

酸乳中葡糖杆菌的 LAMP 检测方法研究

李月华^{1,2}, 张翠侠², 王爽², 章晶晶², 杨岚², 周巍^{1,2}, 张岩²

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

(2. 河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 河北石家庄 050071)

摘要: 为了给酸乳生产企业提供一种快捷、简便、灵敏的葡糖杆菌的 LAMP 检测方法, 本研究选取葡糖杆菌属的模式菌株氧化葡糖杆菌为代表菌株。根据 GenBank 中公布的氧化葡糖杆菌的 16S rRNA (X73820) 基因的强特异性序列设计四条引物, 优化引物、Mg²⁺、温度等反应条件, 建立了环介导等温扩增技术检测酸乳中葡糖杆菌的方法。对该方法的特异性和灵敏度进行评价, 并与 PCR 方法的灵敏度进行比较。结果显示, 该组引物的特异性强, 对反应产物进行酶切分析, 酶切产物的片段与理论值相符; 该 LAMP 方法检测纯菌的灵敏度为 7.5×10¹ CFU/mL, 是 PCR 检测方法的 10 倍; 用纯菌液对酸奶进行人工污染, 提取模拟变质酸奶的 DNA 进行 LAMP 扩增, 其最低检出限为 7.5×10² CFU/mL。综上所述, 本研究建立的 LAMP 检测方法特异性强、灵敏度高, 耗时短, 实现了对葡糖杆菌的快速检测, 在食品检测行业具有很好的应用前景。

关键词: 葡糖杆菌属; 环介导等温扩增; 检测; 酸乳

文章编号: 1673-9078(2016)2-342-346

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.050

Study on LAMP for Detecting *Gluconobacter* in Yogurt

LI Yue-hua¹, ZHANG Cui-xia², WANG Shuang², ZHANG Jing-jing², YANG Lan², ZHOU Wei^{1,2}, ZHANG Yan²

(1.College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

(2.Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China)

Abstract: Objective: The aim was to develop a rapid, simple, and sensitive LAMP method for the detection of *Gluconobacter* to be used in the yogurt industry. Method: *Gluconobacter oxydans* was selected as the type culture strain. Two pairs of LAMP primers targeting the 16S rRNA (X73820) housekeeping gene of *Gluconobacter* available in GenBank were designed. Concentrations of the primers and Mg²⁺ and the temperature of the LAMP were optimized, and a rapid, sensitive LAMP assay for *Gluconobacter* detection was established. Sensitivity of the assay was evaluated and compared with the PCR assay. Results: It was found that the LAMP primers showed high specificity and the LAMP product sizes, after restriction enzyme digestion, were consistent with the theoretical fragment sizes. The sensitivity of the LAMP assay for *Gluconobacter* was 7.5 × 10¹ CFU/mL. The LAMP assay was found to be 10-fold more sensitive than the traditional PCR assay. The LAMP detection limit was 7.5 × 10² CFU/mL for artificial contaminated yogurt. Conclusion: LAMP amplification established in this study provides a rapid, highly specific and sensitive method for *Gluconobacter* detection. The LAMP method is valuable for its application and exploitation in food industries.

Key words: *Gluconobacter*; loop-mediated isothermal amplification; detection; yogurt

葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)是一类革兰氏阴性杆菌, 极生鞭毛、绝对好氧, 尚未发现对人及动物产生致病性, 与人类生产生活关系密切。葡糖杆菌属的部分菌株在维生素 C、米格列醇的工业生产合成等食品

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401584); 河北省食药局科技计划项目 (PT2014030)

作者简介: 李月华 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 有害微生物检测与控制。

通讯作者: 张岩 (1979-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全; 周巍 (1983-), 男, 在读博士, 高级工程师, 研究方向为农产品加工及贮藏工程。

及医药方面具有重要应用^[1-2], 是醋酸菌科的核心菌属之一。醋酸菌科(*Acetic acid bacteria, AAB*)中的醋杆菌属(*Acetobacter*)、葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)和葡糖杆菌属在食品、医药、化工等行业都有广阔的应用前景, 是醋酸菌科中最常见的 3 个属。其中葡糖杆菌属区别于其他两个属的最重要的特征是能氧化乙醇但不能进一步氧化乙酸和乙酸盐^[3], 常见于富糖的环境中。因而葡糖杆菌属可存在于一些含糖量高的食品中, 对这些食品的感官特性产生不良的影响。崔云^[4]等对返浑食醋中尚存的杂菌进行分离纯化鉴定, 证实属于葡糖杆菌属的杂菌可使醋返浑、导致醋体变质; 张大为^[5]等从自然腐烂的柑橘中分离腐败菌, 初步研

究鉴定引起柑橘腐烂、霉变的主要细菌为葡糖杆菌属和不动杆菌属;葡糖杆菌属存在于未损完好的葡萄中,可从葡萄果实或葡萄汁中分离出来,生长在葡萄酒的表面形成一种半透明的膜状,成为葡萄酒酿造与陈酿中的大敌^[6]。此外,据文献报道,葡糖杆菌也可污染酸乳,破坏酸乳包装使其涨袋,降低酸乳的 pH 最终导致口感的过酸化,醋酸菌污染是酸乳变色的原因之一^[7,8]。对于酸乳生产企业来说及时有效的控制生产过程中葡糖杆菌的污染十分关键,因此,针对葡糖杆菌属建立快速、灵敏的检测方法意义重大。

目前,葡糖杆菌属的鉴定方法主要为传统的生理生化法和分子生物学方法。传统的鉴定方法检测时间较长且操作繁琐,不利于实际应用;分子生物学方法应用最广泛的是 PCR 技术,以普通 PCR 为基础建立的 RT-PCR、巢式 PCR 等都得到广泛应用,但其对实验室条件要求比较高,需要昂贵的仪器设备,仍不利于推广应用。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种恒温条件下的核酸扩增技术,自 2000 年由 Notomi 等建立以来得到迅速发展^[9]。LAMP 技术是针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异性的引物,在链置换 DNA 聚合酶的作用下,恒温反应几十分钟就可扩增出 10^9 倍的靶序列拷贝。LAMP 操作简便、成本低廉、便于推广,可满足食品企业快速检测的目的。目前,LAMP 技术已在病毒检测^[10]、病原菌检测^[11~12]、转基因检测^[13]等多个领域得到广泛应用。

本研究以模式菌株氧化葡糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)为代表菌株,选取 16S rRNA 基因序列设计引物,采用 LAMP 技术建立起快速检测葡糖杆菌的方法,并对此方法的特异性和灵敏度进行了评价。此方法能成功的检测出模拟样品中的葡糖杆菌,并且可在 3 小时之内完成全部检验工作,实现葡糖杆菌的快速检验。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养条件

本研究所用 21 株菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心和中国普通微生物菌种保藏管理中心,这 21 株菌包括 3 葡糖杆菌、3 株醋酸杆菌和 15 株非醋酸菌,菌株编号及培养条件详见表 1。

1.2 主要试剂

10×Thermol buffer、DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase large fragment): New England Biolab 公司;

dNTPs (10 mmol/L)、MgCl₂ (25 mmol/L): 上海生工生物工程有限公司; Easy Taq DNA polymerase 和 Easy Pure Genomic DNA Kit: 上海生工生物工程有限公司。LAMP 引物、100 bp DNA Ladder Marker 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 实验用菌株

Table 1 Bacterial strains used for study

序号	菌株编号	菌种名称	培养条件
1	CGMCC1.0637	氧化葡糖杆菌	28℃,需氧
2	CGMCC1.3748	泰国葡糖杆菌	28℃,需氧
3	CICC10357	葡糖杆菌	28℃,需氧
4	CICC21682	醋化醋杆 S 菌	30℃,需氧
5	CICC22519	醋化醋杆菌	30℃,需氧
6	CICC21683	醋化醋杆菌	30℃,需氧
7	CICC21482	肠炎沙门氏菌	36℃,兼性厌氧
8	CICC10420	鼠李伤寒沙门氏菌	37℃,兼性厌氧
9	CICC21560	阪崎肠杆菌	36℃,兼性厌氧
10	CICC21534	福氏志贺氏菌	36℃,兼性厌氧
11	CICC21600	金黄色葡萄球菌	37℃,兼性厌氧
12	CICC6224	鼠李糖乳杆菌	37℃
13	CICC6076	植物乳糖杆菌	37℃,厌氧
14	CICC6223	嗜热链球菌	37℃
15	CICC6077	德氏乳杆菌	37℃,厌氧
16	CICC6069	婴儿双歧杆菌	37℃,厌氧
17	CICC21633	单增李斯特细菌	37℃,兼性厌氧
18	CICC10389	大肠埃希氏菌	37℃,兼性厌氧
19	CICC21617	副溶血弧菌	30℃,兼性厌氧
20	CICC10041	蜡样芽胞杆菌	30℃,兼性厌氧
21	CICC21699	小肠结肠炎耶尔森氏菌	26℃,兼性厌氧

葡糖杆菌培养基: 葡萄糖 100.0 g, 酵母提取物 10.0 g, CaCO₃ 20.0 g, (琼脂 15.0 g), 蒸馏水 1.0 L, pH6.8。

1.3 方法

1.3.1 纯菌培养和 DNA 提取

将氧化葡糖杆菌(CGMCC1.0637)接种于无菌的液体培养基中,30℃,200 r/min 摇床培养 48 h。将液体菌液逐级稀释并在固体培养基上进行菌落计数,测定其纯培养物活菌浓度为 7.5×10^7 CFU/mL。采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒法提取氧化葡糖杆菌的基因组 DNA,将提取的基因组 DNA 储存在 -20℃,备用。

1.3.2 引物设计

结合文献报道,在 GenBank 中选取葡糖杆菌的多条基因序列(登录号: AB063287、AB128050、X73820、

X82290、NZ-AHK101000164) 分别进行 BLAST 同源分析, 最终选取特异性强的 X73820 序列为目的序列。运用引物设计软件 (<https://primerexplorer.jp.lamp4.0.0.index.html>) 进行 LAMP 引物设计。设计出来的引物用 DNAMAN 软件分析其二级结构及引物间的错配效应, 筛选得到一组优良的引物, 此引物扩增的目的片段大小为 220 bp。根据酶切位点选用的限制性内切酶为 XbaI。引物的名称和具体序列见表 2。

表 2 LAMP 引物

Table 2 LAMP primer

Primer Name	Sequence(5'→3')
上游外部引物	ACGCGCAGAACCTTACCA
下游外部引物	TGACGTCATCCCCACCTTC
上游内部引物	AGCTGACGACAGCCATGCAGGGACC GGTTCAGAGATGGA
下游内部引物	TGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGAGTC TCTCTAGAGTGCCAC

1.3.3 LAMP 方法的建立

通过对反应体系中不同组分浓度的优化试验, 确定了 LAMP 的最佳反应体系和条件。25 μL LAMP 反应体系如下: 2.5 mmol/L MgCl_2 , 0.6 mmol/L dNTPs, FIP 和 BIP 各 1.4 $\mu\text{mol/L}$, F3 和 B3 各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 8U 的 Bst DNA 聚合酶大片段, 10 \times Bst DNA 聚合酶反应缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.1% Triton X-100) 2.5 μL , 2 μL DNA 模板, 用灭菌蒸馏水补足体系。63 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min, 85 $^\circ\text{C}$ 终止反应 5 min。

取 5 μL LAMP 产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。根据凝胶成像系统观察反应条带判断 LAMP 扩增反应。

1.3.4 LAMP 反应特异性检测

将表 1 所列的 21 株试验菌株分别接种于相应的培养基, 摇床培养后, 用试剂盒法提取基因组 DNA 作为 LAMP 反应的模板, 以灭菌双蒸水代替模板做为阴性对照, 进行 LAMP 扩增, 以验证引物的特异性。

1.3.5 PCR 反应体系

PCR 反应体系: 10 \times EasyTaq buffer 2.5 μL , 1.0 mmol/L MgCl_2 , 0.4 mmol/L dNTPs, 10 μM 上下游引物各 1 μL , 2.5 U 的 Easy Taq DNA polymerase, 2 μL 的 DNA 模板并用灭菌双蒸水补足 25 μL 反应体系。

PCR 的反应程序: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性, 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性, 45 s; 56 $^\circ\text{C}$ 退火, 45 s; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸, 45 s。进行 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 后延伸 10 min。PCR 反应产物 5 μL , 与 1 μL 的 6 \times loading buffer 均匀混合, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察电泳结果。

1.3.6 LAMP 酶切分析

用限制性内切酶 XbaI 进行酶切验证。20 μL 的酶切反应体系如下: 1 μL XbaI; 2 μL 10 \times MBuffer; 2 μL 0.1% BSA; 2 μL LAMP 反应产物; 灭菌的双蒸水补足 20 μL 。37 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h 后, 加入 2 μL 10 \times loading buffer 终止反应。反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察电泳结果。

1.3.7 LAMP 灵敏度评价

取摇床培养后葡萄糖杆菌的菌悬液, 用灭菌双蒸水逐级从 7.5×10^7 CFU/mL 稀释到 7.5 CFU/mL, 按照试剂盒法提取葡萄糖杆菌的基因组 DNA, 用所建立的 LAMP 方法进行检验, 确定此方法的灵敏度。同时用 LAMP 设计的两条外引物 (见表 2) 作为 PCR 反应的引物, 以不同稀释度提取的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 将两种方法的灵敏度做比较, 对 LAMP 方法的灵敏度进行评价。

1.3.8 LAMP 检测人工污染酸奶

酸奶样品在人工污染前进行灭菌处理确保不含葡萄糖杆菌。取 25 g 酸奶样品加入 225 mL 灭菌的生理盐水中, 匀浆。将氧化葡萄糖杆菌菌悬液 10 倍梯度逐级稀释, 取各稀释度的菌液 1 mL 对上述匀浆液进行人工污染。采用试剂盒法分别提取基因组 DNA, 用 LAMP 方法检验葡萄糖杆菌人工污染酸奶的检出限。

2 结果与分析

2.1 特异性检测结果

将表 1 所列的 21 株供试菌株提取 DNA 后, 在 LAMP 反应体系中进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测是否出现特异性条带。结果如图 1, 三株葡萄糖杆菌都能扩增出梯形条带, 而同属醋酸菌科的醋杆菌属及其他非葡萄糖杆菌均未出现扩增, 表明本研究设计的引物表现出良好的特异性, 可用于葡萄糖杆菌的 LAMP 方法检测。



图 1 葡萄糖杆菌 LAMP 引物特异性检测的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis for the specificity test of LAMP primers for *Gluconobacter*

注: M:100 bp DNA ladder marker;1-氧化葡萄糖杆菌 (CGMCC1.0637); 2-泰国葡萄糖杆菌 (CGMCC1.3748); 3-葡萄糖

杆菌 (CICC10357); 4-醋化醋杆菌 1 (CICC21682); 5-醋化醋杆菌 2(CICC22519);6-醋化醋杆菌 3 (CICC21683); 7-肠炎沙门氏菌; 8-鼠李伤寒沙门氏菌; 9-阪崎肠杆菌; 10-福氏志贺氏菌; 11-金黄色葡萄球菌; 12-鼠李糖乳杆菌; 13-植物乳糖杆菌; 14-嗜热链球菌; 15-德氏乳杆菌; 16-婴儿双歧杆菌; 17-单增李斯特细菌; 18-大肠埃希氏菌; 19-副溶血弧菌; 20-蜡样芽胞杆菌; 21-小肠结肠炎耶尔森氏菌。

2.2 LAMP 酶切分析结果

本研究设计限制性内切酶 XbaI 对 LAMP 扩增产物进行酶切验证。XbaI 的酶切位点位于引物 B1c 和 B2 之间,通过理论计算可知,LAMP 引物设计的 XbaI 酶切位点主要产生的片段大小为 273 bp、228 bp 和 180 bp。如图 2 所示,LAMP 产物经酶切消化后,电泳检测所产生的片段大小与理论值一致。

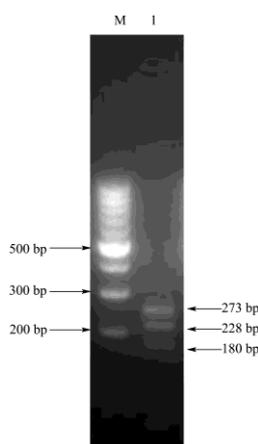


图 2 葡糖杆菌 LAMP 产物酶切分析

Fig.2 Restriction enzyme analysis for LAMP products of *Gluconobacter*

注: M: 100bp DNA ladder marker; 1-酶切产物。

2.3 LAMP 灵敏度检测结果

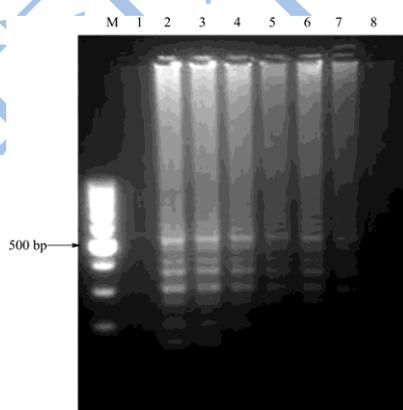


图 3 LAMP 检测葡糖杆菌的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of LAMP detection for *Gluconobacter*

注: M.100 bp DNA ladder marker; 1. negative control; 2.

7.5×10^6 CFU/mL; 3. 7.5×10^5 CFU/mL; 4. 7.5×10^4 CFU/mL; 5. 7.5×10^3 CFU/mL; 6. 7.5×10^2 CFU/mL; 7. 7.5×10^1 CFU/mL; 8. 7.5×10^0 CFU/mL。

将各稀释度菌液提取的 DNA 分别作为模板,以灭菌双蒸水做为阴性对照进行 LAMP 检测,确定此方法的灵敏度,同时用 PCR 方法扩增进行对比。结果见图 3 和图 4。图 3 表明,当纯菌的培养物浓度为 $7.5 \times 10^6 \sim 7.5 \times 10^1$ CFU /mL 时,均能扩增出梯形条带,LAMP 呈现阳性结果;当纯菌的培养物浓度为 7.5×10^0 时,未发生 LAMP 扩增反应,呈阴性结果。因此,本研究建立的葡糖杆菌的 LAMP 检测方法的灵敏度为 75 CFU /mL。图 4 表明,当纯菌的培养物浓度为 7.5×10^1 CFU /mL 时,PCR 方法不再扩增出目的条带,其灵敏度为 7.5×10^2 CFU /mL。所以,LAMP 检测葡糖杆菌的灵敏度是 PCR 检测的 10 倍。

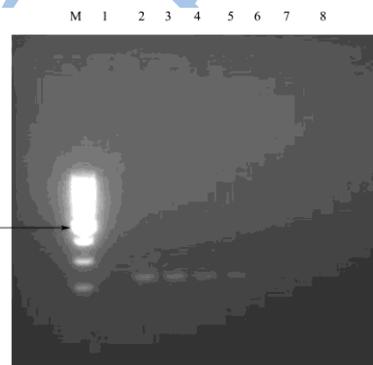


图 4 PCR 检测葡糖杆菌的灵敏度

Fig.4 Sensitivity of PCR detection for *Gluconobacter*

注: M: 100 bp DNA ladder marker; 1. negative control; 2: 7.5×10^6 CFU/mL; 3: 7.5×10^5 CFU/mL; 4: 7.5×10^4 CFU/mL; 5: 7.5×10^3 CFU/mL; 6: 7.5×10^2 CFU/mL; 7: 7.5×10^1 CFU/mL; 8: 7.5×10^0 CFU/mL。

2.4 LAMP 人工污染检出限

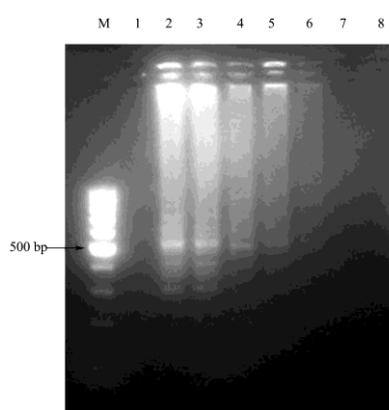


图 5 LAMP 检测人工污染酸乳的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of LAMP detection for artificially contaminated yogurt

注: M:100bp DNA ladder marker; 1. negative control; 2. 7.5×10^6 CFU/mL; 3. 7.5×10^5 CFU/mL; 4. 7.5×10^4 CFU/mL; 5. 7.5×10^3 CFU/mL; 6. 7.5×10^2 CFU/mL; 7. 7.5×10^1 CFU/mL; 8. 7.5×10^0 CFU/mL。

按 1.3.8 所述方法提取的 DNA 进行 LAMP 扩增, 结果见图 5。稀释液菌浓度为 7.5×10^1 CFU/mL 污染的酸奶样品, 无扩增条带, 呈阴性结果。即葡糖杆菌的 LAMP 方法检测模拟样品的检出限为 750 CFU /mL。

3 结论

3.1 近年来, 葡糖杆菌在食品及医药卫生行业表现出极大的应用价值, 可以为企业带来可观的经济效益, 所以大多数研究者们把焦点集中在葡糖杆菌的应用研发方面。葡糖杆菌污染酸乳的现象虽早有文献报道, 但是针对酸乳中葡糖杆菌的检测方法的研究报道甚少。在生产中及时有效的检测出葡糖杆菌的污染, 采取有效的措施控制污染源, 才能将酸乳企业的损失降到最低。

3.2 引物的筛选对 LAMP 方法的建立至关重要。本研究通过对葡糖杆菌属的多条序列进行 BLAST 分析, 选取属内同源性相近且属外特异性强的一段 16S rRNA. (X73820) 序列, 利用 LAMP 引物设计软件进行在线设计。用 LAMP 方法对设计的多组引物进行验证, 最终筛选出一组对同属醋酸菌科的醋化醋菌未发生扩增, 而同种的葡糖杆菌均能扩增出梯形条带的引物; 反应产物经酶切消化后片段与理论值相符, 表明此引物可进行有效的 LAMP 扩增。

3.3 本研究所建立的 LAMP 检测方法检测纯菌的灵敏度为 75 CFU/mL, 与普通 PCR 检测方法相比较, LAMP 方法的灵敏度是常规 PCR 的 10 倍; 用葡糖杆菌的纯菌液对酸乳进行人工污染, 模拟实际样品的检测, 测定 LAMP 方法的检测实样的检出限为 750 CFU/mL, 此结果达不到纯菌的检测灵敏度 75 CFU/mL, 分析原因可能是在 DNA 提取过程中, 由于酸乳中蛋白质含量较高, 菌体与蛋白质分离不彻底, 导致提取的 DNA 含有较多杂质, 对核酸扩增过程有抑制作用, 因此需要对污染酸乳进行前处理, 并改进酸乳中 DNA 的提取方法, 提高实际样品的检出限。

3.4 综上所述, 本研究建立的 LAMP 检测葡糖杆菌的方法具有特异性强、灵敏度高的特点。与传统的检测方法比较大大缩短了检测时间, 可在 3 小时内完成检测, 且无需昂贵的检测仪器, 检测成本远远低于 PCR 方法。另外, 从实验易操作性、低成本的角度出发, 该 LAMP 方法可应用于酸乳企业葡糖杆菌的快速检验。

参考文献

- [1] MUYNCK C D, PEREIRA C S, NAESSENS M, et al. The genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007,27(3):147-171
- [2] 冯静,施庆珊,欧阳友生,等.葡糖杆菌属分类及其主要应用的研究进展[J].*微生物学杂志*,2010,30(2):86-90
FENG Jing, SHI Qing-shan, OUYANG You-sheng, et al. Advance in Classification and Main Application of *Gluconobacter* [J]. *Journal of Microbiology*, 2010, 30 (2): 86-90
- [3] Raspor P, Goranovic D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria [J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2008, 28(2): 101-124
- [4] 崔云,卢红梅,张义明,等.食醋中微生物的分离与鉴定[J].*中国酿造*,2008,22: 29-31
CUI Yun, LU Hong-mei, ZHANG Yi-min g, et al. Microbial separation and identification in the vinegar [J]. *China Brewing*, 2008, 22: 29-31
- [5] 张大为,张浩,李猛,等.分离引起柑橘腐、烂霉变的微生物及生物防治[J].*生物加工过程*,2011,4(9):54-58
ZHANG Da-wei, ZHANG Jie, LI Meng. Isolation and biocontrol of strains caused rotten and mildewing of oranges [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2011, 4(9): 54-58
- [6] 翁鸿珍,成宇峰.葡萄酒的微生物病害[J].*酿酒科技*,2011. 8:132-135
WENG Hong-zhen, CHENG Yu-feng. Study on microbial disease of grape wine [J]. *Liquor Making Science Technology*, 2011, 8:132-135
- [7] 张红发,王荫榆.酸乳饮料变色原因研究[J].*乳业科学与技术*,2008,2:70-72
ZHANG Hong-fa, WANG Yin-yu. The research on the color deterioration of the Yogurt drink [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2008, 2: 70-72
- [8] Nwagu Tochukwu Nwamaka, Amadi Emmanuel Chike. Bacteria population of some commercially prepared yoghurt sold in Enugu State, Eastern Nigeria [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 4 (10): 984-988
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): 63
- [10] Li C, Chen Z, Meng C, et al. Rapid detection of duck hepatitis A virus genotype C using reverse transcription

- loop-mediated isothermal amplification [J]. *J. Virol. Methods*, 2014, 196: 193-198
- [11] 李琳,周蓉,李冰,等.环介导恒温核酸扩增法在病原微生物快速检测领域的应用[J].*现代食品科技*,2014,6:301-307
LI Lin, ZHOU Rong, LI Bing, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification on pathogens rapid detection [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 6:301-307
- [12] Lu YX, Meng ZX, Ma XY, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk powder by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 28(6): 703-706
- [13] 李向丽,谭贵良,刘垚,等.实时 LAMP 法快速检测食用植物油中的转基因成分 CaMV-35S[J].*现代食品科技*,2014,2: 244-248
- [14] LI Xiang-li,TAN Gui-liang, LIU Yao, et al. Rapid detection of CaMV-35S promoter in vegetable oils by loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 2: 244-248

现代食品科技