

使用管家基因进行生物气溶胶组分分析的初步研究

李金珂^{1,2}, 王玉娜³, 李丽丽², 马雪征², 张丽萍², 赵欣², 程铭⁴, 周春雅⁵,
王涛^{1*}, 胡孔新^{2*}

(1. 天津大学 生命科学学院, 中国天津 300072; 2. 中国检验检疫科学研究院 卫生检疫研究所, 中国北京 100176; 3. 哈尔滨医科大学 公共卫生学院, 中国黑龙江 哈尔滨 150001; 4. 湖北国际旅行卫生保健中心, 中国湖北 武汉 430000; 5. 杭州萧山机场海关, 中国浙江 杭州 310000)

摘要: 空气中生物成分来源多样, 对人类健康构成潜在威胁, 目前缺少有效监测空气中不同生物成分含量的技术, 通过检测不同物种的管家基因进行鉴别是可选的手段。本研究使用 BIO Capturer-6 病毒气溶胶采集富集仪收集环境样本 28 份, 分别使用细菌、动物和植物管家基因特异性引物探针进行荧光定量 PCR 扩增, 检测分析空气中各物种含量差异。结果表明: 全部样本均检出细菌、动物和植物成分; 不同高度(地面和楼顶)空气中各生物组分含量无统计学差异, 温度高、湿度小时, 空气中细菌成分含量最多。本研究创造性地将管家基因与生物气溶胶检测结合起来, 建立了评价空气质量的新方法; 并通过实验证明了该方法有良好的稳定性和灵敏度, 相信可以为空气生物学调查分析提供新的手段。

关键词: 空气检测; 生物气溶胶; 管家基因; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q89; R122.1+2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2019)02-0108-07

Preliminary Study on Bioaerosol Component Analysis via Housekeeping Genes

LI Jin-ke^{1,2}, WANG Yu-na³, LI Li-li², MA Xue-zheng², ZHANG Li-ping²,
ZHAO Xin², CHENG Ming⁴, ZHOU Chun-ya⁵, WANG Tao^{1*}, HU Kong-xin^{2*}

(1. College of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Institute of Health Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. Department of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China; 4. Hubei International Travel Healthcare Center, Wuhan 430000, Hubei, China; 5. Hangzhou Xiaoshan Airport Customs, Hangzhou 310000, Zhejiang, China)

Abstract: The complexity of biological components in the air poses a potential threat to human health. There is currently no effective technology to monitor the content of different biological components in the air. Examining the housekeeping genes of different species is an optional means to identify these components. Herein, 28 environmental samples were collected using the BIO Capturer-6, and the real-time PCR amplification was performed using bacterial, animal and plant housekeeping gene primer probes to detect and analyze the differences in the content of each species. The results showed that bacterial, animal and plant components were detectable in all the samples, and that the contents of various biological components in the air at different heights (ground and roof) were not statistically different. The bacterial component was the

收稿日期: 2019-01-09; 修回日期: 2019-03-14

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFF0214904, 2016YFF0103103-2); 科技部应急专项(10600100000015001206); 国家科技重大专项(2018ZX10101003-002-004); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2017JK019, 2018JK015)

作者简介: 李金珂(1994-), 男, 山东德州人, 硕士研究生; 李金珂和王玉娜对本文贡献相同, 为本文共同第一作者; * 通讯作者: 胡孔新(1974-), 男, 安徽池州人, 博士, 中国检验检疫科学研究院研究员, 主要从事生物气溶胶采集富集检测关键技术研究, Tel: 010-53897796, E-mail: hukongxin@caiq.gov.cn; 王涛(1972-), 男, 四川富顺人, 博士, 天津大学研究员, 主要从事病毒免疫与生物安全相关研究, Tel: 022-27403902, E-mail: wangtaobio@tju.edu.cn.

most in the case of both high temperature and low humidity. This research creatively combined housekeeping genes with bioaerosol detection for evaluating air quality. It proved that the method has a good stability and sensitivity and could be used for the investigation and analysis of aerobiology.

Key words: air detection; bioaerosol; housekeeping genes; real-time PCR

(*Life Science Research*, 2019, 23(2): 108~114)

生物气溶胶(bioaerosol)指的是含有生物活性成分的气溶胶粒子,往往包含细菌、真菌、病毒等微生物粒子和孢子、植物花粉、动物碎片等生物体所释放的微粒成分^[1-2],生物粒子大小在 0.01~100 μm 之间。虽然生物粒子在空气颗粒物中所占比例不大,但其长时间悬浮在空气中,对人体健康的潜在危害不容小视^[3]。近些年生物气溶胶的潜在危害性被越来越多的人重视,2017年6月,以“生物气溶胶与人类健康、国家生物安全及大气污染”为主题的学术讨论会在北京成功召开^[4]。

分子生物学方法是空气生物学研究的重要手段。管家基因是指为细胞的生存提供基本功能,因而在所有细胞中都表达的基因,常常作为内参基因应用于分子生物学研究中^[5]。本研究根据细菌、动物和植物3种生物气溶胶组成成分的管家基因,分别设计特异引物探针,利用荧光定量PCR方法实现对不同生物气溶胶组分的相对定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

病毒气溶胶采集富集仪 BIO Capturer-6 由中国检验检疫科学研究院卫生检疫研究所自主研发,杭州富集生物科技公司生产。文中所用 PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪。

1.1.2 试剂

磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2~7.4)购自 Biosharp 公司;磁珠富集液为课题组自制;动物组织、细菌样本的核酸提取试剂盒为德国 QIAGEN 公司的 Blood & Tissue Kit;植物组织样本的提取试剂盒为北京天根生化科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒;环境样本的核酸提取试剂盒为德国 QIAGEN 公司的 DNeasy PowerWater Kit;实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒 One-Step RT-PCR Kit 购自赛默飞世尔科技有限公司。本研究所用引物探针均由上海英潍捷基贸

易有限公司合成。

1.2 管家基因引物探针序列的特异性验证

1.2.1 样本来源

该部分分别利用动植物组织和细菌样本对各自管家基因的引物探针进行验证。动物组织选用的猪肉、牛肉、鱼肉和鸡肉样本,以及植物样本油菜、莴苣均购自北京大兴区旧宫镇万科广场永辉生活超市。冬青样本采集于北京市大兴区旧宫镇旧忠路街道,杜仲、紫叶桃、银杏、滴水观音、绿萝样本采集于中国检验检疫科学研究院院内。所用细菌样本为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、粪链球菌,均属于实验室保存菌种。

1.2.2 扩增方法

细菌扩增管家基因选择 16S *rRNA*^[6],具体引物探针见表 1。动物扩增管家基因选择动物线粒体 16S *rRNA*^[7]。植物扩增管家基因选择植物内源性基因 *tRNA-leu*^[8],并根据 20 余种常见植物 *tRNA-leu* 序列(序列信息见表 2),使用 MEGA 7 进行多序列比对后自行设计得出最优探针序列(表 1)。

扩增反应体系为 25 μL ,扩增程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$, 9 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s (40 个循环)。扩增实验对照组使用其余两类生物核酸(比如:若验证细菌引物则对照组为动物、植物核酸样本),阴性对照使用荧光定量 PCR 扩增试剂盒内提供的无菌无核酸酶水。

1.3 室外环境生物气溶胶样本分析

1.3.1 环境气溶胶样本的采集

本研究使用 BIO Capturer-6 病毒气溶胶采集富集仪共采集环境气溶胶样本 28 份。采集地为中国检验检疫科学研究院院内(北纬 39 $^{\circ}$ 47' 0'', 东经 116 $^{\circ}$ 30' 37''),采样点选取中国检验检疫科学研究院主楼 12 层顶开放性天台(距地平面高度 60 m)和后院内地平面,时间为 2018 年 6 月 27 日至 7 月 3 日共 7 d,每天分上午和下午两个时段进行采样。采样时记录温湿度等天气状况,7 d 内采样温度跨度为 24~39 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度跨度为 15%~82%。

采集气溶胶样本时,采样瓶中加入采样液

表 1 荧光定量 PCR 引物探针序列
Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

Primer name	Sequence	
Bacterial	Sense:	5' CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC 3'
	Antisense:	5' CATCGGCTACCTTGTACGACTTC 3'
	Probe:	FAM-CGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTG-BHQ1
Animal	Sense:	5' ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCA 3'
	Antisense:	5' GCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT 3'
	Probe:	FAM-ACTTGTATGAATGGCCGCACGAGGGTT-BHQ1
Plant	Sense:	5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'
	Antisense:	5' TTCCATTGAGTCTCTGCACCT 3'
	Probe:	FAM-ATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGC-BHQ1

表 2 25 种植物的 *tRNA-leu* 序列信息
Table 2 *tRNA-leu* sequence information of 25 plants

Sequence information	NCBI number
<i>Genlisea repens</i> chloroplast, complete genome	MF593124.1
<i>Shibataea chiangshanensis</i> voucher plastid, complete genome	MF066257.1
<i>Sasa longiligulata</i> voucher plastid, complete genome	MF066256.1
<i>Pseudosasa cantorii</i> voucher plastid, complete genome	MF066255.1
<i>Oldeania cf. madagascariensis</i> voucher 15CS10839 plastid, complete genome	MF066254.1
<i>Cornus controversa</i> chloroplast, complete genome	MG525004.1
<i>Stephania longipes</i> isolate S2014047 <i>tRNA-Leu (trnL)</i> gene	KY189293.1
<i>Orientobryum oligonema</i> chloroplast DNA, <i>tRNA-Leu (trnL)</i> ,	LC195479.1
<i>Rumex nepalensis</i> chloroplast DNA, nearly complete sequence	AP017909.1
<i>Caryopteris mongholica</i> chloroplast, complete genome	MF346535.1
<i>Themeda triandra</i> isolate AL88 chloroplast, complete genome	KY707771.1
<i>Salvia japonica</i> chloroplast, complete genome	KY646163.1
<i>Eriocaulon parvicephalum trnL-trnF</i> intergenic spacer region, partial sequence; chloroplast	KX229819.1
<i>Maclura tricuspidata</i> isolate GJB <i>tRNA-Leu (trnL)</i> gene, partial sequence	KX572963.1
<i>Chaetium bromoides</i> voucher ISC:Clark & Lewis 1643 chloroplast, complete genome	KY432805.1
<i>Vatica vinosa</i> isolate 01-0265 <i>trnT-trnL</i> intergenic spacer, <i>tRNA-Leu (trnL)</i> gene	KY972897.1
<i>Cedrela saltensis</i> isolate SSA8 <i>trnT-trnL</i> intergenic spacer	KT384357.1
<i>Pohlia wahlenbergii</i> chloroplast DNA, <i>trnL</i> gene	LC270609.1
<i>Aphananthe aspera</i> chloroplast DNA, nearly complete sequence	AP017911.1
<i>Fragaria orientalis</i> chloroplast, complete genome	KY769126.1
<i>Shorea pachyphylla</i> isolate KASpac1 <i>trnT-trnL</i> intergenic spacer	KY972850.1
<i>Pohlia prolifera</i> chloroplast DNA, <i>trnL</i> gene	LC270605.1
<i>Aegilops speltoides</i> voucher PI 542245 chloroplast, partial genome	KY636049.1
<i>Henrardia persica</i> voucher PI 401347 chloroplast, partial genome	KY636100.1
<i>Adenocalymma subspicatum</i> voucher R.G. Udulutsch 2758 chloroplast, complete genome	MG008315.1

PBS 50 mL, 并加入 150 μ L 磁珠。每个空气样本设定采样量为 1 000 L。采样完成后将采样瓶放到磁力架上, 静置吸附 10 min, 使磁珠充分被吸附于磁铁处, 倒掉上清, 移走磁力架, 加入 500 μ L PBS, 使磁珠重悬, 吸出至 1.5 mL EP 管中, 放于 -80°C 冰箱冻存备用。采样瓶不重复使用, 采样喷头旋下后用 75%乙醇浸泡至少 1 h, 使用双蒸水冲洗干净, 放入 80°C 烘箱中过夜干燥备用。

阴性对照样本的采集: 在实验室选择一台 II 级生物安全柜, 打开运转 20 min 后, 将 BIO Capturer-6 采样器放到安全柜操作台面上, 采集 1 000 L 无菌空气样本作为阴性对照。

1.3.2 环境气溶胶样本管家基因的检测

使用 DNeasy PowerWater Kit 水样 DNA 提取试剂盒提取样本核酸, 荧光定量 PCR 扩增方法同步骤 1.2.2。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计检验, 两组间正态分布计量资料的均数比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 计量资料组间两两比较采用 *q* 检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 作为具有统计学差异的检验标准。

2 结果

2.1 管家基因引物探针序列的特异性验证

2.1.1 细菌 16S *rRNA* 基因引物探针的通用性及特异性检测

将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、粪链球菌的 DNA 样本作为实验组, 并取部分动物(猪肉、鸡肉)和植物(杜仲、银杏)的 DNA 样本作为对照组, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果如下: 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、粪链球菌样本的 Ct 值分别为 15.81、12.62、12.07、9.05; 选用的杜仲、银杏、猪肉、鸡肉以及体系水对照样本均无扩增曲线。虽然多次重复结果的阳性 Ct 值有细微改变, 但各物种扩增结果相同。以上结果证明 16S *rRNA* 引物探针有良好的细菌源性检测通用性及物种特异性。

2.1.2 动物线粒体 16S *rRNA* 基因引物探针的通用性及特异性验证

将提取的牛肉、猪肉、鱼肉、鸡肉 DNA 作为实验组, 同时以部分植物(杜仲、银杏)和细菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)的 DNA 样本作为对照组, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果显示: 牛肉、猪肉、鱼肉、鸡肉样本的 Ct 值分别为 11.30、14.80、26.66、26.02; 选用的杜仲、银杏、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及体系水对照样本均无扩增曲线。虽然多次重复结果的阳性 Ct 值有细微改变, 但各物种扩增结果相同。以上结果证明动物线粒体 16S *rRNA* 引物探针有良好的动物源性检测通用性及物种特异性。

2.1.3 植物 *tRNA-leu* 基因引物探针的通用性及特异性检测

将杜仲、紫叶桃、冬青、银杏、滴水观音、油菜、莴苣、绿萝的 DNA 样本作为实验组, 并取部分动物(鸡肉、猪肉)和细菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)的 DNA 样本作为对照组, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果如下: 杜仲、紫叶桃、冬青、银杏、滴水观音、油菜、莴苣、绿萝样本的 Ct 值分别为 19.00、13.85、24.55、22.13、15.45、12.88、11.64、12.93; 选用的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鸡肉、猪肉以及体系水对照样本均无扩增曲线。虽然多次重复结果的阳性 Ct 值有细微改变, 但各物种扩增结果相同。以上信息证明 *tRNA-leu* 引物探针有良好的植物源性检测通用性及物种特异性。

2.2 环境气溶胶样品的组分分析

使用 3 种管家基因引物探针对 28 份环境样

本进行荧光定量 PCR 检测, 取 PCR 酶体系水为空白对照, 安全柜内采集的气溶胶样本为阴性对照, 1.2 章节选取的细菌、动物和植物中提取的核酸分别为相对应的阳性对照。荧光扩增曲线如图 1 所示, 具体 Ct 值见表 3。结果表明, 28 份环境样本均有细菌、动物和植物成分检出, 且有完整扩增曲线; 阴性对照、空白对照的检测结果均为 undetected。

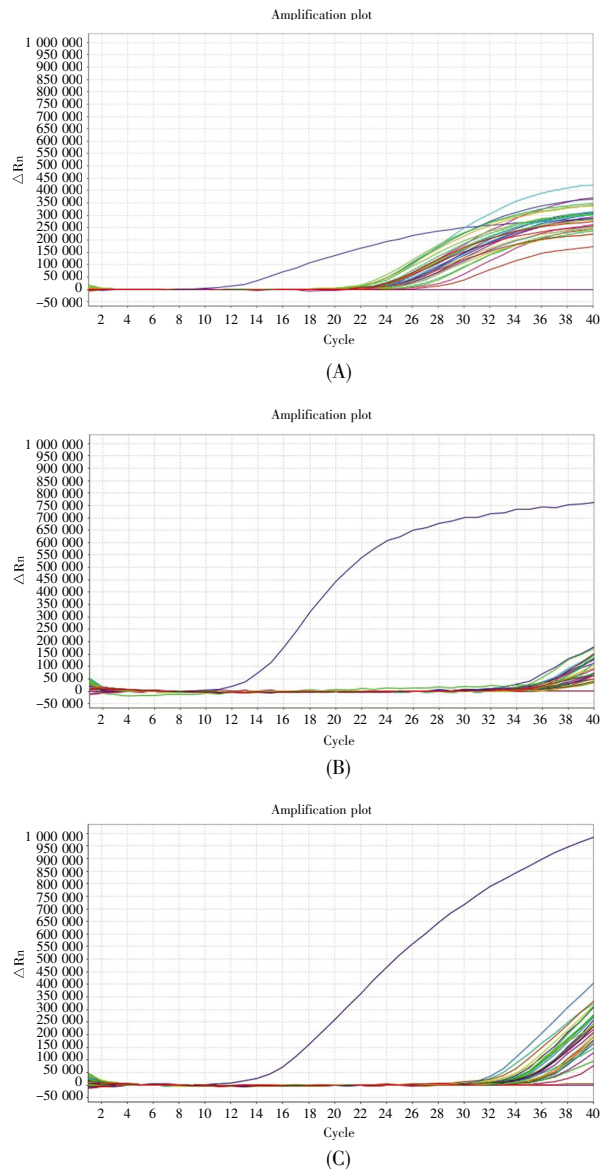


图 1 环境气溶胶样本的管家基因检测结果 (A) 细菌成分检测结果; (B) 动物成分检测结果; (C) 植物成分检测结果。各图中阴性对照及空白对照均无扩增曲线, 阳性对照扩增曲线完好。

Fig.1 Housekeeping gene detection of environmental aerosol sample

(A) Bacterial component testing; (B) Animal component testing; (C) Plant component testing. Negative control and blank control in each figure have no amplification curve, and the positive control amplification curve is intact.

2.2.1 空气样本中细菌、动物和植物三者成分间的比较

对收集到的样本中细菌、动物和植物成分的相对含量进行分析(图2)。结果表明,空气中细菌、动物和植物来源的成分含量差异显著($P=0.000<0.05$)。进一步两两比较可知,采集到的气溶胶中细菌、动物、植物三者成分的相对含量存在差异,细菌最多,植物次之,动物成分最少。

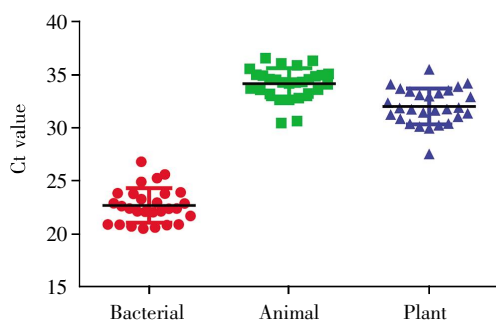


图2 空气气溶胶中细菌、动物和植物成分的 Ct 值散点图
Fig.2 Scatter plot of Ct values of bacterial, animal and plant constituents in aerosols

2.2.2 高度对空气样本中细菌、动物和植物成分的影响

按照采样时的高度将采集样本分为12层天台(高度60 m)和后院地面(高度0 m)两组。结果表明不同高度的空气中细菌、动物、植物的成分含量均无显著性差异(细菌 $P=0.365>0.05$, 动物 $P=0.904>0.05$, 植物 $P=0.847>0.05$, 图3)。

2.2.3 温度对空气样本中细菌、动物和植物成分的影响

在样品采集的一周内,温度变化范围为24~39 °C,不同温度条件下的空气样本中细菌、动物、植物成分的 Ct 值如图4所示。结果表明:不同温度下,空气中动物、植物的成分含量无显著性差异(动物 $P=0.45>0.05$, 植物 $P=0.963>0.05$);温度与细菌 Ct 值呈负相关($r=-0.434$, $P=0.021<0.05$),即温度越高,细菌 Ct 值越低,采集到的细菌粒子越多。

2.2.4 湿度对空气样本中细菌、动物和植物成分的影响

在样品采集的一周内,相对湿度变化范围为15%~82%,不同湿度条件下的空气样本中细菌、

表3 环境气溶胶样本管家基因检测结果

Table 3 Housekeeping gene detection results of environmental aerosol samples

Sampling locations	Sample number	Bacterial Ct value	Animal Ct value	Plant Ct value
Roof	062701	22.04	32.60	31.23
	062703	20.45	32.77	31.73
	062801	20.78	33.16	31.43
	062803	22.35	33.67	31.71
	062901	22.01	33.56	27.51
	062903	20.85	34.89	31.89
	063001	22.35	34.30	31.85
	063003	23.75	33.58	33.67
	070101	26.77	34.98	32.33
	070103	22.34	36.04	34.09
	070201	22.92	33.21	33.51
	070204	25.58	34.15	35.50
	070301	23.87	35.54	30.35
	070303	24.87	34.93	30.22
	Ground	062702	20.56	34.26
062704		20.85	34.56	33.86
062802		20.66	30.61	30.83
062804		22.58	34.54	31.01
062902		22.08	36.54	30.37
062904		20.83	34.06	32.90
063002		22.08	34.24	31.61
063004		23.79	35.06	33.41
070102		23.24	34.84	32.95
070104		21.65	34.51	30.08
070203		22.84	30.41	33.25
070205		22.82	32.61	34.18
070302		25.22	35.87	31.35
070304		23.74	36.29	29.92

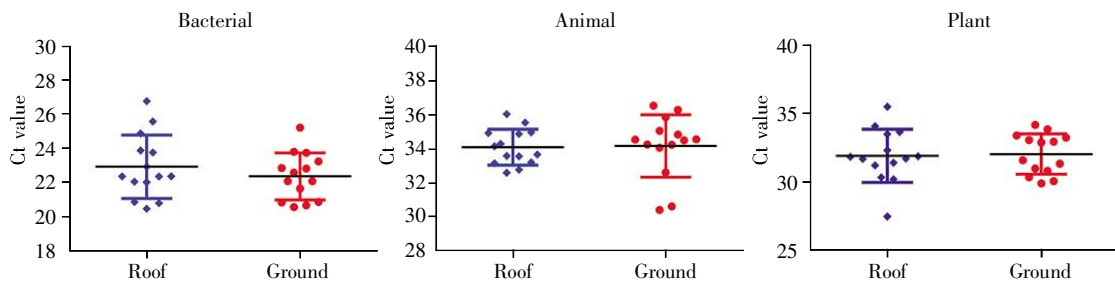


图 3 不同采样高度下各成分的 Ct 值

Fig.3 Ct value of each component at different sampling heights

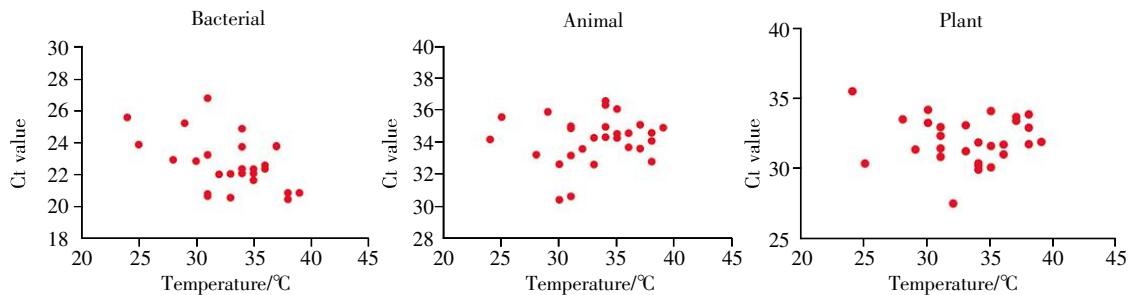


图 4 不同采样温度下各成分的 Ct 值

Fig.4 Ct value of each component at different sampling temperatures

动物、植物成分的 Ct 值如图 5 所示。结果表明:不同湿度下,空气中动物和植物成分的含量无显著性差异(动物 $P=0.463>0.05$, 植物 $P=0.956>0.05$);湿度与细菌 Ct 值呈正相关($r=0.660$, $P=0.000<0.05$),即湿度越低,细菌 Ct 值越低,采集到的细菌粒子越多。

3 讨论

生物气溶胶的潜在危害性被越来越多的人重视,对生物气溶胶的研究需要气象学、分子生物学、细胞生物学、生物信息学等多个领域的技术^[9-10]。众所周知空气微生物中的细菌如沙门氏菌、大肠杆菌、肺炎链球菌等感染会危害人类健康甚至生命^[11],但空气中存在的动植物源性成分对人类健康构成

的潜在危害往往被人忽略:植物花粉会引发敏感人群的过敏反应^[12];寄生虫及虫卵可引发人群传染病^[13];蚊虫等生物是许多传染病的传播媒介^[14]。目前对空气中生物气溶胶的研究主要针对细菌、真菌或病毒^[15-18],缺少有效的手段对空气中的各生物组分进行成分监测。管家基因是一类在所有细胞中稳定表达的基因,凭借其这一特性,管家基因成为研究基因表达的重要内参。管家基因常常作为分子标记被用于物种鉴别和生物掺杂鉴定:杨永存等^[19]使用同源异形盒基因鉴别食用油中是否混有动物源性地沟油成分;18S *rRNA* 基因被用于检测明胶中的牛羊等动物源性成分^[20];岳巧云等^[21]使用 *leu* 基因作为检测奶粉中是否掺入大豆成分的分子标记。

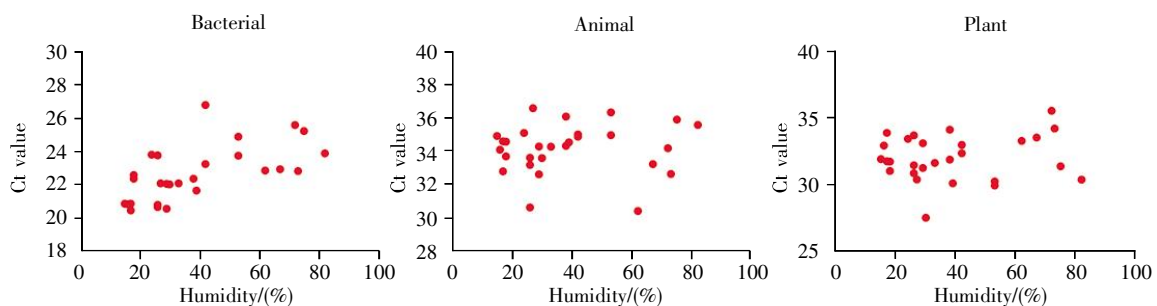


图 5 不同采样湿度下各成分的 Ct 值

Fig.5 Ct value of each component under different sampling humidities

本研究从生物管家基因角度出发,借助自主研发的 BIO Capturer-6 病毒气溶胶采集富集仪,建立了一种检测生物气溶胶样本中动物、植物、细菌总成分相对含量的方法。通过对影响空气中细菌、动物、植物成分采集的相关因素进行分析,一方面得出温度和湿度对细菌的采集均有影响,随着温度的升高或湿度的降低,气溶胶样本中细菌 Ct 值逐渐降低,这可能是由于当温度较高、湿度较小时,更有利于细菌在空中的悬浮,从而易于采集;另一方面,我们发现空气气溶胶中细菌、动物、植物三者成分的相对含量存在差异,即细菌最多,植物次之,动物最少,此结果可能与气溶胶样本中不同成分的粒径大小有关, BIO Capturer-6 对细菌类的小粒径颗粒的采集效率优于对动植物类较大粒径颗粒的采集效率。

参考文献(References):

- [1] ANDREAE M O, CRUTZEN P J. Atmospheric aerosols: biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry[J]. *Science*, 1997, 276(5315): 1052-1058.
- [2] 杜睿. 大气生物气溶胶的研究进展[J]. 气候与环境研究(DU Rui. The progress of atmospheric bioaerosol research[J]. *Climatic and Environmental Research*), 2006, 11(4): 546-552.
- [3] HAAS D, GALLER H, LUXNER J, *et al.* The concentrations of culturable microorganisms in relation to particulate matter in urban air[J]. *Atmospheric Environment*, 2013, 65(2): 215-222.
- [4] 江桂斌. 快速发展的生物气溶胶学科[J]. 科学通报(JIANG Gui-bin. Rapid development of bioaerosol science[J]. *Chinese Science Bulletin*), 2018, 63(10): 875.
- [5] ZHANG L, ZHANG Q, JIANG Y, *et al.* Reference genes identification for normalization of qPCR under multiple stresses in *Hordeum brevisubulatum*[J]. *Plant Methods*, 2018, 14: 110.
- [6] 万松华. 食品中污染微生物通用型荧光 PCR 检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学(WAN Song-hua. A Study of Detecting Microorganism in Food by Real-time PCR Method with Universal Primers and Probe[D]. Guangzhou: South China University of Technology), 2015.
- [7] 赵新, 易萌, 刘娜, 等. DB12/T 653—2016, 鲜冻畜、禽肉中动物源性成分的定量检测——实时荧光 PCR 法[S]. 天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津市东丽区产品质量监督检验所(ZHAO Xin, YI Meng, LIU Na, *et al.* DB12/T 653—2016, Quantitative PCR method for animal derived materials in meat and meat products[S]. Tianjin Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Tianjin Dongli District Product Quality Supervision and Inspection Institute), 2016-09-27.
- [8] 顾晓慧, 姚琳, 王联珠, 等. 冷冻鱼糜中植物成分的 PCR 检测方法[J]. 中国渔业质量与标准(GU Xiao-hui, YAO Lin, WANG Lian-zhu, *et al.* PCR detection method of plant ingredient in frozen surimi[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*), 2014, 4(2): 44-49.
- [9] KESAVAN J, SAGRIPANTI J L. Evaluation criteria for bioaerosol samplers[J]. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 2015, 17(3): 638-645.
- [10] MAMTA, SHRIVASTAVA J N, SATSANGI G P, *et al.* Assessment of bioaerosol pollution over Indo-Gangetic plain[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(8): 6004-6009.
- [11] 刘民, 马秋月. 肺炎链球菌相关疾病流行病学研究进展[J]. 中国公共卫生(LIU Min, MA Qiu-yue. Progress in epidemiological studies on pneumococcal diseases[J]. *China Journal of Public Health*), 2018, 34(11): 1449-1452.
- [12] 宋柏龙, 孙勇, 许栋岳, 等. 蒿属花粉分布及对过敏性鼻炎患者气道反应性的影响分析[J]. 中国医学文摘(耳鼻喉科学)(SONG Bo-long, SUN Yong, XU Dong-yue, *et al.* Distribution of artemisia pollen and its effect on airway responsiveness in patients with allergic rhinitis[J]. *Chinese Medical Digest: Otorhinolaryngology*), 2018, 33(5): 385-387.
- [13] 孙凌聪, 吴冬妮, 张华勋, 等. 湖北省首例输入性疟疾混合感染的实验室诊断分析[J]. 公共卫生与预防医学(SUN Ling-cong, WU Dong-ni, ZHANG Hua-xun, *et al.* Laboratory diagnosis of the first mixed infection of imported malaria in Hubei[J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*), 2017, 28(2): 131-133.
- [14] 刘起勇. 寨卡病毒媒介伊蚊控制策略和措施展望[J]. 中国媒介生物学及控制杂志(LIU Qi-yong. Prospects on Zika virus control measures and strategy[J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*), 2016, 27(2): 93-98.
- [15] 高敏, 仇天雷, 贾瑞志, 等. 北京雾霾天气生物气溶胶浓度和粒径特征[J]. 环境科学(GAO Min, QIU Tian-lei, JIA Rui-zhi, *et al.* Concentration and size distribution of bioaerosols at non-haze and haze days in Beijing[J]. *Environmental Science*), 2014, 35(12): 4415-4421.
- [16] 刘杨, 马雪征, 张丽萍, 等. 生物气溶胶采集富集仪用于医院空气中甲型流感病毒的调查[J]. 中国国境卫生检疫杂志(LIU Yang, MA Xue-zheng, ZHANG Li-ping, *et al.* Survey on influenza A virus in hospital air by using biological aerosol collection and enrichment instrument[J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*), 2018, 41(1): 5-7.
- [17] 祁建华, 武丽婧, 高冬梅, 等. 青岛近海生物气溶胶中可培养微生物浓度及群落多样性的季节变化[J]. 环境科学(QI Jian-hua, WU Li-jing, GAO Dong-mei, *et al.* Concentration and community diversity of microbes in bioaerosols in the Qingdao coastal region[J]. *Environmental Science*), 2014, 35(3): 801-809.
- [18] 李艾阳, 东东, 孟志航, 等. 典型高校公共场所室内空气微生物分布特征[J]. 环境科学学报(LI Ai-yang, DONG Dong, MENG Zhi-hang, *et al.* Distribution of indoor air microorganisms in public rooms of a university[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*), 2016, 36(8): 2827-2831.
- [19] 杨永存, 杨冬燕, 李浩, 等. 实时荧光 PCR 检测动物源性基因鉴定地沟油[J]. 中国卫生检验杂志(YANG Yong-cun, YANG Dong-yan, LI Hao, *et al.* Identification of hogwash oil through animal-original genes detection with real-time PCR[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2013, 23(18): 3514-3517.
- [20] 陈颖, 吴亚君, 袁飞, 等. GB/T 25165—2010, 明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法——实时荧光 PCR 法[S]. 中国检验检疫科学研究院(CHEN Ying, WU Ya-jun, YUAN Fei, *et al.* GB/T 25165—2010, Protocol of identification of bovine, caprine, ovine and porcine derived materials in gelatin—Real time PCR method[S]. *Chinese Academy of Inspection and Quarantine*), 2010-09-26.
- [21] 岳巧云, 陈定虎, 伍朝晖, 等. 实时荧光 PCR 在鉴别奶粉中掺入大豆成分的应用研究[J]. 食品科学(YUE Qiao-yun, CHEN Ding-hu, WU Zhao-hui, *et al.* Real-time fluorescent PCR detection of soybean ingredients adulterate in milk powder[J]. *Food Science*), 2009, 30(12): 190-193.