

环介导等温扩增技术检测食品中酸土环脂芽孢杆菌

周赞虎^{1,2}, 张海艳³, 郑俊超², 江喆敏², 陈春香², 何艺贞², 林俊君², 苏雪勤², 王根芳², 郑天凌^{1,*}
(1.厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;
2.漳州出入境检验检疫局, 福建 漳州 363000; 3.漳州卫生职业学院, 福建 漳州 363000)

摘要: 目的: 利用环介导等温扩增技术建立食品中酸土环脂芽孢杆菌快速检测方法。方法: 针对酸土环脂芽孢杆菌16S序列设计特异引物, 再优选反应体系, 用显色法检测实验结果。结果: 该方法能够在63 °C条件下1 h内检出食品中酸土环脂芽孢杆菌, 所设计的引物有良好的特异性; 灵敏度达6.7 CFU/mL (弱阳性)。结论: 该方法具有高效、特异性强和敏感性高等特点, 可满足酸土环脂芽孢杆菌快速检测筛选的要求。

关键词: 环介导等温扩增; 酸土环脂芽孢杆菌; 食品

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Foods

ZHOU Zan-hu^{1,2}, ZHANG Hai-yan³, ZHENG Jun-chao², JIANG Zhe-min², CHEN Chun-xiang², HE Yi-zhen²,
LIN Jun-jun², SU Xue-qin², WANG Gen-fang², ZHENG Tian-ling^{1,*}

(1. Key Laboratory of Coastal and Wetland Ecosystems, Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Zhangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangzhou 363000, China; 3. College of Zhangzhou Health Vocational, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Purpose: A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was established for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in foods. Methods: After optimization of the reaction conditions of LAMP including the concentrations of primers, reaction time and amplification temperature, the LAMP method was developed, and its sensitivity and specificity were evaluated. Results: The method was capable of rapidly and specifically detecting *A. acidoterrestris* in foods within 1 hour at a constant temperature of 63 °C. The sensitivity of the method was 6.7 CFU/mL and the specificity was 100%. Conclusions: The LAMP method is efficient, highly sensitive and specific, and suitable for the rapid detection of *A. acidoterrestris* in various food samples.

Key words: loop-mediated isothermal amplification (LAMP); *Alicyclobacillus acidoterrestris*; food

中图分类号: S182

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 22-0233-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201422045

酸土环脂芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)^[1] 是一种嗜热、嗜酸、好氧的杆菌, 是耐热菌 (thermoacidophilic bacteria, TAB) 中污染果汁的主要菌种, 其芽孢能经受酸性果汁加工中的巴氏杀菌而存活, 在适宜的温度条件下可大量繁殖, 可以引起巴氏灭菌果汁的腐败, 产生难以接受的气味, 在这种腐败初期, 产品并不出现明显的胀包或酸败, 但该菌代谢产物在极低浓度就会使果汁口感风味变劣, 产生浊度升高乃至形成白色沉淀等质量危害。耐热菌超标是浓缩果汁产品最为严重的质量问题之一。近年来, 我国浓缩苹果汁行业取得了突

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 福建省漳州市自然科学基金项目 (ZZ2012J16)

作者简介: 周赞虎 (1973—), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为微生物与分子生物学。E-mail: 24345460@qq.com

*通信作者: 郑天凌 (1955—), 男, 教授, 博士, 研究方向为海洋微生物生态学。E-mail: 24345460@qq.com

飞猛进的进步, 2010年我国已经成为世界苹果浓缩汁的生产出口第一大国。2013年1—12月我国出口浓缩苹果汁数量为59.79万 t, 金额为8.98亿美元, 出口金额比2010年同比增长50.90%^[2]。目前国际贸易中对果汁中耐热菌有严格要求, 是苹果浓缩汁的必检项目, 也是当前中国苹果浓缩汁出口中所遭遇的主要技术壁垒之一和苹果浓缩汁生产中急待解决的问题。

目前检测酸土环脂芽孢杆菌方法^[3]主要有传统的微生物培养生理生化检测法和分子生物学聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法, 传统的微生物培

养检测法耗时耗力, 整个检测周期需耗费7~10 d; PCR法则需要昂贵的PCR仪和有分子生物学检测技术的检测人员, 基层微生物检测实验室较难满足条件。目前国内尚未检索到用环介导等温扩增技术检测酸土环脂芽孢杆菌的报道。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是Notomi等^[4]建立的一种新的核酸扩增方法, 其原理是针对靶基因的6个特异区域, 设计4条特异性引物(分别为上游外引物(F3)、下游外引物(B3)、上游内引物(FIP)和下游内引物(BIP)及具有链置换活性的*Bst* DNA聚合酶, 在恒温条件下特异、高效、快速地扩增DNA, 在1 h内能达到 10^9 靶序列拷贝, 通过观察副产物焦磷酸镁沉淀的浊度或者荧光染料亮度即可判断反应是否发生。因其不需要昂贵的仪器, 在水浴锅里保持恒温, 60 min内即可高效扩增目的DNA上亿倍, 且可以通过目测判断结果, 所以适合在基层应用和推广, 用于大量样品的快速检测和筛选。

本研究旨在建立一种快速、准确检测食品中酸土环脂芽孢杆菌的方法并进行实际应用, 以满足进出口水果浓缩汁快速检测的需要, 旨在为实现与国际检测技术接轨提供更多的参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

酸土环脂芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*, ATCC 49025)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 8739)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, CMCC(B) 50115)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*, CMCC 51528(5))、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, CMCC(B) 54002)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B) 10104) 中国食品药品检定研究院; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CICC10012)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, CICC10322)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*, CICC10448)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus Cereus*, CICC20551) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 试剂与仪器

甜菜碱 美国Sigma公司; dNTPs、SYBR Green I染料 上海生工生物工程有限公司; *Bst* DNA聚合酶大片 美国NEB公司; 其他试剂均为分析纯级。

TGRADIENT 96梯度PCR仪 德国Biometra公司; FIREREADER凝胶成像仪 英国UVItec公司; 600水

浴锅 江苏省金坛市江南仪器厂; LAMP反应管 广州华峰生物科技有限公司。

1.1.3 引 物

根据GenBank中酸土环脂芽孢杆菌16S序列, 设计了4条特异性引物, 即F3、B3、FIP和BIP, 其序列依次为:

F3: 5'-CGGCGCATTAGCTAGTTGG-3'

B3: 5'-ACTCTCCTTGTGCTCTCC-3'

FIP: 5'-TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC-GAGGTAACGGCTACCAAG-3'

BIP: 5'-TAGGGAATCTTCCGCAATGGGC-AGAGCTTTACAACCCGAAGG-3'

以上引物均委托上海生工生物工程技术公司合成。

1.1.4 培养基与果汁样品

YSG液体培养基(酵母膏2 g、葡萄糖1 g、可溶性淀粉2 g, 溶于1 L蒸馏水中, 用1 mol/L盐酸调节pH(3.7±0.1), 121 °C灭菌15 min); 苹果汁、橙汁和菠萝汁均为福建绿泉食品有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 细菌DNA的提取

取酸土环脂芽孢杆菌菌液1 mL加到1.5 mL无菌离心管中, 10 000×g离心2 min, 尽量吸弃上清液; 加入100 μL TE-Trinton, 混匀后沸水浴10 min; 12 000×g离心2 min, 上清液即为模板DNA, -20 °C保存备用。

1.2.2 LAMP反应体系初建

根据文献[5], 初步设定LAMP反应体系: 内外引物比为8:1, FIP和BIP各1.6 μmol/L, F3和B3各0.2 μmol/L, dNTP Mixture 1.6 mmol/L, ThermoPol缓冲液1×, 甜菜碱0.8 mol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, DNA模板2 μL, 8 U *Bst* DNA聚合酶0.5 μL, 加双蒸水至25 μL。反应混合物先在95 °C加热5 min使DNA解链, 放在冰上冷却5 min后加8 U *Bst* DNA聚合酶大片, 然后在63 °C孵育60 min, 最后在80 °C、10 min终止反应。反应完成后, 加入1 000×SYBR Green I 2 μL, 轻轻混匀并在白色背景下观察。实验3个重复, 同时做空白对照。

1.2.3 LAMP反应体系优化

反应体系(25 μL)分别进行酶添加量、反应时间、反应温度和引物浓度优化, 每组反应进行3个重复。酶添加量分别为4、8、12、16、20 U; 反应时间分别设为30、45、60、75、90 min; 反应温度分别设为60、61、62、63、64、65 °C; 引物浓度设置: 根据LAMP文献[5]等多个LAMP研究, LAMP内外引物比在8:1反应效果较好, 设定内外引物比为8:1, 然后分别设定外引物的终浓度为0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μmol/L, 同时根据8:1的比例添加相应的内引物进行实验。

1.2.4 特异性实验

用食品中常见致病菌大肠杆菌、沙门氏菌、痢疾志

贺氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌进行验证；同时选取果汁中常见的枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌进行特异性验证。提取以上各种菌基因组DNA，用1.2.2节方法进行检测，验证该方法检测酸土环脂芽孢杆菌的种属特异性。

1.2.5 敏感性实验

将酸土环脂芽孢杆菌标准菌株经YSG液体培养基，过夜培养后，增菌液以10倍递增稀释至 10^6 倍，每一稀释倍数菌悬液分别取1 mL，进行菌落计数，每组设3个重复；然后再分别取上述每个稀释度菌悬液1 mL提取其DNA，同时用双蒸水为空白对照，依据1.2.2节方法进行检测，确定该方法的检出限。

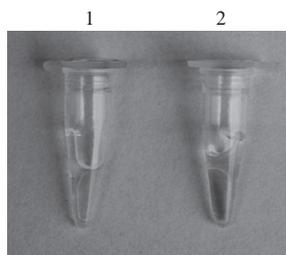
1.2.6 食品样品检测

取经PCR检测酸土环脂芽孢杆菌阴性的苹果汁、橙汁和菠萝汁各100 mL，分装入3根无菌的试管，并分别接入浊度0.6的酸土环脂芽孢杆菌液10 μ L，混匀后45 $^{\circ}$ C培养48 h；同时另取相应酸土环脂芽孢杆菌阴性的果汁在45 $^{\circ}$ C培养48 h作为阴性对照；各取1 mL用1.2.1节方法提取DNA，按酸土环脂芽孢杆菌LAMP检测优选方案进行LAMP扩增检测。

2 结果与分析

2.1 酸土环脂芽孢杆菌LAMP反应初建体系实验

酸土环脂芽孢杆菌反应管3个重复实验结果均为特异性绿色，空白对照为橙色。阳性结果跟空白对照结果如图1所示。



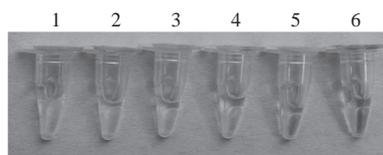
1. *A. acidoterrestris*; 2. 空白对照。

图1 酸土环脂芽孢杆菌LAMP检测结果

Fig.1 LAMP results of *A. acidoterrestris*

2.2 反应体系优化实验结果

反应温度60、61、62、63、64、65 $^{\circ}$ C均能扩增目的产物显绿色，各管颜色没明显差异；3组重复性实验没有差异。25 μ L反应体系酶添加量分别为4、8、12、16、20 U，均能扩增目的产物显色，各管颜色没明显差异；3组重复性实验没有差异。

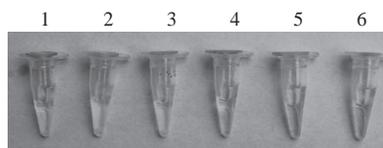


1~5.反应时间分别为90、75、60、45、30 min; 6.空白对照。

图2 反应时间对LAMP的影响

Fig.2 Effect of reaction time on the LAMP

由图2可知，反应30 min时实验结果有转绿，但绿色比较浅（弱阳性），反应45 min以后各管颜色均显示绿色且没明显差异；3组重复性实验没有明显的组间差异。



1~5.引物浓度分别为2.0、1.6、1.2、0.8、0.4 μ mol/L; 6. 空白对照。

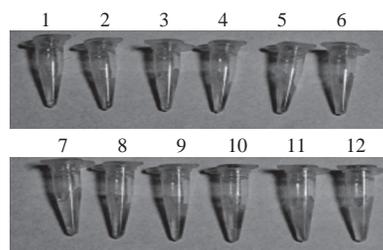
图3 引物浓度对LAMP的影响

Fig.3 Effect of primer concentrations on the LAMP

由图3可见，引物终浓度为0.4 μ mol/L显示为阴性，0.8 μ mol/L为弱阳性，1.2 μ mol/L及以上的浓度为阳性；3组重复性实验没有明显的组间差异。

通过对各个反应条件进行实验，在反应体系体积为25 μ L的条件下，反应体系的优选方案为：外引物1、2各0.15 μ mol/L；内引物1、2各1.2 μ mol/L；*Bst* DNA聚合酶，0.16 U/ μ L；DNA模板，2.0 μ L。63 $^{\circ}$ C扩增60 min后，每个反应管中加入1 000 \times SYBR Green I 2 μ L，轻轻混匀并在白色背景下观察。

2.3 特异性实验



1. *Pseudomonas aeruginosa*; 2. *Escherichia coli*; 3. *Salmonella typhimurium*; 4. *Shigella dysenteriae*; 5. *Listeria monocytogenes*; 6. *Staphylococcus aureus*; 7. *Bacillus subtilis*; 8. *Bacillus thuringiensis*; 9. *Bacillus megaterium*; 10. *Bacillus Cereus*; 11. 空白对照; 12. *A. acidoterrestris*。

图4 酸土环脂芽孢杆菌特异性实验结果

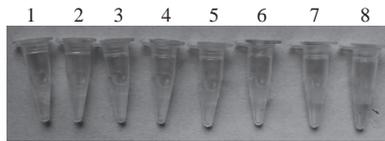
Fig.4 Specificity of the LAMP method for *A. acidoterrestris*

由图4可见，只有酸土环脂芽孢杆菌反应管为特异性绿色，其余均为橙色。3组重复性实验没有出现明显的组间差异，说明该反应体系特异性好。

2.4 灵敏度实验

对酸土环脂芽孢杆菌各个稀释度的菌悬液进行检测后，结果如图5所示，稀释度为 $10^0 \sim 10^5$ 倍时，反应管均

显示绿色, 10^6 稀释度为浅绿色, 空白对照管为橙色。实验重复了3组, 3组实验结果没有大的差异, 最后根据菌落计数结果取3组数据的平均值, 10^5 稀释度细菌浓度对应的平皿菌落计数平均值为58 CFU/mL (具体数值分别为60、64、50 CFU/mL), 10^6 稀释度细菌浓度为6.7 CFU/mL (具体数值分别为5、7、8 CFU/mL); 可以判断, 本研究建立的酸土环脂芽孢杆菌方法的最低检出限可达到10 CFU/mL以内, 但绿色较浅, 肉眼判断有一定的误判可能; 在细菌浓度升高一个数量级后 (平均值为58 CFU/mL) 以后则显示明显的强阳性。



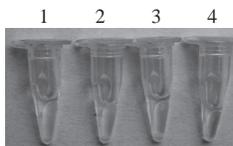
1~7.细菌浓度分别为 6.0×10^6 、 6.0×10^5 、 6.0×10^4 、 6.0×10^3 、 6.0×10^2 、 6.0×10^1 、 6.0×10^0 CFU/mL; 8.空白对照。

图5 酸土环脂芽孢杆菌LAMP检测灵敏度结果

Fig.5 Sensitivity of the LAMP method for *A. acidoterrestris*

2.5 食品样品检测结果

在添加酸土环脂芽孢杆菌的苹果汁、橙汁和菠萝汁均检测出酸土环脂芽孢杆菌阳性, 而未添加酸土环脂芽孢杆菌的果汁则为酸土环脂芽孢杆菌阴性, 证明本检测方法能够从食品中检出酸土环脂芽孢杆菌, 结果见图6。实验重复3次, 结果一致。

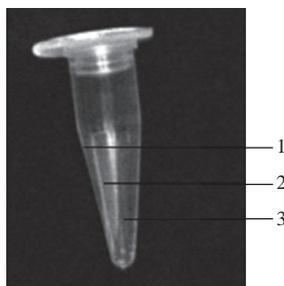


1. *A. acidoterrestris*苹果汁; 2. *A. acidoterrestris*橙汁; 3. *A. acidoterrestris*菠萝汁; 4.空白对照。

图6 加标果汁样品LAMP检测结果

Fig.6 Results obtained for the detection of spiked juice samples by the LAMP method

2.6 LAMP 专用反应管



1.染料室; 2.隔板; 3.反应室。

图7 LAMP专用反应管

Fig.7 Special reaction tube of LAMP

LAMP法由于产物浓度高, 后续染色的时候容易产生污染, 导致后续实验产生假阳性, 本研究采用特制的LAMP反应管, 如图6所示, 在普通的离心管中加设一隔板2, 将离心管分隔成小腔1和大腔3, 大腔作为反应室, 小腔中作为染料室, 反应结束后, 只需上下颠倒反应管即可染色, 不需开盖, 降低了污染概率。

3 讨论与结论

酸土环脂芽孢杆菌作为污染果汁的主要菌种受到人们的广泛关注。目前对于酸土环脂芽孢杆菌的检测手段仍停留在传统的分离培养和后续的生理生化鉴定上。传统的方法不但操作繁琐, 而且检测周期很长。PCR技术是目前一种微生物常用的快速检测方法, 有荧光定量PCR法^[6-9]和普通PCR法^[10-11], 但其检测过程需要PCR仪、电泳仪和凝胶成像系统等贵重仪器, 且对操作人员技术水平要求较高, 这些问题造成PCR技术难以在基层推广。LAMP弥补了PCR技术的不足, 不需要贵重仪器, 操作简便, 反应时间短, 适合推广; 目前很多研究已经采用LAMP检测, 如病原菌检测^[12-16]、病毒检测^[17-21]、寄生虫检测^[22-24]、转基因检测^[25]等。常见的LAMP产物的检测方法有浊度法、显色法、荧光法和凝胶电泳法; 浊度法分辨率较低, 荧光法和凝胶电泳法则需要相关设备, 本研究采用方便性和灵敏度俱佳的显色法检测, 在菌液浓度60 CFU/mL具有强阳性, 与Connor等^[26]的实时荧光定量PCR法的灵敏度相当。研究中采用煮沸法提取模板DNA, 并用其进行LAMP扩增, 结果均能检测出目的菌, 在保证方法特异性的前提下能达到方便、快速的目的。用该方法对食品中常见的致病菌做特异性检验, 均未出现假阳性结果, 显示了良好的特异性。LAMP法由于产物浓度高, 后续染色的时候容易产生污染, 导致后续的实验产生假阳性, 本研究采用特制的LAMP反应管, 不需开盖即可染色, 降低的终产物污染的概率。

综上所述, 本研究建立的酸土环脂芽孢杆菌LAMP检测方法, 具有特异性强, 灵敏度高, 方便、快捷, 成本低等特点, 适用于食品中酸土环脂芽孢杆菌的快速检测。

参考文献:

- [1] 胡怡椿, 岳出利, 袁亚宏, 等. 果汁中脂环酸芽孢杆菌(*Allicyclobacillus* spp.)的危害及其控制[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 364-368.
- [2] 国果. 2014浓缩苹果汁产业分析[J]. 农产品加工: 上, 2014(6): 20-21.
- [3] 孔德义, 董佳, 白小琼. 脂环酸芽孢杆菌的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(2): 39-42.
- [4] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63-69.
- [5] 史亚东, 董海聚, 王荣军, 等. 微小隐孢子虫LAMP检测方法的探索[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(12): 1195-1201.

- [6] 姜雪, 高玉伟, 胡桂学, 等. 猫杯状病毒荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2013, 51(5): 973-977.
- [7] 陈峰, 吴尔翔, 丁锁顺, 等. 二聚体蝎型探针荧光定量PCR快速检测志贺菌方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(9): 886-890.
- [8] SABRINA M, KELTHOUM M, STOYKA C, et al. Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable photobacterium phosphoreum bacteria in Salmon (*Salmo salar*) steaks[J]. Applied and Environmental Microbiol, 2013, 79(8): 2612-2619.
- [9] EIJI H, MASAOKI K, HIROYUKI K, et al. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan[J]. Water Research, 2010, 44(6): 1747-1752.
- [10] 耿伟光, 史成银, 李晋, 等. 同步检测海水养殖动物5种病原菌的扩增子拯救多重PCR(Arm-PCR)方法的建立与应用[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(9): 1125-1134.
- [11] 李宏, 吴海武, 孟凡同, 等. 基于gyrB基因的地衣芽孢杆菌PCR快速检测方法的建立[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2013, 31(3): 230-233; 239.
- [12] 董培培, 李长红, 丁文超, 等. 环介导等温扩增技术与横向流动试纸条法快速检测曼利斯顿氏菌的研究[J]. 水产科学, 2011, 30(2): 63-68.
- [13] 张宏伟, 张霞, 侯丽萍, 等. 环介导等温扩增技术检测乳粉中肺炎克雷伯菌[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2011, 44(2): 38-43.
- [14] PÉREZ-SANCHO M, GARCÍA-SECO T, ARROGANTE L, et al. Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 95(2): 489-494.
- [15] KEVIN W, MONALISA K, TOBIAS M. Evaluation of colorimetric detection methods for *Shigella*, *Salmonella*, and *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 77(4): 321-323.
- [16] LUO J, VOGEL R F, NIESSEN L. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of aflatoxigenic molds and their detection in food samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(3): 214-224.
- [17] PARK J, JUNG Y, KIL E J, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(1): 232-237.
- [18] SHIRO F, MASARU T, HIDEKAZU M, et al. Differential detection of Wheat yellow mosaic virus, Japanese soil-borne wheat mosaic virus and Chinese wheat mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 18(2): 348-354.
- [19] ARUNRUT N, KAMPEERA J, SUEBSING R, et al. Rapid and sensitive detection of shrimp infectious myonecrosis virus using a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and visual colorogenic nanogold hybridization probe assay[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(2): 542-547.
- [20] DENG X, QI X, GAO Y, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of reticuloendotheliosis virus[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 168(1): 82-86.
- [21] BHAT A I, SILJO A, DEESHMA K P. Rapid detection of *Piper* yellow mottle virus and cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(1): 190-196.
- [22] CHEN J H, LU F, LIM C S, et al. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Acta Tropica, 2010, 113(1): 61-65.
- [23] LIU A, GUAN G, DU P, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*[J]. Parasitology International, 2012, 61(4): 658-663.
- [24] WANG L X, HE L, FANG R, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene[J]. Veterinary Parasitology, 2010, 171(1): 159-162.
- [25] 闫兴华, 许文涛, 商颖, 等. 环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测转基因玉米LY038[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(5): 621-626.
- [26] CONNOR C J, LUO H L, GARDENER B B, et al. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99: 229-235.