

微生物快速鉴定、分型技术在食药源性微生物检测中的应用

张国林¹, 景荣先² (1. 苏州市食品药品检验所, 江苏 苏州 215104; 2. 苏州市立医院本部药学部, 江苏 苏州 215002)

摘要: 食品、药品微生物检测是保证食品、药品质量、维护人类健康的重要环节。传统的微生物检测、鉴定方法存在周期长、主观性强等缺点, 并且对一些生长缓慢或者新型微生物难以进行有效检测。现代微生物快速鉴定分型技术的发展为食品、药品微生物检测提供了新的思路和方法。现代分子生物学技术和常规生化鉴定在微生物准确鉴定的属种水平上有所差异, 要将不同鉴定、分型技术相结合应用。本文综述食药微生物鉴定、分型技术的传统方法和现代分子生物学方法进展及其在食品、药品微生物检测领域中的应用, 为发展新型的微生物检测、分型方法提供借鉴和参考。

关键词: 微生物鉴定、分型; PCR; 变性梯度凝胶电泳; 基因芯片; 生物传感器; 标准检测方法

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1412-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.029

Application of Microorganism Identification and Genotyping Techniques in Microbial Contamination Detection in Food and Drug Quality Control

ZHANG Guolin¹, JING Rongxian² (1. Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou 215104, China; 2. Department of Pharmacy, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, China)

ABSTRACT: The microorganism detection, identification and genotyping are the most important aspects for the quality control in food and drug fields. However, the traditional microbial detection methods need relative long period and the result may be influenced greatly by subjective judgment of the researchers to some extent. And traditional methods have disadvantages in the discovering of new microorganisms or microorganisms that grow slowly. The development of modern identification and genotyping techniques provide new directions for the detection of microorganisms in food and drug field. In this review, the application of traditional and modern microorganism identification and genotyping techniques in the field of drug and food quality control is discussed. At the same time, it is aimed to propose new ideas in order to provide reference and technical guarantees for the development of new method for microorganism detection besides the aforementioned areas.

KEY WORDS: microbial contamination detection; PCR; DGGE; gene chip; biosensor; standard detection method

食品、药品无菌和微生物限度检查是控制产品质量、维护人类健康的重要措施。全世界每年有数以亿计的食源性疾病患者, 其中 70% 以上是由食用被微生物污染的食品或饮水引起的。药品, 尤其是血浆、糖浆、滴眼液、氨基酸等药品的成分和生化特性非常适宜微生物的生长、繁殖, 容易被微生物污染。药品受到微生物污染会影响药品质量、诱发患者发生药源性疾病, 严重影响患者的健康, 甚至会危及生命。国内外已有多起因药品被微生物污染造成伤害的报道, 如瑞典甲状腺片的沙门氏菌污染、我国的“欣弗事件”、“齐二药事件”等。目前对食品和药品中微生物检查的标准方法主要采用传统的形态学观察和生化反

应, 这些方法虽然经典, 但均有赖于微生物的分离、纯化、生化实验和血清学鉴定, 操作步骤较为繁琐, 亦存在周期较长、灵敏度较低、主观性强等局限性。另外, 传统的微生物检测、鉴定和分型方法对于一些生长缓慢或者新型微生物无法进行有效检测, 针对环境微生物种类的复杂性和变异的普遍性具有较大的局限性。

微生物的现代分子生物学鉴定、分型技术的发展为食品、药品微生物的检测提供了新的思路与方法。如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术以指数方式扩增待检微生物的 DNA, 具有准确度高、灵敏度强等优点, 实现了从核酸水平上对微生物的检测。同时, 通用引物

基金项目: 苏州市科技发展计划(应用基础研究-医疗卫生)项目(SYS201425)

作者简介: 张国林, 男, 博士, 主管药师

Tel: 18262183668

E-mail: zhangguolin2006@163.com

的使用为新型微生物的检测提供了技术支撑。基质辅助激光解离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析微生物的蛋白质指纹图谱完成微生物的检测、分型,进一步提高了检测的效率和准确性。另外,基因芯片技术、变性梯度凝胶电泳、生物传感器等技术、随机引物扩增多态性及免疫技术等都在微生物检测领域得到了不同程度的应用。

本文综述传统方法和现代分子生物学鉴定、分型技术在食品、药品微生物检测领域的应用及进展,为提高现有检测标准、开发新的检测方法提供参考。

1 PCR

PCR是一种体外快速扩增特定DNA片段的技术。PCR技术自1983年被Mullis发明以来已经在医疗卫生、环境监测、现代农业等多个领域得到了广泛的应用,其基本原理是在体外将引物和目标DNA经过变性、退火和延伸3个步骤实现对目标DNA的快速、特异性扩增。耐热DNA聚合酶的出现极大促进了PCR技术的发展。PCR技术在实际工作中通常与核酸测序技术相结合确定微生物的基因型。16s rDNA可以显示微生物独有的进化信息,在微生物中表现为广泛的保守型和序列的多态性,其基因序列已经成为微生物分类鉴定的重要依据之一。目前,PCR技术已经衍生出多种相关技术应用于微生物分型及检测领域。

1.1 多重PCR

普通PCR仅在反应体系中加入一对引物,一次反应可扩增一个目标基因片段。多重PCR又称多重引物PCR,是近年来出现的一种一次能够检测多种模版的新方法,其基本原理和操作程序与常规PCR相同,只是在反应体系中加入多对特异性的引物。多重PCR可同时检出多种致病菌或对同一致病菌的多个亚型进行分类,也可以通过检测微生物的致病性基因判断微生物的致病性。多重PCR可以显著提高检测效率和降低检测成本,在食品、药品微生物检测领域得到了广泛的应用。

卫沛楠等^[1]利用建立的多重PCR方法检测了144株食源性金黄色葡萄球菌的9种肠毒素基因,并对其分布情况进行了分析,结果发现多重PCR方法快速、简便,且特异性较高,对金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分布研究具有明显的优势。滕

要辉等^[2]建立的多重PCR方法经过4h的增菌培养即可从速冻水饺中同时检出起始菌数100 CFU·g⁻¹的沙门菌和金黄色葡萄球菌,且检测的特异性为100%。张政等^[3]采用热裂解法提取金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和蜡样芽孢杆菌DNA作为模版,建立了多重PCR方法,在6h内即可完成检测,检出限达到104 CFU·mL⁻¹。同时,笔者也正在开展多重PCR技术快速检测药品中大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的相关研究工作。

虽然多重PCR技术已经得到广泛的应用,但是这种方法也存在不足,如敏感性相对普通PCR低、扩增条件需要摸索及不同引物之间容易发生干扰等。对于检测过程中产生的假阳性和非特异性扩增要引起重视,以免引起误检。

1.2 免疫捕获PCR(immuno-capture PCR, IM-PCR)

IM-PCR技术是一种把抗原抗体反应和PCR技术相结合、用于检测微量抗原的新技术。IM-PCR体系主要由2步反应组成,即抗原抗体的免疫反应和常规的PCR反应。该技术既保留了抗原抗体反应的特异性,又应用了PCR技术的高度灵敏性。IM-PCR具有高度特异性、快速检测、易于操作、成本低廉等优点。夏俊芳等^[4]应用免疫捕获PCR方法特异性的检测了2株金黄色葡萄球菌,且在对5种食品模拟带菌检测时发现,该方法无需培养,检测的灵敏度可达到 2.35×10^3 CFU·mL⁻¹,是常规PCR检测灵敏度的100倍。然而,基于免疫学技术的微生物鉴定及分型的局限性是有限的抗原不能够代表微生物的整个基因组,在预测反应分型方面有一定的局限性。免疫捕获PCR技术虽然有一定程度的应用,但该方法尚处于研究阶段,缺乏配套的试剂盒及成熟的方法,其应用受到一定程度的限制。

1.3 荧光定量PCR

PCR技术在理论上是指指数方式增长的扩增曲线,但是由于引物、模版、酶等因素的限制,实际操作中通常表现为S型曲线。因此,常规的PCR很难根据PCR的扩增终产物计算起始模板的拷贝数,即无法对初始模版进行定量分析。而荧光定量PCR技术(real-time quantitative PCR, RT-PCR)在反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的积累对整个PCR全过程进行实时监测,通过标准曲线可对未知模板起始浓度进行定量。高正琴等^[5]建立了特异性检查支原体的TaqMan探针实时荧

光定量 PCR 方法, 检测灵敏度达 9.2 拷贝, 且与空肠弯曲菌、肺炎克雷伯杆菌等 8 种细菌均无交叉反应, 为动物源性药品和生物制品中支原体的快速检测提供了实用的方法。荧光定量 PCR 技术也为检测食品中乳酸杆菌益生菌提供了简便、快捷、灵敏的方法。Herbel 等^[6]研究表明, 利用荧光定量 PCR 技术可以特异性检测到酸奶中乳酸杆菌的浓度为 10^5 CFU·mL⁻¹, 能够完全满足商品中益生菌浓度(通常为 $10^6 \sim 10^{12}$ CFU·mL⁻¹)的检测范围。

除了上述 PCR 方法外, 热启动-PCR、递减 PCR、巢式 PCR、COLD-PCR 等在其他领域有了一定程度的应用, 但在食品药品微生物检测领域应用较少, 不再叙述。

目前, 16s rRNA 或 ITS 基因 PCR 结合测序技术已经在微生物属种层面鉴定和分型领域有了广泛的应用, 但是由于测序技术的误差及 16s rRNA 基因在微生物细胞内拷贝数的差异, 该技术多用于微生物的种属鉴定, 在菌株层面上的分辨率具有一定的局限性, 应用较少。

2 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

DGGE 的基本原理是根据 DNA 在不同浓度的变性剂中解链程度的不同而表现出不同的电泳迁移率, 进而将片段大小相同而碱基组成不同的片段分离。结合 DNA 测序技术, DGGE 电泳常用于相似性聚类分析, 其在研究食品、药品菌落组成及动态变化、检测食源性致病菌等领域得到一定程度的应用。DGGE 通常与 PCR 和核酸测序结合起来联合应用。王萌、王海等建立并优化了 PCR-DGGE 技术体系^[7-8], 分析了中药川芎内生真菌的群落结构, 并结合 DNA 测序技术, 探究了不同产区川芎内生真菌的差异性, 并提出川芎内生真菌种群的多样性和种群结构的相对固定性可能是影响川芎地道性形成的重要因素。毕水莲等^[9]利用鞭毛蛋白基因 *flaA* 和 *flaB* 变性梯度凝胶电泳的方法对食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌污染进行了研究, 发现 Fla-DGGE 方法能实现对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的快速检测和分析。李汉文等^[10]利用 PCR-DGGE 结合传统的平板筛选法分析了海南特产高辣度辣椒的微生物种群, 筛选到了 *Pseudomonas stutzeri* 等多株可培养菌株, 并认为不同微生物对黄帝椒的质量产生重要影响。DGGE 在研究微生物种群动态和多样性方面具有优势, 但是该技术

无法实现对微生物代谢活性和数量方面的检测。因此, DGGE 要与其他分子生物学技术如 Real-time PCR、基因文库分析相结合, 更好发挥在微生物种群结构及演变分析方面的作用。

3 MALDI-TOF 质谱技术

MALDI-TOF 质谱技术是近年出现的一种新的微生物鉴定技术, 可以实现对未知微生物的快速检测、鉴定、分型、溯源及有毒无毒菌株的鉴别等^[11-12]。MALDI-TOF 质谱通过对蛋白质的解离分析来完成对微生物的鉴定及分型, 其基本步骤是将微生物样品与基质分别点在样品板上, 溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶, 然后通过激光轰击, 基质从激光中吸收能量使样品解吸, 基质与样品之间发生电荷转移使得样品分子电离, 经过飞行时间检测器, 采集数据并获得图谱, 从而通过软件分析得到鉴定结果。MALDI-TOF 质谱细菌全细胞指纹图谱分析是根据蛋白质组表达进行分析比较, 考虑到蛋白质是表型的直接决定者, 该技术比从核酸水平进行微生物鉴定更为准确和直接。陈秀金等^[13]对沙门氏菌标准菌株用 MALDI-TOF 质谱进行蛋白质指纹图谱分析, 建立了沙门氏菌的最佳培养基、最佳培养时间及样品处理的标准方法, 并发现沙门氏菌在哥伦比亚琼脂培养基上 24 h 内得到了准确的结果, 为食品药品沙门菌污染的检测提供了参考。Jadhav 等^[14]利用 MALDI-TOF 质谱技术、通过选择性富集肉汤并检测了李斯特菌, 发现该方法可以检测极低水平的李斯特菌。与传统的检测方法相比, 该检测方法的检测时间显著缩短、费用明显降低。Tsilia 等^[15]利用 MALDI-TOF 质谱技术检测了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 致病菌种产生的肠毒素 CytK1(2 310.2 Da) 和 NHE(1 192.5 Da), 并且发现在检测 NheA 方面 MALDI-TOF 质谱技术检测比免疫学试剂盒 TECRA 效果更佳。Tsilia 等也提出 MALDI-TOF 质谱可以应用于评估食源性疾病暴发时是否有蜡样芽孢杆菌的参与。另外, MALDI-TOF 质谱技术对多肽、蛋白质、低聚核苷酸和低聚糖等生化新药及基因工程药物的相关研究和分析也具有重要的应用前景。

4 基因芯片技术

基因芯片又称生物芯片、DNA 芯片, 其基本原理是核酸通过与已知序列的、在基片表面固定的标记过的核酸探针杂交, 然后进行核苷酸测序

的方法。基因芯片技术为 1998 年自然科学领域的十大进展之一, 已经被广泛应用于临床诊断、药物筛选、寻找新的基因、微生物检测等领域。基因芯片具有高度的并行性、多样性、自动化和微型化, 可同时在一张芯片上进行多种微生物的快速检测。基因芯片技术特异性强、灵敏性高, 并且可以减少化学试剂的使用量, 是一种环境友好性的技术。陈昱等^[16]选取了志贺氏菌 ipaH 基因、沙门氏菌 stn 基因和大肠杆菌 O157 的 slt 基因设计探针, 检测了 7 种 26 株细菌, 仅 3 种食源性致病菌得到阳性结果, 表现出该方法的高特异性。同时作者还发现, 致病菌纯培养物和基因组 DNA 的检测灵敏度为 8 pg, 即基因芯片技术比其他结束具有更高的灵敏度。聂志强等^[17]比较了基因芯片、荧光定量 PCR 和宏观基因组学等 3 种分子生物学技术在传统发酵食品发酵过程中微生物多样性和功能的研究应用, 发现基因芯片技术具有高通量、集约化的优点, 且通常与宏转录组技术结合进行微生物群落与功能的研究。除了避免交叉污染外, 基因芯片可以通过回收利用降低研究和检测的成本。黄国亮等^[18]研究发现, 通过合理的探针设计与杂交清洗条件, 大肠杆菌和黄单胞菌基因芯片在 5 次重复使用后仍然有很高的荧光信号。因此, 在适当的条件下, 基因芯片是可以多次重复利用的。

基因芯片技术是一种高通量、大规模、快速、准确、平行的检测微生物的技术, 但是尚未大量转化为商品化产品使用。基因芯片技术需要的仪器如寡核苷酸合成仪、扫描仪等价格昂贵, 且对基因芯片检测的结果判定上目前没有统一的标准、样品制备难度大限制了其广泛的应用。随着技术的不断发展和研究的深入, 微生物基因库的不断丰富, 生物芯片技术在食品药品微生物检测领域将得到更普遍的应用。

5 生物传感器技术

生物传感器是将传感技术与分子生物诊断技术相结合而形成的一门新技术。生物传感器对生物物质敏感、并将其浓度转化为电信号进行检测。生物传感器目前广泛应用于食品工业、医药行业、发酵工业和环境监测等领域。生物传感器用生物活性材料、生物衍生材料和生物仿生材料与物理化学转换器进行有机结合的技术, 是现代生物技术领域一种新型的检测与监控手段。生物传感器分为分子识别部分和转换部分, 前者是生物传感

器特异性的基础, 可以特异性的识别抗体、细菌、细胞等。研制高质量生物传感器的另一个重要方面是选择合适的换能器, 主要依据是根据分子识别功能物质制备的敏感元件所引起的化学变化或物理变化。斯城燕等^[19]基于表面等离子体共振原理建立了生物传感器方法, 并利用氢氧化钠溶液对芯片再生, 得到大肠杆菌 O157:H7 的检测限为 3×10^5 CFU·mL⁻¹, 且 RU 变化值与菌体浓度具有较好的相关性($r=0.99$), 是一种检测食源性致病菌的有力手段。生物传感器除了可以对微生物进行检测外, 也可以基于全细胞微生物构建生物传感器。钱俊等^[20]基于对数生长后期和稳定期的大肠杆菌微生物传感器具有良好的毒性分析功能, 发现了其在重金属及农药污染引起的急性生物毒性方面和水体急性生物毒性在线监测具有较好的应用前景。生物传感器在微生物检测领域虽然得到了一定程度的应用, 但是存在成本高、特异性低、需专门人员进行检测, 产业化生产程度低, 因此要不断加强生物传感器的技术革新, 通过开发多致病菌识别和高灵敏度的探针, 在检测的灵敏度、特异性方面不断提高, 促进生物传感器技术在食品药品微生物检测领域的应用。

6 随机引物扩增多态性(random amplified polymorphic DNA analysis, RAPD)技术与微生物分型

近年来分子标记技术如 RFLP、AFLP 及 ARDRA 等迅速发展并得到广泛应用, 但这些技术均需要对基因组进行特异性扩增。但微生物物种的繁多而使其应用受到一定的局限性。RAPD 自上世纪 90 年代建立以来, 在临床检验及实验室微生物分型方面发挥了重要的作用。RAPD 的基本原理是采用 8~12 个核苷酸长度的随机引物在低温条件下进行退火, 通过引物与基因组 DNA 的非特异位点错配而复性, 并通过 PCR 进行扩增。鉴于上述原因, RAPD 反应条件的优化是得到稳定、可靠的微生物分型的关键。目前, RAPD 技术已经广泛应用于细菌、真菌及支原体等相关微生物分型。高璐等^[21]采用 RAPD 技术分析了淡水中分离的 59 株副溶血弧菌和 107 株溶藻弧菌, 发现前者有 18 个基因型, 后者有 21 个基因型。李西柱等^[22]针对酒球菌抗病性标记工作要求, 以 SD-2a 为材料建立并优化了酒球菌基因组 DNA 的提取方法及 RAPD-PCR 的反应体系, 为进行酒球菌的抗性形状分子标记奠定了基础。RAPD 技术与其他技术

相结合,可以加速重要基因的获取进程,与染色体步移技术结合可完成相关基因的定位与克隆分离。随着 RAPD 技术的更加成熟,其在流行病学及菌株鉴别上将发挥更重要的作用。

7 基于抗原抗体反应的免疫技术与微生物鉴定分型

分子生物学技术的成熟促使融合抗体偶联物的制备成为可能。酶联免疫吸附测定是将抗原、抗体特异性反应和酶的高效催化结合的一项技术,其原理是将酶标记的抗体结合到固相载体表面,既保留抗体的免疫活性,又保留酶活性。待检测样品与固相载体表面抗体反应后结合,未结合的残留部分被洗脱。然后加入与抗体结合酶的反应底物进行显色,并分析抗原种类及丰度。史艳宇等^[23]将 PCR 技术与 ELISA 技术相结合,建立并优化了食品中空肠弯曲菌的 PCR-ELISA,且发现建立的方法特异性强、灵敏度高,可用于快速检测食品中污染的空肠弯曲菌。勇倩倩^[24]以 *E.coli* O157:H7 免疫动物得到单克隆抗体并建立可对其具有较好特异性的 ELISA 检测方法,能够检测出绿茶中 $1\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *E.coli* O157:H7 抗原,极大的提高了检测的灵敏度和高通量要求。与常规的检测方法相比,ELISA 检测具有灵敏度高、时间短和操作简便的优点。同时,该方法基于抗原决定簇与抗体反应,受外部干扰影响较小。但是,ELISA 方法也存在一定的缺陷:主要是免疫反应特异性强,对试剂的要求较高;对结构类似抗原存在一定程度的交叉反应,应优先选择单克隆抗体;ELISA 方法无法有效检测分子量较小的化合物或体积较小的微生物。另外,基于免疫技术的微生物检测方法还包括测流免疫层析技术、时间分辨荧光免疫分析法、免疫磁性分离-电化学发光技术等。

8 讨论

微生物污染是影响食品药品安全的重要因素。探索新的、准确、灵敏的微生物检测、鉴定及分型技术对保证食品、药品质量十分必要。现代分子生物学技术的发展为微生物检测提供了新的思路和方法,PCR 或 MALDI-TOF-MS 可以实现从核酸或蛋白质水平上直接对微生物进行分析,在效率、准确性和灵敏度方面较传统方法都有了很大程度的提高。同时,RT-PCR 方法也可以对待检测的微生物定性的基础上实现定量。同时,传

统方法作为经典的微生物检测、鉴定方法,具有不可替代的作用。一般来讲,不同的鉴定方法在准确鉴定层面上有所差异,如 16s rRNA 能准确鉴定到属种,但对菌种、菌种层面上分辨率具有局限性;API 条收录 1 500 余种菌种特征,在属水平上准确性更高,VITEK 收录细菌特征较少,但包含的生化反应达到 60 多种,在种的鉴定上更有优势。

分子生物学方法对微生物检测目前主要处于实验室研究或检测、分型阶段,仅作为标准检测方法的参考,在生产实践中的应用尚待加强。因此,在以后的工作中要加强基于现代微生物检测、鉴定及分型手段的生产实际应用,并在结合传统的微生物鉴定方法的基础上,建立标准化的食品药品微生物检测方法。同时,现代分子生物学技术为微生物污染的溯源也提供了一定的技术支撑,尤其是对无菌药品阳性检出菌及食药中致病菌、控制菌的溯源具有十分重要的意义。目前,笔者所在单位已经对此项工作进行了探索性研究,并取得了一定的结果。

因此,采用现代分子生物学技术结合传统方法对微生物进行鉴定、分型,并对检出的微生物污染进行溯源,提供准确、客观的检验结论,可以为相关部门采取有力的措施进行预警提供技术支持,为食品、药品质量控制、准确检测和安全生产保驾护航。

REFERENCES

- [1] WEI P N, LYU G P, XU B H, et al. Multiplex PCR for the detection of the 9 enterotoxin genes in foodborne *staphylococcus aureus* [J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2013, 40(17): 3269-3272.
- [2] TENG Y H, SUO B, AI Z L, et al. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in quick-frozen foods [J]. Food Sci (食品科学), 2013, 34(8): 140-144.
- [3] ZHANG Z, WANG Y, LIU Z, et al. Establishment and application of multiplex PCR for the detection of pathogenic microorganism [J]. Food Indust(食品工业), 2012, 33(12): 165-168.
- [4] XIA J F, LIU Q, HAN S Y, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by immunocaptured PCR [J]. Biotech Bullet(生物技术通报), 2012, 240(7): 181-187.
- [5] GAO Z Q, XING J, FENG Y F, et al. TaqMan MGB probe real-time fluorescence quantitative PCR for rapid detection of *Mycoplasma* [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2011, 31(9): 1770-1775.
- [6] HERBEL S R, LAUZAT B, VON NICKISCH-ROSENECK M, et al. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR [J]. J

- Appl Microbiol. 2013, 115(6): 1402-1410.
- [7] WANG M, YAN Z Y, HE D M, et al. Establishment and optimization of PCR-DGGE technique on endophytic fungi for *Ligusticum chuanxiong* [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2013, 28(4): 335-337.
- [8] WANG H, YAN Z Y, HE D M, et al. Analysis of endophytic fungi community of *Ligusticum chuanxiong* using PCR-DGGE [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(12): 1893-1897.
- [9] BI S L, CHEN M R, ZHANG Z G. Detection and genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in food samples by *Fla*-DGGE [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2010, 26(10): 1148-1152.
- [10] LI H W, ZHU G B, FANG H Y, et al. Isolation, identification of fermentation microorganism in *Capsicum* Chinese based on PCR-DGGE [J]. Food Ferment Indust(食品与发酵工业), 2012, 43(3): 38-42.
- [11] MARTINY D, VISSCHER A, CATRY B, et al. Optimization of campylobacter growth conditions for further identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. J Microbiol Methods, 2013, 94(3): 221-223.
- [12] LELI C, CENCI E, CARDACCIA A, et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS [J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(4): 205-209.
- [13] CHEN X J, YIN H H, KUANG H, et al. Studies on protein fingerprint of *Salmonella* by MALDI-TOF-MS [J]. J Food Sci Biotech(食品与生物技术学报), 2012, 31(11): 1189-1197.
- [14] JADHAV S, SEVIOR D, BHAVE M, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. J Proteomics, 2014(97): 100-106. Doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.014.
- [15] TSILIA V, DEVREESE B, BAENST I, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(6): 1691-1702.
- [16] CHEN Y, PAN Y J, ZHAO Y, et al. Detection of three foodborne pathogenic microorganisms by DNA microarray [J]. Microbiology(微生物学通报), 2009, 36(2): 285-291.
- [17] NIE Z Q, WANG M, ZHENG Y. Application of three molecular biotechnologies in microbial diversity of microorganisms from traditional fermented foods [J]. Food Sci(食品科学), 2012, 33(23): 346-350.
- [18] HUANG G L, XU S K, DENG C, et al. Microbe identification using gene chip and reapplication [J]. J Tsinghua Univ (Sci Tech)(清华大学学报: 自然科学版), 2007, 47(9): 1526-1530.
- [19] SI C Y, YE Z Z, WANG Y X, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 using surface plasmon resonance (SPR) biosensor [J]. Spectrosc Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2011, 31(10): 2598-2601.
- [20] QIAN J, LI J M, ZHI J F, et al. Development of a whole cells microbial biosensor based on *E. coli* and its application to acute biotoxicity determination [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2013, 41(5): 738-743.
- [21] GAO L, TANG W, YANG Z Q, et al. Genetic diversity of dominant *Vibrio* species isolated from freshwater products in Jiangsu province by RAPD [J]. Jiangsu J Agric Sci(江苏农业学报), 2013, 29(3): 599-605.
- [22] LI X Z, LIU S W, WANG Z J, et al. Genomic DNA extraction and the optimization of RAPD reaction conditions of *Oenococcus oeni* [J]. Liquor-Making Sci Tech(酿酒科技), 2009, 30(4): 46-50, 53.
- [23] SHI Y Y, LIU J H, XUE L G, et al. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in food by PCR-ELISA [J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34(10): 246-249.
- [24] YONG Q Q. Study on PCR and ELISA methods for detecting pathogenic microorganisms by magnetic nanoparticles [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.

收稿日期: 2014-01-10

新型局部给药系统促进创伤愈合的研究进展

魏巍¹, 高建青², 于莲^{1*} (1.佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.浙江大学药学院药剂所, 杭州 310058)

摘要: 目的 皮肤组织的创伤修复是临床常见的问题, 对于创伤的治疗手段多种多样。方法 对近几年的相关创伤愈合文献进行整理、分析和归纳。结果 阐述了皮肤组织愈合的机制及用于创伤治疗的新型局部给药系统。结论 新型的局部给药系统具有能够增加局部药物浓度、减少不良反应、促进伤口愈合、使用方便、提高患者依从性等特点, 新型的给药系统用于治疗局部创伤具有巨大的市场潜力。

关键词: 皮肤; 创伤愈合; 局部给药

中图分类号: R969

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)11-1417-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.030

作者简介: 魏巍, 女, 硕士生
E-mail: jdyulian@163.com

Tel: 15858287179

E-mail: weiwei5112@gmail.com

*通信作者: 于莲, 女, 教授

Tel: 13845405552