

液相基因芯片法同时检测3种食源性病原菌

郭启新¹, 张 蕾¹, 张柏棋², 赵浩军¹, 韩 勤¹, 毛永杨¹, 彭飞进¹, 李苏龙^{3,*}

(1.大理州质量技术监督综合检测中心, 云南 大理 671000; 2.辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001;

3.黑龙江出入境检验检疫局, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 目的: 建立一种能同时检测3种食源性病原菌的液相基因芯片方法。方法: 针对金黄色葡萄球菌23S rDNA、志贺氏菌*iapH*、单核增生李斯特氏菌*iap*基因分别设计引物和探针, 通过多重聚合酶链式反应扩增获得大小为246、112bp和174bp的目的片段; 将探针偶联到编码微球上, 制成基因芯片, 与目的片段进行杂交, 建立3种食源性病原菌的液相基因芯片方法; 并评价该方法的特异性、灵敏度。结果: 建立的液相基因芯片检测方法特异性好、灵敏度高。对金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特氏菌、志贺氏菌的检测灵敏度分别为38、44、21CFU/mL。结论: 成功建立了3种致病菌的液相基因芯片检测方法。

关键词: 液相基因芯片; 金黄色葡萄球菌; 单核增生李斯特氏菌; 志贺氏菌

Development of Liquid Gene Chip for Simultaneous Detection of Three Species of Pathogenic Bacteria

GUO Qi-xin¹, ZHANG Lei¹, ZHANG Bai-qi², ZHAO Hao-jun¹, HAN Qin¹, MAO Yong-yang¹, PENG Fei-jin¹, LI Su-long^{3,*}

(1. Dali Quality and Technical Comprehensive Supervision Testing Center, Dali 671000, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

Abstract: Objective: To establish a method for simultaneous detection of three species of foodborne pathogenic bacteria using liquid gene chips. Method: Three sets of specific primers and probes were designed according to the gene 23S rDNA of *Staphylococcus aureus*, the gene *iap* of *Listeria monocytogenes* and the gene *ipaH* of *Shigella* spp. The multiple PCR reaction systems gave rise to target fragments of 246, 112 bp and 174 bp, respectively. The target fragments were captured by microspheres coupled with the gene-specific probes, finally establishing liquid gene chips. Results: The method was highly sensitive and specific. The sensitivity for *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella* spp. were 38, 44 CFU/mL and 21 CFU/mL, respectively. Conclusion: We here report a novel detection assay using liquid gene chips for three foodborne pathogenic bacteria, which provides a high-throughput system for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria.

Key words: liquid gene chip; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Shigella* spp.

中图分类号: Q93.331

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0191-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316038

食品安全问题是关系到人类健康和国计民生的重大问题, 其中食源性疾病是食品安全领域面临的主要问题。目前, 对一些病原菌的检测, 主要依赖于传统的细菌学培养方法, 该方法大多采用常规的生化反应、血浆凝固酶实验、血清学鉴定^[1-3]。国内外已经建立了单增李斯特氏菌的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法^[4]。姜永强等^[5]在应用PCR扩增方法对单增李斯特氏菌进行鉴定的基础上, 用微孔板杂交法检测单增李斯特氏菌溶血素编码基因*hlyA*片段, 使检测特异性和敏感性大大提高, 通过化学抽提的方法制备模板, 可

较好地避免食物成分的抑制。固相基因芯片技术可以在同一时间内平行分析大量的基因^[6-7]。靳连群等^[8]运用寡核苷酸微阵列技术, 同时快速检测了沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、蜡样芽孢杆菌、志贺氏菌等11个菌属的常见肠道病原菌, 检测特异性高达96.2%。以上检测方法繁琐, 费时耗力, 样品制备比较复杂, 难以满足当今经济全球化形势下食品快速流通的需要, 因此研究简便、快速、灵敏、特异、高通量的食源性病原菌检测技术迫在眉睫。

液相芯片是20世纪90年代中期由美国Luminex公

收稿日期: 2012-07-25

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2009IK161)

作者简介: 郭启新(1982—), 男, 助理工程师, 硕士, 研究方向为食品污染物限量检测。E-mail: gqx071@yahoo.cn

*通信作者: 李苏龙(1966—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为食品微生物检验。E-mail: lisulong2002@yahoo.com.cn

司开发的多功能多指标同步分析(flexible multi-analyte profiling, xMAP)技术^[9]。Luminex液相芯片在国外研究较成熟,应用范围也较广,在国内主要用于微生物检验、临床检验和诊断,将液相基因芯片应用于农药、兽药分析等领域正在成为科研及临床的重要检测平台^[10-13]。通过将探针与PCR产物进行杂交,以编码微球作为载体,流式细胞仪作为检测平台,采用两束相互交叉的激光测定色标微球,红色激光用来激发微球本身的荧光,对鉴定微球的编码起到定性的作用,绿色激光检测微球上报告分子(绿色荧光染料)的荧光强度,从而对反应杂交体进行定量^[14-15]。该技术具有高通量、高速度、低成本、准确性高、重复性好、灵敏度高、操作简便、既能检测蛋白又能检测核酸等优点。因此,本研究以多重PCR技术为基础,以芯片技术为手段,以常见的食源性致病菌的特异性序列为检测目标,旨在建立一套新型致病菌液相芯片检测技术,为食源性致病菌检测提供一种高通量检测途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标准菌株志贺氏菌(CMCC51592)、单核增生李斯特杆菌(CMCC54002)、金黄色葡萄球菌(CMCC26003)、创伤弧菌(ATCC27562)、溶藻弧菌(ATCC17749)、霍乱弧菌(93-3)、鼠伤寒沙门菌(ATCC35640)、副溶血弧菌(ATCC17802)均由黑龙江出入境检验检疫局和大理州质量技术监督综合检测中心收藏保存。

DNA提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; TaKaRa Taq酶(5U/μL)、10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus)、dNTP Mixture(各2.5mmol/L)、上下游引物(各10pmol/L)、6×Loading Buffer、DL2000DNA Marker 宝生物工程(大连)有限公司; 96孔超滤板 美国Millipore公司; 氯化四甲胺(TMAC)、鞘液、羧基化编码微球(编号46、51、52,直径为5.5μm) 美国Luminex公司; 链霉亲和素化的藻红蛋白(SA-PE)、校正液(Call1、Call2、Con1、Con2) 上海透景生命科技公司; 阳性对照和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 仪器与设备

22331Hamburg梯度PCR仪 德国Eppendorf公司; Image Quant300凝胶成像系统 美国GE公司; BG-600水平电泳仪 广州新化公司; HFsafe-1500型生物安全柜 上海力申科学仪器厂; 液相芯片仪 美国Luminex公司; Milli-Q纯水机 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针的设计与合成

查找相关资料,选取3种目的菌的靶基因,从GenBank数据库下载相关基因序列,用Primer Premier 5.0

软件设计特异性引物和探针,在探针5'末端加上6个T的连接臂并进行氨基化修饰,以利于核酸杂交、探针和微球共价交联。设计的引物和探针见表1。

表1 特异性引物和探针设计
Table 1 Design of specific primers and probe

菌种(目的基因)	探针、引物序列	片段大小/bp
金黄色葡萄球菌 (23S rDNA)	23Spb: 5'-amino-TTTTTTAGGACGACATTAGACGAATCAp-3'	246
	23Spf: 5'-biotin-GCACACCCGGAGAACTGAAAC-3'	
	23Spr: 5'-biotin-CCGTCGTA CTGAGGATCCACTC-3'	
单增李斯特氏菌 (iap)	iappb: 5'-amino-TTTTTTATACGATAACATCCACGGCp-3'	174
	iappf: 5'-biotin-CTGAATCTCAAGCAAACCTGGT-3'	
	iappr: 5'-biotin-CGCGACCGA AGCCAAC TA-3'	
志贺氏菌 (ipaH)	ipapb: 5'-amino-TTTTTTAGCAAATGACCTCCGCACTp-3'	112
	ipapf: 5'-biotin-AAATGCGTTTCTATGGCGTGT-3'	
	ipapr: 5'-biotin-CCCCAGAGGGAGAACCACTC-3'	

1.3.2 多重PCR退火温度的优化

多重PCR初始反应条件: 94℃、4min; 94℃、10s, 55℃、30s, 72℃、30s, 30个循环; 72℃、7min。初始反应体系50μL: Taq酶(5U/μL)0.5μL; 10×PCR Buffer(Mg²⁺)5.0μL; dNTP Mixture 6.0μL; 3种菌的上下游引物各1.0μL; DNA基因组各1.0μL。将退火温度分别设为50.0、52.8、55.4、57.8、59.9℃,分析扩增后的电泳图,确定最佳退火温度。

1.3.3 微球与探针的偶联

微球与探针交联委托上海透景生命科技公司,微球的选择应按Luminex公司的推荐,使色标微球的搭配最优化,微球和探针的对应关系见表2。偶联程序:吸取5.0×10⁶微球(约200μL)至棕色EP管中,8000r/min离心微球1~2min,弃上清液;加入50μL 0.1g/mol的2-(N-吗啉代)乙磺酸(pH4.5),悬摇、超声处理20s;加2μL 0.1nmol/μL(表2)相对应的特异性探针至重悬微球中,振荡以混匀;向每个交联反应中依次加入2.5μL新鲜配制的10mg/mL的1-乙基-3-3-二甲基氨基丙基碳化二亚胺,振荡混匀,避光、室温放置30min;向微球中加入1.0mL 0.02% Tween-20,8000r/min离心微球1~2min,弃上清液;用1.0mL 0.1%的十二烷基硫酸钠重悬微球,8000r/min离心微球1~2min,弃上清液,用100μL TE(pH8.0)悬摇、振荡20s以重悬微球,避光储存于2~8℃冰箱3个月。

表2 微球编码与探针的对应关系
Table 2 Microspheres and corresponding probes

微球编码	对应菌特异性探针	探针合成号
46	Sta	6952
51	Lm	6953
52	Shi	6954

注: Sta. 金黄色葡萄球菌; Lm. 单增李斯特氏菌; Shi. 志贺氏菌。下同。

1.3.4 目标基因与探针杂交检测

用1.5×TMAC杂交液将各组微球稀释至150个/μL; 样品反应管、阳性对照管、空白对照管各加入20μL混合

微球工作液；向每个阳性对照管加入3μL已生物素化的探针互补寡核苷酸序列(10pmol/L)，向其他每管加入3μL已生物素化的PCR扩增产物，每管补加7μL TE Buffer，混匀，置于PCR仪中，95℃变性5min，54℃杂交25min；配制新鲜的荧光显色液：1×TMAC杂交液将链霉亲和素-藻红蛋白配成1μg/mL；每管加入80μL显色液，混匀，在杂交温度条件下静置20min；迅速吸取80μL移入96孔V形底的PCR板中，放入液态芯片仪内进行检测。

1.3.5 杂交条件的优化

初始杂交反应体系：多重PCR产物3μL、TE缓冲液7μL、微球稀释液20μL。

1.3.5.1 多重PCR产物加入量对检测结果的影响

在其他杂交反应条件完全相同的前提下，分别加入1、2、3、4、5μL和6μL多重PCR反应产物，TE缓冲液7μL，微球稀释液20μL，考察多重PCR产物对检测结果的影响。

1.3.5.2 杂交温度对检测结果的影响

在其他杂交反应条件完全相同的前提下，将杂交温度分别设在45、48、51、54、57℃和60℃，杂交25min，考察杂交温度对检测结果的影响。

1.3.5.3 杂交时间对检测结果的影响

在其他杂交反应条件完全相同的前提下，将杂交温度设为54℃，杂交时间分别设为15、20、25、30、35min和40min，考察杂交时间对检测结果的影响。

1.3.6 特异性实验

取3种标准目的菌和沙门氏菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌，创伤弧菌5种非目的菌的PCR产物进行检测，验证液相芯片检测方法的特异性。

1.3.7 重复性实验

取3种标准目的菌多重PCR产物，在相同的实验条件下重复5次，并对结果进行分析，验证本方法的重复性。

1.3.8 灵敏度实验

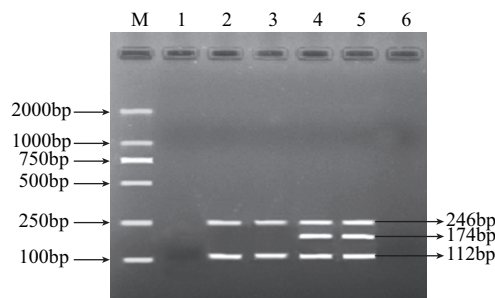
分别取金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、志贺氏菌各标准菌株的纯培养物，用灭菌去离子水进行10倍系列稀释，得到 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-10}$ 不同稀释梯度的菌悬液，各稀释倍数的菌悬液各取1mL涂平板并进行菌落计数，在各稀释度取1mL菌液提取模板DNA分别进行常规PCR和多重PCR扩增。然后利用液相基因芯片方法对扩增产物进行检测，同时将剩余的PCR产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳，观察电泳条带的有无及明亮程度，以验证液相基因芯片检测方法的灵敏度。

1.3.9 人工模拟污染实验

将目标菌的标准菌株菌悬液随机人工污染牛奶、饮料、海鲜制品各20份，其中每份样品都有5个随机被污染，其余15个未被污染的样品作为杂交检测的本底对照。然后进行DNA提取和多重PCR扩增，将扩增产物进行液相基因芯片杂交，检测其荧光强度。另外设计2个超纯水对照组。

2 结果与分析

2.1 多重PCR退火温度的优化



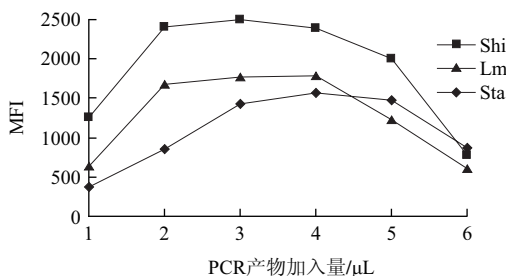
M. DL2000 Marker; 1~5. 退火温度分别为50.0、52.8、55.4、57.8、59.9℃；6.空白对照。

图1 多重PCR退火温度的优化结果

Fig.1 Optimization results for multiplex PCR annealing temperature

由图1可知，在退火温度为50.0℃时3种目的菌都没有特异性片段扩增，退火温度调到52.8℃和55.4℃时金黄色葡萄球菌和志贺氏菌都有明亮的特异性条带，退火温度调至57.8℃和59.9℃时3种目的菌都有明亮的特异性条带出现，因此确定退火温度为58.0℃。

2.2 多重PCR产物加入量对检测结果的影响



Shi. 志贺氏菌；Lm. 单增李斯特氏菌；Sta. 金黄色葡萄球菌。下同。

图2 多重PCR产物加入量对检测结果的影响

Fig.2 Effect of the dosage of multiplex PCR amplification products on results of detection of pathogenic bacteria

由图2可知，荧光强度先随多重PCR产物加入量的增加而增大，单增李斯特氏菌和志贺氏菌在2~4μL，金黄色葡萄球菌在3~5μL时的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)稳定且达到最大值，这一稳定区称为最适浓度区^[16]，随后随PCR产物加入量的增加MFI降低。本方法综合考虑3种菌的杂交情况，选择多重PCR加入量为3μL。

2.3 杂交温度对检测结果的影响

由图3可知，志贺氏菌在杂交温度为51℃时，MFI最大，在杂交温度54℃时MFI仍有较高值；金黄色葡萄球菌和单增李斯特氏菌在杂交温度为54℃时，MFI都达到最大。最终确定3种致病菌的杂交温度为54℃。

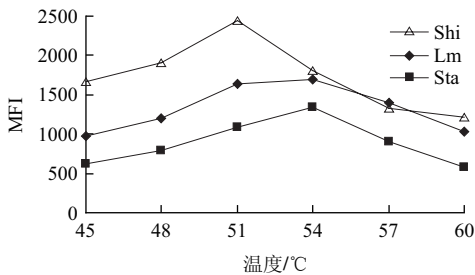


图3 杂交温度对检测结果的影响

Fig.3 Effect of hybridization temperature on results of detection of pathogenic bacteria

2.4 杂交时间对检测结果的影响

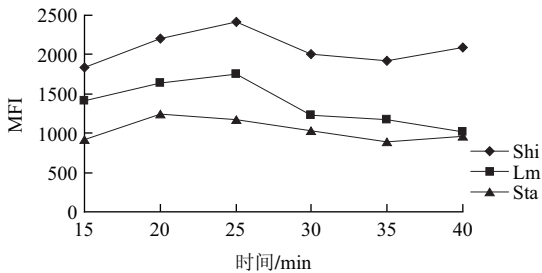


图4 杂交时间对检测结果的影响

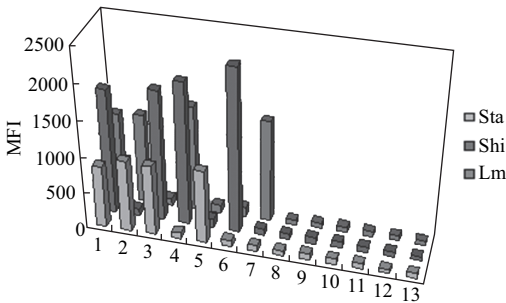
Fig.4 Effect of hybridization time on results of detection of pathogenic bacteria

由图4可以看出, 志贺氏菌和单增李斯特氏菌杂交25min时MFI最大, 金黄色葡萄球菌杂交20min时MFI值最大, 在25min时MFI值有所下降, 但不会影响阳性结果的判定, 故选择杂交25min作为3种目标菌的最佳杂交时间。

2.5 液相基因芯片检测体系的建立

对多重PCR产物进行杂交检测, 本方法规定的阳性结果为阴性对照管3倍信噪比, 建立的液相基因芯片检测体系对金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌和志贺氏菌的信噪比分别为36.15、29.21和47.73。因此, 金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌和志贺氏菌荧光强度信号值明显高于108.45、87.63和143.19, 表明是有效阳性结果。

2.6 特异性实验



1.金黄色葡萄球菌+志贺氏菌+单增李斯特氏菌; 2.金黄色葡萄球菌+单增李斯特氏菌; 3.金黄色葡萄球菌+志贺氏菌; 4.志贺氏菌+单增李斯特氏菌; 5.金黄色葡萄球菌; 6.志贺氏菌; 7.单增李斯特氏菌; 8.沙门氏菌; 9.创伤弧菌; 10.霍乱弧菌; 11.溶藻弧菌; 12.副溶血弧菌; 13.空白对照。

图5 特异性检测结果

Fig.5 Specificity of the liquid gene chips

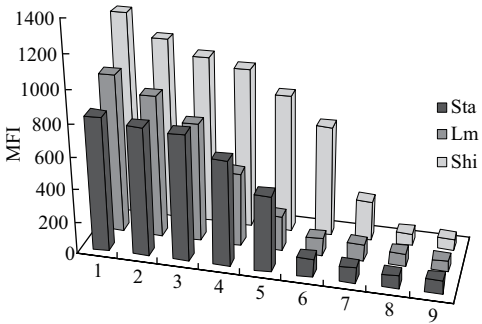
在最优的杂交条件下, 将3种致病菌按照不同组合进行PCR扩增、液相芯片仪检测, 结果如图5所示。表明对3株目的菌株的检测结果均为阳性, 而对于非目的菌的扩增产物的检测值均为阴性, 且不存在交叉反应。说明建立的液相基因芯片法具有很强的特异性。

2.7 重复性实验

多重PCR扩增后, 用所建立的液相基因芯片方法重复进行5次检测, 用以验证该方法的重复性。计算各批次间检测的标准方差(S)和平均荧光强度的变异系数(CV), 结果显示各个变异系数均在3%以内(表3), 表明该方法具有良好的重复性和稳定性。

表3 液相芯片的重复性实验结果			
Table 3 Repeatability of the liquid gene chips			
项目	目标菌		
	金黄色葡萄球菌	单增李斯特氏菌	志贺氏菌
S	25	21	20
MFI	934	1347	1900
CV/%	2.6	1.6	1.1

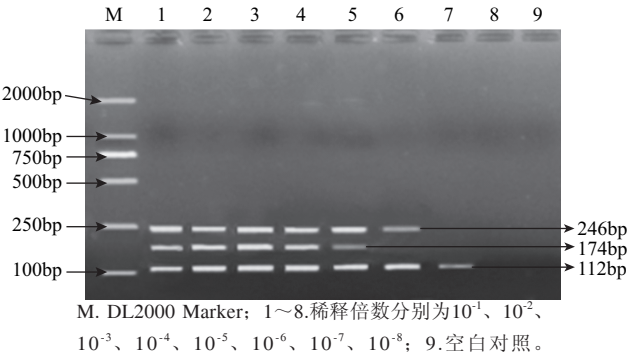
2.8 灵敏度实验



1~8. 稀释倍数分别为 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} ; 9.空白对照。

图6 液相基因芯片的灵敏度检测结果

Fig.6 Sensitivity of the liquid gene chips



M. DL2000 Marker; 1~8. 稀释倍数分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ; 9.空白对照。

图7 多重PCR的灵敏度检测结果

Fig.7 Sensitivity of multiple PCR

取金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌、志贺氏菌各标准菌株的纯培养物不同稀释度制备的模板DNA, 分别加入3对引物进行多重PCR扩增, 将扩增产物进行液相

基因芯片杂交检测,结果如图6所示。金黄色葡萄球菌检测为阳性的菌液38CFU/mL,志贺氏菌检测为阳性的菌液21CFU/mL,单增李斯特氏菌检测阳性菌液44CFU/mL。对各目的基因进行多重PCR琼脂糖凝胶电泳,结果如图7所示,多重PCR检测单增李斯特氏菌灵敏度470CFU/mL、志贺氏菌240CFU/mL、金黄色葡萄球菌380CFU/mL。志贺氏菌在稀释度为 10^8 处没有条带,而液相基因芯片法有较强的荧光强度值,单增李斯特氏菌在稀释度为 10^5 处多重PCR电泳图有较弱的条带,而液相基因芯片有很强的信号,表明液相基因芯片方法较多重PCR法具有更强的灵敏性。

2.9 人工模拟污染实验

应用建立的液相基因芯片体系检测62个随机编号的人工模拟污染样品,出现的阳性结果通过国家标准方法进行验证^[1-3],人工污染样品阳性检出率为100%(15/15),出现假阳性的样品奶粉2个、海鲜1个,饮料检测的准确率为100%,假阴性结果0%,与预期结果基本相符。

3 讨论

分子生物学检测方法的特异性与灵敏度主要取决于相应检测靶点的选择,常见食源性致病菌的特异性靶点一般是核糖体基因或特异性基因,以毒力基因为主。在细菌的分子鉴定中,23S rDNA基因具有重要的生物学意义,23S rDNA在细菌间的变异性较16S rDNA大,在细菌的鉴别诊断23S rDNA有一定优势^[17]。在本实验起初设计引物时,曾采用16S rDNA设计通用引物。设计通用引物容易,但同时设计特异性探针却很难,尤其液相芯片检测要求PCR扩增片段不能太大,通常小于300bp,这就限制了采用16S rDNA设计通用引物的方法。后来采用不同目标菌采用不同的靶基因。单增李斯特氏菌检测常用*hly*、*iap*基因,这两个都是毒力相关基因^[18-19],*hly*基因扩增出300~400bp的片段,片段较大,扩增出的片段杂交空间位阻较大。由于设计的探针与PCR扩增产物杂交时可能存在空间位阻,不同探针杂交时条件又不一致,往往造成实验的失败。因此,探针设计时,需要设计多套探针,然后通过实验来筛选出最适合探针。*ipaH*基因是志贺氏菌的特异序列,以*ipaH*基因为检测靶基因可以检测出全部4种志贺氏菌和少量大肠杆菌,设计引物和探针应引起注意^[20-21]。本方法设计出特异基因*iap*、23S rDNA、*ipaH*和特异性探针,在用液相基因芯片检测目标菌前,需要通过一次多重PCR进行目标菌模板的制备,所设计的特异性引物保证尽可能地扩增出预期片段,在进行基因芯片检测时,特异性核酸探针又一次保证了能与PCR扩增产物进行特异性结合,因此,液相基因芯片方法检测比多重PCR方法特异性高很多。该方法检测的线性范围宽,检测的荧光强度的CV值控制在3%内,本实

验结果均证明该方法具有良好的稳定性和重复性。

实验中发现PCR扩增后电泳条带的亮度与液相基因芯片检测结果并不是一致的,多重PCR扩增后的电泳条带亮度较弱甚至是无条带扩出时,液相基因芯片检测到的荧光强度却比较高,说明液相基因芯片检测技术要比多重PCR检测灵敏度高。

本实验建立的方法整个实验过程只需要6.5h,而国家标准方法需要4~7d才能鉴定出结果,大大缩短检测时间。对于用液相基因芯片方法检测出来的阳性结果需通过国家标准方法进行验证,以使检测结果客观。

虽然本研究在人工模拟污染实验中出现假阳性的结果,可能与实际样品基体比较复杂以及受干扰因素较多等原因有关,在实际检测中假阳性结果一定要通过国家标准方法验证。该方法具有特异性强、时间短、灵敏度高等优点,在质监部门大批量检测和检测基体较简单的食品样品方面具有一定的意义,广泛地应用到实际检测中还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] GB 4789.5—2012 食品微生物学检验:志贺氏菌检验[S].
- [2] GB 4789.10—2010 食品微生物学检验:金黄色葡萄球菌检验[S].
- [3] GB 4789.30—2010 食品微生物学检验:单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
- [4] 徐宝梁,贾建会,陈颖,等.单核细胞增生李斯特氏菌的PCR检测方法[J].食品与发酵工业,2004(6):100-103.
- [5] 姜永强,雷祥荣,李瑾,等.PCR与微孔板杂交结合检测单核细胞增生李斯特氏菌[J].中华微生物学和免疫学杂志,1998,32(1):19-20.
- [6] 杜巍.定量PCR技术在食源性致病微生物检测中的应用[J].食品科学,2006,27(4):263-268.
- [7] 曹玮,王明忠,王晓英,等.核酸检测及相关技术在食源性致病细菌快速检测中的研究[J].卫生研究,2008,37(2):120-123.
- [8] 靳连群,李君文,王升启,等.基因芯片技术检测环境中常见致病菌的初步研究[J].中华微生物学免疫学杂志,2003,23(1):78-82.
- [9] MCDAD R L, SPAIN M D. Rapid economical testing in the clinical laboratory: a new flow cytometry-based multiplex system[J]. Clin Immunol Newsletter, 1997, 17(10): 154-158.
- [10] 王蕾,吴英松,李明.液相芯片分析技术及其应用简介[J].热带医学杂志,2005,5(4):562-564.
- [11] 王建中.最新流式细胞分析技术在实验诊断中的应用[J].诊断学理论与实践,2004,3(5):310-312.
- [12] 杨洋,汤华.液相芯片技术在检验医学和生物医学中的应用[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(4):256-261.
- [13] 吴盛海,于道军.悬浮芯片技术及其在病原微生物检测中的应用[J].国际流行病学传染病学杂志,2007,34(6):418-420.
- [14] NOLAN J P, SKLAR L A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(1): 9-12.
- [15] MARTINS T B. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral-respiratory or antibody profile[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(1): 41-45.
- [16] 杨鹏欣,张子群,路义鑫,等.食品中弓形虫和旋毛虫液相基因芯片检测方法的研究[J].中国预防兽医学报,2010,32(10):777-780.
- [17] 洪帮兴,江丽芳,胡玉山,等.应用寡核苷酸芯片技术检测食源性感染常见致病菌[J].中华检验医学杂志,2005,28(2):169-174.
- [18] DAWN M N, CARL A B. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 2122-2127.
- [19] INGEBORG H, DIETER K, ANGELIKA L, et al. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay[J]. Research Microbiology, 2001, 152: 37-46.
- [20] VU D T, ORNTIPA S, LORENZVON S, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang[J]. Vietnam Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(5): 2031-2035.
- [21] 李智琼,邓尚廉,孙承谋.用检测*ipaH*基因的PCR检测志贺氏菌[J].临床检验杂志,2009,27(3):185-186.