

## 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测志贺氏菌

李尚阳<sup>1</sup> 周前进<sup>1\*</sup> 张严峻<sup>2</sup> 潘军航<sup>2</sup> 陈炯<sup>1</sup>

(1. 宁波大学生物与海洋科学系 浙江 宁波 315211)

(2. 浙江省疾病预防控制中心 浙江 杭州 310051)

**摘要:**【目的】将环介导等温扩增技术(LAMP)与横向流动试纸条(LFD)联合应用,建立一种可应用于志贺氏菌快速检测的 LAMP-LFD 技术。【方法】以福氏志贺氏菌的侵袭性质粒抗原 H (*ipaH*) 基因为检测靶标设计 3 对特异性引物(其中上游内引物 Sfl-*ipaH*-FIP 由生物素标记),进行 LAMP 反应;同时设计 1 条异硫氰酸荧光素(FITC)标记的探针 Sfl-*ipaH*-HP,与获得的 LAMP 产物进行特异性杂交,杂交产物经 LFD 完成检测。【结果】优化后的 LAMP 反应条件为 63 °C 40 min,加上 LFD 结果判读共需 50 min。LAMP-LFD 方法能够特异性检测出福氏志贺氏菌,而对肠炎沙门氏菌等其它 4 种导致腹泻的致病菌和创伤弧菌等 5 种常见食物源性致病菌,以及 4 株不同大肠杆菌的检测结果呈阴性。该方法针对福氏志贺氏菌的检测灵敏度为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL 或 4 CFU/反应,针对人工污染鲤鱼肠组织的检测灵敏度是  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL,是以 LAMP 外引物 Sfl-*ipaH*-F3/Sfl-*ipaH*-B3 的常规 PCR 方法的 100 倍。【结论】建立的 LAMP-LFD 技术具有操作简单、检测快速准确、检测成本低等优点,有望在志贺氏菌的常规监测和即时检测中被普及使用。

**关键词:** 志贺氏菌, 侵袭性质粒抗原 H 基因, 环介导等温扩增技术, 横向流动试纸条, 检测

Visual detection of *Shigella* based on loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstickLI Shang-Yang<sup>1</sup> ZHOU Qian-Jin<sup>1\*</sup> ZHANG Yan-Jun<sup>2</sup> PAN Jun-Hang<sup>2</sup> CHEN Jiong<sup>1</sup>

(1. Department of Biology and Marine Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

(2. Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China)

**Abstract:** [Objective] To develop an LAMP-LFD method to detect rapidly *Shigella* spp., based on nucleotide enrichment by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and chromatographic visualization by a lateral flow dipstick assay. [Methods] Three pairs of primers were designed based on

**Foundation item:** China Spark Program (No. 2014GA701007); Science and Technology Project of Zhejiang Province (No. 2013C03045-1); Technology Innovation Team of Ningbo City (No. 2015C110018); Ningbo Science and Technology “Fumin Engineering” Project (No. 2016C10042); Key Disciplines in Ningbo (No. XKL14D2083)

\*Corresponding author: E-mail: mumu2325@163.com

**Received:** January 09, 2016; **Accepted:** March 31, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 18, 2016

**基金项目:** 国家星火计划(No. 2014GA701007); 浙江省重大科技专项重点社会发展项目(No. 2013C03045-1); 宁波市科技创新团队项目(No. 2015C110018); 宁波市科技富民项目(No. 2016C10042); 宁波大学学科项目(No. XKL14D2083)

\*通讯作者: E-mail: mumu2325@163.com

**收稿日期:** 2016-01-09; **接受日期:** 2016-03-31; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-18

conserved regions of the invasive plasmid antigen H (*ipaH*) gene of *Shigella flexneri* and used in LAMP reaction, among which the forward inner primer Sfl-ipaH-FIP was biotinylated. Similarly, a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled probe Sfl-ipaH-HP was designed to specifically hybridize with LAMP products. And the hybridized products were visually detected by LFD. **[Results]** The LAMP-LFD method to detect *Shigella* spp. was developed. The optimized condition for LAMP reaction was at 63 °C for 40 min; and plus visually detecting by LFD, it was approximately 50 min. The LAMP-LFD method discriminated *S. flexneri* from another 4 pathogenic bacteria causing diarrhea (*Salmonella enteric*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio cholera*) and 5 common food-borne pathogens (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *V. alginolyticus*), and 4 different *Escherichia coli* strains. The detection limit of LAMP-LFD was  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL for *Shigella* pure cultures (equivalent to 4 CFU per reaction), which was 100 times lower than that of the conventional PCR method using primers Sfl-ipaH-F3/Sfl-ipaH-B3. In the case of artificially contaminated *Common carp* intestinal tissue, the detection limit was  $5 \times 10^2$  CFU/mL (equivalent to 20 CFU per reaction). **[Conclusion]** This rapid and accurate LAMP-LFD method is a promising alternative in the routine surveillance and point-of-care test of *Shigella* spp.

**Keywords:** *Shigella*, Invasive plasmid antigen H gene, Loop-mediated isothermal amplification, Lateral flow dipstick assay, Detection

志贺氏菌是一种革兰氏阴性无芽孢杆菌, 属于胞内寄生菌。该细菌具高度传染性, 主要通过粪口途径在人与人之间传播, 也可因接触或摄入污染的食物或水感染。进入人体后, 主要侵染结肠, 引发炎症并形成溃疡, 引起粘液性腹泻, 即导致临床上的细菌性痢疾, 严重威胁公共健康。据报道, 全球的腹泻患者中, 有 5%–15% 是感染了志贺氏菌, 而其中 5 岁以下儿童约占 2/3<sup>[1]</sup>。对亚洲临床样本进行的一项微生物学调查发现, 1/3 的志贺氏菌阴性样品中能够检测到志贺氏菌的 DNA<sup>[2]</sup>。因此, 快速、准确地鉴定志贺氏菌, 不仅为有效防控志贺氏菌引发的疾病提供依据, 也是维护公共健康的必需条件。

传统的志贺氏菌检测以平板琼脂培养为主, 依据细菌形态学和生化特征完成鉴定。该方法检测准确、结果稳定、假阳性较低, 仍是目前应用于志贺氏菌检测的主要方法之一。在我国, 志贺氏菌检测主要遵循于食品安全国家标准 GB4789.5-2012。依据该标准, 细菌在 41.5 °C 条件下的厌氧培养获得, 继续利用 XLD 和 MAC 选择性培养基培养可疑菌落, 结合生化反应进行细菌鉴定。但是, 传统方法的整个检测过程耗时比较长(需 3–5 d), 步骤繁琐,

对检测人员的知识背景要求较高; 而且该方法具有较低的检测灵敏度, 时常有漏检现象, 已远不能适应市场即时快速的检测需求。免疫学相关技术因自身操作相对简单, 甚至无需耗时的增菌阶段, 已广泛应用于多种微生物的检测。比如, 我国现行的志贺氏菌国家标准即是利用特异性血清与志贺氏菌病原发生的凝集反应进行细菌分型。但由于免疫学方法具有较高的假阳性, 更加适合于志贺氏菌疑似样品的初筛; 若要准确鉴定细菌, 必需辅助于其它方法。依赖于核酸检测的分子生物学技术因其灵敏度高、方法特异等优点, 已成为各类病原实验室诊断的重要手段。其中, 依赖于 *Bst* DNA 聚合酶的环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 可在单一温度(61–65 °C)下实现核酸的快速扩增, 在检测耗时、仪器成本等方面表现出比 PCR 相关技术更加优越的性能。因此, 自报道以来, 该技术已在细菌、病毒, 以及寄生虫等诸多领域取得了应用<sup>[3–5]</sup>。目前, LAMP 产物的分析方法主要有 3 种: (1) 利用琼脂糖凝胶电泳, 需配备凝胶成像系统, 成本较高, 且需要接触 EB 等有毒试剂; (2) 利用浊度仪检测焦磷酸镁沉淀, 仪器成本高; (3) 使用荧光染料, 通过肉眼观察颜色

变化,容易造成结果的假阳性。LAMP-LFD 技术将 LAMP 产物在横向流动试纸条(Lateral flow dipstick, LFD)上以显色的方式呈现,通过肉眼即可轻松完成结果判断。该方法完全摆脱了对于仪器的依赖性,摒弃了 EB 等有毒试剂,加之特异性探针的引入,使得结果更加特异,而且整个检测时程也仅在 LAMP 反应的基础上增加了 8–10 min,体现出了良好的应用潜力<sup>[6–8]</sup>。本研究根据福氏志贺氏菌 *ipaH* 基因的保守区设计 6 条引物和 1 条异硫氰酸荧光素标记的探针,条件优化后,旨在建立一种准确高效的志贺氏菌 LAMP-LFD 方法,为志贺氏菌的快速检出和即时诊断提供更加可靠、便捷的技术手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:** 福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri* ATCC12022)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica* ATCC50041)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni* ATCC33291)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica* ATCC23715)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC33847)、霍乱弧菌(*V. cholera* CMCC4819)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC9637、ATCC25922)由浙江省疾病预防控制中心张严峻研究员惠赠;创伤弧菌(*V. vulnificus* ATCC27562)购自中国普通微生物菌种保藏中心;单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* ATCC19115)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC6538)购自广东省微生物菌种保藏中心;溶藻弧菌(*V. alginolyticus* ATCC17749)购自美国菌种保藏中心。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和大肠杆菌 BL21(DE3)购自德国 Novagen 公司,于本实验室完成培养传代。其中,福氏志贺氏菌 ATCC12022 用于 LAMP 条件优化和灵敏度分析等实验。

**1.1.2 试剂和仪器:** LB、BHI 固体培养基,北京陆桥技术股份有限公司;TCBS 固体培养基,杭州微生物试剂有限公司; *Bst* DNA 聚合酶, New England

BioLabs Inc., 美国; *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L), TaKaRa Bio Inc., 日本; 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc., 美国; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型) GK1071, 上海捷瑞生物工程有限公司; 动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; LFD 试纸条、Milenia GenLine Hybri Detect 试剂盒, Milenia Biotec GmbH, 德国; 引物、探针, 英潍捷基(上海)贸易有限公司。电热恒温水槽 DK-80, 上海精宏实验设备有限公司; DYY-II 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; GelDoc-IT2 Imager 凝胶成像系统, UVP, 美国。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养和基因组 DNA 的制备:** 福氏志贺氏菌、肠炎沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌,以及各大肠杆菌菌株划线接种于 LB 或 BHI 固体培养基, 30 °C 或 37 °C 培养后,挑取单菌落于 LB 或 BHI 液体培养基中 200 r/min 振荡培养至所需浓度;研究涉及的弧菌划线接种于 TCBS 固体培养基, 28–30 °C 培养 12–24 h 后,挑取单菌落于碱性蛋白胨水中振荡培养至所需浓度。细菌基因组 DNA 的制备采用试剂盒完成: 分别取所需浓度的上述菌液 1 mL 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型) GK1071 的步骤提取细菌基因组 DNA,溶解于 50  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 中,作为 LAMP 和 PCR 扩增模板。

**1.2.2 引物和探针设计:** 选择 NCBI 上公布的志贺氏菌的 *ipaH* 基因序列(登录号为 M32063.1),序列比对分析后,在 8 个种内高度保守的基因区段设计 6 条特异性引物,包括外引物 Sfl-*ipaH*-F3 和 Sfl-*ipaH*-B3、内引物 Sfl-*ipaH*-FIP 和 Sfl-*ipaH*-BIP、环引物 Sfl-*ipaH*-LF 和 Sfl-*ipaH*-LB,用于 LAMP 扩增反应。其中 Sfl-*ipaH*-FIP 由引物 Sfl-*ipaH*-F1c+Sfl-*ipaH*-F2 构成, Sfl-*ipaH*-BIP 由引物 Sfl-*ipaH*-B1c+Sfl-*ipaH*-B2 构成(图 1)。同时在引物 Sfl-*ipaH*-F1 和 Sfl-*ipaH*-B1 的有效扩增区段内设计 1 条探针 Sfl-*ipaH*-HP,用于与 LAMP 扩增产物



图 1 志贺氏菌 *ipaH* 基因 LAMP-LFD 引物序列和探针设计示意图

Figure 1 The design diagram for primers and DNA probe targeting *ipaH* gene of *Shigella flexneri* ATCC12022 in LAMP-LFD assay

注: LAMP 反应所用引物及 LFD 检测所用探针序列使用下划线或方框表示, 其中, Sfl-ipaH-B1c、Sfl-ipaH-B2c、Sfl-ipaH-B3c 和 Sfl-ipaH-LFc 分别是引物 Sfl-ipaH-B1、Sfl-ipaH-B2、Sfl-ipaH-B3 和 Sfl-ipaH-LF 的互补序列。  
Note: Sfl-ipaH-B1c, Sfl-ipaH-B2c, Sfl-ipaH-B3c, and Sfl-ipaH-LFc represented the reverse complement sequence of Sfl-ipaH-B1, Sfl-ipaH-B2, Sfl-ipaH-B3, and Sfl-ipaH-LF respectively.

的特异性杂交(表 1, 图 1)。其中, 使用生物素标记在内引物 Sfl-ipaH-FIP 的 5'端(表 1), 用于有生物素标记的 LAMP 扩增反应; 使用异硫氰酸荧光素标记在探针 Sfl-ipaH-HP 的 5'端, 用于与生物素标记的

LAMP 扩增产物的特异性杂交, 杂交产物可在 LFD 试纸条上完成检测。另外, 将外引物 Sfl-ipaH-F3 和 Sfl-ipaH-B3 也作为 PCR 扩增的特异性引物, 扩增的预期片段大小为 242 bp。

**1.2.3 LAMP 反应条件的优化** LAMP: 扩增的反应体系参考 Ding 的方法<sup>[6]</sup>, 25  $\mu$ L 体系中主要包括: KCl 10 mmol/L,  $MgSO_4$  6.5 mmol/L,  $(NH_4)_2SO_4$  10 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L (pH 8.8), dNTPs 1.4 mmol/L, Triton X-100 0.1%, 甜菜碱 1.6 mol/L, 外引物 Sfl-ipaH-F3 和 Sfl-ipaH-B3 各 0.2  $\mu$ mol/L, 内引物 Sfl-ipaH-FIP 和 Sfl-ipaH-BIP 各 1.6  $\mu$ mol/L, 环引物 Sfl-ipaH-LF 和 Sfl-ipaH-LB 各 0.4  $\mu$ mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 志贺氏菌基因组 DNA 2  $\mu$ L。阴性对照不使用任何 DNA。

选取志贺氏菌培养 12 h 的培养物, 经平板计数法计数并调整菌液浓度至  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL, 将此浓度定为起始浓度。使用无菌的液体 LB 培养基将起始菌液进行连续 10 倍浓度梯度稀释, 获得  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$  和  $1.0 \times 10^1$  CFU/mL 等 7 个浓度的菌液, 按 1.2.1 所述的方法分别提取其基因组 DNA。选择较低模板浓度(相当于  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL), 分别在 61、63 和 65  $^{\circ}C$

表 1 根据志贺氏菌的 <i>ipaH</i> 基因序列设计的 LAMP-LFD 扩增引物序列和探针			
Table 1 The primers and DNA probe targeting <i>ipaH</i> gene of <i>Shigella flexneri</i> ATCC12022 used in LAMP-LFD assay			
引物 Primer	类型 Type	长度 Size (bp)	序列 Primer sequence (5'→3')
Sfl-ipaH-F3	上游外引物	18	TGAAGAGCATGCCAACAC
Sfl-ipaH-B3	下游外引物	19	CTTCTGATGCCTGATGGAC
Sfl-ipaH-FIP <sup>a</sup>	上游内引物(Sfl-ipaH-F1c+tttt+Sfl-ipaH-F2)	40	CTCCGCAGAGGCACTGAGttttCTCTGCACGCAATACCTC
Sfl-ipaH-BIP	下游内引物(Sfl-ipaH-B1c+tttt+Sfl-ipaH-B2)	41	CGCTGTTGCTGCTGATGCTttttAGATTGTTCCATGTGAGCG
Sfl-ipaH-LF	上游环引物	18	GCGACCTGTTACGGAAT
Sfl-ipaH-LB	下游环引物	19	CACTGAGAGCTGTGAGGAC
Sfl-ipaH-HP <sup>b</sup>	杂交探针	20	CTTCGACAGCAGTCTTTTCGC

注: <sup>a</sup>: 上游引物 Sfl-ipaH-FIP 的 5'端进行生物素标记; <sup>b</sup>: Sfl-ipaH-HP 的 5'端进行异硫氰酸荧光素标记。  
Note: <sup>a</sup>: Forward inner primer (Sfl-ipaH-FIP) was biotiny lated; <sup>b</sup>: DNA probe (Sfl-ipaH-HP) was labled by fluorescein.

条件下温育 60 min,产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。每个温度下平行制备 3 个基因组 DNA 样品,确定 LAMP 的最佳反应温度。为确定 LAMP 反应的最佳反应时间,选择 2 个浓度的菌液(较高模板浓度相当于  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL,较低模板浓度相当于  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL)的基因组 DNA 作为模板,在确定好的最佳反应温度下分别温育 0、10、15、20、25、30、40 和 50 min,产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.4 横向流动试纸条(LFD)检测 LAMP 产物(LAMP-LFD):** 使用经生物素标记的内引物 Sfl-ipaH-FIP 在优化的反应时间和温度下进行 LAMP 反应;反应结束后,向反应液中加入 20 pmol 的经 FITC 标记的探针 Sfl-ipaH-HP,继续在相同温度下杂交 5 min,80 °C 温育 10 min 终止反应。取 5  $\mu$ L 反应液加入到 100  $\mu$ L 检测 Buffer 中混匀,将 LFD 试纸条的检测端竖直浸入 Buffer 溶液中,静置 3–5 min,肉眼判断结果。生物素标记的 LAMP 产物与 Sfl-ipaH-HP 特异性杂交后形成复合物会结合在生物素标记抗体的检测线上,使得判读结果呈阳性;未杂交的 FITC 标记的探针与胶体金标记的抗 FITC 抗体形成不含生物素的复合物穿过检测线而结合在质控线上。

**1.2.5 LAMP-LFD 的特异性实验:** 用于 LAMP-LFD 特异性实验的细菌种类主要包括 4 种常见致腹泻的病原菌(肠炎沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、霍乱弧菌),5 种常见的食源性病原菌(副溶血弧菌、创伤弧菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌),以及 4 种不同的大肠杆菌菌株。将各菌株的新鲜培养物调整浓度至  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL,按 1.2.1 所述提基因组 DNA 作为模板,利用优化的反应温度和反应时间进行有生物素标记的 LAMP 反应,产物分别利用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳和 LFD 试纸条检测。

**1.2.6 LAMP-LFD 的灵敏度实验:** 分别取 1.2.3 所述的不同稀释浓度的志贺氏菌菌液提取的基因组 DNA 2  $\mu$ L 为模板,每个浓度平行制备 3 个样品。

利用优化的反应条件进行有生物素标记的 LAMP 反应,产物分别利用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳和 LFD 试纸条检测。

同样,取上述各稀释度的基因组 DNA 为模板,以外引物 Sfl-ipaH-F3 和 Sfl-ipaH-B3 作为引物,进行 PCR 反应。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.15  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, Sfl-ipaH-F3 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Sfl-ipaH-B3 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 基因组 DNA 模板 2  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 54 °C 45 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应产物利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.7 LAMP-LFD 的重复性实验:** 取 1 mL 新鲜培养的志贺氏菌菌液,计数并调整浓度至  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL,连续 10 倍浓度梯度稀释至 LAMP-LFD 检测的最低浓度,平行制备 3 个样品。按 1.2.1 所述提取基因组 DNA,并以此为模板,采用优化的 LAMP 反应体系进行扩增,验证方法的重复性。

**1.2.8 志贺氏菌人工污染鲤鱼组织实验及田间样本的检测:** 无菌条件下取健康鲤鱼肠道,选其内容物经传统生物学鉴定志贺氏菌阴性后,对该肠组织进行匀浆。取 1 mL 新鲜培养的志贺氏菌菌液,计数并调整浓度至  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL,10 倍浓度梯度稀释后,选取  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$  和  $1.0 \times 10^1$  CFU/mL 等 6 个浓度的菌液各 1 mL 与鲤鱼肠组织匀浆液等体积混匀。每个浓度平行制备 3 个样品。取 1 mL 细菌污染的肠组织匀浆液,利用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA,溶解于 50  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 中,用作 LAMP-LFD 和 PCR 测试的模板。健康鲤鱼的肠组织基因组 DNA 用作阴性对照。

从宁波市菜市场分 4 次随机购买体重 0.5–1.0 kg 的鲤鱼 24 尾。实验室无菌条件下采集鲤鱼肠道中后段,选其适量内容物,参照食品卫生学检验的行业标准 GB4789.5-2012 的方法进行细菌分离、鉴定;同时取适量的肠道中后段,提取基因组



DNA, 采用 LAMP-LFD 和 PCR 方法进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 扩增条件的确定

结果表明, 以较低浓度的基因组 DNA 为模板时, 上述 3 个温度下的 LAMP 产物均能通过琼脂糖凝胶电泳检测到明显的梯形条带, 且带形一致; 其中, 63 °C 条件下获得的产物带形更加清晰、明亮, 定性地反映出此温度下的产物量应大于其它两个温度, 因此, 选择 63 °C 作为 LAMP 反应的最适温度(图 2A)。未添加 DNA 模板的反应管中未检测到明显的梯状条带(图 2A)。

LAMP 反应时间优化的实验结果表明, 在一定时间内, LAMP 反应的产物量随着时间的延长而增加, 且明显受到基因组 DNA 浓度的影响。当使用高浓度的基因组 DNA 为模板时, LAMP 反应 15 min 即可检测到明显的梯形条带; 反应时间延长至 30 min 时, 条带亮度达到最大, 再延长时间, 产物量几乎不再增加(图 2B)。当模板浓度偏低时, LAMP 反应至 20 min 时才能够检测到微弱的梯形条带, 延长反应时间至 40 min 时, 产物量达到最大(图 2B)。因此, 本研究将 LAMP 的最佳反应时间确定为 40 min, 以确保在实际样品检测过程中, 当待检目标物丰度较低时仍可有效检出(图 2C)。

### 2.2 LAMP-LFD 的特异性

使用生物素标记的内引物 Sfl-ipaH-FIP 进行 LAMP 反应, 反应条件为优化后的 63 °C 温育 40 min。当以志贺氏菌的基因组 DNA 为模板时, LAMP 产物经琼脂糖凝胶电泳后可获得典型的梯形条带(图 3A); 该 LAMP 产物与探针 Sfl-ipaH-HP 杂交, 杂交产物在 LFD 试纸条的检测线位置生成一条清晰的条带, 说明检测呈阳性(图 3B)。而当分别以肠炎沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌, 以及 4 株不同的大肠杆菌的基因组 DNA 为模板时, LAMP 产物均呈阴性(图 3A); 与探针 Sfl-ipaH-HP 的杂交产物在 LFD

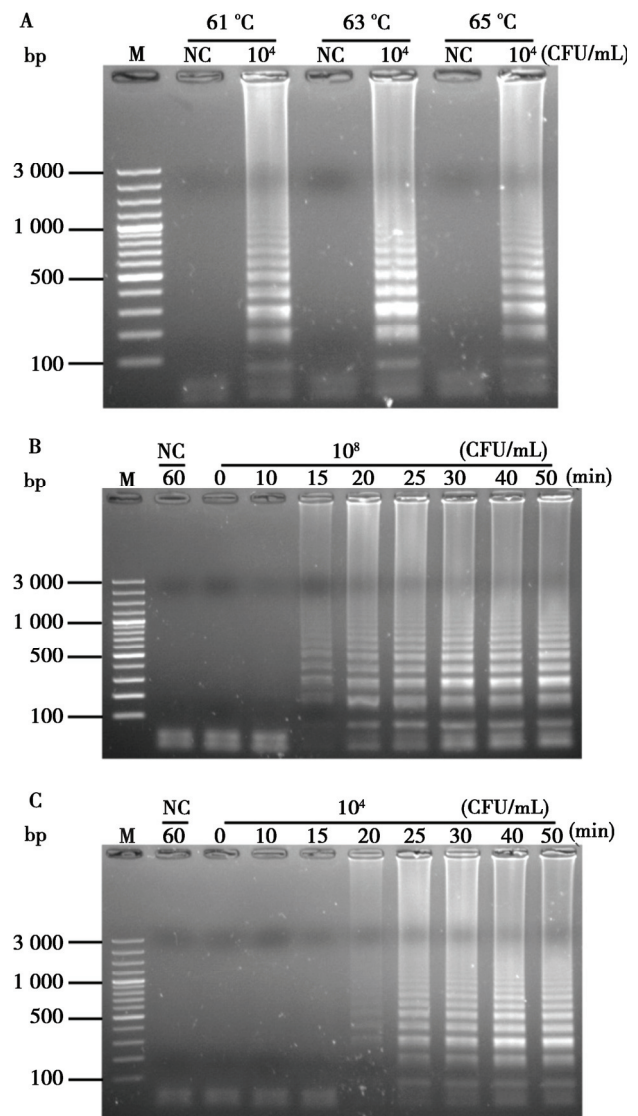


图 2 LAMP 反应条件的优化

Figure 2 The optimization of LAMP for detection of *Shigella*

注: M: 100 bp Plus DNA ladder; NC: 以无菌去离子水为模板, 反应时间为 60 min; A: LAMP 反应温度的确立; 10<sup>4</sup>: 模板浓度约为 1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL, 反应时间为 60 min; B、C: 反应时间的确定, B: 模板浓度约为 1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL, C: 模板浓度约为 1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL。

Note: M: 100 bp Plus DNA ladder; NC: Amplification using ddH<sub>2</sub>O as negative control for 60 min; A: Determination of the optimal temperature; 10<sup>4</sup>: Amplification using DNA of *S. flexneri* ATCC12022 (1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL) for 60 min; B, C: Determination of the optimal time, template used in the LAMP assay was 1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL (B) and 1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL (C).

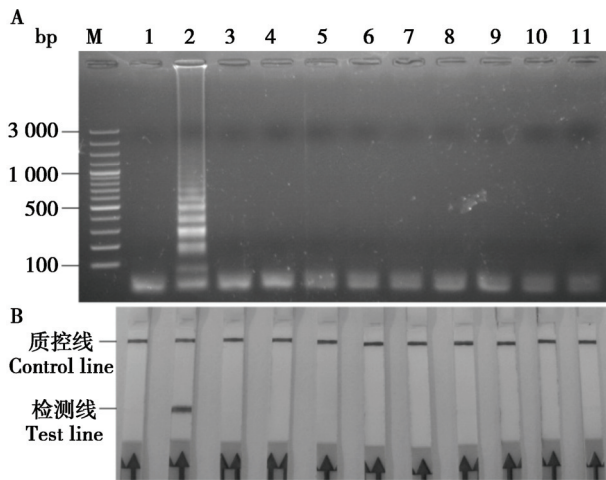


图3 LAMP (A)和 LAMP-LFD (B)特异性分析

Figure 3 Specificity test of LAMP-LFD (A) and LAMP (B) for detection of *Shigella*

注: A: 琼脂糖凝胶电泳; B: LFD. M: 100 bp Plus DNA ladder; 1: 以无菌去离子水为模板; 2: 以志贺氏菌的基因组 DNA 为模板; 3-11: 分别以肠炎沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌, 以及溶藻弧菌的基因组 DNA 为模板; 12-15: 分别以 4 株不同的大肠杆菌的基因组 DNA 为模板。

Note: A: Detection by gel electrophoresis; B: Detection by LFD. M: 100 bp Plus DNA ladder; 1: Amplification using ddH<sub>2</sub>O as negative control. 2: Amplification using DNA of *S. flexneri* ATCC12022 ( $1.0 \times 10^4$  CFU/mL); 3-11: gDNA of different pathogens used as templates in the LAMP assay was *S. enterica* ATCC50041, *C. jejuni* ATCC33291, *Y. enterocolitica* ATCC23715, *V. parahaemolyticus* ATCC33847, *V. cholera* CMCC4819, *V. vulnificus* ATCC27562, *L. monocytogenes* ATCC19115, *S. aureus* ATCC6538, and *V. alginolyticus* ATCC17749 (each bacterium:  $1 \times 10^5$  CFU/mL), respectively; 12-15: gDNA of four strains of *E. coli* used as templates was *E. coli* ATCC9637, *E. coli* ATCC25922, *E. coli* DH5 $\alpha$ , and *E. coli* DE3 (each bacterium:  $1 \times 10^5$  CFU/mL), respectively.

试纸条上的检测线位置未呈现任何条带, 检测呈阴性(图 3B)。以无菌去离子水为模板时, LAMP 反应也呈阴性(图 3)。

### 2.3 LAMP-LFD 的灵敏度验证

由图 2C 的结果可知, 当以  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL 基因组 DNA 为模板时, LAMP 反应 25 min 即可明显获得阳性扩增。灵敏度结果表明, 当以  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$  和  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL 浓度的志贺氏菌基因组 DNA 为模板时, LAMP 产物经琼脂糖凝胶电泳后可获得典型的梯形条带(图 4A),

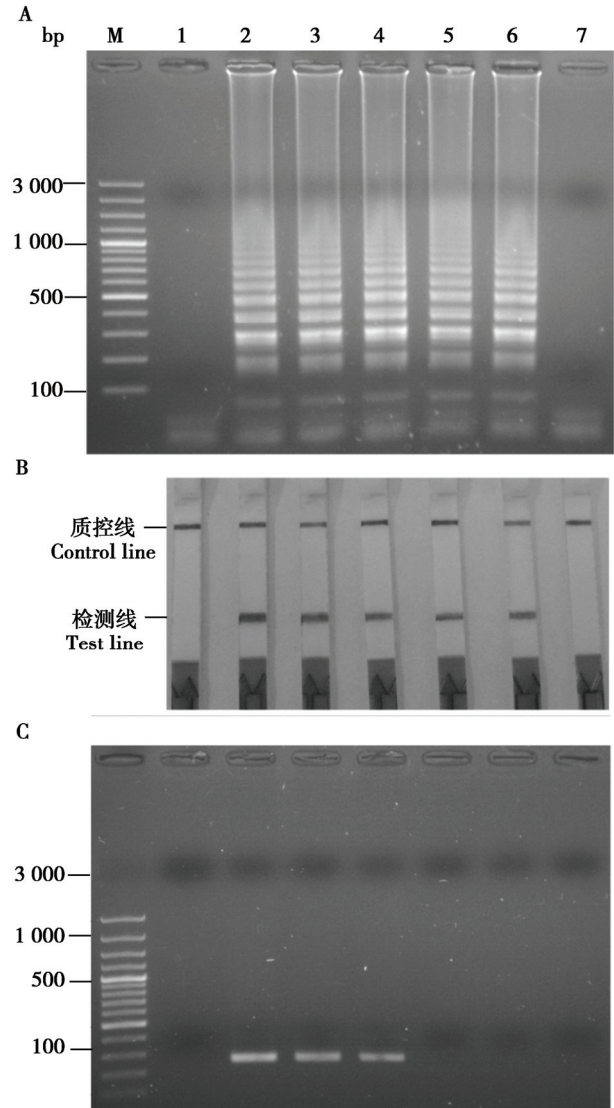


图4 LAMP (A)、LAMP-LFD (B)和 PCR (C)方法的灵敏度

Figure 4 Sensitivity of LAMP (A), LAMP-LFD (B) and PCR (C) for detection of *Shigella*

注: A: 琼脂糖凝胶电泳检测 LAMP 反应产物; B: LFD 检测 LAMP 产物; C: 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物; M: 100 bp Plus DNA ladder; 1: 以无菌去离子水作为模板; 2-7: 不同浓度志贺氏菌( $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^1$  CFU/mL)的菌液提取的基因组 DNA 作为模板。

Note: A: LAMP products detected by gel electrophoresis; B: LAMP products detected by LFD; C: PCR products detected by gel electrophoresis. M: 100 bp Plus DNA ladder; 1: Amplification using ddH<sub>2</sub>O as negative control; 2-7: The different gDNA concentration of *S. flexneri* ATCC12022 used as the template in the LAMP and PCR assays.



LAMP 产物与探针 Sfl-*ipaH*-HP 的杂交产物均可在 LFD 试纸条的检测线位置生成一条清晰的条带,说明检测呈阳性(图 4B);而当将菌液浓度继续降低至  $1.0 \times 10^1$  CFU/mL 时,琼脂糖凝胶电泳的结果呈阴性(图 4A);与探针 Sfl-*ipaH*-HP 杂交后的产物在 LFD 试纸条的检测线位置未呈现任何条带(图 4B);表明经 LFD 检测的最低模板浓度为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL 或 4 CFU/反应,利用琼脂糖凝胶电泳可检测到的最低模板浓度同样为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL。当以 Sfl-*ipaH*-F3 和 Sfl-*ipaH*-B3 为引物的 PCR 方法能够检测到的最低模板浓度为  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL 或 400 CFU/反应(图 4C)。

## 2.4 LAMP-LFD 重复性分析

重新培养 3 份志贺氏菌的新鲜培养悬液,浓度调整至  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL,以其基因组 DNA 为模板,按优化的反应体系在 63 °C 温育 40 min。结果表明,当以最低检测模板浓度的志贺氏菌的基因组 DNA 为模板时,LAMP 产物经琼脂糖凝胶电泳和 LFD 检测,结果均呈阳性(图 5);以无菌去离子水为模板时,检测均呈阴性,具有良好的重复性(图 5)。

## 2.5 LAMP-LFD 检测志贺氏菌人工污染鲤鱼组织的灵敏度及适用性分析

不同浓度的志贺氏菌等体积污染鲤鱼组织发现,LAMP-LFD 可从  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL 污染的鲤鱼肠组织中稳定检测到病原,检测灵敏度为  $5 \times 10^2$  CFU/mL 或 20 CFU/反应。PCR 方法只能从  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL 污染的鲤鱼肠组织中稳定检测到病原(表 2)。LAMP-LFD 对未人工污染志贺氏菌的鲤鱼肠组织的检测结果为阴性(表 2),特异性良好。

利用行业标准法对野外鲤鱼样品肠组织分离的细菌进行鉴定后发现,24 尾鲤鱼样品中有 2 尾鲤鱼体内感染有志贺氏菌。利用 LAMP-LFD 方法从传统方法鉴定阳性的样品中均可检测到志贺氏菌,对其余 22 个样品检测呈阴性;PCR 方法能够从传统方法鉴定阳性的 1 个样品中检测到志贺氏菌,对其余 23 个样品检测均呈阴性(表 2)。

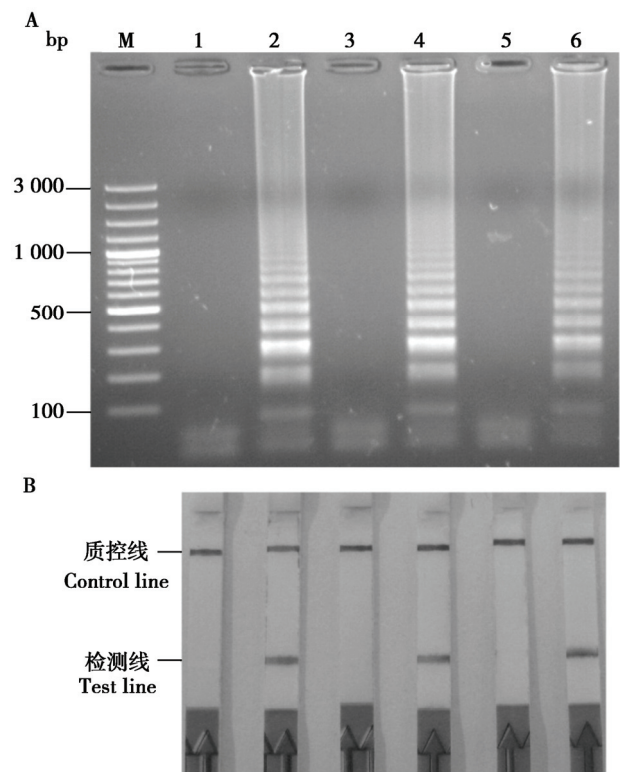


图 5 LAMP (A)和 LAMP-LFD (B)的重复性试验

Figure 5 Reproducibility of LAMP-LFD for detection of *Shigella*

注: A: 琼脂糖凝胶电泳检测 LAMP 反应产物; B: LFD 检测 LAMP 产物。M: 100 bp Plus DNA ladder; 1、3、5: 以无菌去离子水作为模板; 2、4、6: 最低检测浓度( $1.0 \times 10^2$  CFU/mL)的志贺氏菌菌液提取基因组 DNA 作为模板。

Note: A: LAMP products detected by gel electrophoresis; B: LAMP products detected by LFD; M: 100 bp Plus DNA ladder; 1, 3, 5: Taking ddH<sub>2</sub>O as the template; 2, 4, 6: Taking gDNA of *S. flexneri* ATCC12022 of  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL as the template.

## 3 讨论

志贺氏菌是引起感染性腹泻的首要致病菌。我国每年的痢疾患者大约有 170 万,需住院治疗的就多达 20 万<sup>[9-10]</sup>。福氏志贺氏菌是引发我国细菌性腹泻的主要优势致病菌<sup>[10-11]</sup>。Qiu 等对 2003–2013 年间腹泻患者体内分离的 2 912 株志贺氏菌的分析发现,福氏志贺氏菌比重达到 55.3%<sup>[12]</sup>。因此,本研究选择以福氏志贺氏菌的 *ipaH* 基因作为检测靶标,建立了快速、灵敏的 LAMP-LFD 方法,为该病原菌的准确鉴定提供了一种可靠方法。



表 2 志贺氏菌人工污染健康鲤鱼肠组织以及鲤鱼野外样品的检测结果  
Table 2 Detection of *Shigella* from the intestinal tissue of artificially contaminated common carp and field samples

Method	污染志贺氏菌肠组织所用志贺氏菌浓度 Concentration of <i>S. flexneri</i> for contaminated carp intestinal tissue (CFU/mL)					未被污染的健康鲤鱼肠组织 Carp intestinal tissue without <i>S. flexneri</i> free (CFU/mL)	鲤鱼野外样品 Carp field samples (24)	
	1.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>		阳性 Positive	阴性 Negative
行业标准法 GB4789.5-2012	+	+	+	+	+	—	2	22
LAMP-LFD	+	+	+	—	—	—	2	22
	+	+	+	—	—	—		
	+	+	+	—	—	—		
PCR	+	—	—	—	—	—	1	23
	+	+	—	—	—	—		
	+	—	—	—	—	—		

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

稳定的 LAMP 反应体系和条件是决定整个技术性能的重要环节。*Bst* DNA 聚合酶在 60–65 °C 下通常具有最佳的工作效率, 因引物组合不同使得针对各种检测靶标时需对具体的工作温度进一步优化, 已有的研究表明 LAMP 的最佳反应温度通常在 63–65 °C<sup>[6-7]</sup>。因此, 本研究比较分析了 61、63 和 65 °C 3 个温度, 得出 63 °C 条件下 LAMP 反应具有最佳的扩增效果。快速是 LAMP 方法优于其它分子检测技术的重要特点, 通常 LAMP 扩增反应可在 1 h 内完成; 若添加环引物又可明显缩短扩增时间<sup>[13]</sup>。本研究表明, 添加环引物的条件下, 当使用较高模板浓度时, LAMP 反应 15 min 即可通过琼脂糖凝胶电泳检测到典型的梯形条带; 即使模板浓度降低至 1.0×10<sup>2</sup> CFU/mL, LAMP 仍可在 25 min 之内完成有效扩增, 反应 40 min 时即可获得最大产物量(图 2)。

灵敏度是反映核酸检测类技术性能的重要技术指标。Villalobo 和 Torres 在 1998 年即以志贺氏菌的毒理因子 A (*virA*) 基因为靶目标建立了可特异性检测该菌的 PCR 方法<sup>[14]</sup>, 灵敏度达到了 100–1 000 CFU/mL。Lindsay 等以 *ipaH* 基因作为检测靶标建立的定量 PCR 技术可特异性地应用于粪便样

品中志贺氏菌的检测, 当检测阈值设定在 1.4×10<sup>4</sup> 个基因拷贝时可有效保证方法具有良好的检测可靠性<sup>[15]</sup>。Peng 等基于 16S rRNA 的通用引物并结合细菌的特异性抗体建立了免疫捕获 PCR 技术, 成功应用于环境污水中志贺氏菌的鉴定和分型<sup>[16]</sup>, 灵敏度达到 5 CFU/20 μL。多重 PCR 技术在包括志贺氏菌在内的食源性致病菌或腹泻致病菌的检测中取得了一定的应用。马凯等<sup>[17]</sup>基于免疫磁珠方法建立了针对志贺氏菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的多重荧光定量 PCR 技术, 应用于食品中常见食源性致病菌的检测, 针对志贺氏菌的灵敏度达到 6.8 CFU/g; 而 van Lint 等<sup>[18]</sup>建立的多种 PCR 技术可应用于志贺氏菌等 5 类重要致腹泻病原菌的快速检测, 其中针对志贺氏菌的灵敏度达到 61 CFU/mL。LAMP 方法被认为具有比 PCR 更加优越的灵敏度<sup>[19]</sup>。Song 等<sup>[20]</sup>最先将 LAMP 技术应用于志贺氏菌的快速检测, 最低检测限为 8 CFU/反应。Shao 等<sup>[21]</sup>以 *ipaH* 基因为检测靶标, 将 LAMP 技术与限制性片段长度多态性方法联合应用 (RFLP) 建立了 mLAMP-RFLP 技术, 应用于牛奶中志贺氏菌和沙门氏菌的筛检, 检测灵敏度达到 100 fg 的细菌基因

组 DNA。Liew 等<sup>[22]</sup>将 LAMP 方法应用于生菜等蔬菜中志贺氏菌的快速检验, 当生菜样品中的细菌污染量不低于  $3.6 \times 10^2$  CFU/g 时, 利用该技术可稳定检出。本研究建立的 LAMP-LFD 方法, 针对志贺氏菌纯培养物的检测灵敏度为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL 或 4 CFU/反应; 利用该方法能够从污染强度达到  $5 \times 10^2$  CFU/mL 的鲤鱼肠组织中稳定检测到志贺氏菌的存在, 具有良好的灵敏度。

操作便捷、检测快速是本研究追求的又一重要目标。尽管 LAMP 技术的单一温度需求极大地降低了扩增过程对于精密昂贵仪器的依赖, 比 PCR 依赖性的技术具有明显的优势<sup>[23]</sup>, 但在扩增产物的环节, 仍存在与 PCR 产物检测相似的弊端, 如昂贵的凝胶成像系统或浊度检测设备, 以及易接触有毒试剂等<sup>[24-25]</sup>, 尤其扩增产物的气溶胶问题加重了核酸检测类方法所共有的假阳性率高的问题。LAMP-LFD 技术利用 LFD 试纸条进行产物检测, 完全摒弃了对上述检测设备的依赖, 更加符合基层的即时检测; 而且由于特异性探针的引入, 可很大程度上减少非特异性扩增引起的假阳性现象, 确保检测结果的可靠性。在检测耗时方面, Song 等<sup>[20]</sup>以 *ipaH* 基因为检测靶标的前提下, 由于未引入环引物, 且扩增产物需经过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 整个耗时需 2 h; 而 Shao 等<sup>[21]</sup>建立的 mLAMP-RFLP 技术, 需要特定的限制性内切酶对扩增产物进行酶解, 因而耗时更长; 本研究建立的 LAMP-LFD 技术, 核酸扩增仅需 40 min, 加上 LFD 判断结果的时间也只需要 50 min。

## 4 结论

本研究以志贺氏菌的 *ipaH* 基因为检测靶标建立了 LAMP-LFD 方法。该方法可特异性地检出志贺氏菌, 并且具有快速(整个检测过程仅需 50 min 即可完成)、灵敏(针对细菌纯培养物的检测灵敏度达到  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL 或 4 CFU/反应)、重复性良好、仪器需求简单等特点, 可应用于志贺氏菌的基层即时检测。

## 参考文献

- [1] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies[J]. Bulletin of the World Health Organization, 1999, 77(8): 651-666
- [2] Seidlein L, Kim DR, Ali M, et al. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(9): e353
- [3] Zhang J, Ma WJ, Zhu TH. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cylindrocylindrium scoparium* on Eucalyptus[J]. Microbiology China, 2015, 42(4): 791-799 (in Chinese)  
张静, 麻文建, 朱天辉. 一种快速检测桉树焦枯病菌 (*Cylindrocylindrium scoparium*) 的 LAMP 体系的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 791-799
- [4] Zhou CY, Xie ZX, Song Y, et al. Establishment of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of H6 subtype avian influenza virus[J]. Microbiology China, 2011, 38(12): 1855-1861 (in Chinese)  
周辰瑜, 谢芝勋, 宋杨, 等. H6 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1855-1861
- [5] Qu DF, Zhou HY, Han JZ, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork[J]. Veterinary Parasitology, 2013, 192(1/3): 98-103
- [6] Ding WC, Chen J, Shi YH, et al. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Archives of Virology, 2010, 155(3): 385-389
- [7] Wang RN, Zhou QJ, Chen J. Visual detection of *Streptococcus iniae* based on loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(12): 1584-1594 (in Chinese)  
王瑞娜, 周前进, 陈炯. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测海豚链球菌方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(12): 1584-1594
- [8] Puthawibool T, Senapin S, Kiatpathomchai W, et al. Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 156(1/2): 27-31
- [9] Qiu SF, Wang ZQ, Chen C, et al. Emergence of a novel *Shigella flexneri* serotype 4s strain that evolved from a serotype X variant in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(3): 1148-1150
- [10] Wang XY, Tao FB, Xiao DL, et al. Trend and disease burden of bacillary dysentery in China (1991-2000)[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2006, 84(7): 561-568
- [11] Ye CY, Lan RT, Xia SL, et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(2): 419-426
- [12] Qiu S, Xu X, Yang C, et al. Shift in serotype distribution of *Shigella* species in China, 2003-2013[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2015, 21(3): 252.e5-252.e8
- [13] 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
- [14] Villalobo E, Torres A. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1242-1245
- [15] Lindsay B, Ochieng JB, Ikumapayi UN, et al. Quantitative PCR for detection of *Shigella* improves ascertainment of *Shigella* burden in children with moderate-to-severe diarrhea in

- low-income countries[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(6): 1740-1746
- [16] Peng XX, Luo W, Zhang JY, et al. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR with universal primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2580-2583
- [17] Ma K, Li BM, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2369-2377 (in Chinese)  
马凯, 李宝明, 白羽, 等. 基于免疫磁分离的三重荧光定量PCR 检测食品中沙门氏菌, 志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2369-2377
- [18] van Lint P, de Witte E, de Henau H, et al. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. /EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(3): 535-542
- [19] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(44/46): 6679-6682
- [20] Song TY, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243(1): 259-263
- [21] Shao YC, Zhu SM, Jin CC, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 75-79
- [22] Liew PS, Teh CSJ, Lau YL, et al. A real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Shigella* species[J]. Tropical Biomedicine, 2014, 31(4): 709-720
- [23] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2009, 15(2): 62-69
- [24] Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2004, 23(4): 289-299
- [25] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation[J]. BioTechniques, 2005, 39(1): 75-85

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

