

恒温实时荧光法快速检测奶粉中阪崎肠杆菌方法的建立

李丽丽¹, 叶蕾¹, 张璜², 曹炜伟², 邓梓欣², 石磊¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 为实现奶粉中快速检测阪崎肠杆菌, 本文建立了检测阪崎肠杆菌的恒温实时荧光法。针对阪崎肠杆菌 16S rRNA 设计三组 LAMP 引物, 采用 Deaou-308C 恒温实时荧光检测平台, 选取常见病原菌标准株进行引物特异性检测; 选取阪崎肠杆菌标准菌株进行基因组 DNA 灵敏度和最低检测限测定, 同时利用人工污染方式检测此方法在脱脂和全脂奶粉中的灵敏度和最低检测限, 利用 RealAmp 法和国标法对 20 份市售奶粉进行对比实验。结果显示, 引物组 16S-11 扩增效率最优, 与常见病原菌无交叉反应, 对阪崎肠杆菌基因组 DNA、阪崎肠杆菌污染的脱脂和全脂奶粉的灵敏度分别达到 10^2 CFU/mL、 10^2 CFU/mL 和 10^3 CFU/mL; 对阪崎肠杆菌基因组 DNA 和阪崎肠杆菌污染的脱脂和全脂奶粉的最低检测限分别达到 10^3 CFU/mL、 10^3 CFU/mL 和 10^4 CFU/mL; 在 20 份市售奶粉样品中 RealAmp 检测结果与传统国标培养结果一致, 表明本文建立的阪崎肠杆菌 RealAmp 检测方法适用于阪崎肠杆菌的快速检测。

关键词: 恒温实时荧光法; 阪崎肠杆菌; 奶粉

文章编号: 1673-9078(2016)9-308-313

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.044

A Real-time Fluorescence Loop-mediated Isothermal Amplification

Method to Detect *Enterobacter sakazakii* in Milk Powder

LI Li-li¹, YE Lei¹, ZHANG Huang², CAO Wei-wei², DENG Zi-xin², SHI Lei¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. GuangZhou Deaou Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: In order to rapidly detect *Enterobacter sakazakii* in milk powder, a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) method was developed. Three sets of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers targeting the *Enterobacter sakazakii* 16S rRNA sequence were designed. With a DEAOU-308C thermostat fluorescence detector, the specificity of the primers was examined using a standard strain of *Enterobacter sakazakii*. The sensitivity and detection limit on genomic DNA were also determined with a standard strain of *Enterobacter sakazakii*, followed by measuring the sensitivity and detection limit of this assay for artificially contaminated skimmed milk powder and whole milk powder, and a comparative experiment was performed on 20 commercial milk powder samples using the RealAmp method and national standard method. The results showed that the primer set 16S-11 had the best amplification efficiency, showed no cross-reactivity with common pathogens, and the sensitivity of RealAmp for detecting *Enterobacter sakazakii* genomic DNA, artificially contaminated skimmed milk powder, and whole milk powder reached 10^2 CFU/mL, 10^2 CFU/mL, and 10^3 CFU/mL, respectively. The detection limit of RealAmp in detecting *Enterobacter sakazakii* genomic DNA, artificially contaminated skimmed milk powder, and whole milk powder reached 10^3 CFU/mL, 10^3 CFU/mL, and 10^4 CFU/mL, respectively. The results of 20 commercial milk powder samples obtained by the RealAmp method were consistent with those from the national standard culture method. The results suggest that this RealAmp assay is suitable for the rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in milk powder.

Key words: real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification; *Enterobacter sakazakii*; milk powder

收稿日期: 2015-09-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2015ZM063); 中国博士后科学基金 (2015M580723)

作者简介: 李丽丽 (1986-), 女, 在读博士, 研究方向: 食品安全与微生物快速检测

通讯作者: 叶蕾 (1983-), 女, 工学博士, 助理研究员, 研究方向: 食品安全与微生物快速检测

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是人和动物肠道内寄生的一种革兰氏阴性无芽孢杆菌,属肠杆菌科^[1]。它是乳制品中近几年新发现的引起广泛关注的一种致病菌,阪崎肠杆菌毒力强,能导致新生儿脑膜炎、致死性小肠结肠炎和菌血症等疾病,尽管使用抗生素治疗可以康复,但伴随着严重的神经系统后遗症、发育障碍等症状,由该菌引起的感染死亡率高达50%以上。近年来,婴儿配方奶粉中污染阪崎肠杆菌的报道较多,其散发和爆发的病例在全球范围内相继出现已引起世界多国相关部门的重视^[2]。

目前对阪崎肠杆菌的检测方法主要有FDA推荐的传统检测方法、免疫学方法和各种PCR方法。传统检测方法操作繁琐,检测时间长,而且灵敏度较低;免疫学方法的特异性和灵敏度也不理想;PCR方法敏感、快速,在实验室检测中应用最为广泛;但是该方法需要昂贵的仪器设备、较高检测费用以及对检测人员较高的技术要求,使其难以在基层普及和推广^[3-4]。

环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由日本学者Notomi发明的一种新型核酸扩增技术。该技术针对靶基因的6或8个区域设计4或6条特异引物,增强了反应的特异性;不需要模板的热变性、长时间温度循环,利用一种链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)在等温条件下就能完成反应,缩短了检测时间,操作简单、方便^[5]。本研究以LAMP技术和实时荧光技术相结合,采用广州迪澳生物有限公司研发的便携式实时荧光恒温扩增仪Deaou-308C为检测平台开发出一种恒温实时荧光LAMP检测方法,用于奶粉中阪崎肠杆菌的检测。便携式实时荧光恒温扩增仪可自行调控温度,并通过收集荧光信号来判断样品是否发生扩增并判断扩增量,其表面的液晶显示屏会根据收集到的荧光信号显示阳性扩增曲线。与普通LAMP技术比较,所建立的检测方法具有可实时监控反应过程、反应时间更短、灵敏度和特异性更高,操作更为简单、成本更低廉等优点,利于基层推广应用。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 实验菌株

阪崎肠杆菌 ATCC29544, 单核增生李斯特氏 ATCC19115/413, 沙门氏菌 ATCC14028, 金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 大肠杆菌 O157ATCC43889, 绿脓杆菌 ATCC9027, 大肠杆菌 ATCC25922, 大肠杆菌 CMCC44102, 阪崎肠杆菌 ATCC12868, 副溶血性弧菌 ATCC17802, 创伤弧菌 ATCC27562, 金黄色葡萄球菌 CMCC26003, 鲍氏志贺氏菌 CMCC51346, 宋内氏志贺氏菌 N1CP51334, 普通变形杆菌 N1CPB490059, 奇异变形杆菌 HB7131, 克雷伯氏菌 CMCC(B)46117, 藤黄微球菌 CMCC28001, 由广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

Bst DNA polymerase large fragment, New England Biolabs 公司; 甜菜碱(Betaine), MgCl₂, Sigma 公司; dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司; SYTO-9 荧光染料, Life Technologies 公司; 引物, 英潍捷基有限公司; -80 °C 冻存柜 (DAYA-024), Thermo Fisher Scientific; 高速台式离心机 (PICO17), Thermo Fisher Scientific; DEAOU-308C, 广州迪澳生物科技有限公司; 快速混匀器 (XK80-A), 江苏新康医疗器械有限公司; 微量移液器, 德国 Eppendorf 公司; 分析天平 (AL104), 梅特勒-托利多仪器有限公司; 超净工作台 (SW-CJ-1FD), 苏州安泰空气技术有限公司; 微量紫外分光光度计 (Nanodrop 2000), Thermo Fisher Scientific; 金属浴 (OSE-H) 天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物的设计与合成

针对阪崎肠杆菌的16S rRNA 基因(GenBank: AB626126.1), 应用Primer Explorer V4 software (Eiken Chemical; http://primerexplorer.jp/elamp_4.0.0/index.html) 软件设计LAMP引物组, 设计完成引物序列利用NCBI网站进行序列特异性的比对。引物序列见表1, 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

表1 荧光PCR引物及探针序列

Table 1 Sequences of the primers and probes for real-time PCR

引物名称	序列
F3	CGAAGGTTAAGCTACCTACTTC
B3	ACGTCAAGTCATCATGGC
16S-11 FIP(F1c+F2)	GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTATTCACCGTGGCATTCT
BIP(B1c+B2)	CCAATCCGGACTACGACGCGCTACAATGGCGCATACA

转下页

接上页

	LoopF	TCGGAATCGCTAGTAATCGTG
	LoopB	TTATGAGGTCGCTTGCTC
	F3	GGAACGTATTCACCGTG
	B3	TATCCTTTGTTGCCAGCG
16S-12	FIP(F1c+F2)	CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGCATTCTGATCCACGATTACTA
	BIP(B1c+B2)	CGCGAGGTCGCTTCTTACGTCAAGTCATCATGGC
	LoopF	ACTCCATGAAGTCGGAATCG
	LoopB	TGTATGCGCCATTGTAGCA
	F3	GGAACGTATTCACCGTG
	B3	TATCCTTTGTTGCCAGCG
16S-12	FIP(F1c+F2)	CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGCATTCTGATCCACGATTACTA
	BIP(B1c+B2)	CGCGAGGTCGCTTCTTACGTCAAGTCATCATGGC
	LoopF	ACTCCATGAAGTCGGAATCG
	LoopB	TGTATGCGCCATTGTAGCA

1.2.2 阪崎肠杆菌浓度测定及 DNA 提取

挑取阪崎肠杆菌接种于营养肉汤培养基中, 过夜培养后以浊度法测量菌液浓度, 再以灭菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释。选取 2~3 个适宜稀释度的菌液, 各取 1 mL 分别加入无菌培养皿(含 15~20 mL 培养基)内, 转动平皿使混合均匀, 每个梯度做两个重复, 进行培养计数。

采用水煮法提取 DNA: 按平板计数结果换算各梯度菌液浓度, 取各梯度菌液, 每个梯度各取 1 mL 菌液加入 1.5 mL EP 管中, 12000 r/min 离心 2 min, 去上清; 加入 100 μ L 灭菌 Tris-HCl, 涡旋混匀, 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 加热后 12000 r/min 离心 2 min, 吸取上清即为各浓度阪崎肠杆菌粗提 DNA。

1.2.3 RealAmp 反应体系的建立

25 μ L 的反应体系, 其成分包括: 内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 μ mol/L, 外引物 F3 和 B3 各 0.2 μ mol/L, 环引物 LF 和 LB 各 0.8 μ mol/L, 20 mmol/L Tris-HCl (PH 8.8), 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20, 1 mol/L 甜菜碱, 6 mmol/L MgSO₄, 1.6 mmol/L dNTP, 8 U Bst 大片断 DNA 聚合酶, 0.2 μ mol/L SYTO-9, DNA 模板 200 ng。

1.2.4 特异性实验

以阪崎肠杆菌 ATCC29544, 单核增生李斯特氏菌 ATCC19115/413, 沙门氏菌 ATCC14028, 金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 大肠杆菌 O157ATCC43889, 绿脓杆菌 ATCC9027, 大肠杆菌 ATCC25922, 大肠杆菌 CMCC44102, 阪崎肠杆菌 ATCC12868, 副溶血性弧菌 ATCC17802, 创伤弧菌 ATCC27562, 金黄色葡萄球菌 CMCC26003, 鲍氏志贺氏菌 CMCC51346, 宋内氏志贺氏菌 NICP51334, 普通变形杆菌 NICPB490059,

奇异变形杆菌 HB7131, 克雷伯氏菌 CMCC(B)46117, 藤黄微球菌 CMCC28001 的 DNA 作为特异性反应模板验证反应的特异性。

1.2.5 灵敏度实验

1.2.5.1 阪崎肠杆菌基因组 DNA 灵敏度

过夜培养阪崎肠杆菌 ATCC29544, 用平板计数法测定菌浓度, 以灭菌 Tris-HCl 水煮法提取各浓度阪崎肠杆菌的 DNA, 以各梯度的 DNA 作为模板进行反应检测该方法对粗提基因组 DNA 的灵敏度。

1.2.5.2 阪崎肠杆菌人工污染灵敏度

过夜培养阪崎肠杆菌 ATCC29544, 用平板计数法测定菌浓度; 同时过夜培养以国标方法检测的阴性样品, 取各浓度菌液 100 μ L 加入 1.5 mL EP 管中, 分别向各管中加入阴性样品增菌液 900 μ L, 即得各浓度人工污染样品。以灭菌 Tris-HCl 水煮法提取各浓度人工污染样品 DNA, 以各梯度的 DNA 作为模板进行反应检测该方法对人工污染样品的灵敏度。

1.2.6 最低检测限实验

1.2.6.1 阪崎肠杆菌粗提基因组 DNA 最低检测限

分析 1.2.5.1 实验结果, 选取灵敏度及下一个梯度浓度的基因组 DNA 为模板, 每个浓度各重复 20 次, 检测该方法对基因组 DNA 的最低检测限。

1.2.6.2 阪崎肠杆菌人工污染样品最低检测限

分析 1.2.5.2 实验结果, 选取灵敏度及下一个梯度浓度的人工污染样品 DNA 为模板, 每个浓度各重复 20 次, 检测该方法对人工污染样品的最低检测限。

1.2.7 实际样品检测

从超市采集 20 份配方奶粉(10 份样品为全脂奶粉, 其余 10 份为脱脂奶粉), 利用 RealAmp 法对其进行快速检测; 同时利用国标(GB 4789.40-2010)法进

行对比验证, 以验证 Real Amp 方法的实用性。

1.2.8 Deaou-308C 便携式实时荧光恒温扩增仪

Deaou-308C 便携式实时荧光恒温扩增仪通过收集荧光信号判断样品是否发生扩增, 其表面的触摸液晶显示屏会根据收集到的扩增产物荧光信号显示扩增曲线, 无需连接电脑便可通过实时扩增曲线判断检测结果。仪器内部含可调节温度的加热模块, 可同时支持 16 个反应孔(2×8 strips)的恒温反应, 可在在短时间内通过等温扩增法检测出目标的 DNA、RNA 分子。Deaou-308C 重 4 kg, 尺寸为 375 mm 长×315 mm 宽×135 mm 高。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 引物筛选及反应体系的建立

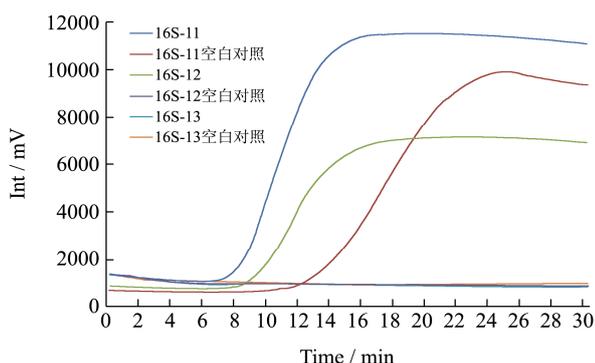


图 1 引物反应效率的检测

Fig. 1 Efficiency of the RealAmp primers

采用阪崎肠杆菌的 DNA 作为阳性模板 (10^6 CFU/mL), 超纯水作为阴性对照, 分别用各套引物进行反应, $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 运行 30 min, 结果见图 1。此次设计的 3 套 LAMP 引物组均无非特异性扩增, 且三组引物组的扩增效率极高; 出峰时间都在 12 min 内, 其中 16S-11 出峰时间最快, 在 8 min 之内出现扩增峰, 适合作为 RealAmp 法检测阪崎肠杆菌的反应引物组。

2.1.2 特异性实验

16S-11 引物组在本实验选取的常见的病原菌株 DNA 模板均无扩增 (图 2), 说明此引物组特异性良好。

2.1.3 灵敏度实验

2.1.3.1 阪崎肠杆菌基因组 DNA 灵敏度

过夜培养阪崎肠杆菌, 用平板计数法测定菌浓度, 挑取 10^6 CFU/mL~ 10^1 CFU/mL 浓度下的菌液为模版, 以灭菌 Tris-HCl 水煮法提取这些浓度下菌体的 DNA; 以各梯度的 DNA 作为模板进行反应检测该方法对粗

提基因组 DNA 的灵敏度。由图 3a 所示结果得知, RealAmp 检测阪崎肠杆菌 DNA 的灵敏度可达到 10^2 CFU/mL, 在此浓度下的 DNA 模版在 15 min 内便可出现扩增峰。

2.1.3.2 阪崎肠杆菌人工污染灵敏度

本实验分别采用全脂奶粉和脱脂奶粉作为人工污染灵敏度的检测对象, 分析 RealAmp 法检测阪崎肠杆菌在这两种类别的奶粉中的灵敏度。由图 3b 和图 3c 可知, 对阪崎肠杆菌污染的脱脂奶粉样品, 灵敏度可达 10^2 CFU/mL; 而对阪崎肠杆菌污染的全脂奶粉样品, 本方法灵敏度则可达 10^3 CFU/mL。

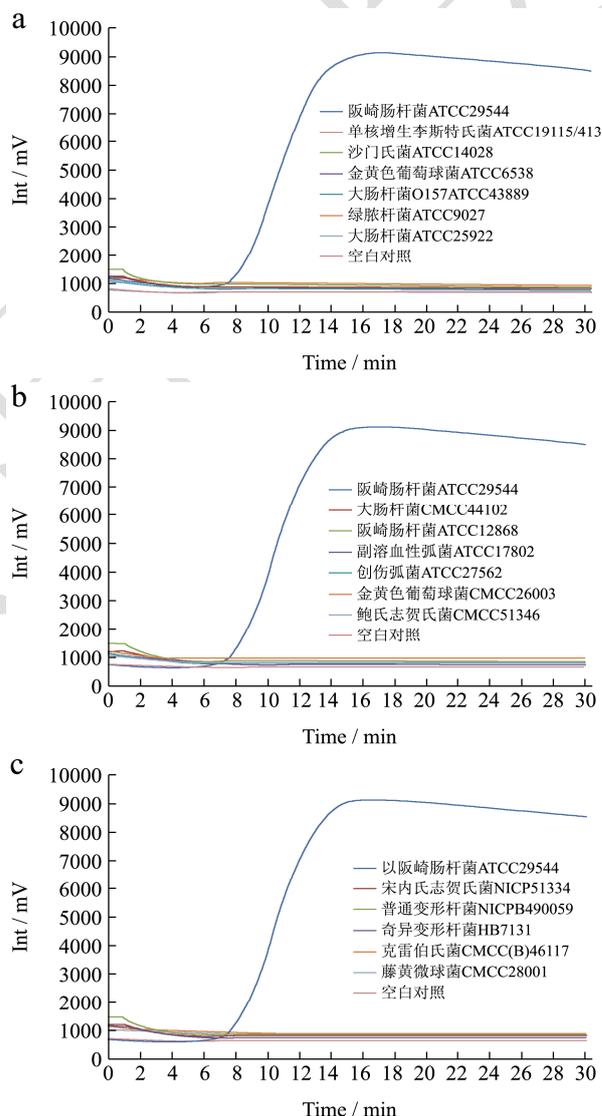


图 2 16S-11 引物组特异性检测

Fig.2 Specificity of primer set 16S-11

2.1.4 最低检测限实验

2.1.4.1 阪崎肠杆菌基因组 DNA 最低检测限

根据 2.1.3.1 的结果, 选取灵敏度浓度 (10^2 CFU/mL) 以及以下一个梯度 (10^3 CFU/mL) 的基因组 DNA 为模板, 每个浓度各重复 20 次 RealAmp 反

应,把检出率达到 85%的最低浓度梯度定为最低检出限。实验结果显示,20 份 10^3 CFU/mL 菌液浓度下的 DNA 样品其检出率为 100%,20 份 10^2 CFU/mL 菌液浓度下的 DNA 样品检出率为 80%,因此本实验建立的 RealAmp 法检测阪崎肠杆菌基因组 DNA 的检出限规定为 10^3 CFU/mL。

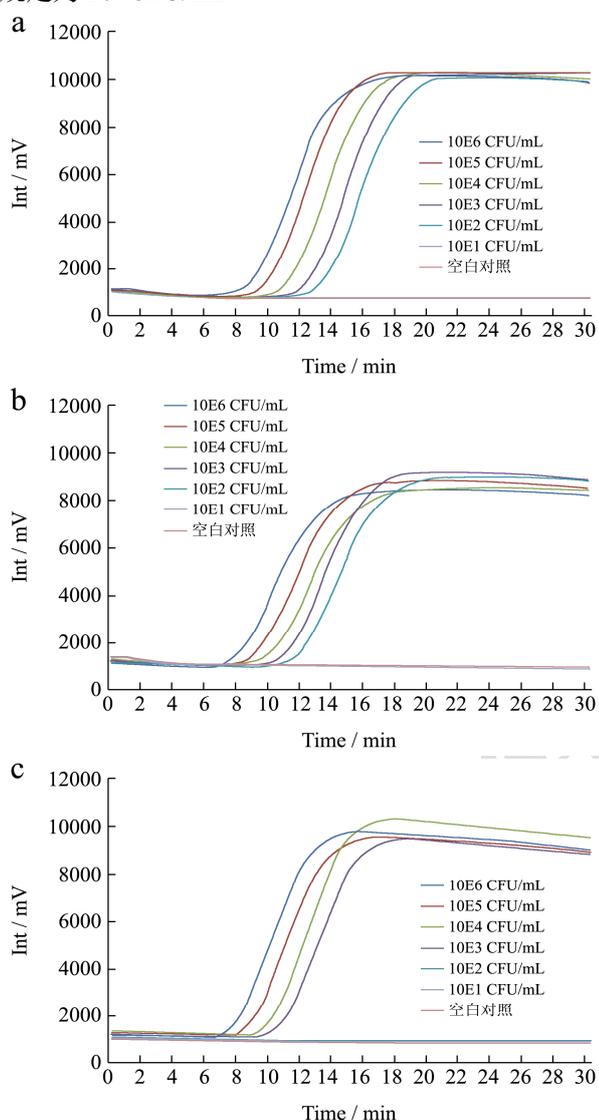


图3 RealAmp 法检测阪崎肠杆菌基因组和人工污染奶粉样品的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of the RealAmp assay in detecting *Enterobacter sakazakii* genomic DNA and in artificially contaminated milk powder samples

注: a, RealAmp 检测阪崎肠杆菌 DNA 的灵敏度; b, RealAmp 检测阪崎肠杆菌污染脱脂奶粉的灵敏度; c, RealAmp 检测阪崎肠杆菌污染全脂奶粉的灵敏度。

2.1.4.2 阪崎肠杆菌人工污染样品最低检测限

根据 2.1.3.2 的结果,选取灵敏度浓度 (10^2 CFU/mL) 以及下一个梯度 (10^3 CFU/mL) 的阪崎肠杆菌污染脱脂奶粉样品,每个浓度各重复 20 次

RealAmp 反应,把检出率达到 85%的最低浓度梯度定为最低检出限,检测结果显示,对脱脂奶粉污染样品 10^2 CFU/mL 检出率为 25%, 10^3 CFU/mL 检出率为 100%,所以规定其检出限为 10^3 CFU/mL。

根据 2.1.3.2 的结果,选取灵敏度浓度 (10^3 CFU/mL) 及下一个梯度 (10^4 CFU/mL) 的阪崎肠杆菌污染全脂奶粉样品,每个浓度各重复 20 次 RealAmp 反应,把检出率达到 85%的最低浓度梯度定为最低检出限,检测结果显示,对全脂奶粉污染样品 10^3 CFU/mL 检出率为 25%, 10^4 CFU/mL 检出率为 100%,所以规定其检出限为 10^4 CFU/mL。

2.1.5 适用性实验

实际样品检测中 RealAmp 检测结果与传统国标培养 (GB 4789.40-2010) 结果完全一致,在 20 份市售奶粉样品中检出 1 份样品中含阪崎肠杆菌,假阳性率和假阴性率均为 0,表明本文建立的奶粉中阪崎肠杆菌 RealAmp 检测方法适用于阪崎肠杆菌的检测。

2.2 讨论

根据国家法律和相关标准要求,微生物指标为产品出厂必检项目。而当前国家标准检测食品中微生物的方法由于检测周期长,对操作人员能力要求高等原因,在食品企业内未能有效地开展。现行食品安全微生物学检验国家标准以培养分离法为主,而这些检测方法由于人为干扰、交叉污染等原因,会对检测结果造成较大影响:结果可靠性较低、重现性较差、周期长,妨碍了质控管理的标准化。对乳品企业而言,自身的环境监测和生产过程控制比样品检测更为重要。确保厂区内洁净作业区的设施和环境不会对产品带来微生物污染,才能真正保证产品安全。而传统的微生物学培养方法很难满足微生物风险评估、监测和污染溯源的需求。因此,乳品企业急需基于 DNA 分析技术的高效检测设备以适应未来的应用需求。

RealAmp 检测法是将实时荧光和 LAMP 技术结合的一种简便、快速、高特异性基因扩增系统。以往,LAMP 法的结果主要通过焦磷酸镁沉淀观察法、荧光染料法和实时浊度法进行检测。焦磷酸镁沉淀观察法和实时浊度法检测灵敏度不高,无法检测低浓度目标 DNA,且焦磷酸镁沉淀观察法存在人为判断的主观性。荧光染料法需要在 LAMP 反应终止时打开反应管的管盖并加荧光染料,此种操作方式极易造成 LAMP 扩增产物气溶胶污染。为了克服上述方式的不足,并适应高灵敏度现场检测和床旁检测的需求,近年来便携式实时恒温仪被开发并用于 LAMP 检测技术中^[6-9]。

本研究建立的奶粉中检测阪崎肠杆菌的 RealAmp

法通过实时采集荧光信号对扩增过程进行及时判读,在保证灵敏度的同时,使结果数据化、形象化,比传统 LAMP 终点判断产物的浊度或颜色变化更客观可靠。该方法与常见病原菌无交叉反应,特异性强,检测灵敏度高,可在 10~30 min 内完成扩增反应。与传统的荧光定量 PCR 法和 LAMP 60~90 min 相比^[5,10~11],大大缩短了反应时间;因而可用于奶粉中阪崎肠杆菌的快速检测。该方法便携、易于操作,在没有外接电源的情况下可使用充电电池持续工作数小时;与荧光定量 PCR 仪相比,节约了大量成本,非常适合现场检测使用。

3 结论

本研究在 Deaou-308C 恒温实时荧光检测平台上建立的阪崎肠杆菌的 RealAmp 法具有操作简单、反应速度快、特异性好、灵敏度高、成本低、可实时观察反应进行情况的优点,为奶粉中阪崎肠杆菌的检测提供了新的发展方向,对我国的食品卫生及进出口食品安全监控具有重要的意义。

参考文献

- [1] Drudy D, Mullane N R, Quinn T, et al. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(8): 996-1002
- [2] Iversen C, Forsythe S J. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products [J]. *Food Microbiology*, 2004, 21(6): 771-776
- [3] 高建新,卢兆芸,肖菊珍,等.乳粉中阪崎肠杆菌的检测方法[J].*中国乳品工业*,2009,37(5):40-43
GAO Jian-xin, LU Zhao-yun, XIAO Ju-zhen, et al. Study on a method for detection of *Enterobacter sakazakii* in milk powder [J]. *Dairy Industry*, 2009, 37(5): 40-43
- [4] 高虹,张霞,高旗利.奶粉中阪崎肠杆菌 PCR 和荧光 PCR 检测方法的研究[J].*食品科学*,2006,27(9):203-207
GAO Hong, ZHANG Xia, GAO Qi-li. PCR and real time PCR detection for *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered milk [J]. *Food Science*, 2006, 27(9): 203-207
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*. 2000, 28(12): 63-68
- [6] 刘羽霏,叶蕾,孟赫诚,等.恒温实时荧光法检测金黄色葡萄球菌[J].*现代食品科技*,2013,29(9):2262-2266
LIU Yu-fei, YE Lei, MENG He-cheng, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by real time fluorescence isothermal amplification [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2262-2266
- [7] Ye L, Li Y, Zhao J, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 61(1): 85-90
- [8] Li Y, Shi L, Pan A, et al. Evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples [J]. *Journal of Microbiology Methods*, 2014, 104: 55-58
- [9] Yi M Y, Ling L, Neogi S B, et al. Real time loop-mediated isothermal amplification using a portable fluorescence scanner for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Control*, 2014, 41(2): 91-95
- [10] Zhang Y Q, Shan X X, Shi L, et al. Development of a *fimY*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food [J]. *Food Research International*, 2012, 45: 1011-1015
- [11] Shan X X, Zhang Y Q, Chen M R, et al. Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(1): 101-106