

基于 DPO 引物特异性检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的 PCR 方法

徐义刚¹, 李丹丹², 刘忠梅¹, 吴岩¹, 李苏龙¹

摘要:目的 引入一种设计简易、特异性强、退火温度范围宽的双启动寡核苷酸引物(dual-priming oligonucleotide, DPO)设计,建立基于 DPO 引物特异性检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的 PCR 方法。方法 以小肠结肠炎耶尔森氏菌 16S-23S rRNA 基因为靶基因,设计一对 DPO 引物,经过 PCR 反应体系优化,建立小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法。测定了检测灵敏度,以常规 PCR 方法作为参照,分析 DPO-PCR 方法的特异性及退火温度。结果 建立的小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法的灵敏度为 1.43×10^2 CFU/mL;与常规 PCR 方法相比,DPO-PCR 方法在 49~69 °C 退火温度范围内均能保持高效率扩增;特异性强,所测试 17 种病原菌中,仅小肠结肠炎耶尔森氏菌为阳性结果,且无非特异性扩增。结论 DPO-PCR 方法不需要对引物参数特别是退火温度进行优化,特异性强,为致病微生物的快速准确检测提供了新方法。

关键词: 小肠结肠炎耶尔森氏菌;16S-23S rRNA;DPO-PCR

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)05-0507-05

DPO-based PCR method for specific detection of *Yersinia enterocolitica*

XU Yi-gang¹, LI Dan-dan², LIU Zhong-mei¹, WU Yan¹, LI Su-long¹

(1. Technical Centre of Heilongjiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China;

2. Technical Centre of Hainan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570125, China)

ABSTRACT: Dual-priming oligonucleotide (DPO), with characteristics of simple design, high specificity and annealing temperature insensitivity, was introduced to develop a DPO-based PCR assay for detection of *Y. enterocolitica*. A pair of DPO primers was designed based on 16S-23S rRNA of *Y. enterocolitica* as target gene, and the DPO-PCR assay for detection of *Y. enterocolitica* was established by following optimization operation of PCR reaction system. Sensitivity of the assay was determined and its specificity and annealing temperature insensitivity were analyzed using conventional PCR as a reference. Results showed that the sensitivity of the DPO-PCR assay was 1.43×10^2 CFU/mL. Compared to conventional PCR, the DPO-PCR assay can efficiently amplify the target gene in the annealing temperature range from 49 to 69 °C. The specificity of the assay was evaluated using 17 bacterial strains and only *Y. enterocolitica* was in positive result, and no nonspecific amplification was observed, showing high specificity. The DPO-PCR assay provided a new way for rapid and accurate detection of pathogens.

KEY WORDS: *Yersinia enterocolitica*; 16S-23S rRNA; DPO-PCR

Supported by the Technology Projects of the State Quality Inspection Administration (No. 2012IK157&2013IK051) and the Special Program for Scientific Research in Public Welfare Industry (No. 201310126)

Corresponding author: Li Su-long, Email: ciqlsl@aliyun.com

小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*, *Y. enterocolitica*),一种人兽共患病病原菌,具

有重要公共卫生意义^[1-5]。诊断方法有过许多探索^[6-11]。

双启动寡核苷酸引物(dual-priming oligonucleotide, DPO)是一种新型的 PCR 引物设计方法,极大地简化了常规 PCR 引物设计。DPO 引物主要由两部分组成:5'端(长 18—25 bp, $T_m > 65$ °C)和 3'端(长 6—12 bp, GC 含量 40—80%),两者间用多聚次黄嘌呤连接。DPO 引物具有两极结构,退火温度

国家质检总局科技项目(No. 2012IK157 & 2013IK051)和质检公益性行业科研专项(No. 201310126)联合资助

通讯作者:李苏龙,Email:ciqlsl@aliyun.com

作者单位:1. 黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心,哈尔滨 150001;

2. 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心,海口 570125

范围较宽,试验中无需对 PCR 退火温度进行优化。DPO 引物特异性强,其 5'端或 3'端有 3 个以上碱基发生错配,扩增反应就会终止,有效地阻断了非特异性扩增^[12-15]。本研究基于 DPO 引物建立了特异性检测 *Y. enterocolitica* 的 DPO-PCR 检测方法,为其快速准确检测提供了新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 小肠结肠炎耶尔森氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、大肠杆菌、阪崎肠杆菌、嗜水气单胞菌、空肠弯曲

菌、单核细胞增生李斯特氏菌、变形杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、粘质沙雷菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和溶血性链球菌来自美国典型菌种保藏中心(ATCC)。

1.1.2 试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIAN-GEN 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 MgCl₂ 购自 TaKaRa 公司;增菌培养基 BPW 购自北京兰伯瑞生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 以 *Y. enterocolitica* 16S-23S rRNA 基因为靶基因,选择其保守区域设计 DPO 引物(表 1),引物由上海生工公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

Primer type	Code	Sequence	Product size/bp
Conventional primer	YE-CGF	5'- CTTGTTGGGTCTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCAC-3'	289
	YE-CGR	5'- ATTTCAACAACACTGTGTCTTGCGACCGCAGTACGTT-3'	
DPO primer	YE-DPOF	5'- CTTGTTGGGTCTGTAGCTCAGGIIIIHAGAGCGCAC-3'	289
	YE-DPOR	5'- ATTTCAACAACACTGTGTCTTGCHIIICAGTACGTT-3'	

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取 试剂盒法(灵敏度试验用),具体操作详见说明书。煮沸法(特异性试验和实践检测用):取 1 mL 菌液,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 150 μ L 无菌水,混匀,沸水浴 10 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 DPO-PCR 反应体系优化: 25 μ L 反应体系: Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)用量范围 0.05~0.5 μ L,以 0.05 μ L 递增;Mg²⁺(25 mmol/L)用量范围 0.25~2.5 μ L,以 0.25 μ L 递增;dNTP(2.5 mmol/L)用量范围 0.25~2.5 μ L,以 0.25 μ L 递增。反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.2.4 DPO-PCR 退火温度不敏感性试验 退火温度范围设为 49~69 $^{\circ}$ C,进行 DPO-PCR 扩增试验,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果,同时与常规 PCR 引物进行比较。

1.2.5 DPO-PCR 灵敏度试验 将菌体浓度为 1.43 \times 10⁸ CFU/mL 的 *Y. enterocolitica* 进行 10 倍梯度稀释,利用试剂盒提取每级稀释度细菌基因组 DNA,以此作为模板进行 DPO-PCR 反应,经琼脂糖凝胶电泳分析以确定该方法的检测灵敏度。

1.2.6 DPO-PCR 特异性试验 利用建立的小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 方法检测 1.1.1 所示菌株,以验证本方法的特异性。

1.2.7 实践应用 将建立的小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法应用于检验检疫实践工作,检测结果经检验检疫行业标准(SN/T 0174-2011 出口食品小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法)复验,以验证该方法的实用性。

2 结果

2.1 DPO-PCR 检测方法的建立 以 *Y. enterocolitica* 16S-23S rRNA 基因为靶基因,设计 DPO 引物,经反应体系的优化,建立了 *Y. enterocolitica* DPO-PCR 检测方法(图 1)。反应体系为:10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.1 μ L, Mg²⁺(25 mmol/L)1.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)1.5 μ L,上/下游 DPO 引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 0.5 μ L,去离子水补充至 25 μ L。

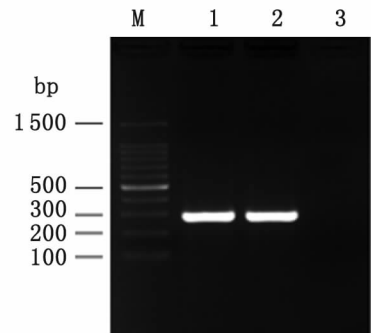


图 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法的建立 M:DNA marker 100 ladder;1-2:DPO-PCR 阳性结果;3:阴性对照。

Fig. 1 Development of DPO-PCR method for detection of *Y. enterocolitica*

M: DNA marker 100 ladder; 1-2: Positive result of DPO-PCR; 3: Negative control.

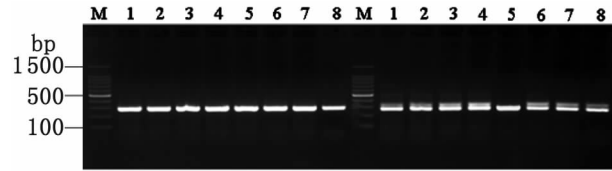


图 2 DPO 引物退火温度不敏感性

M: DNA marker 100 ladder. 1-8: 退火温度依次为 49.3 °C, 52.4 °C, 54.7 °C, 57.3 °C, 60.1 °C, 65.1 °C, 67 °C 和 69 °C; 左 1-8 为 DPO-PCR 扩增结果, 右 1-8 为常规 PCR 扩增结果。

Fig. 2 Insensitivity of annealing temperature of DPO primers

M: DNA marker 100 ladder. 1-8: Annealing temperature of 49.3 °C, 52.4 °C, 54.7 °C, 57.3 °C, 60.1 °C, 65.1 °C, 67 °C and 69 °C, respectively.

Left 1-8 were results of DPO-PCR; right 1-8 were results of conventional PCR.

2.2 DPO-PCR 退火温度不敏感性 结果显示, DPO 引物在 49~69 °C 的退火温度范围内均能够保持高效率、高特异性扩增, 表明 DPO 引物的退火温度范围较宽; 常规 PCR 引物则表现欠佳, 存在最佳退火温度(图 2)。

2.3 DPO-PCR 方法灵敏度 菌体浓度为 1.43×10^8 CFU/mL 的 *Y. enterocolitica* 经 10^6 倍稀释后, 经 DPO-PCR 方法仍能有效扩增出目的基因(图 3), 表明所建立的 DPO-PCR 检测方法的灵敏度为 1.43×10^2 CFU/mL。

2.4 DPO-PCR 方法特异性 利用建立的 DPO-PCR 方法检测 1.1.1 所示细菌, 结果显示仅 *Y. enterocolitica* 为 DPO-PCR 阳性结果, 而且无非特异性扩增产生(图 4-A); 常规 PCR 除能检测出目标菌外, 同时对个别菌株存在非特异性反应(图 4-B)。

2.5 方法实践应用 利用建立的 *Y. enterocolitica* DPO-PCR 检测方法对冻肉、鲜肉、冷藏食品和熟食等四类食品 197 份样品进行了检测, 共检出 11 份 *Y. enterocolitica* 阳性样品, 经 SN/T 0174-2011 法复验, 检测结果正确(表 2), 显示该方法具有良好的实用性。

3 讨论

小肠结肠炎耶尔森氏菌广泛存在于河流、土壤、动物、湖泊等自然环境以及人类社会环境中, 是导致人类腹泻病的重要病原菌, 在发达国家和发展中国家都有较高的流行性。该菌也是一种危害严重的食源性致病菌, 可在食物冷藏的环境中存活和繁殖, 增加了食品污染的风险。小肠结肠炎耶尔森氏菌血清型较多, 不同国家和地区间的致病菌株血清型分布亦存在显著差异, 因此, 凭借分离培养、生化鉴定和血清学分型等传统鉴定方法已不能满足快速检测的需要。

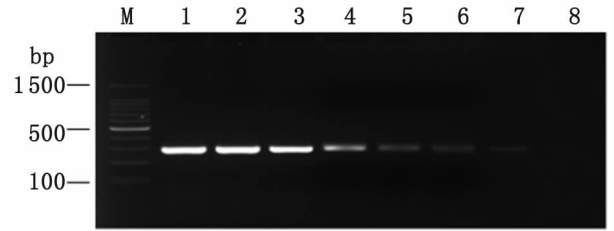


图 3 小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法灵敏度

Fig. 3 Detection sensitivity of DPO-PCR method for *Y. enterocolitica*

M: DNA marker 100 ladder; 1: 1.43×10^8 CFU/mL; 2: 1.43×10^7 CFU/mL; 3: 1.43×10^6 CFU/mL; 4: 1.43×10^5 CFU/mL; 5: 1.43×10^4 CFU/mL; 6: 1.43×10^3 CFU/mL; 7: 1.43×10^2 CFU/mL; 8: 1.43×10^1 CFU/mL.

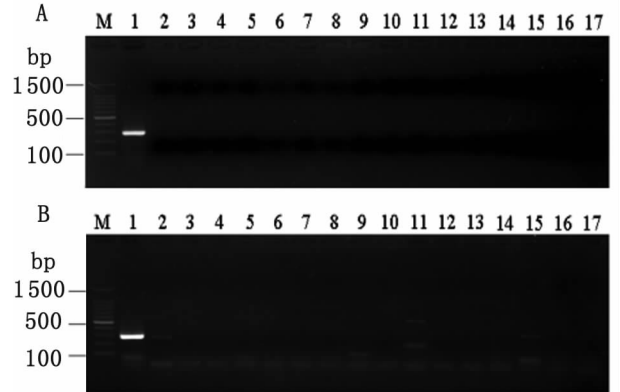


图 4 小肠结肠炎耶尔森氏菌 DPO-PCR 检测方法特异性

A: DPO-PCR 特异性结果. B: 常规 PCR 特异性结果. M: DNA marker 100 ladder. 1: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 2: 阪崎肠杆菌; 3: 肠出血性大肠杆菌; 4: 大肠杆菌; 5: 空肠弯曲菌; 6: 嗜水气单胞菌; 7: 沙门氏菌; 8: 单核细胞增生李斯特氏菌; 9: 粘质沙雷菌; 10: 志贺氏菌; 11: 变形杆菌; 12: 金黄色葡萄球菌; 13: 霍乱弧菌; 14: 副溶血弧菌; 15: 溶血性链球菌; 16: 溶藻弧菌; 17: 创伤弧菌。

Fig. 4 Specificity of DPO-PCR method for *Y. enterocolitica*

A: Specificity result of DPO-PCR; B: Specificity result of conventional PCR.

M: DNA marker 100 ladder; 1: *Y. enterocolitica*; 2: *E. sakazakii*; 3: Enterohemorrhagic *E. coli*; 4: *E. coli*; 5: *C. jejuni*; 6: *A. hydrophila*; 7: *Salmonella*; 8: *L. monocytogenes*; 9: *S. marcescens*; 10: *Shigella*; 11: *P. vulgaris*; 12: *S. aureus*; 13: *V. cholerae*; 14: *V. parahaemolyticus*; 15: *S. hemolyticus*; 16: *V. alginolyticus*; 17: *V. vulnificus*.

PCR 技术因具有检测快速、灵敏、特异性强等优点, 在基因克隆、医学鉴定、DNA 序列分析、致病基因检测等方面发挥着重要作用, 亦为微生物的诊断提供了快速检测平台。在 PCR 技术基础之上, 又

表 2 DPO-PCR 对样品耶氏菌的检测

Tab. 2 Detection of *Y. enterocolitica* by the DPO-PCR method in practice

Sample	Nos	DPO-PCR		SN/T 0174-2011	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Frozen meat	70	4	66	4	66
Fresh meat	40	1	39	1	39
Chilled food	55	6	49	6	49
Cooked food	32	0	32	0	32
Total	197	11	186	11	186

相继发展了 real-time PCR 技术和 LAMP 技术等。引物设计是构建这类检测方法的核心与关键。常规的引物设计中,为获得靶基因的高效率扩增,需要反复优化引物的各项参数特别是退火温度,同时为确保扩增的特异性,对引物序列还需要反复 BLAST 分析,操作较繁琐,当涉及多重 PCR 引物设计时,需要的工作量则更大。

DPO 引物作为一种新型的引物设计方法,简化了常规引物的设计步骤。设计 DPO 引物时,只需先确定短 3'-端,长度一般为 6~15 bp,GC 含量为 40%~80%,然后反向延伸 18~25 bp,使其 T_m 值大于 65℃,即长 5'-端,中间用多聚次黄嘌呤肌苷 (poly I) 连接。基于 DPO 引物的特殊结构,使其有效退火温度范围较宽。试验结果显示,在 49~69℃ 退火温度内,所设计的 DPO 引物均可获得靶基因的高效扩增,无需对引物退火温度进行优化,而常规 PCR 引物存在最佳退火温度,建立 PCR 方法时,需要优化退火温度。因此,与常规 PCR 引物相比,DPO 引物简化了设计与实验步骤。

DPO 引物中 poly I 的氢键结合力弱,在 DPO 引物引导 PCR 扩增时,若其 5'端或 3'端存在 3 个以上碱基错配,DPO 引物就会与 DNA 模板脱离,终止反应,增强了检测特异性,有效地阻断非特异性扩增,而且 DPO 引物自身以及引物间难形成二级结构,更提高了扩增效率^[12]。特异性结果显示,DPO 引物能够准确地鉴定出目标菌,与其它菌株无交叉反应,常规 PCR 引物特异性则相对较差,存在交叉反应。因此,与常规 PCR 引物相比,DPO 引物特异性更强,在设计 DPO 引物时,无需对引物的特异性进行反复比对。实践应用证明,所建立的 DPO-PCR 方法检测快速且结果准确,具有良好的实用性。

参考文献:

[1] Yu ES. Research progress of *Yersinia enterocolitica* disease in China[J]. Chin J Epidemiol, 2000, 21(6): 453-455. (in Chinese)

于恩庶. 中国小肠结肠炎耶尔森氏菌病研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(6): 453-455.

[2] Xu JJ, Yang JC, Wang X. Investigation report on *Yersinia enterocolitica* human and animal carrier conditions in 2004 in Xuzhou[J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(11): 1358-1359. (in Chinese)

许静静, 杨晋川, 王鑫. 徐州市 2004 年小肠结肠炎耶尔森氏菌人及动物带菌情况调查报告[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1358-1359.

[3] Liu Z, Wu XD, Liu ZD. Detection of *Yersinia enterocolitica* in frozen food[J]. Chin J Public Health, 2005, 21(11): 1322. (in Chinese)

刘振, 吴旭东, 刘宗东. 冷冻食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检测[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(11): 1322.

[4] Zhang J, Liu QY, Deng ZA, et al. Preliminary investigation on pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* in Guangzhou[J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(5): 875-877. (in Chinese)

张健, 刘巧宜, 邓志爱, 等. 广州地区食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分布特性的初步研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 875-877.

[5] Ong KL, Gould LH, Chen DL, et al. Changing epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections: markedly decreased rates in young black children, foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2009 [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(S5): S385-S390. DOI: 10.1093/cid/cis053

[6] Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bogli-Stubler K, et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1810-1816. DOI: 10.1128/AEM.69.3.1810-1816.2003

[7] Xiao YC, Li KW, Liang JR, et al. Comparison of *Yersinia enterocolitica* detection by PCR and conventional culturing[J]. Dis Surveil, 2013, 28(6): 456-458. (in Chinese)

肖玉春, 李可维, 梁俊容, 等. 聚合酶链反应法和分离培养法筛选小肠结肠炎耶尔森菌方法的比较研究[J]. 疾病监测, 2013, 28(6): 456-458.

[8] Bhaduri S. A comparison of sample preparation methods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from ground pork using swabbing and slurry homogenate techniques[J]. Mol Cell Probe, 2003, 17(2/3): 99-105. DOI: 10.1016/S0890-8508(03)00027-6

3969/j. issn. 1006-6179. 2009. 05. 008

- [14]Salant H, Weingram T, Spira DT, et al. An outbreak of Toxoplasmosis amongst squirrel monkeys in an Israeli monkey colony [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 159(1): 24-29. DOI: 10. 1016/j. vetpar. 2008. 10. 011
- [15]Carme B, Ajzenberg D, Demar M, et al. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 163(1-2): 132-135. DOI: 10. 1016/j. vetpar. 2009. 04. 004
- [16]Juan-Salles C, Prats N, Marco AJ, et al. Fatal acute toxoplasmosis in three golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 1998, 29(1): 55-60.
- [17]Pertz C, Dubielzig RR, Lindsay DS. Fatal *Toxoplasma gondii* infection in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia rosalia*) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 1997, 28(4): 491-493.
- [18]Inoue M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(7): 593-595. DOI: 10. 1292/jvms. 59. 593
- [19]Cunningham AA, Buxton D, Thomson KM. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) [J]. *J Comp Pathol*, 1992, 107(2): 207-219. DOI: 10. 1016/0021-9975(92)90037-U
- [20]Gyimesi ZS, Lappin MR, Dubey JP. Application of assays for the diagnosis of toxoplasmosis in a colony of woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 2006, 37(3): 276-280. DOI: 10. 1638/05-018. 1
- [21]Epiphanio S, Sinhorini IL, Catao-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates [J]. *J Comp Pathol*, 2003, 129(2-3): 196-204. DOI: 10. 1016/S0021-9975(03)00037-5
- [22]Spencer JA, Joiner KS, Hilton CD, et al. Disseminated toxoplasmosis in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*) [J]. *J Parasitol*, 2004, 90(4): 904-906. DOI: 10. 1645/GE-249R
- [23]Dietz HH, Henriksen P, Bille-Hansen V, et al. Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys [J]. *Vet Parasitol*, 1997, 68(4): 299-304. DOI: 10. 1016/S0304-4017(96)01088-6
- [24]Furuta T, Une Y, Omura M, et al. Horizontal transmission of *Toxoplasma gondii* in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) [J]. *Exp Anim*, 2001, 50(4): 299-306. DOI: 10. 1538/expanim. 50. 299
- [25]Schoondermark-Van DVE, Melchers W, Galama J, et al. Congenital toxoplasmosis: an experimental study in rhesus monkeys for transmission and prenatal diagnosis [J]. *Exp Parasitol*, 1993, 77(2): 200-211. DOI: 10. 1006/expr. 1993. 1077
- [26]Schoondermark-Van DVE, Melchers W, Camps W, et al. Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(9): 1930-1936. DOI: 10. 1128/AAC. 38. 9. 1930
- [27]Schoondermark-Van DVE, Galama J, Vree T, et al. Study of treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys with pyrimethamine and sulfadiazine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(1): 137-144. DOI: 10. 1128/AAC. 39. 1. 137
- [28]Schoondermark-Van DVE, Melchers WJ, Galama JM, et al. Prenatal diagnosis and treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infections: an experimental study in rhesus monkeys [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997, 74(2): 183-188. DOI: 10. 1016/S0301-2115(97)00119-X
- [29]Holland GN, O'Connor GR, Diaz RF, et al. Ocular toxoplasmosis in immunosuppressed nonhuman primates [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988, 29(6): 835-842.
- [30]Escajadillo A, Frenkel JK. Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus monkeys [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1991, 44(4): 382-389.

收稿日期:2013-11-30;修回日期:2014-01-22

(上接第 510 页)

- [9]Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuo S, et al. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(19): 6060-6067. DOI: 10. 1128/AEM. 00405-08
- [10]Zhao YL, Zhang HW, Liu W, et al. Specific detection of *Yersinia enterocolitica* by loop-mediated isothermal amplification in food [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2010, 43(2): 8-14. (in Chinese)
- 赵玉龙, 张宏伟, 刘伟, 等. 利用环节导恒温扩增方法特异性鉴定食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌 [J]. *南开大学学报*, 2010, 43(2): 8-14.
- [11]Xu YG, Cui LC, Li SL, et al. Establishment of rapid method for detecting Enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7 by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chin J Zoonoses*, 2010, 6(7): 618-623. (in Chinese)
- 徐义刚, 崔丽春, 李苏龙, 等. 肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 环介导恒温扩增快速检测方法的建立与应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 6(7): 618-623.
- [12]Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(6): e40. DOI: 10. 1093/nar/gkm051
- [13]Liu M, Huang X, Ma ZH, et al. Multiplex RT-PCR for detection of potato viruses with a dual priming oligonucleotide (DPO) system [J]. *Acta Phytopathol Sinica*, 2009, 39(4): 431-434. (in Chinese)
- 刘梅, 黄新, 马占鸿, 等. 应用 DPO 引物检测马铃薯病毒的多重 RT-PCR 技术研究 [J]. *植物病理学报*, 2009, 39(4): 431-434.
- [14]Xu HZ, Ping RJ, Ji RW, et al. Multiplex RT-PCR method for detecting five kinds of mosquito-borne viruses with DPO system [J]. *Chin J Frontier Health Quarantine*, 2012, 35(2): 73-75. (in Chinese)
- 徐焕洲, 平芮巾, 季汝武, 等. 应用 DPO 引物技术同时检测 5 种蚊媒病毒的多重 RT-PCR 方法 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2012, 35(2): 73-75.
- [15]Woo HY, Park BI, Kim BI, et al. Evaluation of dual priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR for detection of HBV YMDD mutants [J]. *Arch Virol*, 2008, 153(11): 2019-2025. DOI: 10. 1007/s00705-008-0218-3

收稿日期:2014-12-19;修回日期:2014-01-20