基于环介导等温扩增技术的产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌特异性检测

徐晓可[1]，郭卉[2]，邓梅清[3]，张菊梅[3]，吴清平[3]，丁郁[2,3]

（1.广东岭南职业技术学院健康管理学院，广东广州 510663）（2.暨南大学理工学院食品科学与工程系，广东广州 510632）（3.广东省微生物研究所省部共建华南应用微生物国家重点实验室，广东广州 510070）

摘要：本研究旨在建立食品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的快速检测方法。基于产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌合成酶基因*cesB*靶基因，设计4条特异性引物（2条内引物、2条外引物），建立环介导等温扩增技术（LAMP）。然后采用2株产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌、19株蜡样芽胞杆菌和41株非蜡样芽胞杆菌验证了该LAMP具有很好的特异性。LAMP检测的灵敏度在DNA水平上达到1.49 pg/μL，纯菌的灵敏度为5×10^3 cfu/mL。人工污染米饭样品，当起始污染量为2 cfu/g时，37 ℃增菌培养6 h，用试剂盒法和煮沸法提取的DNA，都可以检出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌。采用此LAMP方法进行了72份实际样品的检测，检出2份产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌阳性样品，与传统方法一致。因此，本研究建立的LAMP检测方法可应用于食品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的快速特异检测。

关键词：产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌；*cesB*基因；LAMP；食品

文章篇号：1673-9078(2021)01-223-228 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0664

Specific Detection of Emetic *Bacillus cereus* in Foods by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

XU Xiao-ke[1], GUO Hui[2], DENG Mei-qing[3], ZHANG Ju-mei[3], WU Qing-ping[3], DING Yu[2,3]

(1.College of health management, Lingnan Institute of Technology, Guangzhou 510663, China) (2.Department of Food Science and Engineering, College of Science & Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (3.Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of emetic *Bacillus cereus* was developed by designing four primers including two inner primers and two outer primers that specifically amplify segments of the *cesB* gene. Analysis of two emetic *B. cereus* strains, nineteen *B. cereus* strains and forty-one non-*B. cereus* strains demonstrated that this LAMP assay was specific. The detection limit of the LAMP method was 1.49 pg/μL with genomic DNA, 5×10^3 cfu/mL in pure culture. The detection limit of the LAMP method was 2 cfu/g in artificially contaminated rice for either boiling or kit-based DNA isolation method after enrichment at 37 ℃ for 6 h. Among seventy-two food samples, two was identified to be positive by this LAMP method, which was consistent with the international standard method. The result demonstrated that the specific LAMP assay can be used for rapid detection of emetic *B. cereus* strains in food.

Key words: emetic *Bacillus cereus*; *cesB* gene; LAMP; food

引文格式：

徐晓可,郭卉,邓梅清,等.基于环介导等温扩增技术的产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌特异性检测[J].现代食品科技,2021,37(1): 223-228

XU Xiao-ke, GUO Hui, DENG Mei-qing, et al. Specific detection of emetic *Bacillus cereus* in foods by loop mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 223-228

收稿日期：2020-07-16

基金项目：广东省普通高校特色创新项目（2018GKTSCX076）；广东岭南职业技术学院重点科研项目（KA201803）；国家重点研发计划项目（2018YFC1602500）；国家自然科学基金资助项目（31701195）

作者简介：徐晓可(1980-)，女，副研究员，研究方向：微生物检测

通讯作者：丁郁（1980-），男，博士，研究员，研究方向：食品安全与健康

蜡样芽胞杆菌（*Bacillus cereus*）是一种兼性需氧的革兰氏阳性菌，产芽胞，广泛分布于土壤、水、空气和各类生熟食品中[1]。食用了该菌污染的食品容易导致食物中毒，引起的食物中毒类型主要包括腹泻型中毒和呕吐型中毒，其中腹泻型中毒主要与某些菌株分泌肠毒素相关，而呕吐型中毒主要是由于某些菌株产生呕吐毒素引起[2-4]。

国内外均有报道蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件。1950 年在挪威发表了第一起蜡样芽胞杆菌食物中毒的报告，之后许多国家，尤其是欧洲一些国家相继报告了类似食物中毒的爆发。挪威和荷兰将蜡样芽胞杆菌认定为食品中最易检出的病原微生物[5]。我国在上世纪 70 年代报道蜡样芽胞杆菌中毒事件后，此类中毒事件的报道逐年增多。据 2008~2015 年我国国家食源性疾病监测网统计资料显示，微生物性食源性疾病占比 39%，其中蜡样芽胞杆菌引起的中毒事件占 17%，在细菌性病原体中排在第三[6]，危害极为严重。呕吐型蜡样芽胞杆菌引发的食物中毒时有发生，约占蜡样芽胞杆菌食物中毒总数的 75.9%[7]。因此，建立一种快速、特异的方法检测食品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌至关重要。

目前检测蜡样芽胞杆菌的方法是食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽胞杆菌（GB 4789.14-2014），主要包括增菌、分离培养、镜检、生化鉴定、生化分型。对于分离的蜡样芽胞杆菌主要是采用 PCR 或荧光定量 PCR 的方法鉴定其是否是呕吐毒株（呕吐毒素合成酶基因存在与否）。环介导等温扩增技术（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）是一种新兴的检测技术，它以其特异性强、等温灵敏、操作简单、产物易检测等优点在食品安全检测等领域得到了日益广泛的应用。在食源性致病菌方面，目前已经建立了副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、沙门氏菌（*Salmonella* spp.）、克罗诺杆菌（*Cronobacter* spp.）和蜡样芽胞杆菌等致病菌的 LAMP 技术，但没有从蜡样芽胞杆菌中区分出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的 LAMP 检测方法报道[8-11]。本研究旨在以产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌基因 *cesB* 为靶基因，设计 LAMP 反应特异性引物，构建 LAMP 反应体系，建立一种产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的特异快速检测技术，为卫生检验和食品质量安全提供技术保障，不断提高我国食品安全与公共卫生控制水平。

1 材料与方法

1.1 菌株

本试验收集菌株 62 株，所有菌株均由广东省微生物研究所提供。

1.2 培养基和试剂

胰蛋白胨肉汤、LB 肉汤等培养基：广东环凯微生物科技有限公司；*Bst* DNA 聚合酶：NEB 公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，2×PCR Mix：广州东盛生物科技有限公司；显色剂：广州迪奥生物科技有限公司；dNTPs，DNA Marker2000：生工生物工程（上海）股份有限公司；$MgSO_4$ 和甜菜碱：Sigma 公司。

1.3 主要仪器

低温高速离心机：SIGMA 3K30，德国 sigma 公司；酶标仪：EPOCH2，美国 BioTek 公司；PCR 仪：Mini3220，杭州朗基科学仪器有限公司；电泳仪：DDR-6B，北京六一生物科技有限公司；凝胶成像系统：Tanon-4600SF，上海天能科技有限公司；移液枪：德国 Eppendorf 公司；生化培养箱：SPX-150B-Z，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；恒温水浴锅：XMTD-8222，上海精宏实验设备有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养

将菌株接种至在胰蛋白胨肉汤（TSB）培养，36±1 ℃培养 16~18 h。

1.4.2 DNA 抽提

试剂盒法：按照试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。

煮沸法：取 1 mL 菌液或样品增菌液于 12000 r/min 离心 5 min，弃上清。加入 200 μL 无菌水洗涤 1 次后，用 100 μL TE 悬浮混匀，于 100 ℃水浴 10 min，冰浴 3 min，12000 r/min 离心 5 min，取上清备用。

1.4.3 引物设计

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 The sequence of primers

Primer 名称	序列(5' to 3')
cesB-F	ACCCATCTTGCGTCATT
cesB-R	CAGCCAAGTGAAGAATACC
F3	CTACAACAATTTTCTGCAAAGT
B3	AGCCAAGTGAAGAATACCAT
FIP	TGTAATTCCTCTAATGACGCAAGATATTTATTGTAGGAAGAACAGCA
BIP	TGTTCACTATATCGATGGGGACCCTGTCCCCCAAATCTCTT

（1）LAMP 引物设计：以产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 *cesB* 为靶基因，设计 LAMP 引物，引物序列见表 1，由上海生物工程公司合成。

（2）PCR 引物：参考文献序列[12]，由上海生物工程公司合成。

1.4.4 LAMP 扩增

LAMP 反应体系 25 μL，包括 2.5 μL 10×Thermopol 反应缓冲液、1.6 mmol/L dNTPs、0.2 μmol/L 上游外引物 F3、0.2 μmol/L 下游外引物 B3、1.6 μmol/L 上游内引物 FIP、1.6 μmol/L 下游内引物 BIP、6 mmol/L $MgSO_4$、1 mol/L 甜菜碱、8 U *Bst* DNA 聚合酶、3 μL 细菌 DNA 模板，加 dd H_2O 至体积 25 μL，加入显色剂在 PCR 管盖。扩增反应条件：63 ℃恒温水浴 1 h，不用开盖，通过颜色直接观察结果。

1.4.5 PCR 扩增

PCR 反应体系和 PCR 扩增程序参考张志鸿等的报道[10]。用 1×TAE 电泳缓冲液配制 2%琼脂糖凝胶，上样 5 μL，100 V 电压下 30 min 电泳，用凝胶成像系统观察电泳结果并进行分析。

1.4.6 LAMP 特异性验证

将表 2 中所有菌株接种至 TSB 增菌液中 37 ℃培养 16~18 h 后，取 1 mL 菌液用煮沸法提取 DNA，然后进行 LAMP 扩增，验证 LAMP 反应体系的特异性。

1.4.7 LAMP 灵敏度评价

1.4.7.1 基因组灵敏度

将产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 F4810/72 在 TSB 增菌液中 37 ℃培养 16~18 h 后，取 1 mL 菌液，用 DNA 抽提试剂盒抽提 DNA，用酶标仪测定 DNA 浓度。将上述 DNA 进行梯度稀释，进行 LAMP 扩增，评价该方法的 DNA 灵敏度。

1.4.7.2 纯菌灵敏度

将产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 F4810/72 在 TSB 增菌液中 37 ℃培养 16~18 h 后，取 1 mL 菌液，进行梯度稀释，用 DNA 抽提试剂盒抽提不同稀释度的 DNA，进行 LAMP 扩增，评价该方法的纯菌灵敏度。同时对含不同稀释度的菌液进行平板计数。

1.4.8 人工污染样品检测

称取经国标方法检验不含蜡样芽胞杆菌的新鲜米饭样品 25 g 至 225 mL LB 培养基中，接种计数的产呕吐毒素的蜡样芽胞杆菌 F4810/72 菌液，人工模拟样品的最终浓度分别为 10^0 cfu/g、10^1 cfu/g、10^2 cfu/g 和 10^3 cfu/g，37 ℃静置培养，在 0、2、4 和 6 h 后分别从增菌培养基中取 1 mL 上清液于无菌离心管中，提取 DNA 进行 LAMP 检测。同时对含不同稀释度的菌液进行平板计数。

表 2 特异性试验所用菌株及实验结果

Table 2 The specific detection of strains

菌株类型	菌株号[a]	LAMP[d]
emetic *B. cereus*	F4810/72[b]	1/1
emetic *B. cereus*	3733[c]	1/1
B. cereus	ATCC63301	0/1
B. cereus	Food isolates	0/18
non-*B. cereus* (n = 41)		
B. thuringiensis	GIM 1.32	0/1
B. thuringiensis	GIM 1.147	0/1
Vibrio parahaemolyticus	ATCC33847	0/1
V. parahaemolyticus	ATCC17802	0/1
V. parahaemolyticus	Food isolates	0/3
V. cholerae	Vb0	0/1
V. vulnificus	ATCC27562	0/1
V. alginolyticus	ATCC33787	0/1
Cronobacter spp.	Food isolates	0/3
C. sakazakii	ATCC29544	0/1
C. muytjensii	ATCC51329	0/1
Escherichia coli	ATCC25922	0/1
E. coli	8099	0/1
E. coli	Food isolates	0/3
E. coli O157:H7	NCTC12900	0/1
Shigell aflexneri	CMCC51572	0/1
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	0/1
Salmonella spp.	Food isolates	0/3
S. thompon	CMCC50023	0/1
S. paratyphi	CMCC50093	0/1
S. enteritidis	CMCC50335	0/1
S. typhi	CMCC50098	0/1
Staphylococcus aureus	ATCC6538	0/1
S. aureus	Food isolates	0/3
Listeria monocytogenes	CMCC54002	0/1
L. monocytogenes	CMCC54003	0/1
L. monocytogenes	CMCC54004	0/1
L. monocytogenes	ATCC19115	0/1
L. monocytogenes	Food isolates	0/3

注：a：ATCC，美国模式培养物集存库；CMCC，中国普通微生物菌种保藏管理中心；NCTC：国家标准菌库（英国）；GIM：广东省微生物研究所；CAS，中国科学院；b：由武汉中科院病毒所胡晓敏研究员馈赠；c：广东省微生物研究所分离菌株；d：阳性菌株数/所测菌株数。

1.4.9 食品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的检测

购买各大超市和快餐店的食品 72 份，其中熟食 24 份，水产品 24 份，奶制品 24 份。每份样品平均分

成 2 份，一份按 GB 4789.14-2014 分离检测；另一份直接用胰酪胨大豆多黏菌素肉汤培养基增菌培养，取 1.5 mL 增菌液按上述煮沸法提取 DNA，进行 LAMP 检测。

2 结果与讨论

2.1 LAMP 特异性

为了验证所建立产呕吐毒素蜡样芽孢杆菌 LAMP 方法的特异性，本研究将设计的 LAMP 引物分别扩增 2 株产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌、19 株蜡样芽胞杆菌和 41 株非蜡样芽胞杆菌的基因组 DNA，检测结果如表 2 所示。其中 2 株产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌均为阳性，显色反应呈现绿色；19 株蜡样芽胞杆菌和 41 株非蜡样芽胞杆菌均为阴性，显色反应呈现橙色。说明该 LAMP 引物仅针对产呕吐毒素蜡样芽孢杆菌 *cesB* 基因产生特异性扩增，对蜡样芽胞杆菌、苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌等的 DNA 未产生扩增反应，LAMP 扩增的特异性良好，可用于产呕吐毒素蜡样芽孢杆菌的特异检测。

2.2 LAMP 灵敏度

2.2.1 DNA 灵敏度

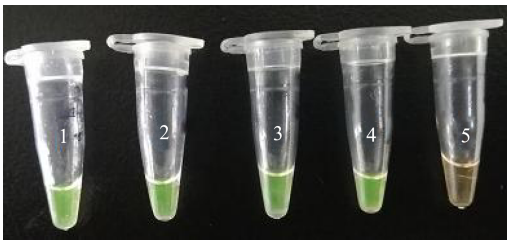

图 1 LAMP DNA 灵敏度实验结果

Fig.1 Sensitivity of the LAMP assay with genomic DNA

注：1：1.49 ng/μL；2：0.149 ng/μL；3：14.9 pg/μL；4：1.49 pg/μL；5：阴性对照。

用 DNA 抽提试剂盒抽提产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 F4810/72 基因组 DNA，用酶标仪测定 DNA 的浓度为 124 ng/μL。将上述 DNA 进行梯度稀释，进行 LAMP 扩增结果表明，LAMP 的灵敏度为 1.49 pg/μL（图 1）。这与徐匆等（2020）建立的单增李斯特菌的 LAMP 基因组灵敏度相当[13]。

2.2.2 纯菌灵敏度

培养产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 F4810/72，纯菌原始浓度为 5.0×10^8 cfu/mL，梯度稀释，分别取不同稀释度菌悬液提取 DNA，LAMP 检出情况见图 2。LAMP 纯菌灵敏度为 5.0×10^3 cfu/mL。杨滴等建立了蜡样芽胞杆菌的实时荧光定量 PCR，其纯菌灵敏度为 1.0×10^3 cfu/mL[14]，与本研究的灵敏度相当。周巍等建立了 LAMP 技术检测酸乳中蜡样芽孢杆菌，其纯菌灵敏度为 6.4 cfu/mL，高于本研究的灵敏度[15]。

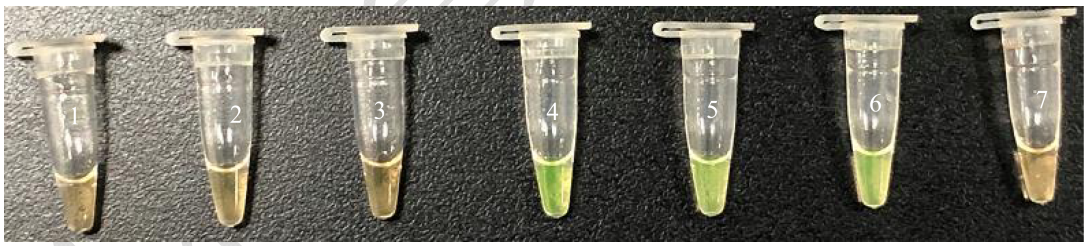

图 2 LAMP 纯菌灵敏度实验结果

Fig.2 Sensitivity of the LAMP assay in pure culture

注：1：5.0×10^0 cfu/mL；2：5.0×10^1 cfu/ mL；3：5.0×10^2 cfu/ mL；4：5.0×10^3 cfu/ mL；5：5.0×10^4 cfu/ mL；6：阳性对照；7：阴性对照。

2.3 人工污染样品检测

培养产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 F4810/72，人工污染米饭的接种浓度分别为 2.0×10^0、2.0×10^1、2.0×10^2、2.0×10^3 cfu/g，0、2、4 和 6 h 后分别取样品增菌液用试剂盒和煮沸法提取 DNA，LAMP 检出情况见表 3 和图 3。当起始污染菌量为 2 cfu/g 时，37 ℃增菌培养 6 h，用试剂盒法和煮沸法提取的 DNA，都可以检出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌。Martina（2007）等建立了产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的实时荧光定量 PCR。产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌人工污染米饭，经过 6 h 增菌，煮沸法提取 DNA，灵敏度为 10^0 cfu/g [16]，本研究建立的 LAMP 体系灵敏度与其相当。张志鸿等（2014）同样建立了产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的实时荧光定量 PCR，产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌人工污染米饭，经过 2 h 增菌，灵敏度为 10^0 cfu/g [12]，高于本研究中的 2 cfu/g，但该研究需要使用特定的荧光定量 PCR 仪器和专业人员操作，不利于在基层检测实验室大规模推广使用，无法满足现场检测的要求。当起始污染菌量大于 2.0×10^3 cfu/g 时，不用经过增菌培养，LAMP 可直

接检测出产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌。Zhang（2014）等建立了产呕吐毒素和非呕吐毒素的蜡样芽胞杆菌多重 PCR，人工污染食品，不用经过增菌培养，其灵敏度为 3.6×10^3 cfu/g[17]，与本研究的灵敏度相当。

综上所述，在大批量实际样品检测时，可以采用煮沸法提取 DNA，从而节省时间和试剂。当产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌污染食品的浓度超过 10^3 cfu/g 时，不需要增菌培养过程，可以直接检出，从而缩短了检测周期。由于食用蜡样芽胞杆菌数量大于 10^5 cfu/g 时有可能引起食物中毒甚至死亡，因此可以用本研究开发的 LAMP 方法直接快速筛查产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌，排查其风险。

表 3 产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌人工污染米饭不同浓度不同增菌时间的 LAMP 检测

Table 3 Effects of different levels and pre-incubation times of artificially contaminated rice on sensitivity of the LAMP detection of emetic *B. cereus*

增菌时间/h	不同浓度的增菌培养/(cfu/g)			
	2.0×10^0	2.0×10^1	2.0×10^2	2.0×10^3
0	-	-	-	+
2	-	-	-	+
4	-	-	+	+
6	+	+	+	+

注：－表示未检出；+表示检出。

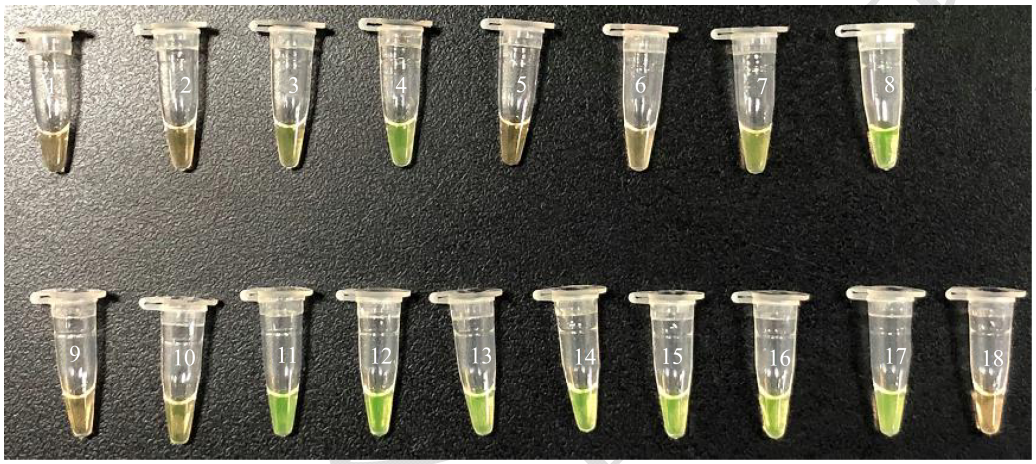

图 3 产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌人工污染米饭不同浓度不同增菌时间的 LAMP 检测结果

Fig.3 Results of different levels and pre-incubation times of artificially contaminated rice on sensitivity of the LAMP detection of emetic *B. cereus*

注：1~4 增菌 0 h，接种量分别为 2.0×10^0、2.0×10^1、2.0×10^2、2.0×10^3 cfu/g，5~8 增菌 2 h，接种量分别为 2.0×10^0、2.0×10^1、2.0×10^2、2.0×10^3 cfu/g；9~12 增菌 4 h，接种量分别为 2.0×10^0、2.0×10^1、2.0×10^2、2.0×10^3 cfu/g；13~16 增菌 2 h，接种量分别为 2.0×10^0、2.0×10^1、2.0×10^2、2.0×10^3 cfu/g；17：阳性对照；18：阴性对照。

2.4 食品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的检测

72 份食品样品用传统方法检出 2 份产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌阳性样品，包括一份熟食和一份巴氏奶。直接用 LAMP 检测 72 份食品样品，也检出 2 份产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌阳性样品，且同传统方法一致，但比传统方法的检测时间大大缩短。

3 结论

本研究首次建立了基于 *cesB* 基因的产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌 LAMP 检测方法。建立的方法具有特异性强、快速的优点。在基因组 DNA 水平的灵敏度为 1.49 pg/μL，纯菌灵敏度为 5.0×10^3 cfu/mL。人工污染米饭样品，当起始污染量为 2 cfu/g 时，37 ℃增菌培养 6 h，即可检出。当产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌污染食品的浓度超过 10^3 cfu/g 时，不需要增菌培养过程，亦可以直接检出。本研究建立的 LAMP 技术可应用于食品样品中产呕吐毒素蜡样芽胞杆菌的快速筛查检测，简便快捷，具有较好的推广应用前景。

参考文献

[1] Rosenbaum A, Papaliodis D, Alley R M, et al. *Bacillus cereus* fasciitis: a unique pathogen and clinically challenging sequela of inoculation [J]. Am J Orthop, 2013, 42(1): 37-39

[2] Griffiths M W, Schraft H. Chapter 20 - *Bacillus cereus* Food Poisoning. Foodborne Diseases (Third edition) [M]. Academic Press, 2017, 395-405

[3] McKillip J, Nimmer P, R. Beer M. *Bacillus cereus*: a bacterial species of environmental and clinical significance [J]. Journal for the Liberal Arts & Sciences, 2014, 18(2): 21-32

[4] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness [J].

Molecular Nutrition & Food Research, 2004, 48(7): 479-487

[5] Codd G A, Metcalf J S, Ward C J, et al. Analysis of cyanobacterial toxins by physicochemical and biochemical methods [J]. J AOAC Int, 2001, 84(5): 1626-1635

[6] 陈小敏,杨华,桂国弘,等.2008-2015 年全国食物中毒情况分析[J].食品安全导刊,2017,25:69-73
CHEN Xiao-min, YANG Hua, GUI Guo-hong, et al. Analysis of food poisoning situation in 2008-2015 [J]. China Food Safety Magazine, 2017, 25: 69-73

[7] 周帼萍,梁天光,丁淑娟.1986-2007 年中国 299 起蜡样芽胞杆菌食物中毒案例分析[J].中国食品卫生杂志,2009,5: 450-454
ZHOU Guo-ping, LIANG Tian-guang, DING Shu-juan. Analysis on 299 *Bacillus cereus* food poisoning cases in 1986-2007 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 5: 450-454

[8] 马骉,吴莹莹,戴明雁,等.副溶血性弧菌PMA-LAMP方法的建立[J].现代食品科技,2016,32(7): 205-213
MA Biao, WU Ying-ying, DAI Ming-yan, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on propidium monoazide (PMA) for detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(7): 205-213

[9] 孔超,董娜,高伟.应用环介导等温扩增法快速检测食品中沙门氏菌的研究[J].中国病原生物学杂志,2015,10(9): 816-840
KONG Chao, DONG Na, GAO Wei. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for rapid detection of *Salmonella* in food [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(9): 816-840

[10] 张淑红,吴清平,徐晓可,等.LAMP 法在阪崎肠杆菌快速检测中的应用[J].食品与机械,2011,27(5):111-114
ZHANG Shu-hong, WU Qing-ping, XU Xiao-ke, et al. The application of loop mediated isothermal amplification (LAMP) technique for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* [J]. Food & Machinery, 2011, 27(5): 111-114

[11] 张童,徐之雯,时逸莹,等.牛乳中蜡样芽孢杆菌高效环介导扩增检测方法建立[J].食品安全质量检测学报,2020,11(12): 3454-3459
ZHANG Tong, XU Zhi-wen, SHI Yi-ying, et al. Establishment of efficient loop mediated amplification method for *Bacillus cereus* detection in milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(12): 3454-3459

[12] 张志鸿,王力均,甘蓓,等.基于 qPCR 快速检测米饭中产呕吐毒素蜡样芽孢杆菌的研究[J].中国粮油学报,2014,29(4): 100-104
ZHANG Zhi-hong, WANG Li-jun, GAN Bei, et al. Study on rapid detection of emetic *Bacillus cereus* by QPCR [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(4): 100-104

[13] 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):1-6
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): 1-6

[14] 杨滴,赵宇明,秦鹏钧,等.肉制品中蜡样芽胞杆菌实时荧光PCR 检测方法的研究[J].肉类工业,2017,6:49-52
YANG Di, ZHAO Yu-ming, QIN Peng-jun, et al. Study on real-time fluorescent PCR detection method of cerea spore bacilli in meat products [J]. Meat Industry, 2017, 6: 49-52

[15] 周巍,张薇,刘亮,等.环介导等温扩增技术检测酸乳中蜡样芽孢杆菌[J].乳业科学与技术,2013,36(5):29- 31
ZHOU Wei, ZHANG Wei, LIU Liang, et al. Detection of *Bacillus cereus* in yogurt by loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2013, 36(5): 9-31

[16] Martina F, Ute M, Ulrich B, et al. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6): 1892-1898

[17] Zhang Z， Wang L， Xu H， et al. Detection of non -emetic and emetic Bacillus cereus by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control [J]. Food Control, 2013, 35(2014): 401-406