ

Separated strains	Number of strains	Food samples	Gene chip	GB/T 4789-2003
<i>Salmonella</i>	24	Pork intestines, beef meat and bone meal, chicken McNuggets, frozen pork tongue, fish meal, lamb, gray duck down	+	+
<i>Staphylococcus aureaus</i>	26	Pizza meat, cod yulius, seafood instant noodles, baby diapers, fish fingers, chicken wings, pig's knuckle, creamy strawberry ice cream	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	6	Frozen chicken wings, frozen fries, frozen pork trotter, frozen chicken paw, Chicken wing aspic	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	5	Lactalbumin, sweet whey powder, skim milk powder, fresh cheese	+	+

极低假阳性率的优点外，SBE-tags 方法则更加简单和廉价。由于对应于每一个特异性序列都有一个不同的标签，杂交反应能够以一个多重形式进行，通过引物上的标签和固定在芯片上的互补标签相结合，不同致病菌的目标产物能够在芯片上相分离而进行多重检测。标签的通用性使得在检测不同序列或位点时不需要重新设计芯片探针，可有效降低大规模检测成本。另外，SBE-tags 方法的精确度也较 SBE 高，Steemers 等^[11]用此方法对 Hapmap 中 723 个 SNP 位点、60 000 多个基因型进行了试验，结果证明正确率是 99.86%。本研究进行了四重检测，基因组 DNA 灵敏度可以达到 0.1 pg，检测限低于一般多模板多重 PCR 和基因芯片方法 1~2 个数量级，食品样品分离菌株的检测正确率也达到 100%。通常食品中的致病菌含量相对较少，有时部分致病菌处于亚致死状态，这就需要一个前增菌过程以达到系统的检测限，本研究中对鼠伤寒沙门氏菌 AS1.1174 的 6 h 增菌纯培养物灵敏度可达到 5×10^2 cfu/mL，比 Guo 等^[13]所报道的检测限要低，可快速高效地检测食源性致病菌。另外，SBE-tags 方法可以结合 Liu 等^[12]报道的扩增内标方法，从而可以有效解决食源性致病菌检测中存在的假阳性和假阴性问题，为全面系统地检测食源性致病菌提供一种新的思路。

REFERENCES

[1] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the united states. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**(5): 607-625.
[2] Liu XM, Chen Yan, Fan YX, et al. Foodborne diseases occurred in 2003-report of the national foodborne diseases surveillance system, China. *J Hyg Res*, 2006, **35**(2): 201-204. 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003 年中国食源性疾病爆发的检测资料. *卫生研究*, 2006, **35**(2): 201-204.
[3] Kerr P, Chart H, Finlay D, et al. Development of a

monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains. *J Appl Microbiol*, 2001, **90**(4): 543-549.
[4] Warsen AE, Krug MJ, LaFrentz S, et al. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(7): 4216-4221.
[5] Fedrigo O, Naylor G. A gene-specific DNA sequencing chip for exploring molecular evolutionary change. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(3): 1208-1213.
[6] Chen SJ, Du WJ, Lu YQ, et al. Gene chip analysis of mutation of HBV-DNA open reading frame. *Chin J Exp Clin Virol*, 2004, **18**(4): 373-376. 陈士俊, 杜文军, 鲁艳芹, 等. DNA 芯片分析 HBV 阅读框架多点基因突变的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, **18**(4): 373-376.
[7] Moul JW, Segawa T, Xu LL, et al. cDNA microarray gene chip for prostate cancer and translational study in a prospective tissue bank and clinical longitudinal database. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2000, **3**(S1): S30.
[8] Sturla LM, Fernandez-Teijeiro A, Pomeroy SL. Application of microarrays to neurological disease. *Arch Neurol*, 2003, **60**(5): 676-682.
[9] Hirschhorn JN, Sklar P, Lindblad-Toh K, et al. SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(22): 12164-12169.
[10] Sobrino B, Lareu M, Brion M, et al. SNP genotyping with single base extension-tag microarrays. *Int Congr Ser*, 2004, **1261**(6): 331-333.
[11] Steemers FJ, Chang W, Lee G, et al. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods*, 2006, **3**(1): 31-33.
[12] Liu B, Shi XM. Application of internal amplification control in the PCR detection method for food-borne *Salmonella*. *Microbiol*, 2006, **33**(2): 156-161. 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用. *微生物学通报*, 2006, **33**(2): 156-161.
[13] Guo X, Chen J, Beuchat LR, et al. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(12): 5248-5252.