

# 牛乳中蜡样芽孢杆菌高效环介导扩增检测方法建立

张 童<sup>1</sup>, 徐之雯<sup>2</sup>, 时逸莹<sup>2</sup>, 杨捷琳<sup>2</sup>, 蒋 原<sup>2\*</sup>

(1. 复旦大学环境科学与工程学院, 上海 200433; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

**摘要: 目的** 建立稳定的环介导恒温扩增体系(loop mediated isothermal amplification, LAMP)检测乳制品中蜡样芽孢杆菌的分析方法。**方法** 设计 5 组引物, 通过特异性、灵敏度等指标测试筛选出较好的引物对。后通过优化反应中关键试剂及浓度, 检出蜡样芽孢杆菌。通过基因组干扰实验排除引物的假阳性干扰。并在牛奶中验证该方法的检测效率。**结果** 最终筛选出一组特异性好的引物, 该扩增方法经过优化后, 在最适扩增体系可以检出 10 fg/ $\mu$ L 纯基因组 DNA, 用实时荧光定量实验进行对比验证可以检测出 100 ag/ $\mu$ L 的基因组 DNA。抗干扰实验结果显示干扰组基因组核酸和培养菌液均对标准组无影响。该方法在检测牛乳中混合的菌落时呈现出良好的检测效果, 可以检测出  $2.1 \times 10^2$  CFU/mL。**结论** 本研究建立了高效、稳定、灵敏的恒温扩增体系, 可以应用与牛奶中蜡样芽孢杆菌的快速检测。

**关键词:** 环介导恒温扩增; 蜡样芽孢杆菌; 牛乳; 灵敏度

## Establishment of efficient loop mediated amplification method for *Bacillus cereus* detection in milk

ZHANG Tong<sup>1</sup>, XU Zhi-Wen<sup>2</sup>, SHI Yi-Ying<sup>2</sup>, YANG Jie-Lin<sup>2</sup>, JIANG Yuan<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Environmental Protection, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a stable method for the detection of *Bacillus cereus* in dairy products by loop mediated isothermal amplification (LAMP) system. **Methods** Five groups of primers were designed, and better primer pairs were screened out through specificity, sensitivity and other index tests. After that, *Bacillus cereus* was detected by optimizing the key reagents and concentrations in the reaction. The false positive interference of primers was eliminated through genome interference experiment. The detection efficiency of the method was verified in milk. **Results** A group of primers with good specificity were screened out. After optimization, the amplification method could detect 10 fg/ $\mu$ L pure genomic DNA in the optimal amplification system, and 100 ag/ $\mu$ L genomic DNA could be detected by real-time fluorescence quantitative experiments. The results of anti-interference experiment showed that the genomic nucleic acid and culture liquid of interference group had no effect on the standard group. The method showed good detection effect when detecting mixed colonies in milk, and could detect  $2.1 \times 10^2$  CFU/mL. **Conclusion**

基金项目: 中央引导地方专项(YDZX20173100004528)

Fund: Supported by Central Government Guided Local Special Projects (YDZX20173100004528)

\*通讯作者: 蒋原, 博士, 主要研究方向为食品安全。E-mail: Jiango@yeah.net

\*Corresponding author: JIANG Yuan, Ph.D, Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China. E-mail: Jiango@yeah.net

This study establish an efficient, stable and sensitive constant temperature amplification system, which can be applied to the rapid detection of *Bacillus cereus* in milk.

**KEY WORDS:** loop mediated isothermal amplification; *Bacillus cereus*; milk; sensitivity

## 1 引 言

蜡样芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,产孢子,是一种常见的病原微生物,常出现在蛋白质和碳水化合物含量高的食物,在腐质食物中含量较高,其产生的毒素会引起食物中毒,引起人的呕吐和腹泻等不良症状<sup>[1,2]</sup>。蜡样芽孢杆菌和副溶血弧菌、沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、大肠杆菌 O-157、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等菌属是食品安全问题中常见引起食源性中毒的微生物<sup>[3]</sup>。

环介导恒温扩增(loop mediated isothermal amplification)是由 Notomi<sup>[4]</sup>于 2000 年公布的技术,其核心是利用 4~6 条引物,形成具有发卡结构的茎环核心元件,后利用茎环结构进行扩增,实现对模板的指数扩增。相比于传统的 PCR 扩增方法,环介导恒温扩增检测快速,1 h 内就可以检测出结果,此外,其检测结果可通过观察扩增管浊度来进行判断<sup>[5]</sup>,不需要复杂的仪器设备,对操作人员要求较低。同时,还可以引入非选择性核酸染料如脱氧核糖核酸小沟嵌合染料来进行实时扩增检测<sup>[6]</sup>。环介导等温扩增正以其快速、简便等优点成为即时检测中重要检测方法,可以进行病原微生物的初步筛选<sup>[7]</sup>。

本研究利用环介导等温扩增方法检测蜡样芽孢杆菌,选择了 8 株蜡样芽孢杆菌和 9 株常见细菌进行特异性验证,优化扩增体系,通过实时荧光定量 PCR 来进行对比验证。同时,将 1 号标准蜡样芽孢杆菌和乳制品制成混合物,验证乳制品中的蜡样芽孢杆菌的灵敏度并,以期为乳制品中蜡样芽孢杆菌的快速检测提供稳定的方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

本实验所用的菌株见表 1, 17 种菌株来自于中国医学细菌保藏管理中心,中国农业微生物菌种保藏管理中心和 ATCC。

### 2.2 试 剂

dNTPs、甜菜碱(美国 Thermo Fisher 公司); 10×Thermo Pol Reaction Buffer, Bst DNA 聚合酶大片段(美国 New England Biolabs 公司); SYBR GREEN I(美国 Sigma 公司); 硫酸镁(国药集团化学试剂有限公司)。

### 2.3 仪器与设备

QuantStudio 3 荧光检测仪器、Nanodrop 超微量紫外分光光度计(美国 ThermoFisher 公司); 1-14 桌面离心机

(美国 Sigma 公司); UVP Gel Doc-IT 凝胶成像系统来(美国 UVP 公司)。

表 1 实验所用菌株  
Table 1 Experimental bacteria strains

菌株名称	拉丁文	编号
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC63302
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 02803
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01664
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10608
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10609
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01956
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10117
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i> Hauser	ATCC 12453
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802
沙门氏菌	<i>Salmonella schottmuelleri</i>	CMCC50001
痢疾志贺氏菌	<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC51135
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC21600
大肠埃希菌	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CICC21530
肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076
单核细胞增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC BAA-751

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 引物设计与筛选

环介导等温扩增引物包含 F3、B3、FIP、BIP、LF 和 LB 6 条引物,引物设计需要考虑引物的  $T_m$  值、长度、引物互补片段之间的距离<sup>[8]</sup>。本实验首先在美国国家生物信息中心(national center for biotechnology information)上选取蜡样芽孢杆菌特征性片段,溶血素 hbl 基因(GenBank: MH844524.1),使用通过在线网站(<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>)PrimerExplorer V5 软件设计 5 组不同位置引物,每组引物混合成 Mix (F3 5 μmol/L, B3 5 μmol/L, FIP 40 μmol/L, BIP 40 μmol/L, LF 20 μmol/L, LB 20 μmol/L),在 ABI QuantStudio 3 仪器上以程序 63 °C, 1 min, 45 个循环按照 NEB 标准 LAMP 扩增体系(10×Thermo Pol Reaction Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 3.5 μL, 引物 Mix 1 μL, Bst DNA 聚合酶大片段 8 U, 样本 1 μL, 水补齐至 25 μL)进行引物阴性筛选、阳性筛选和常见食物病原微生物特异性筛选,最后筛选出一组引物,

引物序列见表 2。

表 2 蜡样芽孢杆菌引物表  
Table 2 Primers of *Bacillus cereus*

引物	序列 (5'→3')
F3	AGCAGCTATTTTAGTTATTGCA
B3	TGCTTTCATACTTAATTCTCCG
FIP	GAGCTGAAAGTCCACCAACAACCGGTAGTTATT GTTGTAAGTGG
BIP	AGCTGGTATCGGTCTAGGAACGAAATTCGTTAT AGGAGTCCAT
LF	AGCCGGTGTGCTGTACCCG
LB	TGCGGCTGGTGTTACAGCATC

#### 2.4.2 细菌核酸提取

蜡样芽孢杆菌标准菌株接种到肉汤培养基中, 37 °C 培养 24 h, 收集菌株, 通过 QiAmp DNA Mini Kit 提取菌株基因组 DNA, 用核酸检测仪进行基因组 DNA 浓度定量。

#### 2.4.3 实时环介导恒温扩增体系建立与优化

25 μL 环介导等温扩增初始体系参考 NEB 公司建议体系, 将上步提取的标准蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 首先稀释到 1 ng/μL 进行初始体系优化, 初始反应体系里加入 0.1 mol/L 镁离子 0、1、2、3 μL 优化反应曲线, 确定完最佳反应曲线。

#### 2.4.4 环介导恒温扩增的灵敏度检测

将提取的基因组 DNA 倍比稀释到 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL、100 ag/μL、10 ag/μL, 用 2.4.3 优化的体系进行反应, 读取最终检测荧光曲线。

#### 2.4.5 实时荧光定量 PCR 验证

用筛选好的环介导扩增引物的 F3 和 B3 进行实时荧光定量反应, 使用 ThermoFisher 公司 SuperScript IV One-Step RT-PCR System 进行标准的 50 μL 反应, 检测核酸按照 2.4.4 的稀释量进行, 反应程序为 94 °C 5 min(94 °C 15 s, 54 °C 20 s, 72 °C 30 s, 45 个循环), 读取最终荧光曲线。

#### 2.4.6 实时环介导等温扩增的抗干扰能力评价

首先测量 1 号标准蜡样芽孢杆菌及干扰菌提取的基因组 DNA 浓度, 将其稀释到标准浓度。选取 3 种干扰菌相同水平的 3 个浓度梯度 300 pg/μL、3 ng/μL、30 ng/μL。将其混合干扰菌基因组 DNA 100 pg/μL、1 ng/μL、10 ng/μL 3 种浓度添加到等温扩增体系中, 同时添加标准蜡样芽孢杆菌 1×10<sup>-8</sup> 倍稀释度的基因组 DNA 加入到上述反应体系中, 同时以无菌水代替蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 做阴性对照, 观察干扰菌基因组 DNA 对纯基因组 DNA 检测灵敏度的影响程度, 每个反应设置 3 组平行重复。

选取肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为干扰菌株, 所有菌株过夜培养,

取一部分菌液稀释后进行涂平板计数, 计算菌落数。将干扰菌原液稀释成(6×10<sup>8</sup>)、(6×10<sup>6</sup>)、(6×10<sup>4</sup>) CFU/mL 3 种浓度进行等体积混匀, 和标准蜡样芽孢杆菌菌液进行混匀制备成干扰混合菌液, 阴性对照用水替代, 提取核酸, 进行等温扩增检测, 判断干扰菌液对蜡样芽孢杆菌的灵敏度影响。

#### 2.4.7 牛奶中种蜡样芽孢杆菌检测灵敏度

取培养好的菌悬液, 倍比稀释后加入到购买的标准无蜡芽孢杆菌的牛奶中, 稀释成 2.1×10<sup>7</sup>、2.1×10<sup>6</sup>、2.1×10<sup>5</sup>、2.1×10<sup>4</sup>、2.1×10<sup>3</sup>、2.1×10<sup>2</sup>、2.1 CFU/mL, 用无水乙醇、氨水和石油醚混合液萃取样品, 取沉淀用 2.4.2 步骤进行菌株基因组 DNA 提取<sup>[9]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 引物的筛选

如图 1A、B、C 所示, 从 5 组引物中最终筛选出第 3 组引物, 其阴性扩增不出峰, 阳性反应出峰时间在 30 min 之前, 将 8 种蜡样芽孢杆菌和常见 9 种微生物进行交叉扩增, 只有蜡样芽孢杆菌扩增呈阳性结果, 最终确定该组引物可用于后续的灵敏度检测和乳制品蜡样芽孢杆菌检测。

### 3.2 实时环介导恒温扩增体系

按照标准体系对额外的镁离子浓度进行优化, 分别在对应核酸的阴性扩增反应和阳性扩增反应中加入 0.1 mol/L 硫酸镁 0、1、2、3 μL, 比较其差别, 结果见图 2A 和图 2B, 可以看出额外加入 1 μL 0.1 mol/L 镁离子的量有利于环介导恒温扩增反应的进行, 当额外加入镁离子的量超过 1 μL 后, 阴性对照组出峰时间也会提前, 不利于反应的判断, 故 1 μL 的 0.1 mol/L 镁离子是最适加入量。

### 3.3 环介导恒温扩增检测蜡状芽孢杆菌的灵敏度

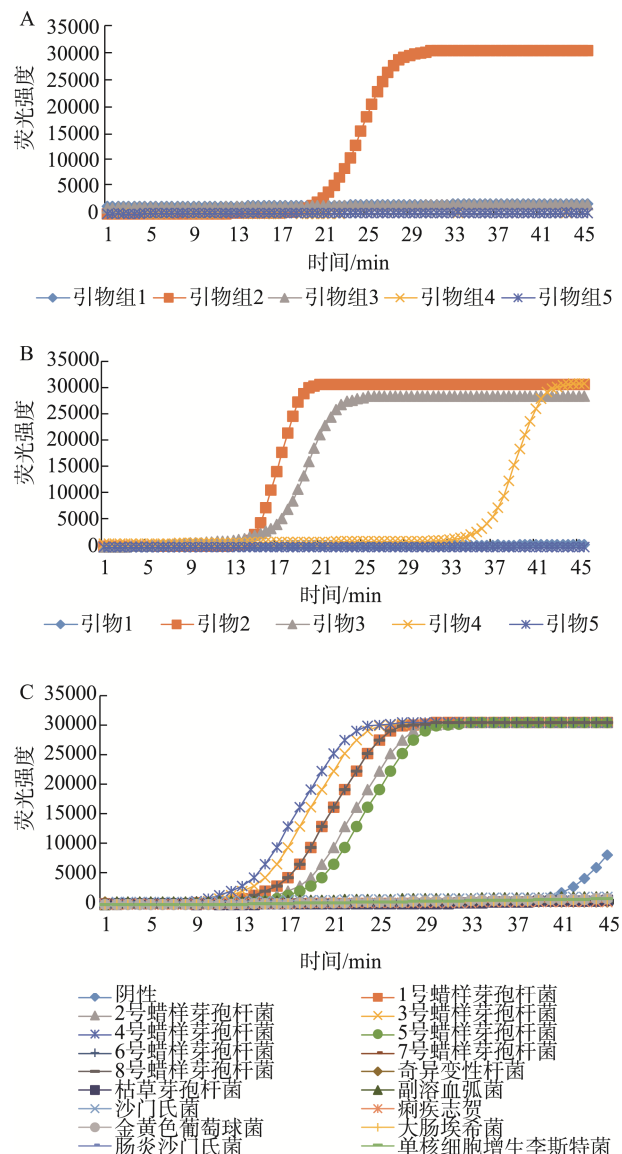
将蜡样芽孢杆菌的基因组 DNA 以优化扩增条件时的核酸浓度向下稀释 10<sup>8</sup> 倍, 结果见图 3, 从图中可以看出优化后的环介导恒温扩增体系(10×Thermo Pol Reaction Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 3.5 μL, 引物 Mix 1 μL, 0.1 mol/L MgSO<sub>4</sub> 1 μL, 5 mol/L 甜菜碱 4 μL, Bst DNA 聚合酶大片段 8 U, 样本 1 μL, 水补齐至 25 μL)可以检测的纯基因组 DNA 限度在 10 fg/μL。

### 3.4 实时荧光定量对环介导恒温扩增检测蜡状芽孢杆菌的验证

通过对蜡样芽孢杆菌核酸进行稀释, 得出环介导等温扩增方法在该检测体系的检测限大约是 10 fg/μL, 为了验证该扩增方法的准确性, 选择金标准扩增方法实时荧光定量法对上述 9 个浓度梯度的核酸进行检测, 结果如图 4, 实时荧光定量法检测限是 100 ag/μL, 相比于环介导等温扩增方法, 检出限提高 100 倍。

### 3.5 实时环介导等温扩增的抗干扰能力评价

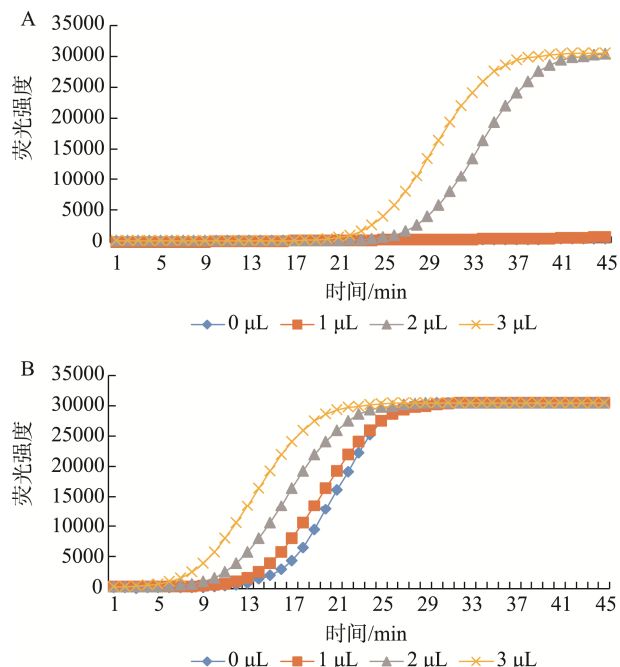
选取肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)3 种微生物作为抗干扰菌株, 分别在 100 pg/μL、1 ng/μL、10 ng/μL 3 个浓度下检测基因组核酸抗干扰实验和 10<sup>4</sup> CFU/μL、10<sup>6</sup> CFU/μL 和 10<sup>8</sup> CFU/μL 3 种菌液浓度进行菌液抗干扰实验, 结果见表 3 和表 4。在等温扩增检测限内每个浓度下, 干扰组和实验组 Ct 值没有显著性差异, 表明干扰组基因组 DNA 和培养菌液都对标准组等温扩增没有影响。



注: A 图, 蜡样芽孢杆菌 5 组引物的阴性筛选荧光曲线结果; B 图, 蜡样芽孢杆菌 5 组引物的阴性筛选荧光曲线结果; C 图, 结合 A 图和 B 图结果选择的第 3 组引物的特异性验证, 有 8 株蜡样芽孢杆菌和 9 株常见干扰菌。

图 1 蜡样芽孢杆菌的扩增引物筛选

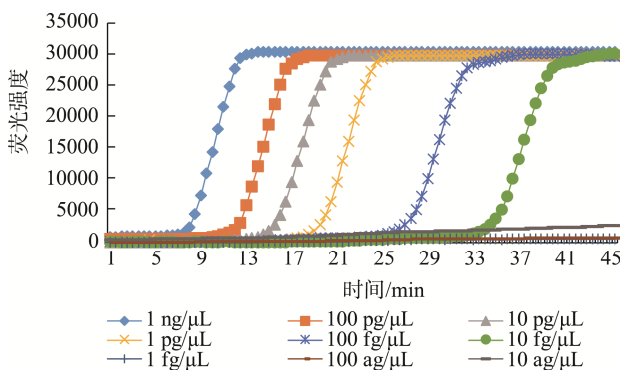
Fig.1 Screening of amplification primers for *Bacillus cereus*



注: A 图和 B 图是镁离子分别在阴性筛选反应和阳性筛选反应中优化的荧光曲线结果。0.1 mol/L 镁离子在整个反应体系中的量: 0~4 μL。

图 2 蜡样芽孢杆菌环介导恒温扩增体系优化

Fig.2 Optimization of loop-mediated isothermal amplification system of *Bacillus cereus*



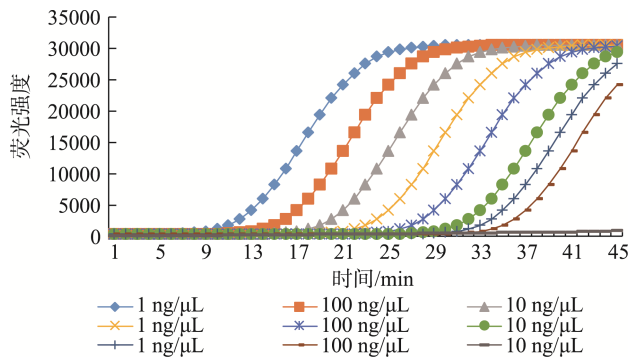
注: 将标准的蜡样芽孢杆菌的基因组 DNA 进行倍比稀释, 共稀释成 9 个浓度梯度进行 LAMP 灵敏度检测。

图 3 蜡样芽孢杆菌检测灵敏度

Fig.3 Sensitivity of LAMP assay for *Bacillus cereus*

### 3.6 牛奶中蜡样芽孢杆菌的灵敏度检测

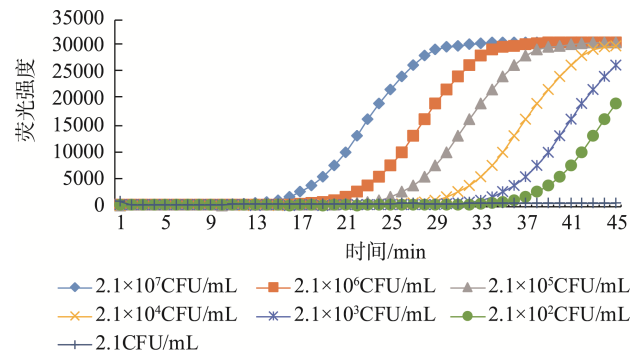
蜡样芽孢杆菌总共稀释成 2.1×10<sup>7</sup>、2.1×10<sup>6</sup>、2.1×10<sup>5</sup>、2.1×10<sup>4</sup>、2.1×10<sup>3</sup>、2.1×10<sup>2</sup>、2.1 CFU/mL 7 个浓度梯度, 这些浓度梯度菌落和牛奶混合, 萃取, 提取完基因组核酸后, 进行恒温扩增检测, 结果如图 5, 可以看出该方法可以检测到 2.1×10<sup>2</sup> CFU/mL。



注: 将标准的蜡样芽孢杆菌的基因组 DNA 进行倍比稀释, 共稀释成 9 个浓度梯度进行 RT-PCR 灵敏度检测。

图 4 实时荧光定量灵敏度

Fig.4 Real time fluorescence quantitative sensitivity



注: 将标准的蜡样芽孢杆菌的培养菌落进行倍比稀释, 混匀到牛奶中制成 7 种浓度梯度的样品进行 LAMP 灵敏度检测。

图 5 牛奶中蜡样芽孢杆菌灵敏度检测

Fig.5 Sensitivity detection of *Bacillus cereus* in milk

表 3 干扰组基因组核酸对标准蜡样芽孢杆菌纯基因组 DNA 检测灵敏度的影响( $n=3$ )

Table 3 Effect of interfering genomic nucleic acids on sensitivity of detection of pure genomic DNA ( $n=3$ )

核酸浓度	无干扰背景 Ct 值	100 pg 干扰背景 Ct 值	1 ng 干扰背景 Ct 值	10 ng 干扰背景 Ct 值
1 ng/ $\mu$ L	8.02 $\pm$ 0.08	8.12 $\pm$ 0.06	7.98 $\pm$ 0.11	8.11 $\pm$ 0.03
100 pg/ $\mu$ L	12.35 $\pm$ 0.43	13.08 $\pm$ 0.19	12.36 $\pm$ 0.22	13.08 $\pm$ 0.20
10 pg/ $\mu$ L	13.87 $\pm$ 0.37	14.36 $\pm$ 0.10	13.93 $\pm$ 0.06	14.29 $\pm$ 0.05
1 pg/ $\mu$ L	18.00 $\pm$ 0.24	18.23 $\pm$ 0.06	17.64 $\pm$ 0.08	18.19 $\pm$ 0.06
100 fg/ $\mu$ L	28.50 $\pm$ 0.41	27.90 $\pm$ 0.33	28.73 $\pm$ 0.21	28.32 $\pm$ 0.26
10 fg/ $\mu$ L	38.62 $\pm$ 0.46	39.23 $\pm$ 0.10	38.51 $\pm$ 0.21	38.37 $\pm$ 0.32
阴性对照	-	-	-	-

注: 通过 GraphPad Prism 7 one-way ANOVA 分析, 在同一浓度下干扰组 Ct 值和无干扰组 Ct 值均无显著性差异。

表 4 干扰组培养物对蜡样芽孢杆菌纯培养物检测灵敏度的影响( $n=3$ )

Table 4 Effect of interference group culture on detection sensitivity of pure culture of *Bacillus cereus*( $n=3$ )

蜡样芽孢杆菌菌落数	无干扰背景 Ct 值	10 <sup>4</sup> CFU 干扰背景 Ct 值	10 <sup>6</sup> 干扰背景 Ct 值	10 <sup>8</sup> 干扰背景 Ct 值
10 <sup>7</sup>	15.76 $\pm$ 0.30	15.26 $\pm$ 0.11	15.92 $\pm$ 0.14	15.57 $\pm$ 0.19
10 <sup>6</sup>	20.92 $\pm$ 0.43	20.69 $\pm$ 0.24	21.27 $\pm$ 0.16	20.71 $\pm$ 0.25
10 <sup>5</sup>	24.69 $\pm$ 0.42	24.37 $\pm$ 0.17	25.03 $\pm$ 0.08	24.44 $\pm$ 0.24
10 <sup>4</sup>	28.71 $\pm$ 0.44	28.49 $\pm$ 0.24	28.75 $\pm$ 0.32	29.52 $\pm$ 0.17
10 <sup>3</sup>	33.70 $\pm$ 0.36	34.16 $\pm$ 0.05	33.52 $\pm$ 0.22	34.21 $\pm$ 0.10
10 <sup>2</sup>	37.94 $\pm$ 0.60	37.70 $\pm$ 0.17	38.32 $\pm$ 0.17	38.22 $\pm$ 0.24
阴性对照	-	-	-	-

注: 通过 GraphPad Prism 7 one-way ANOVA 分析, 在同一浓度下干扰组 Ct 值和无干扰组 Ct 值均无显著性差异。

## 4 结论

蜡样芽孢杆菌是食品中易出现的病原微生物, 容易在食物的制作、储存和运输中引入, 给人体造成不利的影[10]。现行检测牛乳中蜡样芽孢杆菌的检测方法主要分为核酸检测方法和非核酸检测法。核酸检测方法常用的是实时荧光定量检测方法以及适配体联用的 PCR 方法, 这种

方法效率高, 但是对仪器设备要求比较高, 还需要对特定的探针进行筛选, 试剂开发成本较高, 难以实时快速检测[11]。非核酸扩增方法, 包括基于菌液对奶制品纹理的改变的光谱检测应用范围狭窄, 无法进行商业化、高通量应用[12,13]。环介导等温扩增作为一种新型的即时检测方法, 以其快速、简便、操作要求低等特点在医疗、食品卫生领域广泛应用, 是一种具有广泛应用价值的诊断检测工具[14]。

环介导等温扩增引物筛选常易出现假阴性和交叉性, 阳性反应通过的引物会在这两方面出现问题导致重新返工<sup>[15]</sup>。本研究首先就引物的阴性、阳性和交叉性进行筛选, 成功筛选出一对引物, 这为后续体系建立提供一个标准。其次, 环介导恒温扩增体系中镁离子是一种很重要的调节物质, 它可以调节引物与模板的结合, 是聚合酶发挥作用的辅因子<sup>[16,17]</sup>。本反应体系在 NEB 环介导扩增体系基础上进行镁离子的调试, 得出最优化缓冲液, 优化后的反应体系, 可以提高检测的灵敏度。

本实验体系建立的环介导等温扩增体系在检测蜡样芽孢杆菌时的灵敏度达到 10 fg/μL, 而用荧光定量 PCR 进行验证, 可以检测到 100 ag/μL, 这说明环介导等温扩增方法检测的准确性。相比于荧光定量需要精确的温度控制和复杂的光学仪器, 环介导等温扩增实验所需设备要求低, 温度控制简单, 可以实现快速检测的目的。将蜡样芽孢杆菌稀释到牛奶中进行倍比稀释, 然后用环介导恒温扩增方法进行检测, 发现可以检出 2.1×10<sup>2</sup> CFU/mL。实时荧光定量 PCR 可以检出 8.2 CFU/mL<sup>[9]</sup>, 但是其操作步骤繁琐, 对仪器要求很高。而环介导等温扩增检出限虽有所损失, 但是其操作简单, 仪器要求不高, 可以实时检测, 具有很高的应用价值。

综上, 本研究建立了一个稳定的、优化的环介导恒温扩增体系, 经实时荧光定量 PCR 验证, 该体系可以很好的应用于食品中蜡样芽孢杆菌的检测, 具有广泛的检测用途。

## 参考文献

- [1] 张伟伟, 鲁绯, 张金兰, 等. 食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, (5): 1-4.  
Zhang WW, Lu F, Zhang JL, et al. Research progress of *Bacillus cereus* in food [J]. China Brew, 2010, (5): 1-4.
- [2] 何文艳, 裘娟萍, 赵春田. 蜡状芽孢杆菌菌株的致病机理及检测方法[J]. 科技通报, 2012, (1): 92-96.  
He WY, Qiu JP, Zhao CT. Pathogenesis mechanism and detection methods of *Bacillus cereus* [J]. Bull Sci Technol, 2012, (1): 92-96.
- [3] 周帼萍, 袁志明. 蜡状芽孢杆菌污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-361.  
Zhou GP, Yuan ZM. Review on *Bacillus cereus* contamination effects on food safety [J]. Food Sci, 2007, 28(3): 357-361.
- [4] Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28: 12.
- [5] 肖斌, 朱永红, 邹全明. 简便敏感的环介导等温扩增基因诊断新技术[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 761-763.  
Xiao B, Zhu YH, Zou QM. Simple and sensitive new technology for loop-mediated isothermal amplification gene diagnosis [J]. Chin J Lab Med, 2005, 28(7): 761-763.
- [6] Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. J Med Microbiol, 2008, 57 (4): 444-451.
- [7] 初亚男. 环介导等温扩增技术改进的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42 (4): 729-735.

- Chu YN. Research progress on improvement of loop-mediated isothermal amplification technology [J]. Microbiol China, 2015, 42(4): 729-735.
- [8] Srividya A, Maiti B, Chakraborty A, et al. Loop mediated isothermal amplification: A promising tool for screening genetic mutations [J]. Mol Diagnosis Therapy, 2019, 23(6): 723-733.
- [9] 贾雅菁, 付博宇, 王羽, 等. 实时荧光环介导等温扩增技术检测牛乳中的蜡样芽孢杆菌[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 184-189.  
Jia YJ, Fu BY, Wang Yu, et al. Detection of *Bacillus cereus* in milk by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Sci, 2016, 37(6): 184-189.
- [10] 伊莹, 郇娟, 董玲, 等. 食品中蜡样芽孢污染特点及检测方法研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 11-15.  
Yi J, Li J, Dong L, et al. Advances on contamination of *Bacillus cereus* and its detection technology in food [J]. China Brew, 2014, 33(12): 11-15.
- [11] 李聪. 食源性蜡样芽孢杆菌和志贺氏菌适体的筛选及检测方法的建立[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.  
Li C. Aptamer screening and establishment of an aptamer-based method for detection of the food-borne *Bacillus cereus* and *Shigella* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.
- [12] 赵紫竹, 卫勇, 常若葵, 等. 牛奶中蜡样芽孢杆菌高光谱检测模型构建与分析[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 249-254, 43.  
Zhao ZZ, Wei Y, Chang RK, et al. Building and analysis of hyperspectral detection models of *Bacillus cereus* in milk [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(12): 249-254, 43.
- [13] 刘佳丽, 吴海云, 卫勇, 等. 基于高光谱技术结合纹理特征分析牛奶致病病菌[J]. 农技服务, 2017, 34(5): 1-3.  
Liu JL, Wu HY, Wei Y, et al. Analysis of milk pathogens based on hyperspectral technology combined with texture features [J]. Agric Tech Serv, 2017, 34(5): 1-3.
- [14] 朱凯, 王德国. 环介导等温扩增技术在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 9-14.  
Zhu K, Wang DG. Application of loop-mediated isothermal amplification technology in food safety inspection [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(18): 9-14.
- [15] Saini S, Gupta VK, Gururaj K, et al. Comparative diagnostic evaluation of OMP31 gene based TaqMan real-time PCR assay with visual LAMP assay and indirect ELISA for *Caprine brucellosis* [J]. Trop Anim Health Prod, 2017, 49: 1253-1264.
- [16] Steitz TA. A mechanism for all polymerases [J]. Nature, 1998, 391(6664): 231-232.
- [17] Gualberto J. PCR protocols: Methods in molecular biology, seconded [M]. Humana Press, 2003.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



张 童, 博士研究生, 主要研究方向为环境中致病微生物的快速检测。  
E-mail: shmzhyzt@163.com



蒋 原, 博士, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: Jiango@yeah.net