

两种致病性弧菌二重 LAMP-熔解曲线检测方法的建立

姜侃, 张水峰, 张慧, 汪新, 刘鹏鹏

(浙江省质量检测科学研究院, 浙江杭州 310018)

摘要: 应用环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 建立了食品中产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌二重 LAMP-熔解曲线快速检测方法。本方法针对产毒素性霍乱弧菌 *ctxA* 基因和副溶血性弧菌 *gyrB* 基因分别设计引物组进行二重 LAMP 扩增, 并利用熔解曲线法分析扩增产物, 从而判断 DNA 模板中所含目标菌。应用本方法对 9 株目标菌和 17 株非目标菌的检测方法与预期一致, 并可通过熔解曲线的特征峰准确分析 DNA 模板中所含目标菌。对二重 LAMP 扩增产物的测序分析表明, 扩增所得序列与目的基因序列吻合, 从而进一步验证了该方法的特异性。经测试, 本方法对两种目标菌的检测灵敏度均可达 100 fg DNA/反应管。实验证明所建立的方法具有良好的特异性, 并可为食品中两种致病性弧菌的快速检测提供一种重要技术手段。

关键词: 多重 LAMP; 熔解曲线; 霍乱弧菌; 副溶血性弧菌; 食品

文章编号: 1673-9078(2016)10-246-251

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.037

Development of a Multiplex LAMP-Dissociation Curve Method for the Detection of Two Pathogenic *Vibrio* Species

JIANG Kan, ZHANG Shui-feng, ZHANG Hui, WANG Xin, LIU Peng-peng

(Zhejiang Institute of Quality Inspection Science, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was applied to establish a rapid duplex LAMP-dissociation curve method for the simultaneous detection of toxigenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in foods. The primers were designed according to the sequences of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* and the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus*, and the amplification products were analyzed by dissociation curves to determine the target bacteria using the DNA template. The results from the detection of nine target bacterial strains and 17 non-target bacterial strains were consistent with the expected results, and the target bacteria represented by the DNA template could be accurately analyzed using the characteristic peaks in the dissociation curve. DNA sequencing results of LAMP products indicated that the amplified sequences were also consistent with the target gene sequences, further confirming the specificity of this LAMP method. The experimental results showed that the detection limits for the two target bacteria could reach 100 fg DNA/tube. The results suggest that the established method has a high specificity, and can be used as an important technique for the rapid detection of two pathogenic *Vibrio* species in foods.

Key words: multiplex loop-mediated isothermal amplification; dissociation curve; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*; food

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 是弧菌属中两种重要的食源性致病菌。霍乱弧菌是引发烈性肠道传染病-霍乱的病原菌, 曾在世界范围引起多次大流行, 其主要的毒力因子是霍乱毒素。副溶血性弧菌则是威胁近海海水养殖业的主要病原菌之一, 而浙江省作为沿海省份, 近海海水养殖业较为发达, 居民因食用被副溶血性弧菌污染的海产品而引起食物中毒的情况较为普遍。环介导等温

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 浙江省优先主题重点社会发展项目 (2009C13013); 浙江省质监系统科研计划项目 (20120101)

作者简介: 姜侃 (1978-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检验

扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [1] 作为一种新型核酸扩增技术, 虽已得到广泛应用, 但由于其扩增机理有别于 PCR 方法, 因此现有的方法多针对单一目标物进行检测 [2,3], 即便能在同一反应体系中实现对多个目标序列进行扩增, 其扩增产物也不能通过琼脂糖凝胶电泳等常规方法进行分析, 往往需要借助酶切 [4]、测序 [5]、引物标记 [6] 等复杂和高成本的方法对产物进行分析, 以确定所含目标菌。

当采用分子生物学方法检测致病菌时, 目标基因的选择是关键。根据现有国家食品安全监管体系, 霍乱弧菌并不属于常规监测的食源性致病菌, 因此选择目标基因时针对的是有临床意义的产毒素性霍乱弧菌, *ctxA* 基因正是产毒素性霍乱弧菌的特异性基因 [7];

但副溶血性弧菌在多种食品中规定不得检出^[8], 因此需在种水平上对副溶血性弧菌进行检测。有研究显示, 以往广泛应用于副溶血性弧菌 PCR 检测的 *tdh* 和 *trh* 基因主要存在于临床分离的菌株中, 而环境中分离的副溶血性弧菌多不包含上述毒力基因, 因此存在漏检可能, 而 *gyrB* 基因被作为在种水平上鉴定副溶血弧菌的靶基因^[9]。本研究正是选择产毒素性霍乱弧菌 *ctxA* 基因和副溶血性弧菌 *gyrB* 基因序列设计引物组, 在最适条件下进行多重 LAMP 反应, 并最终通过对扩增产物进行溶解曲线分析, 根据溶解曲线中出现特征峰的温度判断所含目标菌, 建立了产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌多重 LAMP-溶解曲线快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与菌种

培养基(青岛海博公司); DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒(Qiagen 公司); PCR 预混液、DNA Marker DL 2000 (TAKARA 公司); Bst DNA 聚合酶及其缓冲液(NEB 公司); MgSO₄ 溶液、dNTP 溶液(Promega 公司); 甜菜碱(Sigma-Aldrich 公司);

Eva Green 染料(Biotium 公司); 琼脂糖(Biowest 公司)。

9 株目标菌: 产毒素性霍乱弧菌(小川型 2 株, 稻叶型 2 株, 浙江省疾控中心提供), 副溶血性弧菌(CICC 10435、CICC 21617、实验室自分离 3 株)。

17 株非目标菌: 非产毒素性霍乱弧菌 1 株(浙江省疾控中心提供), 鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028), 甲型副伤寒沙门菌(CICC 21501), 乙型副伤寒沙门菌(CICC 21495), 丙型副伤寒沙门菌(CICC 21512), 福氏志贺菌(ATCC 12022), 痢疾志贺菌(ATCC 51252), 宋内志贺菌(ATCC 25931), 鲍氏志贺菌(ATCC 9207), 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538), 乙型溶血性链球菌(CMCC 32210), 单增李斯特菌(ATCC 19114), 铜绿假单胞菌(ATCC 15442), 阪崎肠杆菌(ATCC 51329) 大肠埃希氏菌(ATCC 25922), 粪肠球菌(CICC 23536), 屎肠球菌(CICC 21605)、创伤弧菌(ATCC 27562)、溶藻弧菌(ATCC 17749)、拟态弧菌(CICC 10474)、河流弧菌(ATCC 33809)。

各引物序列详见表 1, 配置成 50 μmol/L 浓度的溶液备用。

表 1 2 种致病性弧菌 LAMP 检测引物

Table 1 Sequences of primers for LAMP

目标基因	引物名称	引物序列(5'→3')
产毒素性霍乱弧菌 <i>ctxA</i> 基因 (GenBank: NC_015209.1)	F3	CTCAGACGGGATTGTAGGC
	B3	GGTATTCGTCAAGGAATTTACACC
	FIP	TGGATGAGGACTGTATGCCCTAATAGTTATAGCCACTGCACCCAACA
	BIP	CGAGTTCATTTGGGGTGCTTGTAGCCCTATTACGATGTAATTGTT
副溶血性弧菌 <i>gyrB</i> 基因 (GenBank: NC_004603.1)	F3	CTTACCGTCATGGTGAGCCT
	B3	CATTGCCACTTCTACCGAGATA
	FIP	CGTTTGTCTAGGATGTCGTAATGGCGGTTGTGGGTGATACGG
	BIP	TATCAAGCTTATTGATGAGCGCGAAGAAGTGGTCTTGCTTGTCGG
	LOOP	CAAGTGCAGAACTTTCTCTAACAC

1.2 仪器

Mini-Opticon 型荧光 PCR 仪、Basic 型电泳仪、Gel Doc XR 型自动凝胶成像系统(Bio-Rad 公司); Veriti 型梯度 PCR 仪(AB 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 的获取

将霍乱弧菌(包括产毒和非产毒型)和副溶血性弧菌菌种分别接种于 3%氯化钠碱性蛋白胨水培养基中, 其余菌株分别接种于脑心浸液肉汤培养基中, 36 °C 培养 18 h 后提取细菌基因组 DNA。

1.3.2 多重反应体系的建立

以 25 μL 反应体系为例, 其中各引物的浓度如下: 引物 F3 各 0.02 μmol/L、引物 B3 各 0.02 μmol/L、0.9 μmol/L 霍乱弧菌引物 FIP、0.9 μmol/L 霍乱弧菌引物 BIP、0.6 μmol/L 副溶血性弧菌引物 FIP, 0.6 μmol/L 副溶血性弧菌引物 BIP、0.6 μmol/L 副溶血性弧菌环引物 LOOP。其他组分包括 2.5 μL 10×反应缓冲液, 0.8 mmol/L dNTP, 8 U Bst 聚合酶, 1×Eva Green 荧光染料, 0.64 mol/L 甜菜碱, 1 μL 基因组 DNA 提取液。扩增时间为 100 min。在此体系条件下参考相关文献^[10]探索最适 MgSO₄ 的浓度和最佳扩增温度。

1.3.3 特异性的初步验证

应用 9 株目标菌和 17 株非目标菌基因组 DNA, 在 PCR 仪上分别测试多重 LAMP 反应体系, 并以电泳、离心沉淀和观察荧光三种方法观察扩增结果, 初步验证该方法对目标菌的扩增特异性。每株细菌的基因组 DNA 均需进行 3 次平行测试。

1.3.4 熔解曲线的分析

分别以单一产毒素性霍乱弧菌(小川型)基因组 DNA、单一副溶血性弧菌(CICC 10435)基因组 DNA 和按照 1:1 浓度比混合的二者混合基因组 DNA 为模板, 在荧光 PCR 仪上进行多重扩增, 反应温度设定为 63 °C, 反应时间为 100 min, 并间隔 1 min 收集荧光信号。扩增所得产物在荧光 PCR 仪上进行熔解曲线分析, 以确定霍乱弧菌和副溶血性弧菌扩增产物的熔解温度(即熔解曲线上的特征峰); 同时观察两种目标菌一起扩增时 LAMP 反应产物熔解温度是否与单一目标菌扩增时吻合。测试时以溶藻弧菌基因组 DNA 作为阴性对照。

1.3.5 扩增产物的测序验证

以产毒素性霍乱弧菌(小川型)和副溶血性弧菌(CICC 10435)为测试菌株, 以按 1:1 浓度比混合的二者混合 DNA 为模板, 进行二重 LAMP 扩增, 扩增体系设定为 100 μ L。将扩增所得产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化凝胶中分子量在 200 bp 至 1000 bp 间的产物, 并以此为 DNA 模板, 应用霍乱弧菌 FIP、BIP 引物和副溶血性弧菌 FIP 和 BIP 作为测序引物进行测序分析, 与引物设计时的预期序列进行比对后进一步验证扩增特异性。

1.3.6 对单一目标菌检测灵敏度的测试

以产毒素性霍乱弧菌(小川型)和副溶血性弧菌(CICC 10435)基因组 DNA 为模板, 并将其 DNA 分别自 1 ng/ μ L 的浓度 10 倍梯度稀释至 1 fg/ μ L。应用所建二重 LAMP 检测方法与 PCR 检测方法, 分别针对两种致病性弧菌的各个浓度基因组 DNA 进行单个目标菌检测灵敏度的测试和比较。二重 LAMP 检测分别采用荧光扩增曲线和琼脂糖凝胶电泳两种方式观察结果, PCR 检测以琼脂糖凝胶电泳方式观察结果; 而 PCR 反应体系中包含 0.2 μ mol/L F3 和 B3 引物(序列详见表 1), 2.5 μ L PCR 预混液, DNA 提取液 1 μ L, 反应条件为 95 °C、5 min, 95 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、30 s, 30 个循环, 4 °C 保存。每个浓度梯度的 DNA 模板分别进行 10 次独立测试, 当某个浓度 DNA 模板的 10 次测试中有 1 次无法观察到扩增结果, 该浓度便不能被认定为最低检测灵敏度, 而该浓度的上一稀释浓度才能被认定为最低检测灵敏度。测试时以溶藻弧菌基因组 DNA 作为阴性对照。

1.3.7 对混合目标菌检测灵敏度的测试

以产毒素性霍乱弧菌(小川型)和副溶血性弧菌(CICC 10435)基因组 DNA 为模板, 制备二者混合模板, 以测试两种基因组 DNA 同时存在时的检测灵敏度。模板制备方法为: 将产毒素性霍乱弧菌基因组 DNA 模板最终浓度固定在 1 ng/ μ L, 而副溶血性弧菌基因组 DNA 模板与之以 1:150、1:100、1:50、1:10 和 1:1 形成混合 DNA 模板; 再将副溶血性弧菌基因组 DNA 模板最终浓度固定在 1 ng/ μ L, 而产毒素性霍乱弧菌基因组 DNA 模板与之以 1:200、1:100、1:50、1:10 和 1:1 形成混合 DNA 模板。将各混合 DNA 模板分别进行 10 次多重 LAMP 反应并进行熔解曲线分析, 以测试当一种目标菌基因组 DNA 模板含量固定时, 另一种目标菌基因组 DNA 模板的检测灵敏度。当某个浓度比 DNA 模板的 10 次测试中有 1 次无法观察到扩增结果, 该浓度便不能被认定为最低检测灵敏度, 而该浓度的上一稀释浓度才能被认定为最低检测灵敏度。测试时以溶藻弧菌基因组 DNA 作为阴性对照。

1.3.8 模拟样品与真实样品的检测及与标准方法的比较

将产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌分别接种于 3%氯化钠碱性蛋白胨水培养液, 36 °C 培养 24 h 后, 以生食水产品三文鱼和北极贝为基质, 参考相关文献^[10]分别制备 10 份模拟产毒素性霍乱弧菌阳性样品、10 份副溶血性弧菌阳性样品和 10 份模拟阴性样品。另选取实验室在检的 130 批次生食水产品作为真实样品。

将模拟样品和真实样品分别以本实验建立的方法和标准的方法^[11,12]进行定性检测, 并比较两种方法的检测结果。

2 结果与讨论

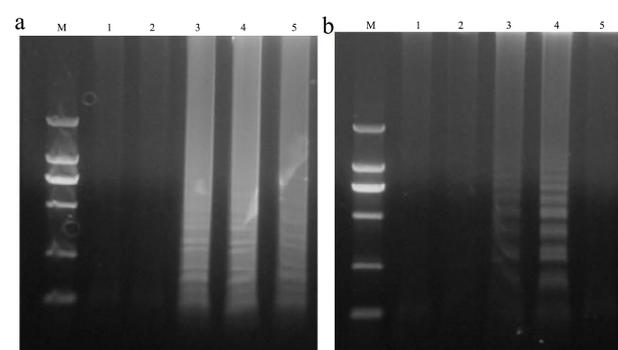


图 1 不同 $MgSO_4$ 浓度扩增产物电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of amplification products with different $MgSO_4$ concentrations

注: a, 霍乱弧菌; b, 副溶血弧菌; M, DNA marker DL2000;

1~5, MgSO₄ 的浓度分别为 3.8 mmol/L、4.2 mmol/L、4.6 mmol/L、5.0 mmol/L、5.4 mmol/L。

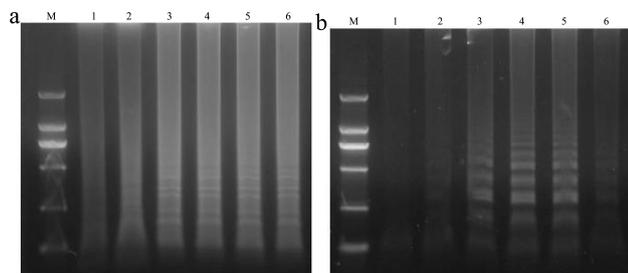


图 2 不同扩增温度扩增产物电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of amplification products with different temperatures

注: a, 霍乱弧菌; b, 副溶血弧菌; M, DNA marker DL 2000; 1~6: 扩增温度分别为 60 °C、61 °C、62 °C、63 °C、64 °C、65 °C。

2.1 最适 MgSO₄ 浓度和最佳扩增温度

产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌基因组 DNA 在不同 MgSO₄ 浓度条件下的扩增结果如图 1 所示, 在不同反应温度下的扩增结果如图 2 所示。由此可知, 当 MgSO₄ 浓度为 5.0 mmol/L, 扩增温度为 63 °C 时, 对两种目标菌基因组 DNA 的扩增效率均较为理想, 分别呈现明亮的扩增条带。最终确定最适 MgSO₄ 浓度为 5.0 mmol/L, 最佳扩增温度为 63 °C。

2.2 初步特异性验证

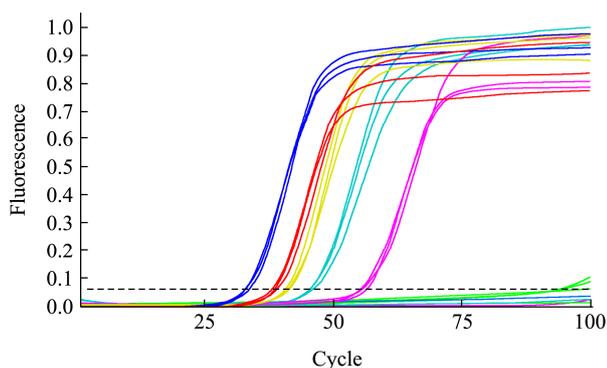


图 3 LAMP 荧光扩增图

Fig.3 Fluorescence curve of LAMP amplification

对 9 株目标菌和 17 株非目标菌的基因组 DNA, 以及 2 种目标菌的混合基因组 DNA 的 3 次平行扩增结果均与预期一致。在荧光定量 PCR 仪进行反应后, 目标菌及混合 DNA 的 3 次平行扩增均呈现明显扩增曲线, 而非目标菌均无扩增曲线 (图 3)。扩增产物的电泳观察检测结果与实时扩增曲线结果一致 (图 4)。通过对不同菌株的测试, 初步确认本方法对产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌基因组 DNA 具良好特异性。

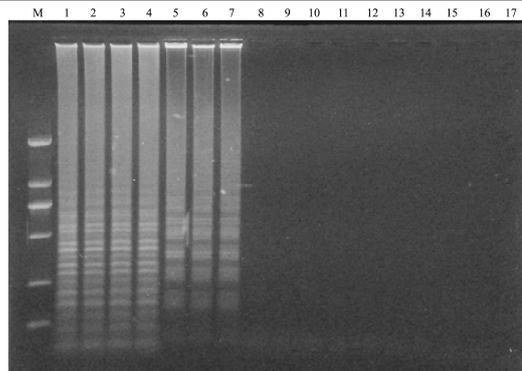


图 4 LAMP 扩增产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis pattern of LAMP amplification products

注: M, DNA marker DL2000; 1-4, 霍乱弧菌; 5-7, 副溶血弧菌; 8-11, 其他弧菌; 12-17, 非目标菌的基因组。

2.3 多重扩增产物的熔解曲线分析

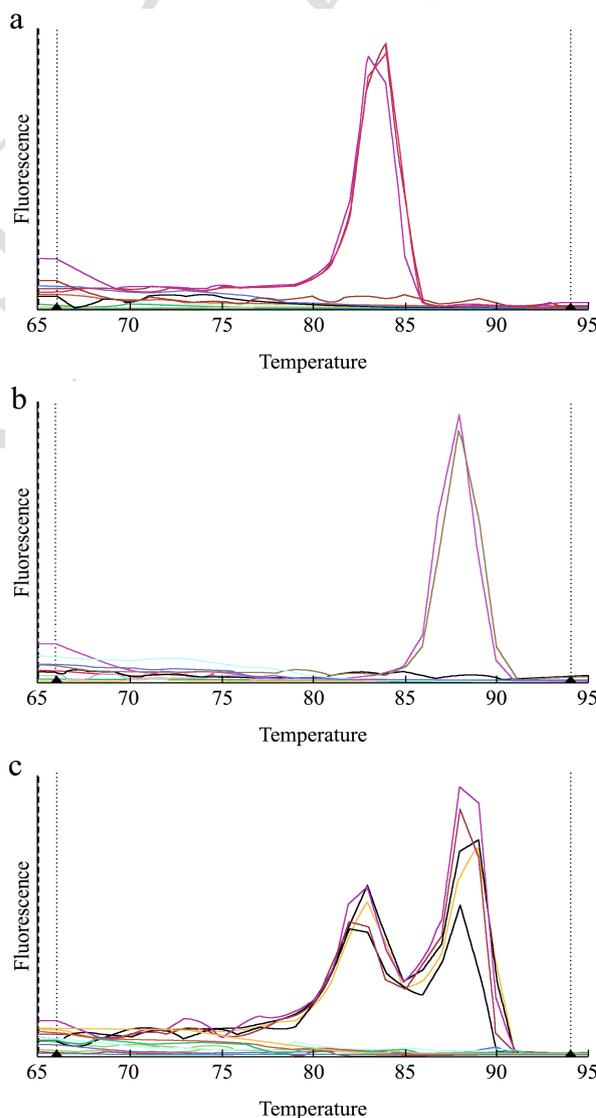


图 5 扩增产物熔解曲线分析结果

Fig.5 Dissociation curve analysis of LAMP products

注: a, 霍乱弧菌; b, 副溶血弧菌; c, 霍乱弧菌和副溶

血弧菌。

将扩增产物在荧光定量 PCR 仪上进行熔解曲线分析后发现：单一产毒素性霍乱弧菌 DNA 扩增产物的熔解曲线峰出现在 81~86 °C 之间，其最高峰出现在 83.5 °C 左右（图 5a）；单一副溶血性弧菌 DNA 扩增产物的熔解曲线峰出现在 86~91 °C 之间，其最高峰出现在 88 °C 左右（图 5b）；产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌混合基因组 DNA 的扩增产物则在 81~86 °C 之间和 86~91 °C 之间各有一个熔解曲线峰（图 5c）。由此可知，本实验所建立的二重 LAMP 检测体系不但可准确检测产毒素性霍乱弧菌和副溶血性弧菌基因组 DNA，而且可在进一步进行熔解曲线分析后，获知准确的目标菌信息。若在 83.5 °C 左右出现熔解曲线峰，说明存在产毒素性霍乱弧菌基因组 DNA；若在 88 °C 左右出现熔解曲线峰，说明存在副溶血性弧菌基因组 DNA；若 83.5 °C 和 88 °C 左右同时出现熔解曲线峰，说明模板中既有产毒素性霍乱弧菌基因组 DNA 又有副溶血性弧菌基因组 DNA。

2.4 单一目标菌的检测灵敏度

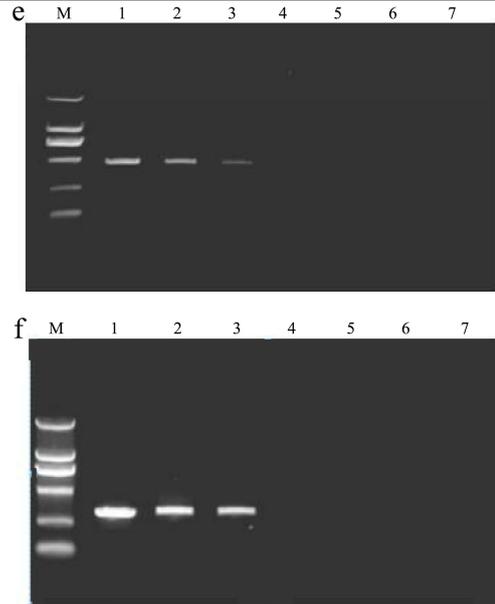
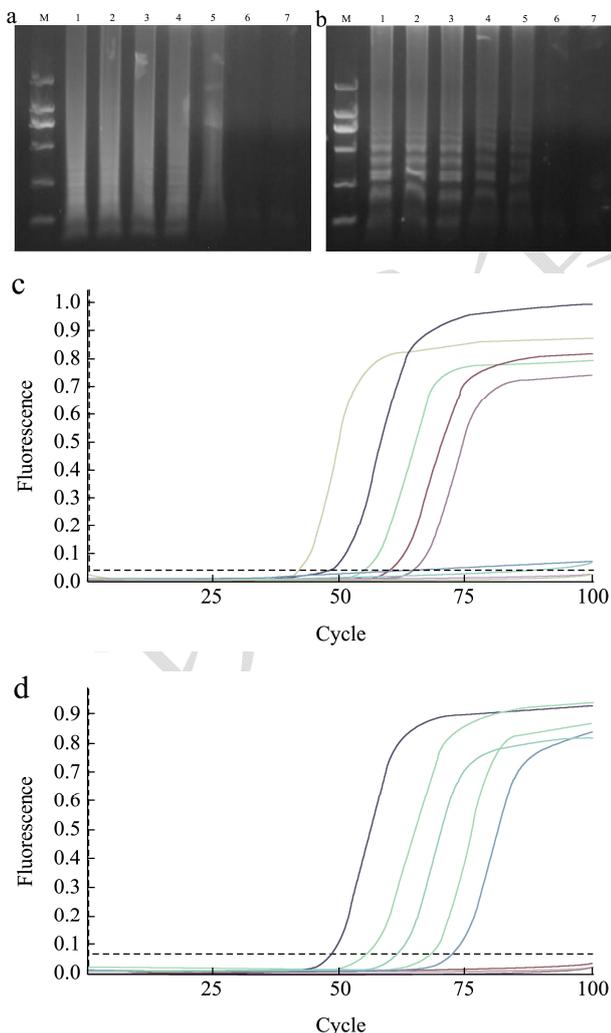


图 6 检测灵敏度对比

Fig.6 Sensitivity comparison of multiplexed LAMP and PCR

注：a 和 b 为 LAMP 扩增物的电泳图；c 和 d 为 LAMP 扩增物的荧光扩增曲线，DNA 模板浓度（以 10 倍稀释率）从 1 ng/L 到 1 fg/L；e 和 f 为 PCR 物质的电泳图；a、c 和为霍乱弧菌；b、d 和 f 为副溶血弧菌；M 为 DNA marker DL 2000；1~7 为 DNA 模板浓度（以 10 倍稀释率）从 1 ng/L 到 1 fg/L 的扩增物。

分别对产毒素性霍乱弧菌（小川型）和副溶血性弧菌（CICC 10435）的 DNA 模板进行 PCR、LAMP 电泳和 LAMP 荧光的灵敏度检测。结果显示，当两株目标菌的 DNA 模板浓度降至 10 fg DNA/反应管（DNA 模板加样量为 1 μL，可按照加入的 DNA 浓度折算每个反应管中 DNA 含量）时，10 次多重 LAMP 独立测试中各有 2 次未能获得阳性扩增结果；当两株目标菌的 DNA 模板浓度降至 1 pg DNA/反应管时，10 次 PCR 独立测试中各有 2 次未能获得阳性扩增结果或阳性扩增条带极弱。从上述实验结果分析，本实验所建立的二重 LAMP 检测方法，无论是通过观察荧光扩增曲线，还是产物电泳分析，其对两种目标菌基因组 DNA 的检测灵敏度均可达到 100 fg DNA/反应管，而 PCR 法对两种目标菌基因组 DNA 的检测灵敏度仅为 10 pg DNA/反应管（图 6）。

2.5 混合目标菌的检测灵敏度

对两种目标菌混合基因组 DNA 测试后发现，当产毒素性霍乱弧菌与副溶血性弧菌基因组 DNA 的浓度比为 1:100 时，10 次扩增的熔解曲线分析时仍可见较为明显的两个目标菌熔解曲线峰，但当浓度比为 1:150 时，已不能观察到副溶血性弧菌的熔解曲线峰；

反之当副溶血性弧菌与产毒素性霍乱弧菌基因组 DNA 的浓度比为 1:100 时,10 次扩增的熔解曲线分析时仍可见较为明显的两个目标菌熔解曲线峰,但当浓度比为 1:150 时,也已不能观察到产毒素性霍乱弧菌的熔解曲线峰。经测试发现,当两种目标菌 DNA 浓度相差超过 100 倍时,会因为高浓度目标 DNA 的优势扩增而抑制低浓度目标 DNA 的扩增。

2.6 多重 LAMP 产物的测序验证

对以霍乱弧菌和副溶血性弧菌两种菌的混合 DNA 为模板的二重 LAMP 扩增产物进行直接测序,结果显示,两种目标菌的 DNA 序列均能被高效扩增,且测序结果与预期完全吻合。测序结果进一步验证所建立的二重 LAMP 方法能具有较好的特异性和稳定性。

2.7 模拟样品和真实样品检测对比试验

应用二重 LAMP 检测方法对所制备的模拟样品和在检的真实样品的检测结果与标准方法的检测结果吻合,且模拟样品的检测结果与预期完全一致。所检的 130 份生食水产品真实样品中,有 21 份检出副溶血性弧菌,检出率为 16.2%;所有样品中均未检出霍乱弧菌。同时,所建立的二重 LAMP 检测方法从增菌至获得结果的检测周期仅为 1 d,如遇高污染的样品,省略增菌步骤后可在 3 h 内获得检测结果,而标准检测方法的检测周期需 3~5 d。

3 结论

3.1 由于 LAMP 反应体系种所含引物较普通 PCR 更多,同时还要保证两种目标物扩增产物的熔解温度不能因太过接近而无法区分,因此引物的设计较为困难,虽进行大量尝试,但应用于最终的体系后仍或多或少存在两种致病菌 DNA 不能等效扩增的情况。有研究通过在反应体系中增加了针对目标序列的环引物可显著提高扩增效率^[13]。本研究在副溶血性弧菌的检测引物组中增加了 1 条环引物,显著提高了二重体系中副溶血性弧菌 DNA 的扩增效率,使两种目标菌基因组 DNA 的 LAMP 扩增效率相对一致。而通过对目标菌株和非目标菌株的测试,以及对扩增产物的测序分析,充分验证了本方法的特异性。

3.2 当应用二重 LAMP 进行快速筛选或现场检测时,可直接对扩增产物离心观察沉淀,或直接观察荧光。若无沉淀或荧光,则可直接判定为阴性结果;若观察到沉淀或荧光,则可将反应管低温暂存,带回实验室后统一在荧光定量 PCR 仪上进行熔解曲线分析,从而确定模板中所含的目标 DNA。而通过比较发现,无论

是 PCR 仪或恒温水浴锅,都能作为二重 LAMP 扩增的加热方式,均能取得良好的扩增效果,其阳性扩增产物能在荧光定量 PCR 仪上进行准确的熔解曲线分析,且整个检测过程无需开盖检测,因此大大降低了污染率。

3.3 本文所建立的二重 LAMP 体系对两种目标菌基因组 DNA 的检测灵敏度均达到了 100 fg DNA/反应管,较普通 PCR 的检测灵敏度提高了 100 倍。但即便有较高的检测灵敏度,对于污染量相对较低的加工食品,仍需通过增菌提高目标菌的数量,避免因目标菌 DNA 模板浓度低于检出限而出现假阴性结果;而对于高污染的样品(如食物中毒样品,临床患者的呕吐物和排泄物),可直接提取样品中细菌 DNA 来获取扩增模板,检测周期更短,适用于现场快速筛查。但后期针对目标菌确认的熔解曲线分析仍依赖荧光 PCR 仪等大型仪器,但分析的过程较酶切、测序、引物标记等方式相对简便,成本更低。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28: E63
- [2] Zhuang L, Gong J, Li Q, et al. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting bcfD gene [J]. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2014, 59(6): 658-664
- [3] Zhao X, Li Y, Park M, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the femA gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples [J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 23(2): 246-50
- [4] Shao Y, Zhu S, Jin C, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 148(2): 75-79
- [5] Jiang K, Lv Q F, Zhang D L, et al. A novel, sensitive, accurate multiplex loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Staphylococcus aureus* in food [J]. *J. Food Agric. Environ.*, 2012, 10(3 & 4): 252-256
- [6] Wang Y, Wang Y, Lan R, et al. Multiple endonuclease restriction real-time loop-mediated isothermal amplification: a novel analytically rapid, sensitive, multiplex loop-mediated isothermal amplification detection technique [J]. *J. Mol. Diagn.*, 2015, 17(4): 392-401
- [7] Okada K, Chantaroj S, Taniguchi T, et al. A rapid, simple, and

- sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholera* in rectal swab samples [J]. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.*, 2010, 66(2): 135-139
- [8] GB 29921-2013, 食品中致病菌限量[S]
GB 29921-2013, Limit of Pathogen in Foods [S]
- [9] 张蔚,潘劲草,孟冬梅,等.多重实时 PCR 检测产毒素性霍乱弧菌和副溶血弧菌[J].*微生物学通报*,2007,34(5):950-954
ZHANG Wei, PAN Jin-cao, MENG Dong-mei, et al. Development of multiplex real-time per for detection of toxigenic *vibrio cholerae* and *virbio parahaemolyticus* [J]. *Microbiology*, 2007, 34(5): 950-954
- [10] 姜侃,张慧,汪新,等.多重 LAMP-熔解曲线法检测食品中两种食源性致病菌[J].*食品与机械*,2015,31(2):87-92
- JIANG Kan, ZHANG Hui, WANG Xin, et al. Development of multiplex LAMP combined with melting curves analysis for detection of two kinds of food borne pathogens [J]. *Food & Machinery*, 2015, 31(2): 87-92
- [11] SN/T 1022-2010,进出口食品中霍乱弧菌检验方法[S]
SN/T 1022-2010, Method for the determination of *Vibrio Cholerae* in food for export [S]
- [12] GB 4789.7-2013,食品微生物学检验副溶血性弧菌检验[S]
GB 4789.7-2013, Food microbiological examination: *Vibrio Parahaemolyticus* [S]
- [13] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol. Cell. Probes*, 2002, 16(3): 223-229