

# 环介导等温扩增技术快速检测双歧杆菌属细菌

范一灵, 杨美成\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 建立一种利用环介导等温扩增(LAMP)技术快速检测双歧杆菌属细菌的方法。**方法** 针对双歧杆菌属细菌 16S rDNA 基因特异性区段设计 LAMP 引物, 根据反应体系的颜色或浊度变化特异性地检测样品中双歧杆菌属细菌。**结果** 对 5 株双歧杆菌属细菌和 19 株非双歧杆菌属细菌进行特异性和非特异检测, 结果均为 100%。该检测可在 60 min 内完成, 双歧杆菌属细菌 DNA 的检测限为  $16.1 \pm 8.2$  pg/ $\mu$ L, 对双歧杆菌属细菌菌体的检测限为 0.1 CFU/mL。**结论** LAMP 方法可作为传统国家标准检测方法的辅助手段, 有效检测食品、保健食品和药品中双歧杆菌属细菌 DNA 的存在。

**关键词:** 双歧杆菌; 环介导等温扩增; 特异性; 16S rDNA 基因

## Rapid detection of *Bifidobacterium* spp. by loop-mediated isothermal amplification

FAN Yi-Ling, YANG Mei-Cheng\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a specific and rapid method for detection of *Bifidobacterium* spp. by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** Specific DNA fraction of 16S rDNA gene of *Bifidobacterium* spp. was targeted for primer design of LAMP. *Bifidobacterium* spp. was confirmed by the changes of color or turbidity of reactions specifically. **Results** Five strains of *Bifidobacterium* spp. and 19 strains of non-*Bifidobacterium* spp. were tested respectively in 60 min. The specificity and exclusivity of the method were 100%. The detection limit of DNA from *Bifidobacterium* spp. was  $16.1 \pm 8.2$  pg/ $\mu$ L, and the detection limit of thallus from *Bifidobacterium* spp. was 0.1 CFU/mL. **Conclusion** As a complementary method of national standard, the LAMP can be used to test *Bifidobacterium* spp. in foods, health foods and pharmaceutical products.

**KEY WORDS:** *Bifidobacterium*; loop-mediated isothermal amplification; specificity; 16S rDNA gene

## 1 引言

双歧杆菌属细菌(*Bifidobacterium* spp.)是一类革

兰氏阳性杆菌, 严格厌氧, 因其可以产生双歧因子, 具有维护肠道正常菌群和调节肠道等功能, 是一类重要的肠道益生菌, 故被广泛应用于食品和医药领域

基金项目: 上海市食品药品监督管理局课题项目(2014JY3-3)、国家药典委员会《中国药典》2015年版附录科研任务(1200)

**Fund:** Supported by the Shanghai Municipal Food and Drug Administration (2014JY3-3) and the Project of Chinese Pharmacopoeia Version 2015 by Chinese Pharmacopoeia Commission (1200)

\*通讯作者: 杨美成, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

\*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Ph.D., Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

[1,2]。由于检测双歧杆菌对培养条件要求苛刻, 按国家标准方法检验周期长, 普通实验室难以保障全程厌氧环境, 检验结果存在较大的不确定性, 这使得不合格双歧杆菌产品流向消费者的可能性增大。现有国家标准方法无法满足现场检查和应对突发事件快速调查的需要, 因此, 有必要采用更准确、快速的手段对市场益生菌产品中所含的双歧杆菌属细菌进行快速筛查。

微生物遗传信息的相对稳定, 使针对微生物 DNA 特异性序列的快速检测技术得到广泛应用<sup>[3-5]</sup>。许多研究是关于食品、环境或人体肠道内分离和检测双歧杆菌属细菌, 除常规培养方法外, 多采用 PCR、电泳或分子杂交等分子生物学方法<sup>[5-10]</sup>, 但此类方法需要特定的设备支持, 适用于实验室开展相关研究, 对操作人员的技术要求也高, 不适用于基层实验室或现场检查。

环介导等温扩增方法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为一种特异性强、灵敏度高的分子检测方法, 无需对样品进行前增菌, 不受厌氧培养条件和专用特殊仪器设备的限制<sup>[11]</sup>, 在普通实验室中也可快速应用, 能快速准确地筛查产品中是否含有双歧杆菌属细菌。

本研究针对双歧杆菌属细菌 16S rDNA 基因片段<sup>[4,12]</sup>上的特异性序列, 开发适用于检测食品、保健食品和药品中双歧杆菌的 LAMP 快速筛查法。该方法可以极大缩减双歧杆菌属细菌的定性检测时间, 适用于现场快速筛查, 为监管部门对市场上双歧杆菌产品的监督检查和突发事件处理提供保障。

## 2 材料与方 法

### 2.1 实验菌种

实验所用各类菌株均由上海市食品药品检验所抗生素室/微生物室提供。

双歧杆菌属菌株 5 株, 分别为青春双歧杆菌(*B. adolescentis* CICC6070)、婴儿双歧杆菌(*B. infantis* CICC6069)、长双歧杆菌(*B. longum* CICC6068)、短双歧杆菌(*B. breve* CICC6079)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum* CICC 6071)。

非双歧杆菌属菌株 19 株, 分别为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* subsp. *casei* GIM 1.159)、罗氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri* CICC 6226)、德氏乳杆菌保加利亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

CICC 6047)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* GIM 1.140)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus* CICC 6063)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* CICC 6074)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CMCC 63501)、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi* B CMCC50094)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* CMCC 44102)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis* ATCC 29212)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* CMCC 10104)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* CICC 10294)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC 26003)、嗜根库克菌(*Kocuriarhizophila* ATCC 9341)、枯草芽孢杆菌亚种(*B. spizienii* ATCC 6633)、白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 1023)、支气管败血性博德氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031)。

双歧杆菌和乳酸菌在 36 °C 接种于 Man Rogosa Sharpe (MRS) 琼脂平板(德国默克公司), 厌氧培养 3 d, 嗜热链球菌在 36 °C 接种于 Modified Chalmers (MC) 琼脂平板(上海盛思生化科技有限公司)上, 需氧培养 24 h, 其他菌种在 36 °C 接种于 Tryptone Soya Agar (TSA) 琼脂平板(德国默克公司)上, 需氧培养 24 h。挑取平板上的菌落, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA(天根生化科技有限公司), 置于 -20 °C 保存备用。

### 2.2 仪器与试剂

实时浊度检测仪 LA-500(日本荣研公司); E-GEL iBase 电泳系统(美国 Life Technology); Quantity one 凝胶成像系统(美国 BioRad); Hellma Tray Cell 核酸蛋白测定仪(美国艾本德公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司); DNA ladder maker DL2000(TAKARA)。Man Rogosa Sharpe (MRS) 琼脂平板(德国默克公司); Modified Chalmers (MC) 琼脂平板(上海盛思生化科技有限公司); Tryptone Soya Agar (TSA) 琼脂平板(德国默克公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 引物设计及反应体系

本实验所用 LAMP 引物采用引物设计软件 Primer Explorer V4 设计, 所有引物序列由 Invitrogen 公司合成, 见表 1。

表1 双歧杆菌属细菌 LAMP 引物设计列表  
Table 1 List of LAMP primers designed for detection of *Bifidobacterium* spp.

引物名称	标记	长度(bp)	退火温度(°C)	GC含量(%)	序列(5'-3')
ID3	F3	20	59.14	0.50	CGGCTACCTTGTTACGACTT
	B3	19	59.65	0.58	CAGTTCGGATCGCAGTCTG
	FIP	38	/	/	AAGTGGGCAGCACCCGAAG-AGTCCCAATCACGAGCCTC
	BIP	38	/	/	AACGCATTCACCGCGACGT-CAACTCGACTGCGTGAAGG
	LF	19	60.97	0.63	GGGATGGAGCCGTCTAAGG
	LB	21	60.02	0.48	TGCTGATTCGCGATTACTAGC
ID7	F3	19	60.31	0.58	CCAGCATCCACCGTTTACG
	B3	17	59.24	0.65	TGCGGTAGGGGAGACTG
	FIP	38	/	/	TGACGCTGAGGAGCGAAAGC-GCGTGGACTACCAGGGTA
	BIP	40	/	/	AGAGACCTGCCTTCGCCATTG-CCGGTGTAAACGGTGAATG
ID31	F3	19	60.26	0.58	GCGTGGACTACCAGGGTAT
	B3	18	60.73	0.61	GGGCGTAAAGGGCTCGTA
	FIP	39	/	/	AGAACACCAATGGCGAAGGCA-CACGCTTTCGCTCCTCAG
	BIP	39	/	/	CCAGTCTCCCCTACCGCACT-CCGGTGTGAAAGTCCATCG
	LF	18	60.60	0.61	TCTGGGCCGTTACTGACG
ID93	LB	17	61.27	0.65	GCGCGGATCCACCGTTA
	F3	19	60.29	0.53	TGAGTTTTAGCCTTGCGGC
	B3	20	60.61	0.55	CGGTGTAACGGTGAATGTG
	FIP	42	/	/	CCGTAAACGGTGGATGCTGGAT-GGATGCTTAACGCGTTAGCT
	BIP	39	/	/	CTGTTTCGCTCCCCACGCTTT-GGGAAGAACACCAATGGCG

采用日本荣研公司朗报(Loopamp)脱氧核糖核酸扩增试剂盒进行 LAMP 试验。实验体系为 2×反应缓冲液 12.5 μL, *Bst* DNA 聚合酶 1 μL, FIP 引物和 BIP 引物各 1 μL(终浓度各 40 pmol), F3 引物和 B3 引物各 1 μL(终浓度各 5 pmol), LoopF 环引物和 LoopB 环引物各 1 μL(终浓度各 20 pmol), DNA 模板 2 μL, 朗报目视检测试剂 1 μL, 加纯化水至 25 μL。在 63 °C 保温 90 min。采用实时浊度检测仪 LA-500 检测 LAMP 反应过程中产生的焦磷酸镁沉淀的浊度值, 或通过反应管颜色变化(由橙黄色变为蓝绿色)判断反应结果。

对扩增产物进行琼脂糖电泳分析, 采用 2%浓度的 E-GEL 预制琼脂糖凝胶, 在 E-GEL iBase 电泳系统中电泳 20 min, 通过 Quantity one 凝胶成像系统确认

电泳条带。其中, DNA ladder maker 采用 DL2000, 由 100、250、500、750、1000 和 2000 bp 的 DNA 条带组成。

### 2.3.2 LAMP 引物的筛选

采用 5 株双歧杆菌属菌株和 19 株非双歧杆菌属菌株的基因组 DNA, 对根据双歧杆菌属细菌 16S rDNA 基因设计的 4 组 LAMP 引物进行特异性评价。对实时浊度检测仪检测具有阳性信号的 DNA 扩增产物进行琼脂糖电泳分析, 确认特征性阶梯状扩增条带, 从中优选出一组 LAMP 引物用于后续检测方法的研究。

### 2.3.3 基因组 DNA 检测灵敏度

提取长双歧杆菌(CICC 6068)的基因组 DNA, 采用 Hellma Tray Cell 核酸蛋白测定仪测定基因组

DNA 浓度, 并对该 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 采用优选的 LAMP 引物对上述长双歧杆菌基因组 DNA 样本进行检测, 分析该 LAMP 方法的基因组 DNA 检测灵敏度。

#### 2.3.4 菌落检测灵敏度

另取长双歧杆菌(CICC6068)菌种接种于 MRS 液体培养基中, 厌氧培养 48 h, 用无菌生理盐水溶液制成 10 倍系列梯度稀释液。参考 GB 4789.35-2010 的检验方法<sup>[13]</sup>, 分别取各梯度稀释液 0.1 mL 涂布于 MRS 琼脂培养基上, 厌氧培养 72 h, 取适宜稀释度上的平板计数双歧杆菌的菌落数。同时, 取各稀释液 1 mL, 12000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀物, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。采用优选的 LAMP 引物对上述样本进行测定, 分析该方法的菌落检测灵敏度。

#### 2.3.5 市售样品检测

为测试 LAMP 方法在益生菌类产品实际检测中的效果, 在市场上选取含有和不含有双歧杆菌属细菌的两类产品进行 LAMP 检测。

待检样品混合均匀后取 1 g 或 1 mL, 用 9 mL 灭菌纯化水分散均匀。取上述混悬液经 10000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液取沉淀物, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。以灭菌纯化水为阴性对照, 采用优选的 LAMP 引物对上述样本进行测定, 考察方法的准确性。

### 3 结果与分析

#### 3.1 LAMP 检测引物的筛选

对 5 株双歧杆菌属的菌种和 19 株非双歧杆菌属的菌种进行检测, 结果见表 2。其中引物 ID 7

和引物 ID 93 未检测到阳性反应结果, 引物 ID 3 在 90 min 内未能检测出两歧双歧杆菌的基因组 DNA。而引物 ID 31 在全部 5 株双歧杆菌菌种中均显示阳性(表 2)。即在 45 min 内, 采用实时浊度仪检测的 LAMP 反应的浊度值大于 0.05, 则反应管可判定为阳性(图 1, A~E)。将阳性反应管的 LAMP 扩增产物进行凝胶电泳分离, 条带应为典型的阶梯状分布(图 2)。用肉眼观察阳性反应体系的颜色应由橙黄色变为蓝绿色。引物 ID 31 对其他非双歧杆菌菌种在 90 min 时间内显示为阴性, 反应体系不变色。因此, 选取引物 ID 31 用于后续的 LAMP 方法研究。

表 2 双歧杆菌 LAMP 引物特异性试验结果  
Table 2 Results of specificity tests of *Bifidobacterium* spp. with LAMP primers

菌株名称	引物 ID			
	3	7	31	93
青春双歧杆菌	+	-	+	-
婴儿双歧杆菌	+	-	+	-
长双歧杆菌	+	-	+	-
短双歧杆菌	+	-	+	-
两歧双歧杆菌	-	-	+	-
18 株非目标菌	-	-	-	-

备注: +表示引物 ID 在菌种中显示阳性; -表示引物 ID 在菌种中显示阴性。

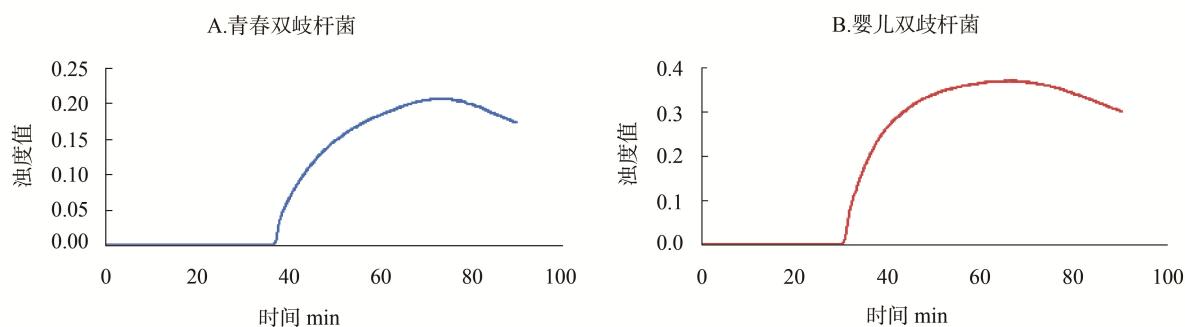
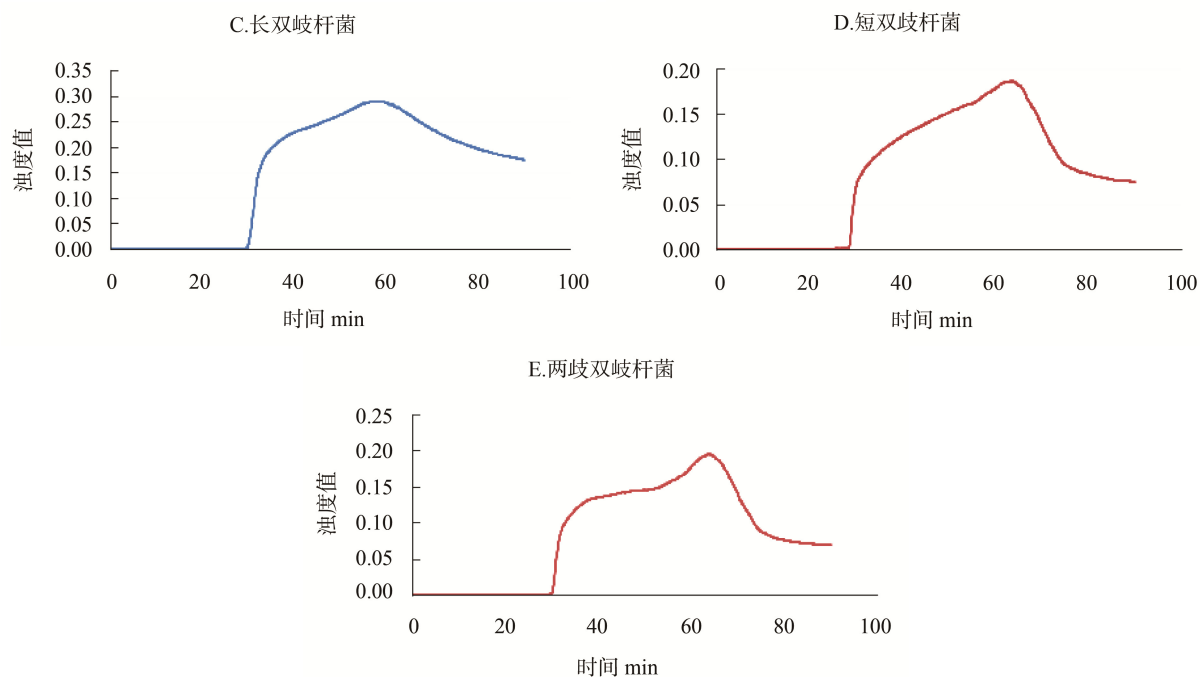


图 1 采用引物 ID 31 进行 LAMP 反应的实时浊度值  
Fig. 1 Real-time turbidity of LAMP tests using primer ID 31



续图1 采用引物 ID 31 进行 LAMP 反应的实时浊度值  
Fig. 1 Real-time turbidity of LAMP tests using primer ID 31

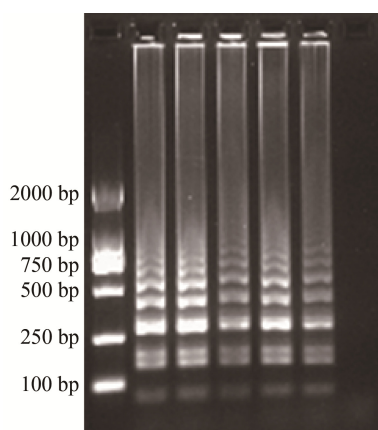


图2 采用引物 31 进行 LAMP 反应凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of LAMP reactant using primer ID 31

M: DNA ladder maker; 1.长双歧杆菌; 2.青春双歧杆菌; 3.婴儿双歧杆菌; 4.两歧双歧杆菌; 5.短双歧杆菌; 6.纯化水

M: DNA ladder marker; 1. *B. longum*; 2. *B. adolescentis*; 3. *B. infantis*; 4. *B. bifidum*; 5. *B. breveand*; 6. purified water

### 3.2 LAMP 检测基因组 DNA 灵敏度

采用 LAMP 引物 ID 31 对制备的长双歧杆菌基因组 DNA 梯度稀释液进行检测。在 DNA 浓度为  $10^7 \sim 10^2$  fg/ $\mu$ L 的浓度范围内,  $\log_{10}$ DNA 与 Ct 值具有

近似的指数关系,  $r^2=0.9786$ (图 3A)。在原液至  $10^7 \sim 10^4$  fg/ $\mu$ L 的浓度范围内,  $\log_{10}$ DNA 与 Ct 值具有近似的线性关系,  $r^2=0.9682$ (图 3B)。

在线性范围内(Ct  $\leq 45$ ), 可以通过直接测定 LAMP 反应的浊度值( $\geq 0.05$ ), 或以肉眼观察反应管中存在可见的白色沉淀, 或以肉眼观察反应体系由黄色变为绿色, 判断 LAMP 反应结果为阳性。以灭菌纯化水做阴性对照试验, 阴性对照试验结果应为阴性; 若 Ct  $> 55$ , 判定 LAMP 测试结果为阴性; 若  $45 < \text{Ct} \leq 55$ , 判定 LAMP 测试结果为可疑, 需要重新实验; 对可疑结果重新实验后, 若 Ct  $\leq 55$ , 判定 LAMP 测试结果为阳性, 否则判断为阴性。

本研究的 LAMP 方法反应时间为 60 min, 可以检测到样本中长双歧杆菌属细菌基因组 DNA 最低浓度为  $1.61 \pm 0.82$  pg/ $\mu$ L。在线性范围内(45 min 内), 可检测到长双歧杆菌基因组 DNA 最低浓度  $16.1 \pm 8.2$  pg/ $\mu$ L(表 3)。

### 3.3 菌落灵敏度检测

对 10 倍梯度系列稀释的长双歧杆菌菌液所提基因组 DNA 的 LAMP 测试结果可知, 当菌落浓度为

0.1±0.018 CFU/mL 时, LAMP 反应的 Ct 值为 41.6±0.43 min(表 4)。由此可以推测, 在 60 min 的反应时间内, 该方法可以较为灵敏地检测到低于 0.1

CFU/mL 的双歧杆菌属细菌。对长双歧杆菌纯培养物 log<sub>10</sub>(CFU/mL)和 Ct 值进行数学分析获得近似线性的拟合结果, r<sup>2</sup>=0.9551(图 4)。

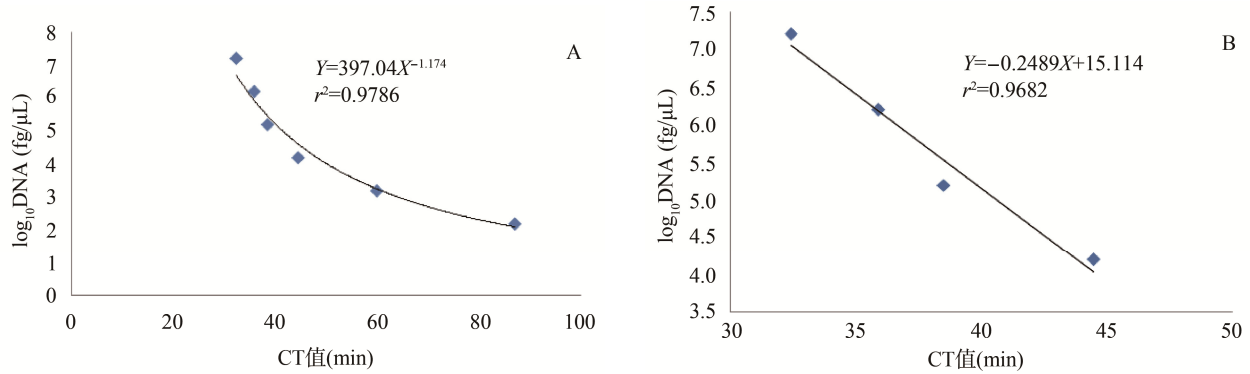


图 3 采用引物 ID 31 进行 LAMP 反应 log<sub>10</sub>DNA 与 Ct 值关系图

Fig. 3 The relational graph of log<sub>10</sub>DNA and Ct valve using primers ID 31 for LAMP tests

A: 所有稀释级 LAMP 检测结果; B: 线性范围内稀释级的 LAMP 检测结果

A:Results of all dilution levels by LAMP; B:Results of dilution levels by LAMP in linear range

表 3 长双歧杆菌 LAMP 检测 DNA 灵敏度试验结果

Table 3 Sensitivity test results of DNA from *Bifidobacterium longum* by LAMP

长双歧杆菌基因组 DNA	稀释级							
	原液	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
DNA 浓度 (fg/μL)	(1.61±0.28) ×10 <sup>7</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>6</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>5</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>4</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>3</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>2</sup>	(1.61±0.82) ×10 <sup>1</sup>	1.61±0.82
log <sub>10</sub> DNA (fg/μL)	7.2±0.12	6.2±0.12	5.2±0.12	4.2±0.12	3.2±0.12	2.2±0.12	1.2±0.12	0.2±0.12
Ct(min)	32.4±0.52	35.9±0.27	38.5±0.33	44.5±0.71	59.9±0.36	86.9±2.12	>90	>90

表 4 长双歧杆菌 LAMP 检测菌落灵敏度试验结果

Table 4 Results of sensitivity test of colonies from *Bifidobacterium longum* by LAMP

长双歧杆菌菌落数	稀释级							
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
菌落计数(CFU/mL)	(1.0±0.18) ×10 <sup>6</sup>	(1.0±0.18) ×10 <sup>5</sup>	(1.0±0.18) ×10 <sup>4</sup>	(1.0±0.18) ×10 <sup>3</sup>	(1.0±0.18) ×10 <sup>2</sup>	(1.0±0.18) ×10 <sup>1</sup>	1.0±0.18	(1.0±0.18) ×10 <sup>-1</sup>
Log <sub>10</sub> (CFU/mL)	5.99±0.11	4.99±0.11	3.99±0.11	2.99±0.11	1.99±0.11	0.99±0.11	-0.01±0.11	-1.01±0.11
Ct(min)	26.3±0.64	28.6±0.28	29.6±0.57	31.9±0.52	32±0.71	35.3±1.20	39.9±0.42	41.6±0.43
菌落计数(CFU/mL)	(1.2±0.11) ×10 <sup>7</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>6</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>5</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>4</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>3</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>2</sup>	(1.2±0.11) ×10 <sup>1</sup>	1.2±0.11
log(CFU/mL)	7.07±0.06	6.07±0.06	5.07±0.06	4.07±0.06	3.07±0.06	2.07±0.06*	1.07±0.06*	0.07±0.06*
Ct(min)	22.5±0.36	24.3±0.28	26.8±0.19	29.5±0.27	29.2±0.71	29.3±0.92	32.7±0.92	34.3±1.20

\*: 不计算在线性拟合数据中

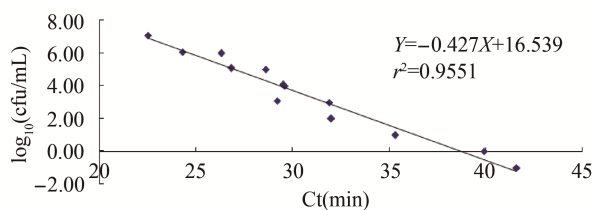


图 4 采用引物 ID 31 进行 LAMP 反应  $\log_{10}(\text{CFU}/\text{mL})$  与反应时间 Ct 的关系图

Fig. 4 The relational graph of  $\log_{10}(\text{CFU}/\text{mL})$  and Ct value using primers ID 31 for LAMP tests

### 3.4 市售样品 LAMP 检测

在市场上选取 8 种产品进行检测, 包含 5 种保健食品、2 种乳制品和 1 种药品。其中 5 种样品含有双歧杆菌属细菌, 另外 3 种样品不含双歧杆菌属细菌。检测结果显示, 5 份含有双歧杆菌属细菌样品的 LAMP 检测实时浊度均有典型的扩增曲线, 且  $Ct < 40$ , 反应体系由橙黄色变为蓝绿色, 判定为阳性。在 3 份不含双歧杆菌属细菌的样品中  $Ct > 60$ , 且在规定时间内反应体系无颜色变化, 判定为阴性样品。LAMP 检测与国家标准的检测检测结果见表 5, 在采用国家标准方法检测中未对双歧杆菌属细菌进行菌

种分类鉴定。各类样品经国家标准方法和 LAMP 测试的结果与商品标签上标示结果一致。

## 4 结论

细菌的 16S rDNA 基因序列具有高度的保守性和相对稳定的变异性<sup>[14]</sup>, 本研究通过对 16S rDNA 基因序列中 V4 至 V6 可变区设计双歧杆菌属细菌的特异性通用 LAMP 引物, 采用等温扩增技术针对双歧杆菌 16SrDNA 基因特异性序列, 采用实时浊度检测仪特有的颜色变化, 快速检测出样品中双歧杆菌属细菌。

现有国家标准要求计数培养 48 h, 分离纯培养物 48 h, 鉴定至少 48 h, 共计 144 h。与其相比, 本研究可以在 1 h 内对产品中是否含有双歧杆菌属细菌进行定性和初步定量, 极大地缩短了检验时间。而且 LAMP 技术是针对 DNA 的检测技术, 无需在严格厌氧的条件下进行操作, 对仪器设备的要求较低。该方法的检测灵敏度远高于一般 PCR 方法<sup>[3-5]</sup>, 且操作简单, 无需对反应产物进行电泳, 可有效地防止高浓度产物对环境及设备的影响。该方法适于基层执法或检测单位应用, 为监管部门对上市产品的监督检查和突发事件处理提供快速便捷的检验技术。

表 5 市售样品中双歧杆菌属细菌的 LAMP 检测结果

Table 5 Test results of *Bifidobacterium* spp. from purchased products using LAMP

编号	样品名称	应含有菌种	国标方法是否检出双歧杆菌属细菌	LAMP 检测	
				Ct(min)	结果判定
1	合生元益生菌冲剂 (儿童型)	瑞士乳杆菌 双歧杆菌	检出	34.9	阳性
2	昂立 1 号益生菌颗粒	嗜酸乳杆菌 长双歧杆菌	检出	34.6	阳性
3	双金爱生舒肠护肝胶囊	嗜酸乳杆菌 两歧双歧杆菌	检出	34.7	阳性
4	杜邦怡能 300	嗜酸乳杆菌 乳双歧杆菌 长双歧杆菌	检出	34.3	阳性
5	培菲康	嗜酸乳杆菌 粪肠球菌	检出	29.3	阳性
6	昂立 1 号优菌多颗粒	嗜酸乳杆菌	未检出	> 60	阴性
7	味全活性乳酸菌饮品(原味)	干酪乳杆菌	未检出	> 60	阴性
8	双金牌三康乐胶囊	嗜酸乳杆菌	未检出	> 60	阴性



本研究的主要对象为乳制品但同样可以适用于环境样品、肠道或粪便样品。本研究对双歧杆菌基因组 DNA 浓度和 Ct 值的数学关系进行了初步的研究, 在一定的 DNA 范围内, DNA 浓度和 Ct 值有线性<sup>[15]</sup>, 但对菌落数和 Ct 值的对应关系还有较大误差。由于样品基质和操作环节的影响, 微生物基因组 DNA 提取效率存在较大的不确定性。在 LAMP 反应的分子原理层面, 沉淀物的产生和 DNA 模板的起始量有对应关系<sup>[11]</sup>, 但浊度检测仪是根据光学散射原理设计的仪器, 从分子层面的反应到可检测的浊度存在较大不确定性, 使得 DNA 浓度与 LAMP 检测的 Ct 值之间的不确定度大幅增加。目前 LAMP 技术在定性检测的灵敏度和准确性上优于国标检测方法, 但在定量检测的准确性方面, 对产品中双歧杆菌的准确定量仍需要结合现有国家标准中的平板计数方法进行培养后计数<sup>[16]</sup>。采用浊度或颜色变化进行结果判断的方法在定量检测上的应用受到限制, 但是可满足短时间内获得定性结果或无法配备大型设备的现场快速检测需求<sup>[11]</sup>。

## 参考文献

- [1] Turroni F, Van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 149(1): 37–44.
- [2] Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 141(1): 15–28.
- [3] Masco L, Huys G, Gevers D, *et al.* Identification of *Bifidobacterium* species using REP-PCR fingerprinting [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26(4): 557–563.
- [4] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, *et al.* Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal *Bifidobacteria* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 167–173.
- [5] Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of *Bifidobacteria* [J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2003, 4(2): 61–69.
- [6] Mianzhai Y, Shah NP. Contemporary nucleic acid-based molecular techniques for detection, identification, and characterization of *Bifidobacterium* [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 00–00.
- [7] Sheu SJ, Hwang WZ, Chiang YC, *et al.* Use of tuf gene-based primers for the PCR detection of probiotic *Bifidobacterium* species and enumeration of bifidobacteria in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(8): 521–527.
- [8] Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, *et al.* Molecular approaches for the detection and identification of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the human gastrointestinal tract [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26(4): 572–584.
- [9] 张力文, 王宗润, 吴秀丽, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测人粪便中双歧杆菌方法的建立及评价[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2014, (3): 686–691.  
Zhang LW, Wang ZR, Wu XL, *et al.* Establishment and evaluation of detection method of *Bifidobacteria* in human fecal using real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2014, (3): 686–691.
- [10] Hidalgo-Cantabrana C, Ordonez I, Ruas-Madiedo P, *et al.* Degenerate PCR primers for detecting putative priming glycosyltransferase genes in *Bifidobacterium* strains [J]. *Beneficial Microbes*, 2015, 6(4): 553–562.
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28 (12): 63.
- [12] Sakata S, Ryu CS, Kitahara M, *et al.* Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences [J]. *Microbiol Immunol*, 2006, 50 (1): 1–10.
- [13] GB 4789.35-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验: 乳酸菌检验[S].  
GB 4789.35-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: Lactic acid bacteria [S].
- [14] Brosius J, Dull T, Sleeter D, *et al.* Gene organisation and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* [J]. *J Mol Biol*, 1981, 148(2): 107–127.
- [15] Mori Y, Kitao M, Tomita N, *et al.* Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 59 (2): 145–157.
- [16] 张红发, 任婧, 刘景, 等. 酸奶中双歧杆菌 PCR 计数方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2012, 33 (14): 188–191.  
Zhang HF, Ren J, Liu J, *et al.* Study on a new method for counting *Bifidobacterium longum* in yogurt by PCR [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33 (14): 188–191.

(责任编辑: 杨翠娜)



## 作者简介



范一灵, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为微生物学检验。  
E-mail: tcfyl@163.com



杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。  
E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

---

## “现代分析仪器在食品检测中的应用”专题征稿函

“民以食为天, 食以安为先”。食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。因此, 对食品质量的控制与安全保障尤为重要, 而这在很大程度上依赖于先进的分析检测技术。现代仪器分析技术在生命科学、环境科学、材料科学等领域发挥着越来越重要的作用, 在食品科学和食品安全领域同样有着不可替代的重要作用。

鉴于此, 《食品安全质量检测学报》特别策划了“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题, 拟于 2016 年 6 月正刊发表。本专题将围绕**气相色谱、液相色谱、离子色谱、质谱、原子光谱、红外光谱、拉曼光谱、表面等离子共振**等现代分析仪器在食品检测与质量安全控制领域的应用, 阐述现代仪器的原理、特点、适用范围、优势与局限性, 展示这些仪器技术在食品安全检测中的应用实例。

鉴于您在现代仪器与食品安全检测方面丰富的研究经历和突出的学术造诣, 主编吴永宁特邀请您撰稿, 综述、研究论文、研究简报等稿件形式均可。我们相信, 您的文章将推动现代仪器在食品检测与质量安全控制领域的推广应用。请您通过网站投稿系统或 E-mail 投稿, 截稿日期为**2016 年 4 月 30 日**。对于您的来稿, 我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部