

单增李斯特菌反转录环介导等温扩增检测方法 的建立

徐匆¹, 罗华建¹, 黄皓¹, 梁卫驱¹, 胡珊¹, 李艳芳¹, 胡楚维¹, 罗鸿斌²

(1. 东莞市农业科学研究中心, 广东东莞 523086) (2. 东莞理工学院研究生处, 广东东莞 523808)

摘要: 本研究针对单增李斯特菌的快速检测方法进行开发, 首先根据单增李斯特菌 *hlyA* 基因序列保守区设计 2 对引物, 在同一体系中对单增李斯特菌的 RNA 进行反转录及环介导等温扩增, 同时使用羟基萘酚蓝(终浓度 200 μM)作为反转录环介导等温扩增产物的指示剂, 在不开盖进行凝胶电泳检测的情况下, 可直接根据体系颜色变化判读结果, 能够在 20 h 内(包括增菌时间)检测出样本中是否存在单增李斯特菌的 RNA。本研究建立的 RT-LAMP-HNB 检测方法对单增李斯特菌 RNA 的检出限为 $5.8 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 起始接种浓度检出限为 10 CFU/10 mL, 灵敏度是 RT-PCR 的 10 倍, 且能够检测出是牛奶中否存在的单增李斯特活菌, 具有实际应用价值。本研究开发的检测方法具有快速、准确、便捷、灵敏度高等特点, 适用于在基层或不便利地区推广使用。

关键词: 单增李斯特菌; 反转录-环介导等温扩增(RT-LAMP); 羟基萘酚蓝(HNB); *hlyA* 基因; 快速检测

文章篇号: 1673-9078(2020)06-297-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1182

Establishment of RT-LAMP-HNB Method for *Listeria monocytogenes*

Detection

XU Cong¹, LUO Hua-jian¹, HUANG Hao¹, LIANG Wei-qu¹, HU Shan¹,
LI Yan-fang¹, HU Chu-wei¹, LUO Hong-bin²

(1. Research Center of Agricultural of Dongguan City, Dongguan 523086, China)

(2. Dongguan University of Technology, Graduate student office, Dongguan 523808, China)

Abstract: A rapid detection method RT-LAMP-HNB for *Listeria monocytogenes* was developed. Two pairs of primers were designed according to the conserved region of the *hlyA* gene sequence. In the same reaction system, the RNA of *Listeria monocytogenes* was reverse transcribed to cDNA and then was amplified by loop mediated isothermal amplification. At the same time, hydroxyl naphthol blue (HNB, the final concentration of 200 μM) was used as an indicator for reverse transcription loop mediated isothermal amplification products (RT-LAMP). The amplified results can be interpreted according to the color change of the system, and the gel electrophoresis was not necessary. This detection can be done within 20 hours (including the time of enrichment) and the live *Listeria monocytogenes* in milk can be detected. The detection limit in this study for the RNA of *Listeria monocytogenes* is $5.8 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, the detection limit of the initial inoculation concentration is 10 CFU/10mL, which are 10 times more sensitive than the RT-PCR method. RT-LAMP-HNB detection method developed in this study has the characteristics of fast, accurate, convenient and high sensitivity, which is suitable for popularization and application in grass-root labs or inconvenient areas.

Key words: *Listeria monocytogenes*; reverse transcript-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP); hydroxynaphthol blue (HNB); *hlyA* gene; rapid detection

引文格式:

徐匆, 罗华建, 黄皓, 等. 单增李斯特菌反转录环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 297-302

XU Cong, LUO Hua-jian, HUANG Hao, et al. Establishment of RT-LAMP-HNB method for *Listeria monocytogenes* detection [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 297-302

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A020208002)

作者简介: 徐匆(1982-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 生物技术

通讯作者: 罗鸿斌(1987-), 男, 工程师, 研究方向: 生物技术

单增李斯特菌(单核细胞增生李斯特氏菌, *Listeria monocytogenes*)是一种广泛存在于自然界中的典型耐冷性细菌,生长温度范围在-1.5 °C~45 °C,是四大食源性致病菌之一^[1]。该菌能够引起人畜共患的李氏菌病,常见于新生儿、孕妇、免疫缺陷患者。临床症状包括发热、自然流产、脑膜炎、败血症等,死亡率可达30%~70%^[2-4],是最致命的病原菌之一。因此,对食品中单增李斯特菌的监控和检测是把控食品安全的重要措施之一。对单增李斯特菌的检测方法包括传统分离培养^[5]、免疫学检测^[6-8]以及分子检测法^[9-13]。传统分离法耗时久、操作繁杂,单增李斯特菌检测的国家食品安全标准采用的就是此类方法,检验时间至少需要四天^[5];免疫学检测需要特异性抗体,假阳性率高;分子检测法具有快速、灵敏、准确等特点,但其中PCR、荧光定量PCR需要特定仪器,恒温扩增法如环介导等温扩增(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)不需要PCR仪这种特殊仪器便可进行反应,适用于现场或基层适用,且LAMP灵敏度普遍高于PCR一个数量级^[6,9,11-13]。

LAMP是2000年由Notomi^[14]等人发明的恒温快速核酸扩增技术,因其便捷、快速、反应条件单一等特点,被应用在如细菌^[15]、病毒^[16]、寄生虫^[17]检测等的诸多领域。LAMP技术与PCR技术相比较,最大的优势在于不需要PCR仪即可完成DNA扩增,但对扩增产物的检测在早期仍需要进行琼脂糖凝胶电泳,这一步骤限制了LAMP技术在野外或是基层单位中的应用。研究者们将SYBR Green I^[18]、钙黄绿素^[19]、HNB(羟基萘酚蓝)^[20]等加入LAMP体系中,通过肉眼可见的颜色变化来判断是否有扩增产物产生,从而为LAMP技术的推广使用提供更合适的技术条件。

本研究针对单增李斯特菌的RNA进行检测,能够避免由于死菌DNA残留引起的假阳性从而判断样品中是否存在活菌;并在体系中加入HNB作为指示

剂,LAMP反应刚开始时HNB与镁离子结合使得体系为紫罗兰色,随着环介导等温扩增反应的进行,焦磷酸根离子不断析出,与镁离子结合生成焦磷酸镁沉淀,HNB失去镁离子,体系颜色由紫罗兰色变为天蓝色。在体系中加入HNB既能够满足肉眼判读结果的要求,又能够避免开盖检测引起气溶胶污染出现的假阳性,更适合在实际检测中应用。

1 材料与方法

1.1 菌株培养和RNA抽提

文中所用菌株均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。包括单增李斯特菌3株(CICC21633, CICC 21635, CICC 23929),志贺氏菌3株(CICC 21534, CICC 21535, CICC 21680)、沙门氏菌4株(CICC21482, CICC 21484, CICC 21493, CICC 21513)、大肠杆菌3株(CICC10389, CICC 10667, CICC 21530)及金黄色葡萄球菌4株(CICC10384, CICC 21600, CICC 21601, CICC 23656)。单增李斯特菌培养基为脑心浸液培养基,培养温度36 °C;志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌使用营养肉汤培养基,培养温度36 °C。

使用细菌总RNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)公司)抽提细菌RNA,紫外分光光度计测定RNA溶液浓度、OD₂₆₀/OD₂₈₀及OD₂₆₀/OD₂₃₀。

1.2 LAMP引物设计

针对单增李斯特菌溶血素hlyA基因设计LAMP内、外引物,hlyA序列下载自NCBI,根据Clustalx的序列比对结果,选取同源性高的序列部分,使用PrimerExplorer V5设计LAMP引物,利用BLAST®验证引物序列的特异性。在本研究中使用1套2对引物进行RT-LAMP检测(表1)。

表1 单增李斯特菌RT-LAMP及RT-PCR引物序列

Table 1 RT-LAMP and RT-PCR primer sequences

引物名称	序列 (5'→3')
RT-LAMP 引物	
F3	GGGATGAAAKAAATTATGATCCTGA
B3	TTTACAAGCGGTARGTT
FIP	ACGATGTGAAATGAGCTAACTTRCCGAAATTGTTCAACATAAAAAGTGG
BIP	AATGTTTACGCTAAAGAATGCACTGCGGTATCAATTACCGTTCT
RT-PCR 引物	
F3	GGGATGAAAKAAATTATGATCCTGA
B3	TTTACAAGCGGTARGTT

1.3 RT-LAMP-HNB

每个 LAMP 反应体系包括 12.5 μL 主反应混合物 (Warmstart Lamp Kit, NEB, USA), F3、B3 引物 2.5 μL (终浓度 0.2 μM), FIP 和 BIP 引物 2.5 μL (终浓度 1.6 μM), 0.25 μL HNB (FLUKA, 终浓度 200 μM)^[9], 1 μL 模板 DNA/RNA, 补充 H₂O 至终体积 25 μL 。体系混匀后加入 20 μL 石蜡油, 64 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 85 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 终止反应。

1.4 RT-PCR

使用表 2 中 F3/B3 为 RT-PCR 引物, 一步法 RT-PCR 试剂盒 (PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2, Takara) 扩增目的片段, 目的片段大小为 212 bp。RT-PCR 体系含酶混合物 2 μL , 缓冲液 12.5 μL , F3 和 B3 引物 5 μL (终浓度 0.4 μM), 1 μL 模板 DNA/RNA, 补充 H₂O 至终体积 25 μL 。扩增条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min) 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.5 引物特异性检测及 RT-LAMP-HNB 灵敏性检测

用 LAMP 引物扩增 3 株单增李斯特菌、4 株金黄色葡萄球菌、4 株沙门氏菌、3 株志贺氏菌及 3 株大肠杆菌的 DNA, 以检验 RT-LAMP-HNB 引物的特异性。

将提取的单增李斯特菌 RNA 进行 10 倍倍比稀释, 以此为模板进行 RT-LAMP-HNB 检测, 检测该方法的灵敏性。

1.6 RT-LAMP-HNB 方法检测人工污染牛奶样品

在 SHAO 及 GARRIDO 等人^[21,22]的方法上稍作改动: 在 9 mL 牛奶(市购)中加入含单增李斯特菌浓度为 $10^0\sim 10^7$ CFU/mL 的牛奶 1 mL, 将此 10 mL 牛奶加入至 90 mL 脑心浸液培养基中, 36 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 16 h 后, 取 1 mL 抽提 RNA, 进行 RT-LAMP-HNB 检测。

1.7 产物检测

RT-LAMP、RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳上进行分析, 以 4S GelRed (BBI) 作为核酸染料。

2 结果

2.1 LAMP 引物特异性检测

本研究初始共设计了 5 套 LAMP 引物, 并通过 BLAST 比对引物序列的特异性。根据引物筛选结果选取第三套引物以供后续实验使用(图 1)。对选取的引物进行特异性检测, 使用该引物分别扩增 3 株单增李斯特菌、4 株金黄色葡萄球菌、4 株沙门氏菌、3 株志贺氏菌及 3 株大肠杆菌基因组 DNA, 检测结果如图 2 所示, 仅 3 株单增李斯特菌出现梯形条带, 其余菌株均显示为阴性。说明该引物仅针对单增李斯特菌 *hylA* 基因产生特异性扩增, 对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌以及大肠杆菌的 DNA 未产生扩增反应, LAMP 扩增的特异性良好, 可用于单增李斯特菌的核酸检测。

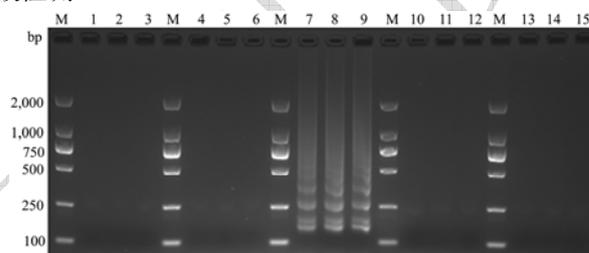


图 1 引物筛选

Fig.1 Primers screening

注: M: DL 2000 Marker; 1~3: 第一套引物扩增结果; 4~6: 第二套引物扩增结果; 7~9: 第三套引物扩增结果; 10~12: 第四套引物扩增结果; 13~15: 第五套引物扩增结果。

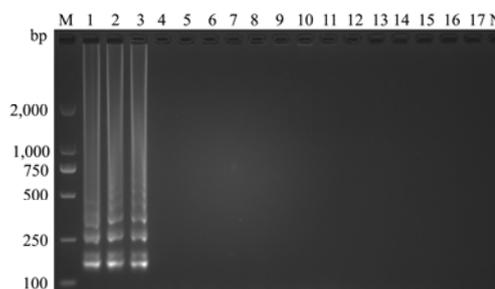


图 2 LAMP 引物特异性检测

Fig.2 Specificity of LAMP assays

注: M: DL 2000 Marker; 1~3: 单增李斯特菌; 4~7: 金黄色葡萄球菌; 8~11: 沙门氏菌; 12~14: 志贺氏菌; 15~17: 大肠杆菌; N: 阴性对照。

2.2 RT-LAMP-HNB 检测方法的建立

将过夜培养的单增李斯特菌高温高压灭活, 提取灭活后菌液中的 RNA, 模拟死菌状态下的 RT-LAMP-HNB 检测; 同时提取未被灭活的活菌 RNA 为阳性对照。对两组 RNA 进行 RT-LAMP, 结果如图 3 所示, 死菌的 RT-LAMP 反应未产生扩增产物, 活

菌则产生明显扩增产物,说明本研究中使用的 RNA 抽提技术及 RT-LAMP 技术能够有效区分检测对象中是否存在活的单增李斯特菌;在死菌及活菌 RT-LAMP 体系中加入 HNB (终浓度 200 μM) 后,结果显示, HNB 不影响 RT-LAMP 体系中的核酸扩增,活菌 RNA 的扩增反应体系为天蓝色,死菌 RNA 的扩增反应体系为紫罗兰色,颜色差别肉眼可见(图 3)。因此, RT-LAMP-HNB 方法可用于活单增李斯特菌的检测,能够避免样品中由死菌产生的假阳性;且该法可依赖肉眼判读结果的阴性或阳性,不需要其他方法及设备。

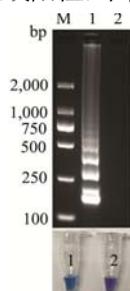


图 3 RT-LAMP-HNB 检测方法的建立

Fig.3 Establishment of RT-LAMP-HNB detection

注: M: DL 2000 Marker; 1: 活菌 RNA RT-LAMP 扩增产物; 2: 死菌 RNA RT-LAMP 扩增产物。上图为电泳检测结果,下图为 HNB 显色结果。

在利用 LAMP 方法对单增李斯特菌进行检测的已有研究中,姚栋等^[22]在 LAMP 反应完成后加入 SYBR Green I 作为产物指示剂对单增李斯特菌 DNA 进行检测,检测下限为 3 CFU/mL,该法虽然使用肉眼判别法,但需要在 LAMP 反应结束后开盖加入 SYBR Green I, LAMP 产物在开盖过程中容易出现气溶胶造成污染,致使后续检测出现假阳性。而本研究在体系配制初期加入 HNB,在 LAMP 反应结束后便可直接用肉眼根据体系颜色变化判断结果,不需要开盖操作,从而能够有效避免由于气溶胶污染引起的假阳性;赵萌^[16]在 LAMP 反应体系中加入 HNB,灵敏度为 4.5 CFU/mL。上述检测方法针对的是单增李斯特菌的 DNA,不能鉴别活菌和死菌,而本研究建立的 RT-LAMP-HNB 检测方法在提取单增李斯特菌的 RNA 后,对 RNA 进行反转录及 LAMP 扩增,能够分辨待检样品中是否存在活的单增李斯特菌。

2.3 RT-LAMP-HNB 及 RT-PCR 灵敏性检测

提取单增李斯特菌活菌 RNA 后,测定 RNA 浓度为 5.8 $\mu\text{g/mL}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=2.04$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}=1.96$,可用于后续实验。将单增李斯特菌 RNA 以 10 倍梯度稀释,稀释液作为模板进行反转录环介导等温扩增,所得扩增产物同时以凝胶电泳和 HNB 显色进行判读。

RT-LAMP 产物经凝胶电泳和 HNB 显色后,两种产物检测方法都显示 RT-LAMP 检测极限为 $5.8 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (图 4a); RT-PCR 产物经凝胶电泳后,检测极限为 $5.8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (图 4b)。因此在本研究中 RT-LAMP-HNB 的灵敏性为 RT-PCR 的 10 倍。

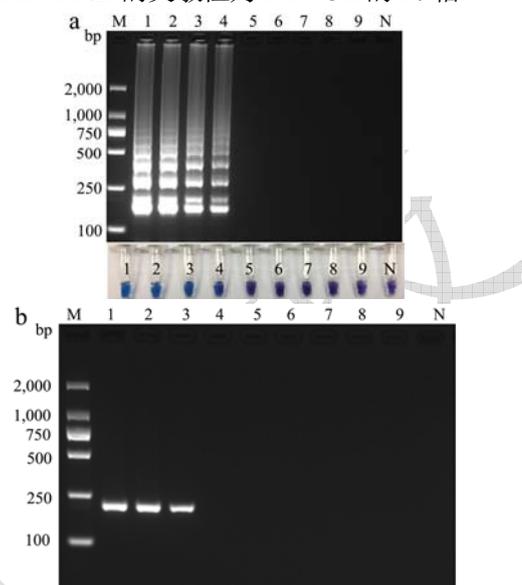


图 4 RT-LAMP-HNB 及 RT-PCR 灵敏性检测

Fig.4 Sensitivity of RT-LAMP-HNB and RT-PCR assays

注: M: DL 2000 Marker; 1~9: RNA 稀释倍数为 $10^0 \sim 10^8$; N: 阴性对照。a: 上图为 RT-LAMP 扩增电泳检测结果,下图为 HNB 显色结果; b: RT-PCR 扩增电泳检测结果。

2.4 RT-LAMP-HNB 在人工污染牛奶检测中的灵敏性检测

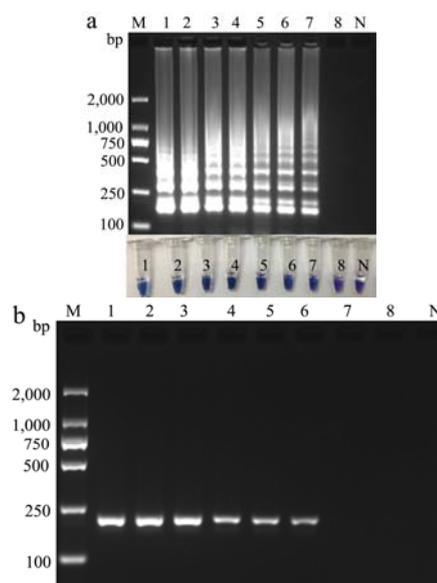


图 5 RT-LAMP-HNB 在人工污染牛奶中的灵敏性检测

Fig.5 Sensitivity of RT-LAMP-HNB and RT-PCR assays for artificially contaminated

注: M: DL 2000 Marker; 1~8: 初始接种浓度为 $10^7 \sim 10^0$ CFU/10 mL; N: 阴性对照。a: RT-LAMP 扩增结果, 上图为电泳检测结果, 下图为 HNB 显色结果; b: RT-PCR 扩增电泳检测结果。

以不同浓度人工接种单增李斯特菌至牛奶中, 过夜培养16 h后取1 mL提取RNA, 进行RT-LAMP-HNB检测, 结果如图5所示, RT-LAMP-HNB可检测出的最低接种浓度为10 CFU/10mL, HNB显色结果与琼脂糖凝胶电泳结果对扩增产物的判读保持一致(图5a); RT-PCR可检测出的最低接种浓度为100 CFU/10 mL(图5b)。以上结果表明本研究建立的RT-LAMP-HNB方法在检测人工污染单增李斯特菌的牛奶时, 灵敏性为RT-PCR的10倍。

周振森等^[11]同样以单增李斯特菌的RAN为检测目的物, 利用OptiGene Genie便携式仪器进行反转录荧光LAMP, 样品增菌后的最低接种浓度 10^0 CFU/25 mL, 高于本研究中的10 CFU/10 mL, 但该研究需要使用特定仪器, 限制了该法的使用。

3 讨论

3.1 本研究以单增李斯特菌的 *hlyA* 基因为目的基因, 建立了单增李斯特菌的 RT-LAMP-HNB 检测方法。该法不仅具有常规 LAMP 方法的特异性强、灵敏度高、实验条件要求低等特点, 还兼顾了仅检测活菌、不需开盖检测, 避免气溶胶污染等特点。该法可从人工污染单增李斯特菌的牛奶中检测出活菌阳性, 说明本研究建立的单增李斯特菌 RT-LAMP-HNB 可适于在实际检测中应用。

3.2 本研究为了能够有效鉴别活、死菌, 将检测对象设定为 RNA, RNA 由于其易降解的特点, 在抽提过程中极易产生损失, 后期研究过程中可设法提高 RNA 抽提效率, 进一步提升该检测方法的灵敏度; 此外仅对牛奶进行了人工污染检测, 基于食品种类繁多, 食品基质的复杂性会影响检测结果, 后续应扩大食品检测种类, 获取更多实际应用数据。

参考文献

- [1] Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii* [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 136-138
- [2] 宋筱瑜, 裴晓燕, 徐海滨, 等. 我国零售食品单增李斯特菌污染的健康风险分级研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(4): 447-450
SONG Xiao-yu, PEI Xiao-yan, XU Hai-bin, et al. Risk ranking of *Listeria monocytogenes* contaminated ready-to-eat foods at retail for sensitive population in China [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(4): 447-450
- [3] Valimaa A L, Tilsala-Timisjarvi A, Virtanen E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain: A review [J]. Food Control, 2015, 55: 103-104
- [4] Williams M A, Schimidt R L, Lenz L L. Early events regulating immunity and pathogenesis during *Listeria monocytogenes* infection [J]. Trends in Immunology, 2012, 33(10): 488-495
- [5] GB 4789.30-2010, 食品安全国家标准单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010
GB 4789.30-2010, National food safety standard for *Listeria monocytogenes* [S]. Beijing: China Standards Press, 2010
- [6] 赵萌. 单增李斯特菌免疫检测方法的建立[D]. 天津: 天津科技大学, 2018
ZHAO Meng. Establishment of immunoassay for *Listeria monocytogenes* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018
- [7] Jaakohuhta S, H Rm H, Tuomola M, et al. Sensitive *Listeria* spp. immunoassay based on europium (III) nanoparticulate labels using time-resolved fluorescence [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 114(3): 288-294
- [8] 周莉, 朱海华, 关炳峰, 等. 免疫磁珠检测食品中单增李斯特菌的研究[J]. 中国食品添加剂, 2016, 2: 132-136
ZHOU Li, ZHU Hai-Hua, GUAN Bing-Feng, et al. Research of immune magnetic beads in *Listeria monocytogenes* testing in foods [J]. China Food Additives, 2016, 2: 132-136
- [9] 张超. 单核细胞增生李斯特菌 HNB-LAMP 检测方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
ZHANG Chao. Development of HNB-LAMP method for detection of *Listeria monocytogenes* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
- [10] 林艳艳, 邢子伟, 谭翰清. 单核细胞增生李斯特菌 *hly* 基因实时荧光 PCR 的建立与研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(12): 1184-1188
LIN Yan-yan, XING Zi-wei, TAN Han-qing, et al. Establishment and application of real-time PCR for *hlyA* gene of *Listeria monocytogenes* [J]. China Tropical Medicine, 2017, 17(12): 1184-1188
- [11] 周振森, 丁梦璇, 梁玉林, 等. 单增李斯特菌 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 184-189
ZHOU Zhen-sen, DING Meng-xuan, LIANG Yu-lin, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification [J]. The

- Food Industry, 2019, 40(4): 184-189
- [12] 张文敏,石育娇,戚成,等.恒温实时荧光法快速检测不同样品中的单增李斯特菌[J].食品与生物技术学报,2019,38(5): 44-50
ZHANG Wen-min, SHI Yu-jiao, QI Cheng, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different samples by real time fluorescence isothermal amplification [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(5):44-50
- [13] 姚栋,张如胜,欧新华,等.快速检测单核细胞增生李斯特菌 LAMP 方法的建立[J].江苏大学学报(医学版),2012,22(5): 394-397
YAO Dong, ZHANG Ru-sheng, OU Xin-hua, et al. To develop a loop-mediated isothermal amplification assay for quick detection of *Listeria monocytoge* [J]. Journal of Jiangsu University (Medicine Edition), 2012, 22(5): 394-397
- [14] Notomi T, Ok Ayama H, Ma Subuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28: e63
- [15] Bosward K L, House J K, Deveridge A, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine milk [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(3): 2142-2150
- [16] Tahzima R, Foucart Y, Peusens Gbelien T, et al. New sensitive and fast detection of little cherry virus 1 using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Journal of Virological Methods, 2019, 265: 91-98
- [17] Di H, Ye L, Neog S B, Meng H, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with enrichment culture for rapid detection of very low numbers of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood samples [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2015, 38(1): 82-87
- [18] Chen L, Jiao Z Y, Liu D M, et al. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Maize chlorotic mottle virus in maize [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 240: 49-53
- [19] Besuschio S A, Llano M M, Benatar A F, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples [J]. Plos Neglected Tropical Diseases, 2017, 11(7): e0005779
- [20] Irin H, Nuntaree D, Wanida L. Semi-quantitative visual detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-generated DNA by distance-based measurement on a paper device [J]. Talanta, 2017, 175: 135-142
- [21] 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]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2), 75-79
- [22] Garrido-Maestu A, Fucinos P, Azinherio S, et al. Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella* spp., *Enteritidis* and *Typhimurium* in food samples [J]. Food Control, 2017, 80, 297-306

勘误

由于编辑人员疏忽,本刊2020年第36卷第5期(总249期)第174页,《食用菌发酵液对热干面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用》一文中图4a错误,现更正如下,并向本文作者及广大读者致歉。

