

## FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中的金黄色葡萄球菌

# Filter-based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of *Staphylococcus aureus* in Meat

刘景武, 张 伟\*, 何俊萍, 周 巍, 袁耀武

LIU Jing-Wu, ZHANG Wei\*, HE Jun-Ping, Zhou Wei and YUAN Yao-Wu

河北农业大学食品科技学院, 保定 071001

Institute of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**摘 要** 利用 FTA 滤膜, 采用 PCR 技术可直接检测肉及肉制品中的金黄色葡萄球菌, 无需增菌, 灵敏度高。在采用浮选与溶剂萃取相结合方法的基础上, 使用 FTA 膜可高效地从鲜肉中提取金黄色葡萄球菌的 DNA, 消除 PCR 反应的抑制因子。以金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因(*nuc*)为靶基因, 经过 PCR 扩增得到 279bp 的产物。经过 DNA 测序证实该产物为目的扩增产物。使用 FTA 滤膜处理样品, 再通过 PCR 方法检测金黄色葡萄球菌, 猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉匀浆液的检出限均为 10cfu/mL, 可在 6h 内完成对肉中金黄色葡萄球菌的检测, 比目前普遍采用的先增菌再进行 PCR 检测的方法缩短了 12~24h。实际检测了 72 份样品, 同时与 GB 4789.10-94 方法及两种快速检测致病性金黄色葡萄球菌检测方法做比较, PCR 方法的检出率为 72.2%, 检出时间为 6h, GB 4789.10-94 方法检出率为 70.8%, 检出时间为 5d, Petrifilm RSA 方法的检出率为 61.1%, 检出时间为 18h, Baird-Parker R.P.F 方法的检出率为 69.4%, 检出时间为 18h。结果表明 FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中金黄色葡萄球菌检出率高, 耗时短。使用 FTA 滤膜法制备模板 DNA, 为食品中的致病菌快速检测构建了一个技术平台。

**关键词** PCR, FTA 滤膜, 金黄色葡萄球菌, 鲜肉

中图分类号 Q939.99 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-1009-05

**Abstract** In the present study, an assay using Polymerase Chain Reaction(PCR) was developed for the detection of *Staphylococcus aureus* in meat. Based on flotation and solvent extraction technology, FTA filter was used to extract *S. aureus* DNA from artificially contaminated meat. Primers targeting the thermostable nuclease gene(*nuc*) were used to amplify a 279 bp DNA fragment which was confirmed by DNA sequencing. The detection limit of PCR was 10 cfu.g<sup>-1</sup> meat of *S. aureus*. This novel FTA-PCR assay allows for detection of *Staphylococcus aureus* in meat in < 6h, which is 12~24 h less than that of conventional PCR with enrichment method. Seventy-two samples were analyzed and the detection rate using the standard cultivation method was 70.8%, detection time was 5d. The detection rate of PCR amplification using filters was 73.6%, detection time was 6h. The detection rate of Baird-Parker R.P.F method was 69.4%, detection time was 18h. The detection rate of petrifilm RSA method was 61.1%, detection time was 18h. Thus PCR amplification using filters provides a faster and more sensitive method of *S. aureus* detection than the standard cultivation method. At the same time, it provides an universal process for preparing DNA template.

**Key words** PCR, FTA filter, *Staphylococcus aureus*, meat

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种普遍存在于自然界中的人兽共患病菌。金黄色葡萄球菌存在于原料肉及发酵肉制品、牛奶及乳制品、蔬菜中。这种细菌有很强的耐盐性,还可耐硝酸盐,在水分活度很低的情况下仍可生长<sup>[1,2]</sup>。经常发生金黄色葡萄球菌食物中毒的食品主要有各类生肉、熟肉制品、乳及乳制品、蛋及蛋制品、和部分淀粉类食品,特别是在肉及肉制品中发生中毒的频率较高。

金黄色葡萄球菌肠毒素食物中毒是个世界性卫生问题,近年来,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒越来越多,据美国疾病控制中心报告,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒居第二位,占整个细菌性食物中毒的33%,加拿大则高达45%<sup>[3]</sup>。我国每年发生的此类中毒事件也非常多。因而金黄色葡萄球菌是一种重要的食源性致病菌,它对食品加工业存在着潜在的危害。

FTA 滤膜能在室温下对各种生物样品进行收集、运输、存档,还可以用于核酸纯化,进行 PCR、SNP、RT-PCR、RFLP 分析,其最早是用于储存血液样品,FTA 卡是将变性剂和螯合剂渗透在纤维基质上,当捕捉到细胞后能自动将其裂解,DNA 吸附在 FTA 卡上经干燥后既可长期保存,也可以用专用缓冲液洗涤,去除样品中的杂质、细胞残片,以及其他 PCR 抑制因子的干扰,可直接作为模板用于 PCR 反应<sup>[4-6]</sup>。

肉中的 PCR 抑制因子主要有脂肪、胶原蛋白、金属离子以及其它的蛋白质等,这些抑制因子的存在大大降低了 PCR 检测肉中的致病菌的灵敏度<sup>[7]</sup>。韩国科学家 Sangbum Kim 等人研究发现胶原蛋白是肉中的重要成分,能强烈抑制 PCR 反应,能与镁离子结合降低 DNA 聚合酶活性,可以通过增加镁离子浓度来消除其影响<sup>[8]</sup>。Petra Wolffs 曾经采用浮选的方法移除猪肉匀浆中的 PCR 抑制因子,最低检出限可达到  $4.2 \times 10^3$  cfu/mL<sup>[9]</sup>。HSIEN-YEE HSIH 等人将免疫磁珠分离技术和多重 PCR 结合起来可快速检测食品中的致病菌<sup>[10]</sup>。Lantzet al 利用多重 PCR 技术检测猪肉样品中小肠结肠炎耶尔森氏菌,该方法对样品进行增菌后,使检测灵敏度达到  $10^2$  cfu/mL<sup>[11]</sup>。Jinneman et al 利用多重 PCR 扩增技术检测原料奶、牛肉等样品中 *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的 DNA,也是利用增菌来提高检测的灵敏度<sup>[12]</sup>。虽然增菌提高了检测灵敏度,但也延长了检测时间,一般可延长 12~24h。

近几年,一些国外的科学家经研究发现 FTA 滤膜可裂解菌体细胞,但是也只是局限于临床检验,还未真正应用到食品检验中。本研究以耐热核酸酶基因 *nuc* 为靶序列,进行 PCR 扩增来检测金黄色葡萄球菌<sup>[13]</sup>。使用 FTA 滤膜直接制备 DNA 模板用于 PCR 扩增,并对 FTA 滤膜用于鲜肉中致病菌 PCR 检测的具体方法进行了探索,为食品特别是肉中致病菌的 PCR 直接检测(无需增菌)奠定了基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 菌种:

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-ATCC6538

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-1.800

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-1.1476

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-26003-21

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-ATCC25923

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-ATCC13565

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-ATCC14458

*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)-ATCC8095。

以上菌种分别购自中国普通微生物菌种保藏管理中心和中国医学细菌保藏管理中心。菌种接种于营养肉汤培养基中,37℃ 摇瓶过夜培养。

1.1.2 培养基:营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、Baird-Park 培养基,购自北京市陆桥技术有限公司。

1.1.3 鲜肉:牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉均购自当地超市。

1.1.4 化学试剂:Premix Taq DR004A、DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程公司。引物(正向引物,反向引物)由大连宝生物工程公司合成。乙酸乙酯为国产分析纯产品。FTA Filter 购自 Whatman 公司,FTA 缓冲液购自 Whatman 公司,Petrilm RSA 购自美国 3M 公司,Baird-Parker R.P.F 购自法国梅里埃公司。

1.1.5 实验仪器:PCR 仪为 Whatman T Gradient 基因扩增仪,电泳仪为北京市六一厂生产 DXY-33A 型电泳仪,凝胶成像系统为华粤企业集团有限公司 UVIpro 凝胶成像系统 2.00mm Harris Micro Punch and Mat 购自 Whatman 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 鲜肉人工污染:牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉均购自当地超市,在人工污染金黄色葡萄球菌前,4 种产品均按国标法检测证实不含有金黄色葡萄球菌。然后将金黄色葡萄球菌人工污染到牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉中:取 25g 样品加入 225mL 生理盐水匀浆,然后对匀浆液人工污染不同浓度的金黄色葡萄球菌,人工污染的匀浆液中金黄色葡萄球菌的浓度依次为  $10^0$  cfu/mL→ $10^{12}$  cfu/mL,直接提取人工污染的鲜肉中金黄色葡萄球菌的 DNA。

### 1.2.2 DNA 提取:

(1)浮选步骤:取 10mL 匀浆液以  $500 \times g$  离心 10min。

(2)吸取上清液加入另一灭菌离心管中以  $14000 \times g$  离心 10 min,沉淀用 500μL 生理盐水悬浮,加入 0.25 倍体积的乙酸乙酯,振荡器混匀 2min,然后以  $17000 \times g$  离心 10 min。

(3)去掉上清液,沉淀用 20μL 生理盐水悬浮,加入直径 2.00mm FTA 滤膜片,然后 56℃ 干燥,干燥后的 FTA 滤膜片,加入 10% SDS 溶液 200 μL 煮沸 10 min,用 FTA 专用缓冲液洗涤 2 次,然后再用 TE 缓冲液洗涤 2 次,56℃ 干燥后,可作为 PCR 反应的模板。

### 1.2.3 PCR:

(1)PCR 引物<sup>[13-15]</sup>:引物序列是根据编码耐热核酸酶基因,利用软件 Primer premier5.0 设计而成(见表 1),由大连宝生物公司合成。

(2)PCR 反应体系:总反应体系 50μL。包括 25μL Premix Taq 预混液,1μL 20μmol 正向引物,1μL 20μmol 反向引物,去离子水 23μL。

阳性对照:取过夜培养的金黄色葡萄球菌,10000 × g 离心 10min,用去离子水洗涤两次,然后以 10000 × g 离心 10min,加 100 μL 去离子水煮沸 10min,14000 × g 离心 10min,

取 2 $\mu$ L 上清液作为模板 ,加入反应体系进行 PCR 扩增 ,扩增结果作为阳性对照。

表 1 引物序列与目的扩增产物大小  
Table 1 Primer Sequence and expected size of the *nuc* PCR product

| Gene       | Primer Sequence<br>( 5'→3' )                     | The expected size of<br>the <i>nuc</i> PCR product |
|------------|--|--|
| <i>nuc</i> | GCGATTGATGGTGATACGGTT<br>AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC | 279bp  |

阴性对照 :取 2 $\mu$ L 去离子水代替模板 ,加入反应体系进行 PCR 扩增 ,作为阴性对照。

( 3 )PCR 扩增程序 :PCR 反应采用冷启动。94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min ,再按 94 $^{\circ}$ C 1 min ~ 58 $^{\circ}$ C 0.5 min ~ 72 $^{\circ}$ C 1.5 min 进行 35 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3.5 min。

( 4 )电泳检测 :取 10 $\mu$ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进

行电泳 ,利用凝胶成像系统观察结果并成像。  
( 5 )PCR 产物鉴定 :大连宝生物工程公司对 PCR 扩增产物进行 DNA 测序。

1.2.4 实际样品的检测 :利用所建立的 PCR 检测方法同 Petrfilm RSA 方法、Baird-Parker R.P.F 方法和国标法对 72 件实际样品进行检测 ,计算其检出率。

2 结果与分析

2.1 人工污染的样品检测结果

本研究能直接从人工污染的含有 10cfu/mL 金黄色葡萄球菌的鲜肉匀浆液中提取金黄色葡萄球菌的 DNA。利用 PCR 扩增技术 ,成功的检测出了人工污染的鲜肉中的金黄色葡萄球菌。由表 2 可知检出限是 10cfu/mL。检测结果见电泳图( 图 1、图 2、图 3、图 4 )。

表 2 鲜肉中 PCR 检测金黄色葡萄球菌的检出限  
Table 2 Detection limits of *Staphylococcus aureus* in meat by PCR

| concentration( cfu/mL ): | 10 <sup>12</sup> | 10 <sup>11</sup> | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>9</sup> | 10 <sup>8</sup> | 10 <sup>7</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>1</sup> | 10 <sup>0</sup> |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| pork                     | +                | +                | +                | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -               |
| beef                     | +                | +                | +                | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -               |
| mutton                   | +                | +                | +                | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -               |
| chicken                  | +                | +                | +                | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -               |

“ + ”means pusitive defection result by PCR ;“ - ”means negative detection result by PCR.

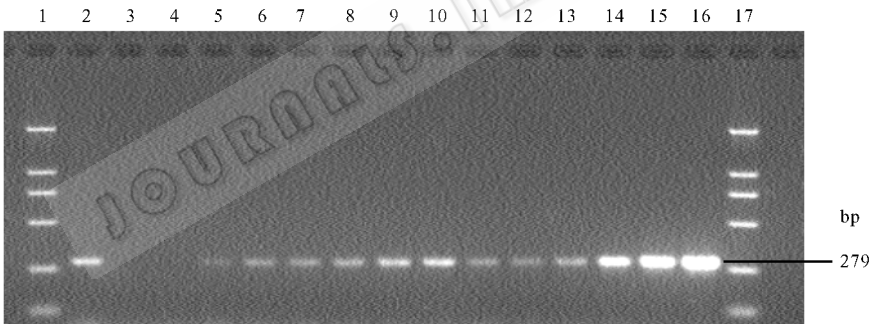


图 1 猪肉中金黄色葡萄球菌 PCR 检测结果

Fig. 1 Detection result of *Staphylococcus aureus* in pork by PCR

lane 1 :marker DL2000 ; lane 2 :positive control ; lane 3 :negative control ; the concentration of *Staphylococcus aureus* from lane 4 to lane 16 is 10<sup>0</sup> cfu/ mL to 1  $\times$  10<sup>12</sup> cfu/mL respectively ; lane17 :marker DL2000 .

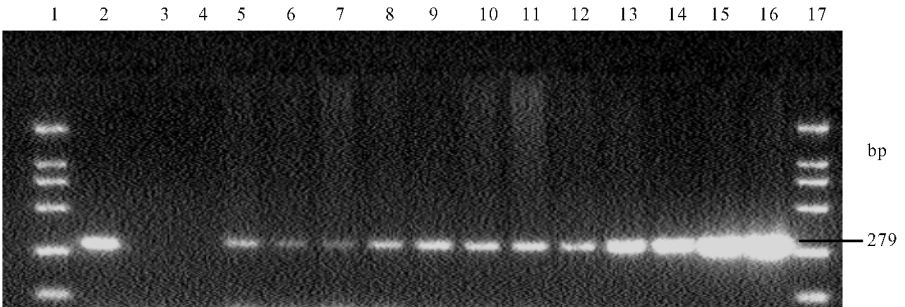


图 2 牛肉中金黄色葡萄球菌 PCR 检测结果

Fig. 2 Detection result of *Staphylococcus aureus* in beef by PCR

lane 1 :marker DL2000 ; lane 2 :positive control ; lane 3 :negative control ; the concentration of *Staphylococcus aureus* from lane 4 to lane 16 is 10<sup>0</sup> cfu/ mL to 1  $\times$  10<sup>12</sup> cfu/mL respectively ; lane17 :marker DL2000 .

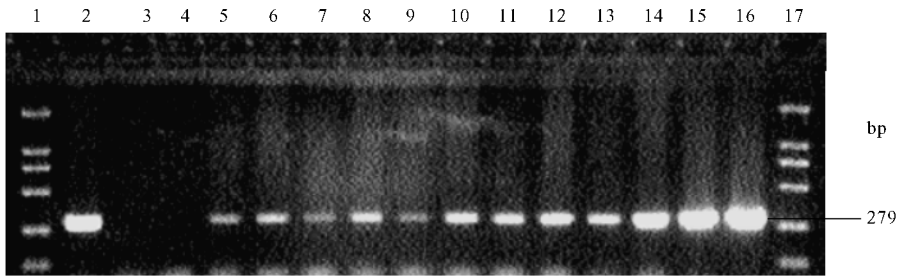


图 3 羊肉中金黄色葡萄球菌 PCR 检测结果

Fig. 3 Detection result of *Staphylococcus aureus* in mutton by PCR

lane 1 : marker DL2000 ; lane 2 : positive control ; lane 3 : negative control ; the concentration of *Staphylococcus aureus* from lane 4 to lane 16 is  $10^0$  cfu/ mL to  $1 \times 10^{12}$  cfu/ mL respectively ; lane 17 : marker DL2000.

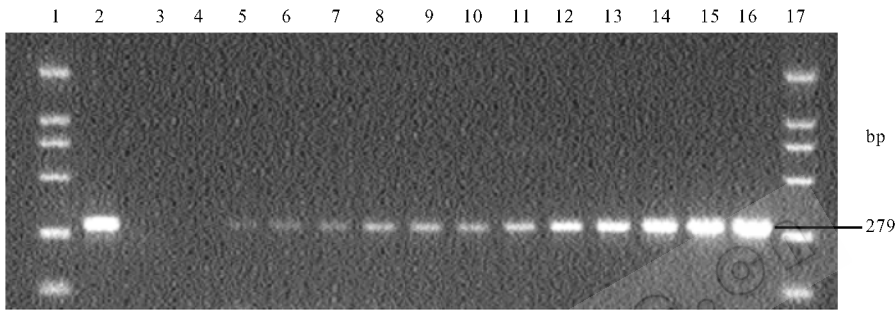


图 4 鸡肉中金黄色葡萄球菌 PCR 检测结果

Fig. 4 Detection result of *Staphylococcus aureus* in chicken by PCR

lane 1 : marker DL2000 ; lane 2 : positive control ; lane 3 : negative control ; the concentration of *Staphylococcus aureus* from lane 4 to lane 16 is  $10^0$  cfu/ mL to  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL respectively ; lane 17 : marker DL2000.

2.2 PCR 产物鉴定结果

大连宝生物工程公司对 PCR 扩增产物进行 DNA 测序 ,测序结果见表 3。

表 3 PCR 产物鉴定结果  
Table 3 The result of identified PCR-amplified products

| ( PCR-Amplified products sequence )  | ( nuc sequence )   |
|--|--|
| GCGATTGATGGTGATACGGTTAAATTAATGTACA   | GCGATTGATGGTGATACGGTTAAATTAATGTACA   |
| AAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTT  | AAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTT  |
| GATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAAGGTGT  | GATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAAGGTGT  |
| AGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTACGA   | AGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTACGA   |
| AAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTC  | AAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTC  |
| GAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATATGG  | GAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATATGG  |
| ACGTGG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> TTAGCGTATATTATGCTGATGGAAAAA | ACGTGG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> TTAGCGTATATTATGCTGATGGAAAAA |
| TGCTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCT  | TGCTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCT  |

由表 3 可知 PCR 扩增产物 DNA 序列与靶基因序列的同源性达 99.6% ,从而证实 PCR 扩增产物确为目的扩增产物。

2.3 实际样品检测结果

利用 PCR 检测方法、Baird-Parker R. P. F 方法、petrfilm RSA 方法和国标法对 72 件样品进行检测 ,结果见表 4。

共检测了 72 份样品 ,同时与 GB 4789.10-94 方法及两种快速检测致病性金黄色葡萄球菌检测方法做比较 ,PCR 方法的检出率为 73.6% ,检出时间为 6h ,GB 4789.10-94 方法检出率为 70.8% ,检出时间为 5d ,Prfilm RSA 方法的检出率为 61.1% ,检出时间为 18h ,Baird-Parker R. P. F 方法的检出率

为 69.4% ,检出时间为 18h ,与国标方法相比 ,FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中金黄色葡萄球菌检出率高 ,检测时间短。与其它两种快速检测致病性金黄色葡萄球菌检测方法相比 ,虽然都不用增菌 ,但由于肉及肉制品中有许多杂菌 ,并且这些菌在样品整个菌系统占优势 ,所以在培养过程中 ,这些杂菌的生长会与金黄色葡萄球菌竞争营养成分 ,结果一些金黄色葡萄球菌没有长起来 ,造成漏检 ,检出率低。由于 PCR 方法特异性强 ,所以使用 FTA 滤膜采用 PCR 方法检测可避免上述问题 ,检出率高。由此可见 ,使用 FTA 滤膜结合 PCR 方法可用于食品和原料的快速检测。

表 4 实际样品检测结果  
Table 4 Detection results of *Staphylococcus aureus* in various foods

| Food samples numbers |    | PCR               |    | Baird-Parker R.P.F |    | Petrifilm RSA     |    | Standard Cultivation method |    |
|----------------------|----|-------------------|----|--------------------|----|-------------------|----|-----------------------------|----|
|                      |    | Positive negative |    | Positive negative  |    | Positive negative |    | Positive negative           |    |
| Beef                 | 10 | 7                 | 3  | 7                  | 3  | 6                 | 4  | 7                           | 3  |
| Mutton               | 10 | 6                 | 4  | 6                  | 4  | 6                 | 4  | 6                           | 4  |
| Pork                 | 10 | 7                 | 3  | 7                  | 3  | 5                 | 5  | 7                           | 3  |
| Chicken              | 11 | 5                 | 6  | 5                  | 6  | 5                 | 6  | 5                           | 6  |
| Sausage              | 16 | 13                | 3  | 10                 | 6  | 9                 | 7  | 11                          | 5  |
| Other meat           | 15 | 15                | 0  | 15                 | 0  | 13                | 2  | 15                          | 0  |
| Total                | 72 | 53                | 19 | 50                 | 22 | 44                | 28 | 51                          | 21 |
| Detection rate/%     |    | 73.6              |    | 69.4               |    | 61.1              |    | 70.8                        |    |
| Detection time       |    | 6h                |    | 18h                |    | 18h               |    | 5d                          |    |

3 讨论

目前国内外采用的 PCR 方法检测致病菌一般都需要进行前增菌,虽然能提高检测的灵敏度,但相应的增加了检测的时间,一般延长 12~24h。本试验采用浮选、溶剂萃取和 FTA 滤膜相结合的方法,来消除鲜肉中的 PCR 抑制因子,采用浮选的方法目的是去除大的肉渣沉淀,乙酸乙酯在本实验中用于去除脂肪的干扰,FTA 滤膜在前人研究基础上使用 Harris 打孔器打成直径 2.00mm 的圆片然后再点样,与改进前效果相同,但大大降低了成本。FTA 滤膜吸附菌体,并将其裂解,DNA 吸附在滤膜上,在本实验中对膜的处理过程加以改进,使用 10%SDS 将干燥后的 FTA 滤膜煮沸 10min 后,既能沉淀杂蛋白,使核酸酶变性,同时使菌体裂解更充分。使用 FTA 滤膜从肉中提取污染的金黄色葡萄球菌模板相比较其他方法更快速、简便,且价格低廉。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Jay JM . Modern Food Microbiology . Chapman&Hall , New York , 1997

[ 2 ] Doan CH , Davidson PM . Growth and production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* on home style french fries. *J Food Sci* , 1999 , **64** : 913 – 917

[ 3 ] Post DE. Food pathogens ( *Staphylococcus aureus* ) Monograph. England , 1999

[ 4 ] Keith AL , Palmer AO , Leroy K. Improved template preparation for PCR assay for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** ( 10 ) : 4539 – 4542

[ 5 ] Palmer AO , Keith AL. Extraction-free , filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J Clin Microbiol* , 2000 , **38** ( 6 ) : 2271 – 2277

[ 6 ] Dana DP , Grace J , Ruth N *et al.* Rapid method for screening dried blood samples on filter paper for Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA. *J Clin Microbiol* ,1999 , **37** ( 2 ) : 350 – 353

[ 7 ] Ian GW . Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** ( 10 ) : 3741 – 3751

[ 8 ] Sangburn K , Ronald GL , Sangryeol R *et al.* Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens* . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** ( 3 ) : 1213 – 1215

[ 9 ] Petra W , Rickard K. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method , flotation , prior to Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* , 2004 , **42** : 1042 – 1047

[ 10 ] Hsien YH , Hau YT . Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. *J Food Prot* , 2001 , **64** ( 11 ) : 1744 – 1750

[ 11 ] Lantz PG , Knutsson YB , Radstrom P *et al.* Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR : a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int J Food Microbiol* , 1998 , **45** : 93 – 105

[ 12 ] Jinneman KC , Troast PA , Hill WE *et al.* Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O<sub>157</sub> shiga-like toxins type I and type II DNA by multiplex polymerase chain reaction. *J Food Prot* , 1995 , **58** : 722 – 726

[ 13 ] Brakstad OG , Aasbakk K , Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol* , 1992 , **30** : 1654 – 1660

[ 14 ] Shortle DA. Genetic system for analysis of *Staphylococcal nuclease* . *Gene* , 1983 , **22** : 181 – 189

[ 15 ] Kim CH , Khan M , Morin DE *et al.* Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J Dairy Sci* , 2001 , **84** : 74 – 83