

免疫磁球捕获-PCR 检测牛奶中金黄色葡萄球菌的研究

邓奕¹,许迪莘¹,赵琳娜²,杨寅^{1,*}

(1.北京市科学器材公司,北京 100010;

2.北京市食品安全监控和风险评估中心,北京 100041)

摘要:对免疫磁球捕获-PCR(IMS-PCR)检测牛奶中金黄色葡萄球菌进行了初步研究。优化了免疫磁球制备参数,确定了金黄色葡萄球菌免疫磁球对目标菌的结合时间。研究结果显示,当纯菌浓度为 $10^1\sim 10^4$ CFU/mL水平时,金黄色葡萄球菌免疫磁球对目标菌的捕获率大于80%。通过对目标菌和非目标菌的检测,IMS-PCR检测方法显示了很强的特异性;在纯培养、无需增菌情况,IMS-PCR检测方法检测限为 10^4 CFU/mL;牛奶中的金黄色葡萄球菌经磁分离后增菌2h用PCR检测,可检测出 10^4 CFU/mL的金黄色葡萄球菌。

关键词:免疫磁球捕获,PCR,牛奶,金黄色葡萄球菌

Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of *Staphylococcus aureus* in milk

DENG Yi¹, XU Di-xin¹, ZHAO Lin-na², YANG Yin^{1,*}

(1.Beijing Scientific Instruments and Materials Corporation, Beijing 100010, China;

2.Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Beijing 100041, China)

Abstract: The present study investigated the use of immunomagnetic separation (IMS) capture as an additional concentration step before PCR in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) from milk. The optimum technological parameters of the IMS system and the coupling time of immunocapture reactions were investigated and evaluated. The capture efficiencies of the immunomagnetic beads were above 80% for *S.aureus* in PBS at a bacterial concentration of $10^1\sim 10^4$ CFU/mL. *S.aureus* could be detected in samples that were otherwise negative by IMS-PCR. The IMS-PCR method showed a detection threshold corresponding to 10^4 CFU/mL in *S.aureus*-spiked PBS. In the case of *S.aureus*-spiked milk, the minimum value of detection was 10^4 CFU/mL after 2h enrichment.

Key words: Immunomagnetic separation; PCR; milk; *Staphylococcus aureus*

中图分类号:TS207.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2015)07-0304-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.07.055

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称金葡菌)广泛分布于自然界,在全世界范围内,由金葡菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中占有较大比例^[1-2],金葡菌产生的肠毒素是引起食物中毒的主要原因^[3]。食品中金葡菌的检测非常重要,是我国食品安全国家标准食品微生物学检验常规检测项目之一^[4]。

传统的检测方法耗时长且灵敏度较低,免疫学方法的特异性和灵敏度受试剂纯度影响很大。PCR方法可以快速、灵敏的从食品中检测金葡菌^[5-6]。血浆凝固酶基因^[7]、耐热核酸酶基因^[8]、纤维蛋白原结

合蛋白基因^[9]、肠毒素编码基因^[10]是常见的检测金黄色葡萄球菌的靶基因,核糖体RNA基因^[11-12]也是良好的鉴定金黄色葡萄球菌的目标位点。

目前制约食品中致病菌检测速度的一个主要问题是目标菌浓度较低,前增菌时间过长,可以通过对样品的增菌液过滤实现目标物的富集以缩短增菌时间^[13]。免疫磁分离方法(Immunomagnetic Separation, IMS)也可以很好的实现目标菌的富集,该方法将具有超顺磁性的高分子微球与抗体结合制备免疫磁球,通过抗原抗体反应选择性地与目标物结合,使目标物与干扰物质分离。免疫磁球对生物的毒性较

收稿日期:2014-05-27

作者简介:邓奕(1980-),女,博士,副研究员,研究方向:食品致病微生物检测。

*通讯作者:杨寅(1980-),男,博士,副研究员,研究方向:材料学。

基金项目:北京市优秀人才培养资助项目(2012D002022000001)。

低,在分离检测微生物方面有独特的优势^[14],被磁球捕获的微生物可以直接培养,或进行 PCR、Elisa^[15-16]等检测,具有极强的应用性^[15,17]。

本研究中 PCR 所检测的目的基因为 *aroA*^[18]。在前期工作基础上^[19],本研究优化了金葡菌免疫磁球的制备等条件,可在 8h 之内完成所有操作,利用免疫磁球富集及 PCR 扩增来提高金葡菌的分子诊断技术,为牛奶中金葡菌的快速筛查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金黄色葡萄球菌标准菌株 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), 鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 (*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028), 福氏志贺氏菌标准菌株 (*Shigella flexneri*, ATCC 12022), 单核细胞增生李斯特菌标准菌株 (*Listeria monocytogenes*, ATCC 15313), 大肠杆菌 O157:H7 标准菌株 (*Escherichia coli* O157:H7) 北京市理化分析测试中心微生物室保存; 粒径为 500nm 超顺磁性聚合物微球 (MPB-d) 北京万德高科技发展有限公司; 金葡菌多克隆抗体 Meridian 公司; Baird-Parker 培养基基础、亚碲酸钾卵黄增菌液、营养肉汤培养基、TSA-YE 培养基、营养琼脂 均购于北京陆桥; PBS 缓冲液、牛血清白蛋白 Sigma 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、D2000 DNA Marker 天根生化科技(北京)有限公司; Taq DNA 聚合酶 Takara; 实验中用水为去离子水。

生物安全柜 BHC-1300 II A2, 苏州安泰科技技术有限公司; 生化培养箱 SHP-150 型, 上海精宏实验设备有限公司; 恒温振荡器 THZ-C, 太仓市实验设备厂; 台式离心机 Sigma 1-14 型, 德国; 纯水仪 Mili-Q MILLIPORE, 美国; 台式天平 SHIMADZU uw620H, 日本; 自动高压灭菌锅 HIRAYAMA HG-80, 日本; 涡旋振荡器 VORTEX-T SI, 美国; PCR 仪 Bio-Rad S1000, 美国; 凝胶电泳仪 DYY-6C, 北京六一厂; 水平琼脂糖凝胶电泳槽 北京六一厂; 凝胶成像系统 Bio-Rad Gel Doc XR, 美国; 磁力架 厦门百维信生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫磁球捕获体系的构建及优化 将 40 μ L 5mg/mL 的磁球用无菌去离子水清洗, 悬浮于 10 μ L 的 PBS (0.01mol/L, pH7.4, 后面均相同) 中; 在磁球的 PBS 溶液中分别加入 5、10、20、40 μ L 的金葡菌多克隆抗体 (2mg/mL) 配制的 PBS 溶液 (总体积为 1mL), 磁球与抗体溶液充分振荡均匀, 室温下 (25 $^{\circ}$ C 左右) 以 100r/min 振荡 2h, 加入 1.0mL PBS 清洗三遍, 1% BSA 封闭 1h 后, 同 1mL 待分离目标菌混合, 室温孵育 60min, 置于磁分离器中磁分离 30min, 移出上清液, 用 1mL PBS 清洗磁球复合物三遍, 并悬浮于 1mL PBS 中。取上清液及悬浮液 200 μ L 涂平板培养。平板计数评价免疫磁球富集效率, 抗体的最适用量由最终的分离捕获率决定。捕获率 (%) = (免疫磁球捕获的细菌数/待分离细菌数) \times 100。

将新鲜培养的金葡菌用 PBS 10 倍倍比稀释, 在含

有 40 μ g 抗体的免疫磁球中加入 1mL 3 \times 10² CFU/mL 的菌液, 室温结合不同时间 (5、10、20、30、60min); 另外, 取含有 40 μ g 抗体的免疫磁球分别加入稀释 (3 \times 10¹~3 \times 10⁵ CFU/mL) 不同浓度的金黄色葡萄球菌溶液中, 室温结合 30min, 磁场下分离金葡菌-免疫磁球复合物, 将分离的复合物洗涤 3 次后重悬于 1mL PBS, 取 200 μ L 涂布于培养基, 恒温 37 $^{\circ}$ C 进行菌落培养, 平板计数评价免疫磁球捕获率。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 检测 经磁分离得到的金葡菌-免疫磁球复合物作为富集的菌液按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明进行金葡菌 DNA 的提取, DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。包被金葡菌抗体且不吸附致病菌的磁球作空白对照。提取 10⁷ CFU/mL 金葡菌的 DNA 为阳性对照。

金葡菌 PCR 检测基因为 *aroA*, 该基因编码 5'-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶^[18], 上游引物 5'-AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC-3', 下游引物 5'-CACAAGCAACTGCAAGCAT-3', 由北京市理化分析测试中心合成, 扩增片段全长 1153bp。PCR 反应体系: 10 \times PCR Buffer (MgCl₂ Free) 2.5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 2 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 20 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L, 5U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 去离子水 ddH₂O 7.8 μ L, DNA 模板 10 μ L, 反应总体积为 25 μ L。扩增反应在 PCR 仪上进行。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 5min。PCR 产物用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, EB 染色, 于凝胶成像系统中观察电泳结果。

1.2.3 IMS-PCR 特异性 取装有金葡菌抗体包被的免疫磁球 5 支, 每管分别加入金葡菌和另外 4 种不对应的致病菌菌液各 1mL, 室温缓慢振荡 30min, 洗涤三次, 小心移出管内液体, 磁分离后用试剂盒提取 DNA 模板进行 PCR 反应, 观察是否有交叉反应。

1.2.4 IMS-PCR 灵敏性 将金葡菌菌液用 PBS 溶液 10 倍递增稀释, 其中细菌浓度约为 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ CFU/mL。分别取 1mL 加入到装有包被好金葡菌抗体免疫磁球的离心管内, 捕获后提取 DNA 进行 PCR 反应, 检验其敏感性。

1.2.5 牛奶样品实验 将市售无菌牛奶分成 900 μ L/份, 金葡菌培养液按照 10 倍倍比稀释, 然后分别将各个稀释度的菌液 100 μ L 加入到牛奶中混匀, 使得模拟样品的细菌浓度为 10¹~10⁵ CFU/mL。金葡菌免疫磁球捕获的细菌经培养 2h 后进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 免疫磁球分离捕获体系的优化

为了快速高效的分离富集金葡菌, 对免疫磁球的偶联抗体量及免疫磁球与目标菌的结合时间进行了考察。制备免疫磁球所用抗体量会影响免疫磁球对金葡菌的捕获率, 见图 1。

当制备免疫磁球所用抗体为 0.01mg, 免疫磁球的捕获率低于 50% (目标菌浓度 3 \times 10⁴ CFU/mL), 当抗体浓度增加, 捕获率明显升高。当偶联实验中抗体为 0.02mg, 同 0.01mg 比, 捕获率增加了 20%; 当

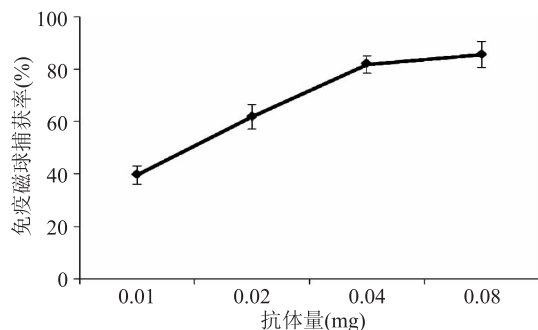


图1 不同抗体用量对金葡菌的捕获率

Fig.1 The effect of quantity of antibodies on the immunocapture of *S.aureus* in PBS

浓度高于或等于 0.04mg 时,捕获率高于 80%;当抗体增加到 0.08mg,在相同的菌浓度下,捕获率并没有显著提高。综合考虑性价比,在后续实验中,用 0.04mg 抗体包被磁球制备免疫磁球,用来捕获 1mL 的待检样品。

如图 2 所示,捕获时间对于目标菌捕获有重要影响。当金葡菌免疫磁球同金葡菌的孵育时间从 5min 增加到 10min,金葡菌的捕获率从 34.7% 增长到 69.0%,当孵育时间延长到 30min,急剧增长到 92.6%,孵育时间增加到 60min 时,免疫磁球对目标菌的捕获率较 30min 没有明显变化。因此,最适捕获时间为 30min。

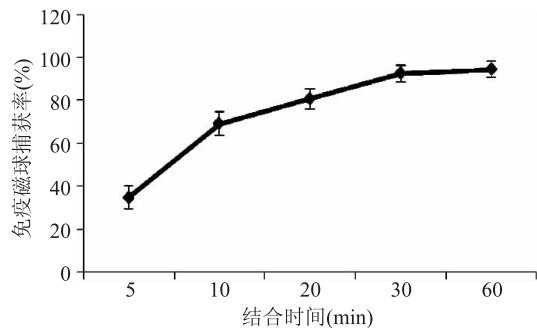


图2 不同孵育时间对金葡菌的捕获率

Fig.2 The effect of immunocapture time on the separation of *S.aureus* in PBS

在金葡菌免疫磁球对不同浓度目标菌的捕获实验中,当目标菌浓度为 10^4 CFU/mL 或低于 10^4 CFU/mL 时,所制备的免疫磁球的捕获率高于 80%,当目标菌浓度增加时,捕获率降低(图 3)。

2.2 IMS-PCR 方法的特异性

为确定 IMS-PCR 检测方法的特异性,对沙门氏菌、志贺氏菌及大肠杆菌等样品菌株进行 IMS 富集并进行 35 个扩增循环。如图 4 所示,在选定引物及 55℃ 退火温度下,只有金葡菌出现了阳性结果(1153bp),扩增出目的基因 *aroA* 的特异性条带,而大肠杆菌 O157:H7、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌均未扩增出目的大小条带,为阴性结果。说明在设定的研究条件下,免疫磁分离的前处理方法同 PCR 方法整合可以特异性的检测金葡菌。

2.3 IMS-PCR 方法的灵敏性

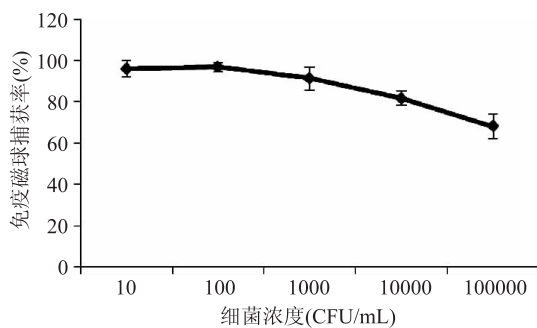


图3 免疫磁球对不同浓度金葡菌的捕获率

Fig.3 The capture efficiencies of the immunomagnetic beads for *S.aureus* in PBS at different bacterial concentration

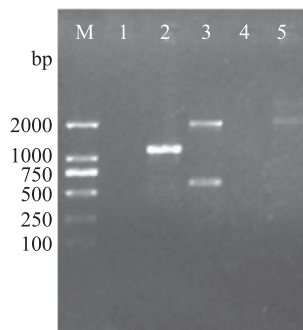


图4 IMS-PCR 特异性实验结果

Fig.4 Specificity tests results of IMS-PCR

注:M;DNA marker;1~5 大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门氏菌。

用 IMS-PCR 检测不同浓度的金葡菌 (10^1 CFU/mL 至 10^5 CFU/mL),凝胶的结果如图 5。IMS-PCR 方法的凝胶条带很清楚,从图中我们可以看到,当金葡菌浓度为 10^5 CFU/mL 时,可以清晰的看到扩增条带,当金葡菌浓度为 10^3 CFU/mL 时,扩增条带不清晰。结果证明用纯培养物确定的 IMS-PCR 的检测限为 10^4 CFU/mL。

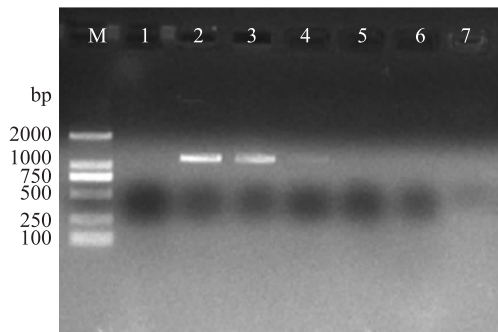


图5 IMS-PCR 灵敏性实验结果

Fig.5 Sensitivity tests results of IMS-PCR

注:M;DNA marker;1~7 分别为空白对照,阳性对照,金葡菌浓度 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL。

2.4 牛奶中金葡菌的检测

用金葡菌免疫磁球分离捕获牛奶中的金葡菌,可以实现金葡菌的特异性富集,减少干扰物质的影

响。取人工污染的混有不同浓度的金葡菌的牛奶 1 mL, 用 IMS-PCR 检测牛奶中的金葡菌, 结果见图 6。牛奶样品经过磁分离后, 再经过 2h 的增菌, 用所建立的 IMS-PCR 检测技术可以检测出牛奶中 10^4 CFU/mL 的金葡菌。

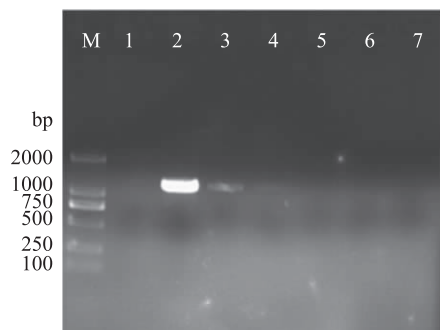


图6 牛奶样品中金葡菌 IMS-PCR 检测结果

Fig.6 *S.aureus* detection using IMS-PCR in milk sample

注: M: DNA marker; 1~7 分别为空白对照, 阳性对照, 金葡菌浓度 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$ CFU/mL。

3 结论与讨论

用免疫磁分离结合 PCR 对目标物进行检测的实际操作中, 显示该方法可以在 8h 内完成, 较国标方法更快速简便, 且具有不影响被分离细胞或其它生物材料的生物学性状和功能等多方面的特点。采用免疫磁球作为前处理步骤, 可以富集浓缩金葡菌从而避免或减少漏检, 同时可去除样品中抑制 PCR 扩增的成分。用免疫磁分离结合 PCR 对目标物进行检测, 可以显著提高 PCR 反应的灵敏性^[20]。

本研究中确定了用以捕获金葡菌的免疫磁球制备所需的抗体量为 0.04mg, 与前期研究中用荧光法标定所用磁球表面饱和抗体吸附值相近^[19]。研究结果显示随着抗体浓度升高到 0.08mg 抗体量超过饱和抗体吸附值, 过量的抗体无法吸附在磁球表面, 对捕获率的提升没有影响。免疫磁球捕获金葡菌在 30min 内达到吸附平衡点, 延长反应时间对捕获率没有明显影响。且免疫磁球对 10^4 CFU/mL 以下浓度的目标菌的捕获率大于 80%, 优于链霉亲和素磁珠制备的金葡菌免疫磁球^[21]。免疫捕获特异性检测结果表明, 包被金葡菌抗体的磁球只有与金葡菌反应后才能扩增出目的条带, 而与其它 4 种菌反应均无目的条带出现, 因此该方法具有高度的特异性, 完全适合食品致病菌的快速检测。在本研究中, 对 IMS-PCR 方法的灵敏性也进行了检测。将纯培养物培养的金葡菌菌液用 PBS 进行 10 倍系列稀释, 当细菌含量为 10^4 CFU/mL 时, 仍能得到特异的 PCR 扩增片段。人工污染金葡菌的牛奶检测结果显示: 在牛奶中金葡菌的菌量为 10^4 CFU/mL 时, 经过磁分离后增菌 2h, IMS-PCR 方法即可检出目标物, 全部检测在 8h 内完成; 若仅用 PCR 方法来检测牛奶中的金葡菌, 整个过程全部完成要 24h^[22]。经免疫磁球富集后提高了金葡菌的检测效率。

本研究所建立的方法在检测牛奶中金葡菌时若

不经过增菌, 检测不到阳性信号, 可能是牛奶中的复杂成分如脂肪及一些金属离子对该实验方法的敏感性有一定的影响^[23]。

综上所述, 将免疫磁分离方法与 PCR 结合, 可以综合两种方法的优势, 避免常规 PCR 引起的假阳性现象及由于包被免疫磁球所用抗体特异性问题引起的交叉反应。目前, 从牛奶中检测金葡菌仅限于人工染菌后建立样品污染模型的实验性阶段, 有待于进一步验证实际样品的检测应用, 并使其标准化。

参考文献

- [1] Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR, et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(1): 145-148.
- [2] Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(4): 815-836.
- [3] Krakauer T, Stiles BG. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings [J]. Virulence, 2013, 4(8): 759-773.
- [4] GB 4789.10-2010. 食品安全国家标准食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验 [S].
- [5] Graber HU, Casey MG, Naskova J, et al. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(10): 4661-4669.
- [6] Nakano S, Kobayashi T, Funabiki K, et al. PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods [J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(6): 1271-1277.
- [7] Lawrence C, Cosseron M, Mimoz O, et al. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996, 37(4): 687-696.
- [8] Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, et al. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1090-1096.
- [9] Smeltzer MS, Gillaspay AF, Pratt FL Jr, et al. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes [J]. Gene, 1997, 196(1-2): 249-259.
- [10] Ahmady M, Kazemi S. Detection of the enterotoxigenic genes (sei, sej) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran [J]. Comparative Clinical Pathology, 2013, 22(4): 649-654.
- [11] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [12] Phuektes P, Browning GF, Anderson G, et al. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*

(下转第 313 页)

- antioxidant activities[J]. Food Chemistry, 2014(147):17-24.
- [14] 李敏杰, 陆兆新, 赵海珍. 超声波辅助-盐析-水蒸气蒸馏法提取葛缕子精油的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 99-103.
- [15] 李伟进, 丁霄霖. 超声波提取金丝小枣多糖的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(6): 73-76.
- [16] 卢时勇, 钱俊青, 邹小明. 响应面法优化超声波提取白术有效成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 549-552.
- [17] Vagi M C, Petsas A S, Kostopoulou M N, et al. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD [J]. Desalination, 2007, 210(1): 146-156.
- [18] 刘清, 姚惠源, 杨赞, 等. 大麦多酚类活性物质超声提取的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 172-176.
- [19] 涂宗财, 张露, 王辉, 等. 超声波辅助提取藜蒿多酚工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 239-242.
- [20] 李富华, 夏春燕, 刘燕妮, 等. 响应面法优化蜂胶黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 226-230.
- [21] Zhang G W, Hu M M, He L, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities *in vitro* [J]. Food and Bioprocess Processing, 2013, 91(2): 158-168.
- [22] Zhong K, Wang Q. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 19-25.
- [23] Prakash M J, Mekala V, Manikandan S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 2018-2026.
- [24] Shen S A, Chen D J, Li X, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014(104): 80-86.
- [25] 普义鑫, 周文化, 蒋爱民, 等. 响应面法优化槟榔中多酚提取工艺条件的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 26(12): 334-338.
- [26] 韩艳利, 旷春桃, 李湘洲, 等. 用不同方法提取山苍子油的比较研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(11): 175-178.
- [27] 于长江, 宋小平, 姜陈林, 等. 海南山苍子核仁油 GC-MS 分析[J]. 广州化工, 2013, 41(13): 139-141.
- [28] 何金明, 肖艳辉, 杨丽娟. 韶关山苍子果实挥发油含量与组分分析[J]. 广东农业科学, 2012, 38(22): 114-116.
- [29] 刘志彬, 杨超. 榆荚仁提取物中挥发油的提取及其化学成分 GC-MS 分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 277-278.
- [30] 黄光文, 卢向阳. 我国山苍子油研究概况[J]. 湖南科技学院学报, 2005, 26(11): 97-102.
- [31] 何金明, 肖艳辉, 潘春香, 等. 韶关山苍子资源果实与挥发油性状分析[J]. 内蒙古大学学报, 2012, 33(3): 30-35.
- [32] 杨帆, 王羽梅. 山鸡椒(山苍子)精油研究现状[J]. 韶关学院学报, 2009, 30(6): 80-84.
- (上接第 307 页)
- dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples [J]. The Journal of Dairy Research, 2003, 70(2): 149-155.
- [13] Reidt U, Chauhan L, Müller G, et al. Reproducible filtration of bacteria with micromechanical filters [J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2008, 16(4): 337-350.
- [14] Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7(1): 43-54.
- [15] Yang ZY, Shim WB, Kim KY, et al. Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMS-PCR) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12): 7135-7140.
- [16] Málková K, Rauch P, Wyatt GM, et al. Combined Immunomagnetic Separation and Detection of *Salmonella enteritidis* in Food Samples [J]. Food and Agricultural Immunology, 1998, 10(3): 271-280.
- [17] Kumar S, Balakrishna K, Singh GP, et al. Rapid detection of *Salmonella typhi* in foods by combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 625-628.
- [18] Marcos JY, Soriano AC, Salazar MS, et al. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(3): 570-574.
- [19] 牛牧, 杜美红, 邓奕, 等. 亚微米免疫磁珠及其在细菌分离中的应用[J]. 高等化学学报, 2011, 32(2): 322-326.
- [20] Coklin T, Farber JM, Parrington LJ, et al. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia Duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(2): 260-267.
- [21] 王程程, 赵玲, 李敏通, 等. 基于免疫磁珠快速分离金黄色葡萄球菌的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 175-182.
- [22] 田静, 计融, 杨军, 等. PCR 方法快速检测食品中的金黄色葡萄球菌[J]. 卫生研究, 2007, 36(2): 183-186.
- [23] Khare S, Ficht TA, Santos RL, et al. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(3): 1075-1081.