

多重 LAMP—熔解曲线法检测食品中 两种食源性致病菌

Development of multiplex LAMP combined with melting curves analysis
for detection of two kinds of food borne pathogens

姜侃 张慧 汪新 刘鹏鹏 黄建锋 周志南

JIANG Kan ZHANG Hui WANG Xin LIU Peng-peng HUANG Jian-feng ZHOU Zhi-nan

(浙江省质量检测科学研究院, 浙江 杭州 310018)

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

摘要:针对沙门氏菌的侵袭蛋白基因(*invA*)和金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因(*nuc*)设计 LAMP 引物,优化反应条件,并分别对反应产物进行熔解曲线分析,判断扩增结果,从而建立食品中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌多重 LAMP—熔解曲线检测方法。对 9 株目标菌和 23 株非目标菌的检测未出现假阳性和假阴性结果,并可通过熔解曲线的熔解温度分析确定所含目标菌;对产物的测序分析表明所得序列与目的基因序列吻合;对目标菌的检测灵敏度均可达到 10 fg/ μ L;对 232 份样品的检测结果显示,其中 2 份生猪肉中检出金黄色葡萄球菌。该方法具有良好的检测特异性,并可为食源性致病菌的快速检测提供一种重要技术手段。

关键词:沙门氏菌;金黄色葡萄球菌;多重 LAMP;熔解曲线;食品

Abstract: A multiplex LAMP-melting curve method for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in food was developed. The primers were designed according to the sequences of *invA* gene of *Salmonella* spp. and *nuc* gene of *Staphylococcus aureus*, and the reaction system was optimized. The amplification products were analyzed by melting curves, electrophoresis, precipitation observation and fluorescence observation as well. No false positive and false negative results emerged during tests of 9 target and 23 non-target bacteria strains, and the pathogens could be determined by melting temperature on melting curves. DNA sequencing of LAMP products showed the sequences as deduced, confirming the correct LAMP amplification. The detection limits for each pathogen were both 10 fg/ μ L. The tests result of 232 samples showed that 2 pieces of raw pork were contaminated by *Staphylococcus aureus*.

基金项目: 浙江省科技厅优先主题重点发展项目(编号: 2009C13013); 浙江省质监系统科研项目(编号: 20120101)

作者简介: 姜侃(1978—),男,浙江省质量检测科学研究院高级工程师。E-mail: jkk_john@163.com

收稿日期: 2014-12-15

This method showed high specificity, and could be used to detect foodborne pathogens rapidly.

Keywords: *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; multiplex LAMP; melting curves; food

依据中国现行食品安全监管体系和食品安全国家标准,沙门氏菌(*Salmonella* spp.)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是重点关注的食源性致病菌,而目前主要采用分离培养方法对这两种致病菌进行检测^[1,2],不但检测周期较长,而且受限于检测人员的专业知识和经验,容易出现误判。随着分子生物学方法逐步应用到微生物检测中,致病菌的检测效率也得到提升。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[3]作为一种新型核酸扩增技术,由于其快速、简便、高效的特点而得到广泛运用^[4,5]。但由于其特殊的扩增机制,现有方法大多是在一个系统中针对单一目标菌进行检测,即便能在同一反应体系中实现多个目的菌快速扩增,其扩增产物也要通过诸如酶切、测序等复杂手段进行分析。本研究拟分别选择沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的高度保守基因^[6,7]设计 LAMP 引物,优化多重 LAMP 反应体系,并对扩增产物进行熔解曲线分析,根据熔解温度判断相应的病原菌,以建立沙门氏菌和金黄色葡萄球菌多重 LAMP 快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

培养基: 青岛海博生物技术有限公司;
DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒: 美国 Qia-gen 公司;
DNA Marker DL2000: 宝生物工程(大连)有限公司;
MgSO₄ 溶液、dNTP 溶液: 美国 Promega 公司;

Bst DNA 聚合酶及其缓冲液:荷兰 NEB 公司;
甜菜碱:美国 Sigma-Aldrich 公司;
Eva Green 染料:美国 Biotium 公司;
琼脂糖:法国 Biowest 公司;
BigDye 测序试剂盒:美国 AB 公司。

试验用菌株包括:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, ATCC 25923, ATCC 27217),甲型福伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi-A*, CICC 21501),乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi-B*, CICC 21495),丙型福伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi-C*, CICC 21512),鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028),猪霍乱沙门菌(*Salmonella cholerae-suis*, CICC 21493),亚利桑纳沙门菌(*Salmonella arizona*, CICC 21506),痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*, ATCC 51252),福氏志贺菌(*Shigella flexneri*, ATCC 12022),鲍氏志贺菌(*Shigella boydii*, ATCC 9207),宋内志贺菌(*Shigella sonnei*, ATCC 25931),单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19114, ATCC 19115),无害

李斯特菌(*Listeria innocua*, ATCC 33090),威氏李斯特氏菌(*Listeria welshimeri*, CICC 21672),斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*, CICC 21671),伊氏李斯特菌(*Listeria ivanovi*, CICC 21663),格氏李斯特菌(*Listeria grayi*, CICC 21670),表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228),腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*, ATCC 49453),粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, CICC 23536),屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, CICC 21605),副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, CICC 21528),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15442),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922),阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*, ATCC 51329),奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, CICC 23676),杨氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter youngae*, CICC 21596),蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, ATCC 11778),乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolytic-β*, CMCC 32210)。

将引物配制成浓度为 50 μmol/L 的溶液备用,序列见表 1。

表 1 LAMP 检测引物

Table 1 Specific primer sequences for LAMP

目标基因	引物名称	引物序列(5'→3')
沙门氏菌 <i>invA</i> 基因 (Genebank NC_003198.1)	<i>invA</i> -F3	GGCCCGATTTTCTCTGGATGG
	<i>invA</i> -B3	CACCAATGGTCAGCATGG
	<i>invA</i> -FIP	GCGCGGCATCCGCATCAATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGT
	<i>invA</i> -BIP	ACGGTTCCTTTGACGGTGCGATACCATGGCGGGTCATC
	<i>invA</i> -sF	CGGTATTATTGATGCGGATGC
	<i>invA</i> -sR	CACCGAAATACCGCCAATAAA
金黄色葡萄球菌 <i>nuc</i> 基因 (Genebank NC_002952.2)	<i>nuc</i> -F3	ACAATACGCAAAGAGGTTTTTCT
	<i>nuc</i> -B3	TTTCGTAAATGCACTTGCTTCA
	<i>nuc</i> -FIP	TGTCGCAGGTTCTTTATGTATAATGGCGTAAATAGAAGTGGTTC
	<i>nuc</i> -BIP	AATGTACAAAGGTCAACCAATGACATAGGATGCTTTGTTTCAGGTG
	<i>nuc</i> -	ACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAA
	LOOP	
	<i>nuc</i> -sF	CAGTATATAGTGCAACTTCAACTAA
	<i>nuc</i> -sR	TGGTTGACCTTTGTACATTAA

1.2 仪器与设备

荧光 PCR 仪:Mini-Opticon 型,美国 Bio-Rad 公司;
梯度 PCR 仪:Veriti 型,美国 AB 公司;
基础电泳仪:Basic 型,美国 Bio-Rad 公司;
自动凝胶成像系统:Gel Doc XR 型,美国 Bio-Rad 公司;
恒温水浴器:TW20 型,德国 Julabo 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 提取 将菌种分别接种于脑心浸液肉汤中,36℃培养 24 h,采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取增菌液培养产物 DNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书。

1.3.2 多重 LAMP 反应体系的优化 25 μL 反应体系中,首先确定的组分及浓度:引物 F3 和 B3 各 0.04 μmol/L,引物 FIP 和 BIP 各 0.5 μmol/L,引物 nuc-LOOP 0.3 μmol/L,甜菜碱 0.64 mol/L,dNTP 各 0.8 mmol/L,Bst 聚合酶 8 U,10×反应缓冲液 2.5 μL,1×Eva Green 荧光染料;扩增时间为 100 min,对 Mg²⁺ 浓度和扩增温度进行优化。在 63℃下,Mg²⁺ 浓度分别设定为 3.6,4.0,4.4,4.8,5.2 mmol/L 的情况下进行测试;在最佳 Mg²⁺ 下,扩增温度分别设定为 61,62,63,64,65℃的情况下进行测试。扩增在 PCR 仪中进行,通过分别观察两种目标菌的扩增效率,最终确定体系中

Mg²⁺ 的浓度和扩增温度。

1.3.3 多重 LAMP 种属特异性 以目标菌株和非目标菌株的基因组 DNA 为模板分别进行 LAMP 检测,同时对鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)和金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的混合 DNA 模板进行 LAMP 检测。设定荧光定量 PCR 仪的反应温度为 63 ℃,每隔 1 min 收集 1 次荧光信号,100 个循环。

反应产物应用琼脂糖凝胶电泳、观察离心沉淀和观察荧光 3 种方法检测扩增结果,验证该方法检测沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的特异性。

1.3.4 熔解曲线分析多重 LAMP 产物 分别以沙门氏菌基因组 DNA、金黄色葡萄球菌基因组 DNA 和二者的混合基因组 DNA 为模板,以最佳条件进行多重 LAMP 反应,设定荧光定量 PCR 仪的反应温度为 63 ℃,每隔 1 min 收集 1 次荧光信号,100 个循环;扩增产物应用荧光定量 PCR 仪分别进行熔解曲线分析,以确定沙门氏菌和金黄色葡萄球菌扩增产物的熔解曲线特征峰,并观察多重 LAMP 反应时熔解曲线特征峰是否与之吻合。以琼脂糖凝胶电泳、观察离心沉淀和观察荧光法为对照检测方法。

1.3.5 多重 LAMP 体系对单一目标菌 DNA 的检测灵敏度 将鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)和金黄色葡萄球菌(ATCC25923)两种标准菌株 DNA 提取液进行 10 倍梯度稀释,使 DNA 浓度为 1,0.1,0.01,0.001,0.000 1,0.000 01,0.000 001 ng/μL。以上述浓度 DNA 为模板,对本 LAMP 检测方法和 PCR 检测方法分别进行单个目标菌 DNA 检测灵敏度的测定,并利用电泳结果对二者灵敏度进行比较。PCR 方法的建立参考相关行业标准^[8]。

1.3.6 多重 LAMP 不同组合检测及产物测序验证 以鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)和金黄色葡萄球菌(ATCC25923)的混合 DNA 为模板,进行多重 LAMP 扩增,对扩增产物进行电泳,将 200~1 000 bp 的产物进行切胶回收纯化,应用 *invA*-sF、*invA*-sB、*nuc*-sF 和 *nuc*-sB 作为测序引物对所纯化产物直接测序分析,并与预期目的片段序列进行比对,从而对反应体系的特异性进行进一步验证。

1.3.7 多重 LAMP 与传统方法检测模拟样品的比较 以液体乳和乳粉为基质分别制备模拟样品。将鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)和金黄色葡萄球菌(ATCC25923)分别接种于营养肉汤培养液,36 ℃ 培养 24 h,将培养液分别离心,弃去上清后,加入生理盐水反复离心洗涤 3 次,加入生理盐水重新悬浮,并调整菌悬液浓度,均匀混合于液体和固体模拟样品,使样品中的污染量达到 10³ mL⁻¹(g⁻¹);同时,在这些样品中也加入志贺氏菌、大肠埃希氏菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌菌悬液作为背景干扰菌,制成 10 份模拟阳性样品;另将志贺氏菌、大肠埃希氏菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌菌悬液均匀混合于其它样品中,制成 10 份模拟阴性样品。

将每份模拟样品分别采用两种方法检测。第一法中,分别取 25 g 模拟样品加入 225 mL 的改良 SSL 复合增菌液^[9](复合增菌液中氯化锂的浓度改为 4 g/L)中,36 ℃ 培养 12 h

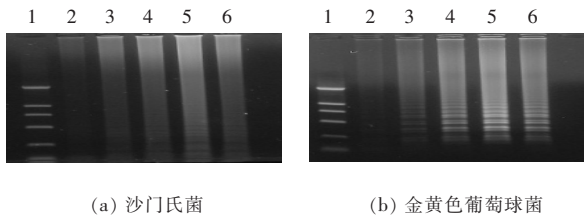
后,应用试剂盒提取培养液中细菌 DNA,并以此为模板,采用多重 LAMP 方法进行检测分析;第二法中,按照中国 GB 4789.4—2010 和 GB 4789.10—2010 的方法对每份模拟样品进行定性检测,并与多重 LAMP 检测结果进行比对。

1.3.8 多重 LAMP 与传统方法检测真实样品的比较 取实验室在检的禽蛋 32 批、生猪肉 66 批、乳制品 134 批,分别按照 1.3.7 中所述两种方法进行检测,比较两组检测结果。

2 结果与讨论

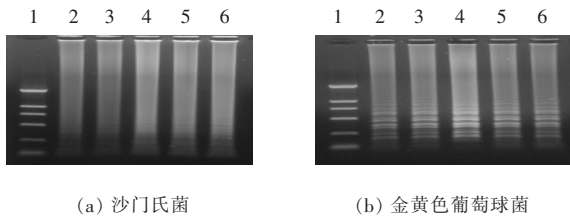
2.1 多重 LAMP 反应体系的优化

沙门氏菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 在同一温度不同 Mg²⁺ 浓度(3.6,4.0,4.4,4.8,5.2 mmol/L)条件下的 LAMP 扩增结果见图 1;沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 DNA 在同一 Mg²⁺ 浓度不同温度下(61,62,63,64,65 ℃)的 LAMP 扩增结果见图 2。由图 1、2 可知,当 Mg²⁺ 浓度为 4.8 mmol/L、扩增温度为 63 ℃ 时,反应体系对两株菌 DNA 的扩增效果均较好,呈现明亮梯状电泳条带,最终确定最佳 Mg²⁺ 浓度为 4.8 mmol/L、最佳扩增温度为 63 ℃。



1. DNA marker DL2000 2~6. Mg²⁺ 浓度依次是3.6,4.0,4.4,4.8,5.2 mmol/L

图 1 不同 Mg²⁺ 浓度 LAMP 扩增产物电泳图
Figure 1 Electrophoresis of LAMP products out of different Mg²⁺ concentrations



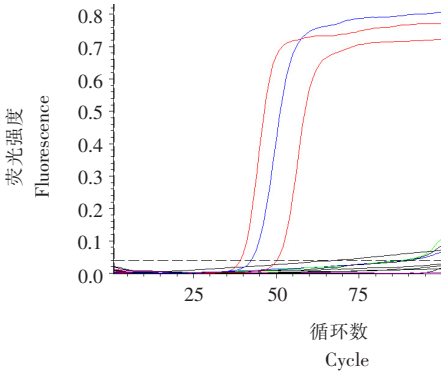
1. DNA marker DL2000 2~6. 扩增温度依次是 61,62,63,64,65 ℃

图 2 不同反应温度 LAMP 扩增产物电泳图
Figure 2 Electrophoresis of LAMP products out of different test temperatures

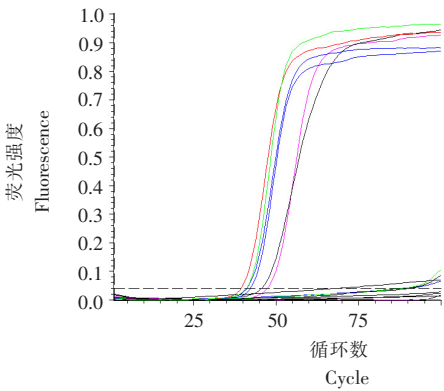
依据相关研究,*invA* 和 *nuc* 序列高度保守^[6,7],本研究正是针对这两个基因序列设计引物,在筛选了大量引物,并优化反应体系后,仍存在两种致病菌 DNA 扩增效率不平衡的情况进行研究的。有研究^[10]显示,反应体系中增加环引物可显著提高扩增效率。本研究针对金黄色葡萄球菌设计增加了 1 条环引物,显著提高了多重体系中金黄色葡萄球菌 DNA 的扩增效率,使其与沙门氏菌 DNA 的扩增效率相对一致。

2.2 多重 LAMP 的种属特异性试验

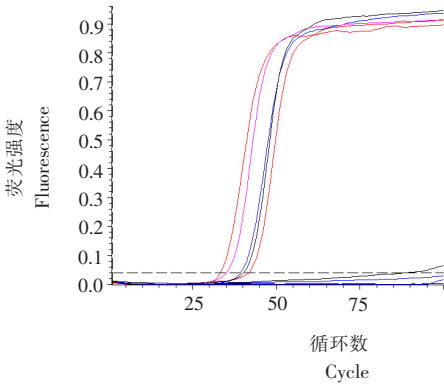
应用多重 LAMP 方法对目标菌和非目标菌的 DNA 以及沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的混合 DNA 分别进行扩增，结果见图 3。由图 3 可知，在荧光定量 PCR 仪进行反应后，9 株目标菌和混合 DNA 呈现明显扩增曲线，而非目标菌无扩增曲线。目标菌株与非目标菌株多重 LAMP 扩增电泳结果见图 4。由图 4 可知，9 株目标菌株扩增产物电泳后呈现明显梯状电泳条带，而非目标菌无电泳条带，其结果与离心观察沉淀及荧光染料法的检测结果与扩增曲线结果一致。通过对目标菌和非目标菌的 LAMP 扩增试验可知，本方法对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 具有高度特异性。



(a) 金黄色葡萄球菌和部分非目标菌



(b) 沙门氏菌和部分非目标菌

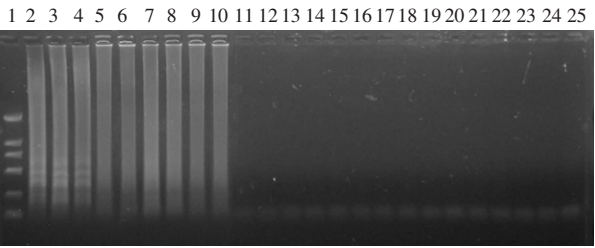


(c) 沙门氏菌和金黄色葡萄球菌

图 3 目标菌株与非目标菌株多重 LAMP 扩增曲线图
Figure 3 Ampliation curves of multiplex LAMP products of each targeting bacteria or non-targeting bacteria

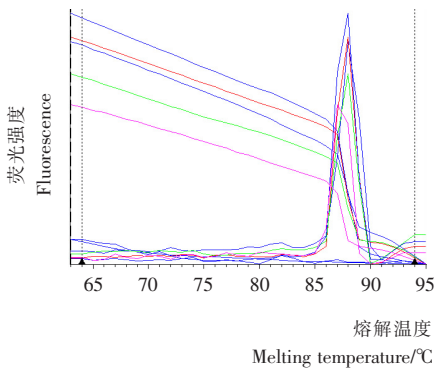
2.3 多重 LAMP 产物分析

扩增产物溶解曲线见图 5。将 PCR 仪加热的扩增产物

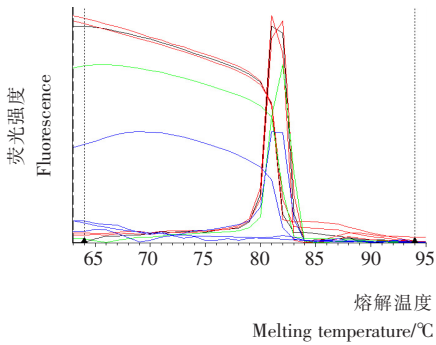


1. DNA marker DL2000 2~4. 金黄色葡萄球菌 5~10. 沙门氏菌 11~25. 部分非目标菌

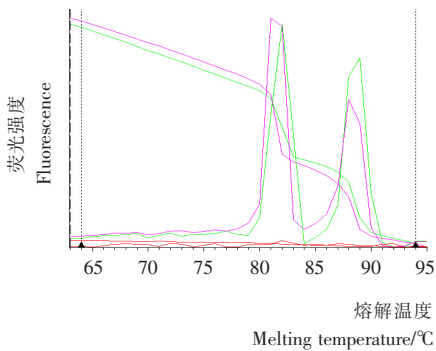
图 4 目标菌株与非目标菌株多重 LAMP 扩增电泳图
Figure 4 Electrophoresis of multiple LAMP products of each targeting bacteria or non-targeting bacteria



(a) 沙门氏菌



(b) 金黄色葡萄球菌

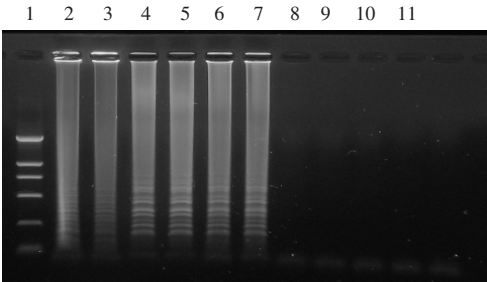


(c) 沙门氏菌+金黄色葡萄球菌

图 5 扩增产物溶解曲线
Figure 5 Melting curves analysis of LAMP products

在荧光定量 PCR 仪上进行熔解曲线分析后发现:单一沙门氏菌 DNA 扩增产物的熔解曲线峰出现在 86~90 ℃,其最高峰出现在 88 ℃左右(图 5(a));单一金黄色葡萄球菌 DNA 扩增产物的熔解曲线峰出现在 80~84 ℃,其最高峰出现在 82 ℃左右(图 5(b));沙门氏菌和金黄色葡萄球菌混合 DNA 的扩增产物在 80~84 ℃和 86~90 ℃分别出现一个熔解曲线峰(图 5(c))。上述结果表明,本试验所建立的多重 LAMP 检测体系可准确检测沙门氏菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA,并可通过熔解曲线分析,准确分析模板中所含有的目标菌 DNA。

混合目标菌多重 LAMP 产物电泳结果见图 6。由图 6 可知,电泳观察时可见明亮梯状条带,给出了与熔解曲线一致的结果,说明熔解曲线分析可行。



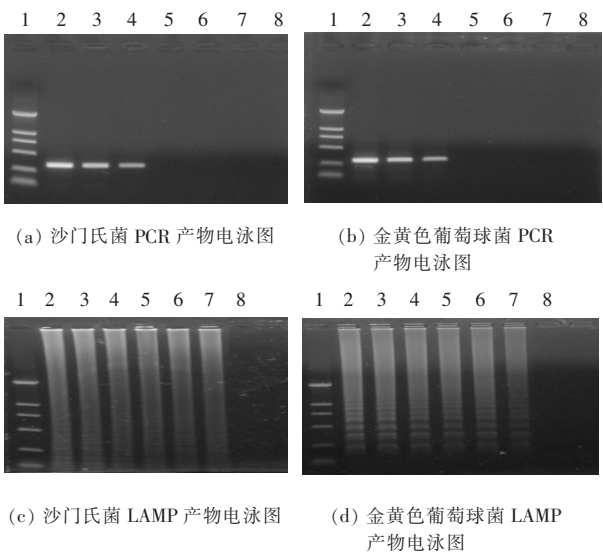
1.DNA marker DL2000 2~3. 沙门氏菌 DNA 扩增结果 4~5. 金黄色葡萄球菌 DNA 扩增结果 6~7. 沙门氏菌+金黄色葡萄球菌 DNA 扩增结果 8~9. 阴性对照 10~11. 空白对照

图 6 混合目标菌 DNA 多重 LAMP 扩增产物电泳图
Figure 6 Electrophoresis of multiple LAMP products of targeting bacteria

现阶段鲜有多重 LAMP 检测的报道,主要是因为 LAMP 反应体系较为复杂,多重 LAMP 中各类影响因素的综合效应难以预料。同时,由于 LAMP 反应产物是由等比分子量的反应产物组成,因此多重 LAMP 的扩增产物无法如多重 PCR 那样直接比对电泳条带的分子量来判断检测体系中存在何种目标菌 DNA。本试验利用荧光定量 PCR 仪对多重扩增产物进行熔解曲线分析,通过观察熔解曲线峰确定模板中所含的目标 DNA。若在 86~90 ℃出现熔解曲线峰,说明模板中存在沙门氏菌 DNA;若在 80~84 ℃出现熔解曲线峰,说明模板中存在金黄色葡萄球菌 DNA;若 86~90 ℃和 80~84 ℃同时出现熔解曲线峰,说明模板中既存在沙门氏菌 DNA,又存在金黄色葡萄球菌 DNA。

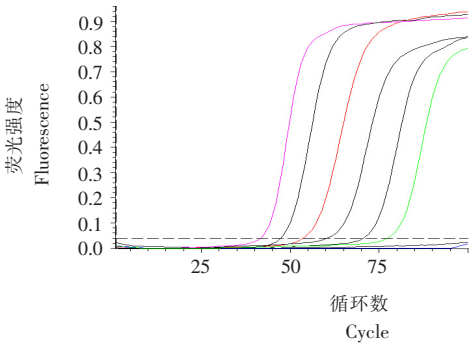
2.4 多重 LAMP 体系对单一目标菌的检测灵敏度

分别对鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 DNA 提取液进行 PCR、多重 LAMP 电泳和多重 LAMP 荧光的灵敏度检测,PCR 和多重 LAMP 检测灵敏度比较见图 7、8。由图 7 可知,沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 DNA 的 PCR 检测灵敏度为 10 pg/μL,多重 LAMP 电泳检测灵敏度达到 10 fg/μL。由图 8 可知,多重 LAMP 荧光检测灵敏度也达到 10 fg/μL。

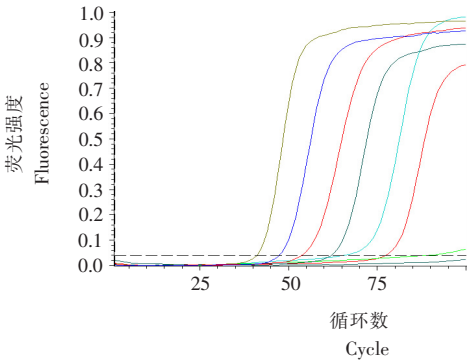


1. DNA marker DL2000 2~8. 分别为 DNA 模板浓度为 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 ng/μL 的反应产物

图 7 PCR 和多重 LAMP 检测灵敏度比较
Figure 7 Sensitivity comparison of multiple LAMP and conventional PCR



(a) 沙门氏菌 LAMP 产物荧光图



(b) 金黄色葡萄球菌 LAMP 产物荧光图

荧光图扩增曲线中从左至右 DNA 模板浓度为 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 ng/μL

图 8 多重 LAMP 荧光检测灵敏度
Figure 8 Sensitivity of multiple LAMP and conventional PCR with fluorescence detecting

2.5 多重 LAMP 产物的测序验证

对以鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌两种菌的混合 DNA 为模板的多重 LAMP 扩增产物进行测序,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了本试验所设计的多重 LAMP 方法能同时对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 进行高效扩增检测,引物之间无互相抑制,并具有较好的特异性和稳定性。

2.6 模拟样品和真实样品检测对比试验

加工食品中食源性致病菌的污染量相对较低,因此增菌是 LAMP 检测中必不可少的环节。本试验采用了一种复合增菌液,并依据文献[9]将复合增菌液中氯化锂的浓度改为 4 g/L,故能同时富集沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,并进一步抑制单增李斯特菌的增菌和其他非目标菌,取得了良好的增菌效果。

对模拟样品和真实样品多重 LAMP 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,无假阳性或假阴性结果出现,说明该方法具有良好的特异性和稳定性。在 232 份真实样品中,其中 2 份生猪肉样品检出金黄色葡萄球菌,其余样品中均未检出沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。同时,多重 LAMP 检测方法从增菌至获得结果的检测周期仅为 1 d,较中国 GB 4789. 4—2010 和 GB 4789. 10—2010 分析方法的 3~5 d 检测周期有明显缩短。

3 结论

本研究针对沙门氏菌的侵袭蛋白基因(*invA*)和金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因(*nuc*)设计 LAMP 引物,优化反应条件,并分别对反应产物进行熔解曲线分析,判断扩增结果,建立了食品中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌多重 LAMP—熔解曲线检测方法。该方法反应体系的组分及浓度为:引物 F3 和 B3 各 0. 04 μ mol/L,引物 FIP 和 BIP 各 0. 5 μ mol/L,引物 *nuc*-LOOP 0. 3 μ mol/L,甜菜碱 0. 64 mol/L, dNTP 各

0. 8 mmol/L, Bst 聚合酶 8 U, 10 $\times$ 反应缓冲液 2. 5 μ L, 1 $\times$ Eva Green 荧光染料, Mg²⁺ 浓度为 4. 8 mmol/L; 扩增温度为 63 $^{\circ}$ C 时, 扩增时间为 100 min。同时,采用多重 LAMP 体系分别对两种致病菌的检测灵敏度进行单独测试,扩增产物电泳检测灵敏度均达为 10 fg/ μ L;而当采用荧光定量 PCR 仪对产物进行分析时,其检测灵敏度甚至达到了 1 fg/ μ L,远远高于 PCR 方法 10 pg/ μ L 的检测灵敏度。

参考文献

- 1 卫生部. GB 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- 2 卫生部. GB 4789. 10—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- 3 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- 4 易海华, 赵金伟, 房超, 等. 志贺菌环介导等温扩增检测方法建立[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(3): 380~382
- 5 董鑫悦, 满朝新, 卢雁, 等. 环介导等温扩增法快速检测乳中阪崎肠杆菌[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 318~320.
- 6 王晶钰, 董睿, 王利勤, 等. 市售鲜鸡蛋中沙门氏菌的分离鉴定及毒力岛基因检测[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 154~158.
- 7 邵美丽, 许岩, 刘思国, 等. TaqMan 探针实时定量 PCR 检测肉中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(3): 109~112.
- 8 质检总局. SN/T 1869—2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- 9 刘园园, 肖性龙, 余以刚. 一种能同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的培养基[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1 389~1 396.
- 10 Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223~229.

信息窗

报告:欧洲近半食品含农药残留 草莓超标率最高

欧洲食品安全局(EFSA)3月12日称,欧洲几乎一半的食品都含有农药残留,而草莓上的农药残留是最有可能超过安全界限的。

据报道,该安全局还在有机食品中发现了农药痕迹,但称在对近8.1万个食品样本进行分析后发现,其对健康产生负面影响的风险很低。

但权益组织称,这一数据令人担忧,尤其是发现不止一种农药残留的情况。他们称,这方面的农药多为杀菌剂,可能含有致癌物,需要对不止一种农药残留所可能产生影响的情况进行更多研究。

报道称,这份报告发现,欧盟及周边国家的食品样本中,近55%不含有可检测到的化学品残留。其余部分中,只有1.5%明显超过安全界限,意味着相关的企业将为此面临法律行动。

据悉,超过安全界限比例最高的是草莓(占抽查样本的2.5%),其次是莴苣(占抽查样本的2.3%)。有机食品抽查的样本中,15.5%的农药残留量在法律限制范围内,但有0.8%超过安全标准。

(来源:www.foodmate.net)