

脱氧胆酸钠在副溶血性弧菌死活细胞叠氮溴乙锭 PCR 鉴别中的应用

张超 吕淑霞* 于晓丹 马镛 郝乐友

(沈阳农业大学 生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 【目的】通过将表面活性剂脱氧胆酸钠(Sodium deoxycholate, SD)与叠氮溴乙锭(Ethidium bromide monoazide, EMA)-PCR 反应体系相结合, 建立 SD-EMA-PCR 鉴别副溶血性弧菌死活细胞的检测方法。【方法】依次对加入检测体系中的脱氧胆酸钠最适浓度、EMA 区分死活细胞 DNA 的浓度范围、EMA 激活光解最佳曝光时间进行优化; 确定 SD-EMA-PCR 方法检测副溶血性弧菌死活细胞混合体系中活细胞的最低检出限。【结果】当脱氧胆酸钠浓度 ≤ 0.5 g/L, EMA 的浓度为 3.2–34.0 mg/L, 曝光时间为 25 min 时, SD-EMA-PCR 检测体系仅对死细胞 DNA 扩增产生抑制作用。SD-EMA-PCR 检测活菌细胞的最低检出限为 10 CFU/mL。【结论】死活细胞混合体系的 SD-EMA-PCR 检测证明该方法能够明显降低 EMA-PCR 漏检的死菌对检测结果造成的影响, 为完善食源性致病菌检测中死活菌细胞鉴别方法提供了一种有效途径。

关键词: 副溶血性弧菌, 死活细胞, 叠氮溴乙锭, 脱氧胆酸钠

基金项目: 辽宁省科技厅项目(No. 201102196); 沈阳市科技局项目(No. 090009)

*通讯作者: ✉: lushuxia@hotmail.com

收稿日期: 2012-09-10; 接受日期: 2012-11-12

The application of sodium deoxycholate incorporation into ethidium bromide monoazide PCR for discrimination of viable and dead cells of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Chao LÜ Shu-Xia* YU Xiao-Dan MA Di HAO Le-You

(College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

Abstract: [Objective] The SD-EMA-PCR was established by incorporating sodium deoxycholate (SD) into EMA-PCR assay for discrimination viable and dead cells of *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] The optimal concentration of the sodium deoxycholate, the concentration of ethidium bromide monoazide (EMA) for discrimination viable and dead cells, the optimal light exposure time for activating and photolyzing EMA were determined respectively. And the detection limit value of *V. parahaemolyticus* in the mixtures of viable and dead cells was obtained by SD-EMA-PCR. [Results] The results showed that when the concentration of sodium deoxycholate is less than or equal to 0.5 g/L, the concentration of EMA is ranged from 3.2 to 34.0 mg/L, the light exposure time is 25 min, the DNA amplification from the dead cells by SD-EMA-PCR were inhibited. The detection limit of the SD-EMA-PCR assay for the viable cells was 10 CFU/mL. [Conclusion] SD-EMA-PCR can be used to minimize the false-positive results by inhibiting the EMA-PCR amplification of *V. parahaemolyticus* dead cells from a mixed bacterial population. It is an efficient new approach for distinction between the viable and dead cells and efficiently avoid false positive results.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Viable and dead cells, Ethidium bromide monoazide, Sodium deoxycholate

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是引起人类肠胃炎的革兰氏阴性、嗜盐食源性病原菌^[1]。常规检测副溶血性弧菌的方法要经过增菌、选择性培养、生化鉴定和血清学反应等过程,操作繁琐、耗时长、检出率低,不利于及时诊断和流行病学溯源。快速新型检验法中的PCR检测法具有快捷、灵敏和特异性强等特性,但不能区分病原菌死细胞或活细胞^[2-3]。

死活细胞的主要区别是死细胞的细胞膜不完整。DNA结合染料叠氮溴乙锭(Ethidium bromide monoazide, EMA)光解后形成的氮宾化合物能够渗透到细胞壁(膜)不完整的菌体内,并与DNA分

子进行不可逆的共价结合,从而抑制该菌体细胞DNA的PCR扩增,而EMA不能透过膜完整的活菌细胞,进而不会影响活菌细胞DNA的PCR扩增^[4],因此一定浓度的EMA与PCR技术相结合(EMA-PCR)可以区分部分死活细胞^[5]。但是,对于部分膜裂解并不充分的死菌只有增加膜的透过性,在EMA-PCR中才能与活菌区分开。表面活性剂是指较低浓度下能显著改变表(界)面性质或与此相关的物质^[6],具有增加细胞膜通透性的能力。目前应用于生物实验的表面活性剂主要包括吐温-40、吐温-60、吐温-80、十六烷基三甲基氯化铵、十二烷基磺酸钠、卵磷脂、脱氧胆酸钠

(Sodium deoxycholate, SD)等^[7]。其中脱氧胆酸钠比较温和,是具有四环三帖结构的磺酸盐类衍生物,通过溶解膜蛋白来达到增加细胞膜通透性甚至裂解细胞的效果^[8]。

Lee 等^[9]通过在创伤弧菌的 EMA-RT-PCR 检测中使用脱氧胆酸钠进行前处理,有效剔除了结果中部分膜裂解不充分死菌对结果造成的假阴性现象,与平板计数结果一致。本研究利用副溶血性弧菌死菌对表面活性剂敏感的特点^[10],将表面活性剂脱氧胆酸钠与 EMA-PCR 技术相结合,建立一种继承 EMA-PCR 快速、简易、灵敏度高、特异性强的特点,并能更充分区分死活细胞的 SD-EMA-PCR 检测手段,为实际样品中副溶血性弧菌的检测方法的改进提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种

实验用标准菌株,副溶血性弧菌 ATCC17802,本实验室保存。

1.2 主要仪器和设备

PCR 仪(TC-512),TECHNE 梯度 PCR 仪;紫外可见分光光度计(U-3010),HITACHI;卤钨灯(500 W),沈阳艺沈器化玻站;凝胶成像仪 UNIVERSAL HOOD II-S.N. 76S/03822, BIO-RAD。

1.3 主要试剂及培养基

EMA (美国 Sigma 公司;溶于 ddH₂O 配制 1 g/L 的 EMA 储存液, -20 °C 避光保存);脱氧胆酸钠(溶于 ddH₂O 中制成 50 g/L 的储存液, 4 °C 避光保存);胰胨肉汤培养基(蛋白胨 2%, NaCl 4%, 0.01% 的结晶紫 0.5%, pH 8.0);DNA marker (TaKaRa 公司, 1 000 bp marker)。

1.4 EMA-PCR 检测中 EMA 抑制死菌细胞 DNA 扩增的最低浓度的确定

挑取保藏在 3.5% 氯化钠三糖铁琼脂培养基中的副溶血性弧菌菌株(ATCC 17802)接种至新鲜无

菌的胰胨肉汤液体培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡培养过夜。

取 0.5 mL 浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的热致死^[11](95 °C, 10 min)的副溶血性弧菌菌悬液于 1.5 mL 离心管中,加入 0.1 g/L 的 EMA,使 EMA 终浓度分别为 0、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、4.8、5.6 mg/L,混匀并黑暗室温下放置 5 min,然后将离心管开盖放置于冰上,距离 500 W 卤钨灯管约 16 cm,光照 30 min,每 5 min 补充一次冰,防止温度升高^[12]。然后,煮沸法抽提 DNA^[13],进行 PCR 扩增,扩增片段大小为 449 bp,扩增产物用含有 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下拍照记录结果^[14-15]。结果为后续优化试验中 EMA 的初始浓度提供参考值。

1.5 脱氧胆酸钠在 SD-EMA-PCR 检测中最适浓度的确定

取浓度为 1.0×10^8 CFU/ML 的活菌菌悬液 0.5 mL 至离心管中,从储存液中取脱氧胆酸钠加入细胞悬液中,使脱氧胆酸钠的终浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.6、0.8、1.0 和 2.0 g/L,并放于 35 °C 温浴 30 min。加入 EMA,其终浓度为 5.6 mg/L,进行曝光处理,抽提 DNA,进行 PCR 扩增检测。

1.6 确定 SD-EMA-PCR 体系鉴别死活细胞的 EMA 浓度范围

取热致死副溶血弧菌菌悬液 (1.0×10^8 CFU/mL) 0.5 mL 分别装入 9 支离心管中,加入脱氧胆酸钠,终浓度 0.5 g/L,于 35 °C 温浴 30 min。加入 EMA 溶液(0.1 g/L),终浓度分别达到 0、0.4、1.2、2.0、2.8、3.2、3.6、4.0、4.2 mg/L。进行曝光处理。抽提 DNA,进行 PCR 扩增检测。

于 12 支离心管中分别装入 0.5 mL 副溶血弧菌活菌菌悬液(1.0×10^8 CFU/mL),经脱氧胆酸钠处理后,加入 EMA 溶液(1 g/L),使 EMA 终浓度分别达到 0、2、8、16、20、28、32、34、56、

64、76、80 mg/L。进行曝光处理。抽提 DNA, 进行 PCR 扩增检测。

1.7 SD-EMA-PCR 体系中 EMA 激活光解的最佳曝光时间的确定

分别取 0.5 mL 副溶血性弧菌活菌悬液 (1.0×10^8 CFU/mL) 于 9 支离心管中, 经过脱氧胆酸钠处理后, 加入 EMA, 终浓度 3.2 mg/L。进行曝光处理, 分别光照 0、5、10、15、20、25、30、35、40 min。取热致死菌悬液以同样的步骤进行 0、10、15、18、20、23、25、28、30 min 的曝光。抽提 DNA, 进行 PCR 扩增检测。

1.8 SD-EMA-PCR 检测的灵敏度试验

将 0.5 mL 经无菌胰脏肉汤稀释的不同浓度 (1.0×10^0 – 1.0×10^8 CFU/mL) 的活菌悬液置于 9 支离心管中, 经过脱氧胆酸钠处理后, 加入终浓度 3.2 mg/L 的 EMA, 曝光 25 min。抽提 DNA, 进行 PCR 扩增和电泳检测, 验证其灵敏度。

1.9 副溶血性弧菌死活细胞混合体系的 SD-EMA-PCR 扩增

将 0.25 mL 热杀死细胞菌悬液 (1.0×10^8 CFU/mL) 混合于 0.25 mL 经无菌胰脏肉汤稀释的不同浓度 (1.0×10^1 – 1.0×10^8 CFU/mL) 的活菌细胞悬液中。经过脱氧胆酸钠处理后, 加入终浓度 3.2 mg/L 的 EMA, 曝光 25 min。抽提 DNA, 进行 PCR 扩增和电泳检测。另用上述方法制备相同浓度梯度的混菌悬液, 加入终浓度 5.6 mg/L 的 EMA, 曝光 30 min, 进行 EMA-PCR 扩增检测。比较两者检测结果, 验证 SD-EMA-PCR 检测的有效性。

2 结果与分析

2.1 EMA-PCR 检测中 EMA 抑制死菌细胞 DNA 扩增的最低浓度

随着 EMA 浓度的不断增加, PCR 扩增条带的亮度越来越弱, 当 EMA 的终浓度 ≥ 5.6 mg/L 时, 电泳图谱上没有相应的条带出现, 即完全抑

制热致死细胞 DNA 的 PCR 扩增的最小 EMA 浓度为 5.6 mg/L (图 1)。因此在 1.5 中优化 SD-EMA-PCR 中脱氧胆酸钠浓度时 EMA 的浓度取 5.6 mg/L 为参考值。

2.2 SD-EMA-PCR 体系中脱氧胆酸钠最适浓度

由图 2 可知, 在 EMA 终浓度是 5.6 mg/L 时, 随着脱氧胆酸钠量的增加, 扩增条带呈现由明到暗的变化。当脱氧胆酸钠终浓度 >0.5 g/L 时, 扩增条带开始变暗, 说明脱氧胆酸钠开始对活细胞产生破坏作用, 致使活细胞的 DNA 与 EMA 相结合, 抑制了活细胞 DNA 的 EMA-PCR 扩增; 当脱氧胆酸钠浓度 ≤ 0.5 g/L 时各浓度均在不同程度上对死细胞 DNA 的 EMA-PCR 扩增产生抑制作用, 但并不影响活细胞。因此在 SD-EMA-PCR 体系中最适宜脱氧胆酸钠浓度为 0.5 g/L。

2.3 SD-EMA-PCR 检测体系区分死活细胞的 EMA 浓度范围

当脱氧胆酸钠的终浓度为 0.5 g/L, 随着 EMA 浓度的增加, 死菌细胞 DNA 扩增被抑制, 显示出条带的亮度逐渐减弱(图 3)。在 EMA 的终

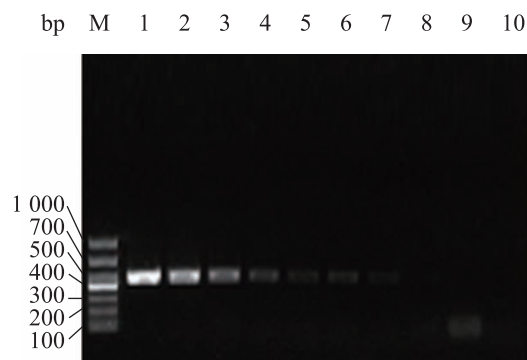


图 1 不同浓度的 EMA 对死细胞 DNA 扩增的抑制效果
Fig. 1 Effect of the different concentration of EMA on amplification of DNA from dead cells

注: M: 1 000 bp marker. 1–9: EMA 浓度分别为 0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8 和 5.6 mg/L; 10: 阴性对照(不加模板 DNA)。

Note: M: 1 000 bp marker. The EMA concentrations of lanes 1–9 were 0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8 and 5.6 mg/L, respectively; 10: Negative control without DNA template.

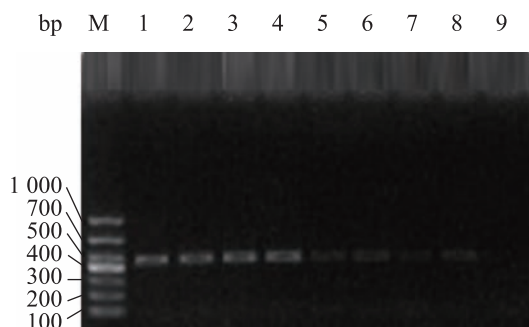


图 2 不同浓度的脱氧胆酸钠对 SD-EMA-PCR 检测结果的影响

Fig. 2 Effect of the different concentration of sodium deoxycholate to SD-EMA-PCR amplification of DNA from viable cells

注: M: 1 000 bp marker. 1-8: 脱氧胆酸钠浓度分别为 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 和 2.0 g/L; 9: 阴性对照(不加模板 DNA).

Note: M: 1 000 bp marker. The SD concentrations of lanes 1-8 were 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 and 2.0 g/L respectively; 9: Negative control without DNA template.

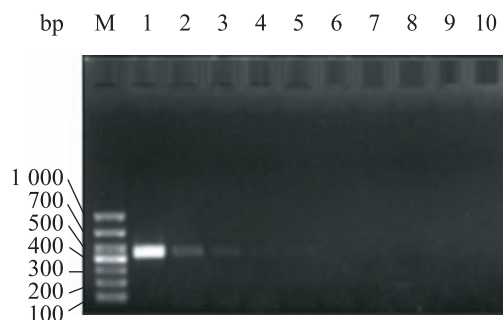


图 3 不同浓度的 EMA 对 SD-EMA-PCR 扩增死菌细胞 DNA 的影响

Fig. 3 Effect of the different concentration of EMA to SD-EMA-PCR amplification of DNA from dead cells

注: M: 1 000 bp marker. 1-9: EMA 浓度分别为 0, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0 和 4.2 mg/L; 10: 阴性对照(不加模板 DNA).

Note: M: 1 000 bp marker. The EMA concentrations of lanes 1-9 were 0, 0.4, 1.2, 2.0, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0 and 4.2 mg/L respectively; 10: Negative control without DNA template.

浓度达到 3.2 mg/L 时, 电泳检测时没有相应的扩增条带出现, 此时死细胞的扩增完全被抑制。

脱氧胆酸钠浓度不变, 随着 EMA 浓度的增加, 部分活细胞 DNA 的 PCR 扩增也会被抑制(图 4)。

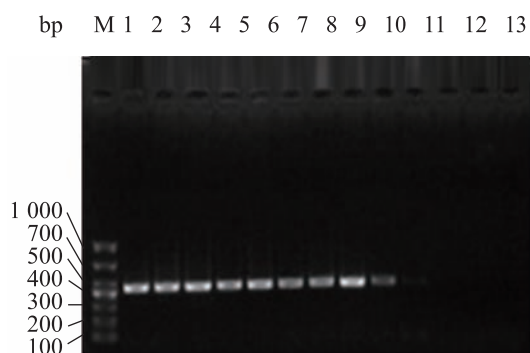


图 4 不同浓度的 EMA 对 SD-EMA-PCR 扩增活细胞 DNA 的影响

Fig. 4 Effect of the different concentration of EMA to SD-EMA-PCR amplification of DNA from viable cells

注: M: 1 000 bp marker. 1-12: EMA 浓度分别为 0, 2, 8, 16, 20, 28, 32, 34, 56, 64, 76, 80 mg/L; 13: 阴性对照(不加模板 DNA).

Note: M: 1 000 bp marker. The EMA concentrations of lanes 1-12 were 0, 2, 8, 16, 20, 28, 32, 34, 56, 64, 76, 80 mg/L respectively; 13: Negative control without DNA template.

当 EMA 终浓度 ≤ 34 mg/L 时, 条带的亮度基本没有变化, 即 EMA 的加入并没有对活细胞 DNA 扩增产生影响; 当 EMA 终浓度 > 34 mg/L 时, 条带的亮度逐渐变暗。表明脱氧胆酸钠处理后, EMA 终浓度 > 34 mg/L 时活细胞 DNA 的扩增被抑制。因此在 SD-EMA-PCR 体系中, EMA 可有效抑制死细胞 DNA 扩增且不抑制活细胞 DNA 扩增的最佳浓度范围是 3.2-34.0 mg/L。

2.4 SD-EMA-PCR 体系中 EMA 激活光解的最佳曝光时间

经终浓度 0.5 g/L 的脱氧胆酸钠和 3.2 mg/L 的 EMA 处理后, 随着曝光时间的延长, 副溶血性弧菌活细胞 DNA 的 PCR 扩增条带不会随着曝光时间的变化而变化(图 5A), 而死细胞的 PCR 扩增条带随着曝光时间延长, 其条带亮度减弱明显。当曝光时间 ≥ 25 min 时, 死细胞 DNA 的 PCR 扩增完全被抑制(图 5B)。因此脱氧胆酸钠处理后, EMA 能够区分死活细胞的最佳曝光时间是 25 min。

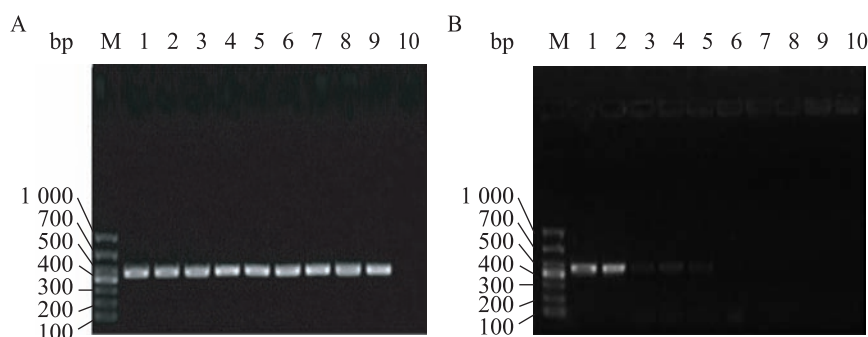


图 5 EMA 激活光解的最佳曝光时间的确定

Fig. 5 Optimization of light exposure time to activate and photolyse EMA

注: A: EMA 的曝光时间对活细胞 DNA 扩增的影响; B: EMA 的曝光时间对死细胞 DNA 扩增的影响。M: 1 000 bp marker; A: 1-9: 曝光 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 和 40 min 后的 PCR 凝胶电泳图; B: 1-9: 曝光 0, 10, 15, 18, 20, 23, 25, 28 和 30 min 后的 PCR 凝胶电泳图; 10: 阴性对照(不加模板 DNA)。

Note: A: Effect of the light exposure time of EMA on amplification of DNA from viable cells; B: Effect of the light exposure time of EMA on amplification of DNA from dead cells. M: 1 000 bp marker; A: The light exposure time of lanes 1-9 were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min respectively; B: The light exposure time of lanes 1-9 was 0, 10, 15, 18, 20, 23, 25, 28 and 30 min respectively; 10: Negative control without DNA template.

2.5 SD-EMA-PCR 检测的灵敏度评价

结果表明, 随着活菌细胞数目的减少, SD-EMA-PCR 检测的 449 bp 的特异性扩增条带也逐渐减弱, 当活菌浓度为 1.0×10^0 CFU/mL 时, 不再出现 PCR 条带, 所以 SD-EMA-PCR 方法检测副溶血性弧菌活细胞的检出限是 10 CFU/mL (图 6)。

2.6 副溶血性弧菌死活细胞混合体系的 SD-EMA-PCR 检测

SD-EMA-PCR 扩增混合菌中活菌结果如图 7A 所示, EMA-PCR 扩增混合菌中活菌的结果如图 7B 所示。随着活菌细胞数目的减少, PCR 扩增的特异性条带也逐渐减弱。图 7B 中相应条带的亮度均高于图 7A, 说明脱氧胆酸钠的处理消除了 EMA-PCR 检测时漏检的死菌造成偏高的 PCR 检测结果, 减小了扩增结果假阳性的出现率。

3 讨论

本文通过向 EMA-PCR 鉴别副溶血性弧菌的

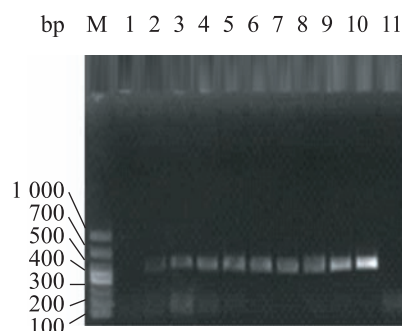


图 6 SD-EMA-PCR 的灵敏度检测结果

Fig. 6 Sensitivity of amplification results by SD-EMA-PCR

注: M: 1 000 bp marker. 1-10: 活菌数量分别是 1.0×10^0 、 1.0×10^1 、 1.0×10^2 、 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 CFU/mL; 11: 阴性对照(不加模板 DNA)。

Note: M: 1 000 bp marker. The viable cells concentrations of lanes 1-10 were 1.0×10^0 , 1.0×10^1 , 1.0×10^2 , 1.0×10^3 , 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 0.5×10^6 , 1.0×10^7 , 1.0×10^8 CFU/mL respectively; 11: Negative control without DNA template.

死活菌细胞的检测体系中加入表面活性剂脱氧胆酸钠, 增加 EMA 对死活细胞的分辨效果, 建立 SD-EMA-PCR 检测体系区分副溶血性弧菌死活细胞。扩增混合菌时 SD-EMA-PCR 扩增的电泳条带的亮度明显低于 EMA-PCR 的扩增结果, 验证了脱氧胆酸钠可以剔除 EMA-PCR 中漏检死

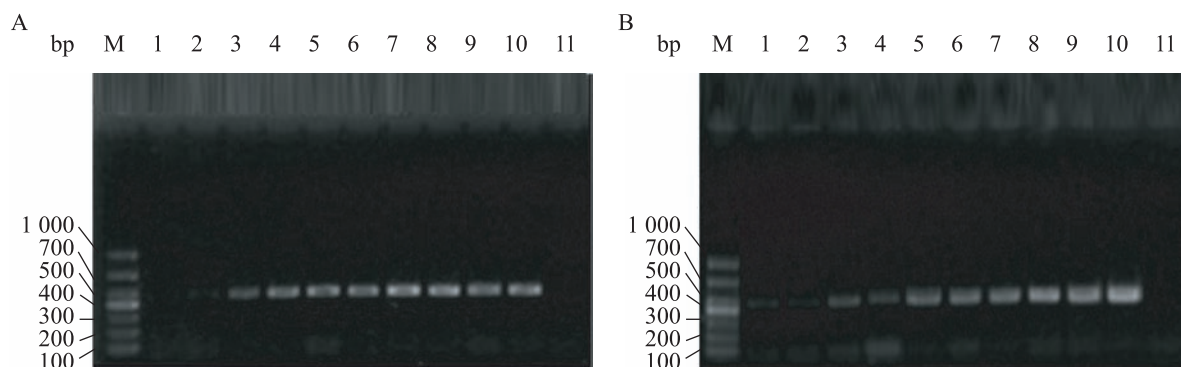


图 7 SD-EMA-PCR 扩增混合菌中活菌 DNA 结果

Fig. 7 Amplification of the viable cells from a mixture of viable and dead cells by SD-EMA-PCR

注: A: SD-EMA-PCR 扩增混合菌的结果; B: EMA-PCR 扩增混合菌的结果. M: 1 000 bp marker. 1–9: 活菌数量分别是 1.0×10^1 、 1.0×10^2 、 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 0.5×10^5 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 CFU/mL; 10: 阳性对照; 11: 阴性对照.

Note: A: SD-EMA-PCR amplification of the DNA from a mixture of viable and dead cells; B: EMA-PCR amplification of the DNA from a mixture of viable and dead cells. M: 1 000 bp marker. 1–9: The viable cells concentration was 1.0×10^1 , 1.0×10^2 , 1.0×10^3 , 1.0×10^4 , 0.5×10^5 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 , 1.0×10^8 CFU/mL respectively; 10: Positive control; 11: Negative control without DNA template.

菌对检测结果的影响。该方法在 EMA-PCR 的基础上进一步增加了副溶血性弧菌死活细胞的鉴别效果, 减小了结果的假阳性, 为实际样品中副溶血性弧菌检测技术的完善提供了一种新思路和新手段。

EMA-PCR 检测时, EMA 终浓度大于 5.6 mg/L 时电泳检测结果显示死菌 DNA 的 PCR 扩增被抑制(图 1), 但加入脱氧胆酸钠后 EMA 终浓度为 3.2 mg/L 时就可以抑制死菌的扩增(图 3)。表明脱氧胆酸钠的加入不仅能够减少结果假阳性的出现, 而且能降低 EMA-PCR 检测成本。

刘月萍等^[16]试验结果显示, 死菌用 500 W 卤钨灯进行 20 min 光照, 其 EMA-PCR 就能够被抑制扩增, 与本实验曝光时间 25 min 抑制死菌的结果相接近(见图 5B)。李青等^[17]用 650 W 卤素灯光照, 当曝光时间于 5–10 min 之间即可产生对死菌的抑制作用。伦镜盛等^[18]用碘钨灯进行曝光也仅需 10 min 即可使 EMA 光解。由此可见, EMA 光解所用时间的不同可能与光照时选用的灯具及其功率大小, 以及灯具使用时间长短有关。因此

在实际样本检测中要注意灯具的选择, 建议选用碘钨灯, 并定期更换灯具。

Lee 和 Levin^[19]曾用叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)代替 EMA 进行死活细胞区分的检测方法, 与 EMA 相比, PMA 的特点在于它无法穿透细胞膜, 因此不会像 EMA 一样既抑制死细胞扩增, 也会降低活细胞的扩增效率。但对于细胞膜裂解不充分的死细胞的检出, 加入一定浓度的表面活性剂依然是一条有效途径。

参 考 文 献

- [1] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(3): 403–431.
- [2] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学[M]. 河北: 河北科技出版社, 2003: 609–622.
- [3] 葛菲菲, 徐锋, 沈莉萍, 等. 副溶血性弧菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 229–232.
- [4] 李正义, 贾俊涛, 祝素珍, 等. 细菌活的非可培

- 养状态的分子生物学检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 308-311.
- [5] Soejima T, Iida KI, Tian Q. Method to detect only live bacteria during PCR amplification[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(7): 2305-2313.
- [6] 刘彩娟. 表面活性剂的应用与发展[J]. 河北化工, 2007, 30(4): 20-21.
- [7] 刘宏, 余再军, 刘明, 等. 表面活性剂对两性霉素 B 溶解行为的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(5): 411-413.
- [8] 李正卿, 马捷. 构建组织工程瓣膜支架中3种去垢剂的比较[J]. 中国组织工程研究与临床修复, 2010, 14(8): 1349-1352.
- [9] Lee JL, Levin RE. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(2): 184-188.
- [10] 王建国, 江黎丽, 惠飞, 等. 脱氧胆酸钠与支撑磷脂双层膜作用的电化学研究[J]. 化学学报, 2007, 65(3): 239-245.
- [11] 祝儒刚, 吕淑霞, 刘月萍, 等. 基于 DNA 染料 EMA 的 PCR 技术检测鉴别副溶血性弧菌死活细胞[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(7): 145-146.
- [12] Lee JL, Levin RE. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 456-462.
- [13] 沈德新, 封志纯, 杜江. 细菌 DNA 提取方法比较[J]. 中原医刊, 2004, 31(10): 21-22.
- [14] 刘琦, 周德庆, 柳淑芳, 等. PCR 快速检测水产品中副溶血性弧菌的方法研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 490-493.
- [15] 张经纬. 聚合酶链式反应(PCR)技术[J]. 重庆师专学报, 1994(2): 56-57.
- [16] 刘月萍. 副溶血性弧菌辐射效应的 PCR、双重 PCR 及 EMA-PCR 检测[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2010.
- [17] 李青, 钟青萍, 王丽. EMA 结合 PCR 技术有效鉴别副溶血弧菌死活细胞[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(1): 108-111.
- [18] 伦镜盛, 夏常艳, 罗鹏, 等. 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测技术的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 952-956.
- [19] Lee JL, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(1): 93-96.