

## 实验技术与方法

## 应用 LAMP 方法检测动物源性食品中沙门菌

何翠华<sup>1</sup> 刘志强<sup>1</sup> 王丹云<sup>1</sup> 孙启明<sup>2</sup> 黄纪徽<sup>1</sup>

(1. 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心,海南 海口 570311;

2. 海口市疾病预防控制中心,海南 海口 570203)

**摘要:**目的 运用两种方法对动物源性食品中沙门菌进行检测,找出一种更加快速、敏感、特异、简便的检验方法。方法 采集 60 份市售的禽、畜等生肉及 60 份奶制品,分别采用 LAMP 方法和国家标准方法 GB/T 4789.4—2008 对沙门菌进行分离与鉴定。结果 120 份采集样品中,LAMP 方法检出 2 例,阳性率 1.67%;国家标准方法检出 1 例,阳性率 0.83%。LAMP 方法的符合率为 99.2%,敏感性为 100%,特异性为 99.2%。结论 LAMP 检测法快速、特异、简便,该方法与国标法的阳性率差异无显著性。

**关键词:**环介导等温扩增技术;沙门菌;动物源性食品

中图分类号:R378.22;R155.55 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)05-0411-04

**Application of LAMP to Detect *Salmonella* in Animal Derived Foods**

HE Cui-hua, LIU Zhi-qiang, WANG Dan-yun, SUN Qi-ming, HUANG Ji-hui  
(Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Inspection and Quarantine  
Technology Center, Hainan Haikou 570311, China)

**Abstract: Objective** Using two methods of *Salmonella* in animal derived foods were detected, to find a more rapid, sensitive, specific, simple testing method. **Method** Collected from 60 commercial poultry, livestock and other raw meat and 60 dairy products, respectively using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method and the national standard method GB/T 4789.4—2008 to separate and identify of *Salmonella*. **Results** In the 120 samples, LAMP method detected two cases, the positive rate of 1.67%; national standard method detected one case, the positive rate of 0.83%. LAMP method of compliance was 99.2%, a sensitivity of 100% and specificity of 99.2%. **Conclusion** LAMP detection method is rapid, specific, simple. This method and the positive rate of national standard was no significant difference.

**Key words:** LAMP Method; *Salmonella*; Animal Derived Foods

沙门菌是最常见的食源性细菌病原体,引起沙门菌食物中毒的最主要原因是吃了未煮透的病死禽、畜肉或在屠宰后其他环节污染的禽、畜肉等。传统的沙门菌检测方法,由于其检测周期长、程序复杂等缺点已不能满足现代检测要求,因此研究沙门菌快速、有效的检测方法显得尤其重要。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法是一种简便、快速、高效的基因扩增法,与 PCR 反应相比,LAMP 反应最明显的优势是,在一般恒温条件下进行,所用设备简单、花费少,普通水浴锅或其他有稳定热源的装置就可以采用,不需要 PCR 所必需的精密温度循环装置,同时它的检测

灵敏度和特异性又能满足快速鉴定病原微生物的需要,可以节约成本<sup>[1]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

对海口市区的多家农贸市场市售的食品进行采样,共采集 60 份禽、畜等生肉及 60 份奶制品。冰块保存样品 2 h 内送达实验室,放置 4 ℃ 冰箱保存不超过 4 h。

#### 1.1.2 培养基和试剂

缓冲蛋白胨水(BPW)、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、四硫磺酸盐煌绿(TTB)增菌液、亚硫酸铋(BS)琼脂、HE 琼脂、三糖铁(TSI)琼脂、营养肉汤和营养琼脂购自北京陆桥技术有限公司,GNI<sup>+</sup>鉴定卡为法国生物梅里埃公司产品,沙门菌(A-F)O 多价

收稿日期:2010-05-06

作者简介:何翠华 女 助理工程师 研究方向为食品微生物检验

E-mail:hecuihua1203@163.com

血清为兰州生物制品研究所产品,LAMP试剂盒(含Sal反应液和Bst酶)为广州华峰生物有限公司产品,均在有效期内使用。

### 1.1.3 标准菌株

鼠伤寒沙门菌 CMCC50115,福氏志贺菌 CMCC6120513,金黄色葡萄球菌 CMCC26003,单核细胞增生李斯特菌 CMCC(B)54002-5,购自广东环凯微生物科技有限公司。

肠炎沙门菌 ATCC13076,伤寒沙门菌 ATCC14028,购自上海汉尼有限公司。

### 1.1.4 仪器

全自动微生物生化鉴定仪(VITEK-32)(法国生物梅里埃公司),高速冷冻离心机(德国Hettich公司),数显恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品的制备和选择性增菌

依据 GB/T 4789.4—2008《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法进行样品制备和选择性增菌。

### 1.2.2 传统培养法

依据 GB/T 4789.4—2008《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行分离、分纯、生化反应、血清学试验。

### 1.2.3 LAMP法

LAMP法按照试剂盒提供的检测程序进行。吸取1.2.1的增菌液1ml进行10000 r/min离心2 min,弃上清;加入80  $\mu$ l DNA提取液,混匀后沸水浴10 min,置冰上10 min;10000 r/min离心2 min,上清即为核酸模板。PCR反应管中加入Sal反应液和Bst酶的混合液22.5  $\mu$ l,再往反应管中加入30  $\mu$ l稳定液。往上述反应管内(稳定液面下)分别加入阴性对照、待检模板和阳性对照各2.5  $\mu$ l。置65  $^{\circ}$ C水浴恒温反应60 min。取出冷却至室温后加入2  $\mu$ l显色液,轻轻混匀即可观察。

### 1.2.4 人工污染食品中沙门菌检测

1.2.4.1 不同浓度菌液的制备 挑取3株不同的沙门菌标准菌株至营养肉汤中增菌,37  $^{\circ}$ C培养24 h,用生理盐水制成菌悬液,用比浊仪调整至约0.4麦氏单位,此液视为相当于 $10^8$  CFU/ml。依次再用无菌生理盐水10倍梯度稀释至 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/ml。

1.2.4.2 人工污染样的制备 将生猪肉及盒装牛奶2种食品样品按GB/T 4789.4—2008方法制成1:10稀释液。吸取1.2.4中制备好的 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/ml菌悬液各2.5 ml加入每一组1:10稀释液中,匀质后即成为 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  CFU/ml 3个浓度水

平的接种样,37  $^{\circ}$ C培养24 h后进行传统培养法及LAMP方法的检测。

### 1.2.5 特异性试验

1.2.5.1 菌悬液的制备 取鼠伤寒沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌按1.2.4.1的方法制成终浓度为 $10^3$  CFU/ml的菌悬液。

1.2.5.2 干扰样的制备 在100 ml的营养肉汤中分别按以下组合添加1.2.5.1菌悬液:鼠伤寒沙门菌+福氏志贺菌;鼠伤寒沙门菌+金黄色葡萄球菌;单核细胞增生李斯特菌+鼠伤寒沙门菌;志贺菌;鼠伤寒沙门菌。37  $^{\circ}$ C培养24 h后进行LAMP方法的检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养情况

样品分离菌在BS琼脂上棕褐色带金属光泽,周围培养基呈褐色;在HE琼脂上蓝绿色,中心带黑色;在TSI琼脂上,斜面产碱,底层产酸, $H_2S$ 阳性。

### 2.2 染色镜检

革兰染色为革兰氏阴性杆菌,无芽孢、荚膜。

### 2.3 生化反应

标准菌株(鼠伤寒沙门菌 CMCC50115)和样品分离菌的VITEK-32鉴定结果均为“很好的鉴定结果,沙门菌属,建议血清检测”。

### 2.4 血清学试验

标准菌株与生理盐水无凝集,与沙门菌(A-F)O多价血清发生凝集;样品分离菌做生理盐水对照无凝集,与沙门菌(A-F)O多价血清发生凝集。

### 2.5 LAMP试验

阴性对照反应管液体为橙色;阳性对照反应管液体为绿色的条件。样品反应管液体呈橙色则未检出沙门菌;样品反应管液体呈绿色则检出沙门菌。阴、阳性对照反应管符合检测判断的条件,本次试验结果有效。

### 2.6 人工污染食品样中沙门菌检测结果

从表1可见,采用LAMP方法检测生猪肉和盒装牛奶中的沙门菌,与传统方法相比,该方法检测沙门菌灵敏度可达到 $10^2$  CFU/ml。

### 2.7 特异性试验结果见表2

### 2.8 自然样品的检测结果

120份样品中,LAMP方法检出阳性样品2份,阳性率1.67%;国家标准方法检出1份,阳性率0.83%。LAMP方法与传统方法比较,差异无统计学意义。LAMP方法的符合率为99.2%,敏感性为100%,特异性为99.2%。见表3、表4。

表 1 人工污染食品样检测结果

沙门菌	浓度 (CFU/ml)	生猪肉		盒装牛奶	
		GB/T 4789.4	LAMP 方法	GB/T 4789.4	LAMP 方法
鼠伤寒沙门菌 CMCCS0115	10 <sup>3</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>2</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>1</sup>	检出	阳性	检出	阳性
肠炎沙门菌 ATCC13076	10 <sup>3</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>2</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>1</sup>	未检出	阴性	未检出	阴性
伤寒沙门菌 ATCC14028	10 <sup>3</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>2</sup>	检出	阳性	检出	阳性
	10 <sup>1</sup>	检出	阳性	检出	阳性

表 2 特异性实验结果

LAMP 结果	鼠伤寒沙门菌 + 志贺菌	鼠伤寒沙门菌 + 金黄色葡萄球菌	单核细胞增生李斯特菌 + 鼠伤寒沙门菌	鼠伤寒沙门菌	志贺菌
阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性

表 3 LAMP 方法与传统方法结果统计

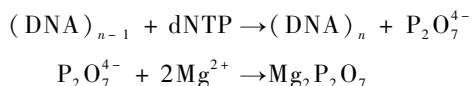
动物源性食品	数量(份)	传统方法		LAMP	
		阳性	阴性	阳性	阴性
生肉	60	1	59	2	58
乳制品	60	0	60	0	60
共计	120	1	119	2	118
检出率		0.83% (1/120)		1.67% (2/120)	

表 4 LAMP 方法的符合率、敏感性、特异性

传统方法阳性, LAMP 阴性(假阴)	传统方法阴性, LAMP 阳性(假阳)	传统方法阳性, LAMP 阳性(真阳性)	符合率(%)	敏感性(%)	特异性(%)
0	1	1	99.2% (1+118)/120	100% 1/(1+0)	99.2% 119/(119+1)

### 3 讨论

结果观察容易。LAMP 方法产物生成的反应式为



传统培养法受检测人员的主观因素(对选择性平板上菌落的判断)影响,易出现漏检;而 LAMP 方法扩增形成白色的焦磷酸镁盐沉淀,产物量大,结果观察十分方便,本次试验中使用的试剂盒则是添加了 Syber Green I 染料,通过直接观察荧光来判断是否有扩增产物出现,反应结束后混合液无沉淀时的颜色为橙色,生成沉淀时颜色会由橙色变为绿色。

LAMP 方法的敏感性高,特异性高。用 LAMP 方法在样品中检测出的沙门菌比传统方法多 1 株,即有 1 例假阳性,原因有两种可能:一是与分子生物学的高灵敏度有关,试验使用的 LAMP 试剂盒中说明书标明其检测的灵敏度为 15 CFU/test,本试验最终灵敏度达到 10<sup>2</sup> CFU/ml。目前的 PCR 方法检测沙门菌属大多将 *invA* 基因作为靶序列来设计引物,来达到减少沙门菌属内漏检的可能性<sup>[2]</sup>。LAMP 方法也是基于分子生物学建立起的一种快速检测方法,该技术依赖于能够识别靶序列上 6 个特异区域的 4 条特异引物和一种具有链置换特性的 DNA 聚

合酶,在恒温条件(65 ℃左右)下可高效、快速、高特异地扩增靶序列。Ohtsuka 等<sup>[3]</sup>利用 LAMP 方法检测鸡蛋中的沙门菌,试验证明,LAMP 方法比培养计数法和 PCR 方法检测的效率都高,110 个样本中,有 10% 的阳性样本 PCR 方法漏检,而 LAMP 方法对沙门菌阳性样本的检出率是 100%。二是传统培养只能检出活菌,而该方法只能确定样品中存在扩增片段,不能证实存在活菌,因此当结果为阳性时需通过培养法确认。鲁玉侠等<sup>[4]</sup>应用 EMA 与 LAMP 相结合的方法区分死菌与活菌,EMA-LAMP 技术是通过设计两对特定的引物即可检测样品中是否有活菌存在,EMA-LAMP 方法的灵敏度比 EMA-PCR 高 100 倍,为快速检测方法提供了一种新的思路。今后食品微生物检测技术的发展方向是:①提高检测效率,即方便、快速和大批量;②试验条件标准化;③检测的高精度和高灵敏度<sup>[5]</sup>。三是该方法为基因扩增方法,在检测过程可由于中器材的污染而出现假阳性。

检测周期短。传统方法对阴性样品检测最短也需要 4 d;而 LAMP 方法包括两次增菌在内只需 2 d。LAMP 方法从加样到观察结果只需不到 2 h,而张如胜等<sup>[6]</sup>更指出还可通过设计 2 条环引物可使反应速度提升 1/3 ~ 1/2。

仪器设备简单、价廉。PCR方法需要热循环,需要使用热循环反应和结果分析等精密、贵重的仪器设备,对实验条件要求苛刻;LAMP方法为等温扩增,只需一个简单的恒温器,无需电泳,结果分析通过肉眼观察,适合现场的快速筛选和应急事件的处理。

目前所使用的沙门菌传统分离培养方法,操作繁琐、费时,不适于食品和水源的卫生监测等;传统PCR检测方法对试验条件和检测人员技术要求较高,且存在扩增后电泳造成实验环境的污染。LAMP方法作为一种快速检测沙门菌的方法具有快速、特异、简便的优点,在与传统方法的比较中 $P > 0.05$ ,说明该方法与国标法的阳性率差异无显著性,但亦存在一定的缺陷,只能作为一种初筛方法。

## 参考文献

- [1] 王丽,李琳,石磊. 食源沙门菌 DNA 环介导恒温核酸扩增法检测[J]. 中国公共卫生,2009,25(2):255-256.
- [2] 欧新华,张如胜,宋克云,等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测沙门菌属方法的建立[J]. 实用预防医学,2008,15(6):1945-1947.
- [3] 王丽,石磊,李琳. DNA 环介导的恒温扩增法在快速鉴定病原微生物中的应用[J]. 生命的化学,2006,26(5):462-464.
- [4] 鲁玉侠,郭祀远,石磊,等. EMA-LAMP方法快速检测死/活的食源性沙门氏菌[J]. 食品科学,2009,30(22):324-327.
- [5] 杨小龙,陈朝琼. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 河北农业科学,2008,12(12):51-53.
- [6] 张如胜,魏泉. LAMP技术在病原微生物检测中的应用[J]. 华南预防医学,2007,33(5):45-49.

## 实验技术与方法

# 利用毛细管电泳法测定乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量的研究

孙国庆 康小红 刘卫星

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司研发中心,内蒙古 呼和浩特 011500)

**摘要:**目的 用毛细管电泳技术检测乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量。方法 将样品经缓冲液处理,选择直径为70  $\mu\text{m}$ ,有效长度600 mm的未涂层石英毛细管柱;柱温为40  $^{\circ}\text{C}$ ;缓冲溶液为柠檬酸缓冲液(pH为 $3.0 \pm 0.2$ );工作电压为27 kV;检测波长为214 nm;进样时间为5 s,进行检测。结果  $\beta$ -乳球蛋白回收率为75.2%~105.2%,相对标准偏差(RSD)为1.09%~3.10%;最低检出限为0.001 mg/ml。结论 该方法简便、准确、灵敏度高,是快速检测乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量较适合的分析方法。

**关键词:**毛细管电泳法;  $\beta$ -乳球蛋白; 乳制品

中图分类号:R446.62;TS252 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)05-0414-04

## Detection of $\beta$ -Lacto Globulin in Milk Products by Capillary Electrophoresis

SUN Guo-qing, KANG Xiao-hong, LIU Wei-xing

(Inner Mongolia Meng Niu Dairy Industry (Group) Co., Ltd R&D Center,  
Inner Mongolia Huhhot 011500, China)

**Abstract: Objective** To establish a capillary electrophoresis method for detecting the content of  $\beta$ -lacto globulin in dairy products. **Method** Samples were handled with buffers; an uncoated neutral capillary column in the diameter of 70  $\mu\text{m}$  and the effective length of 600 mm was used. The samples were detected under the condition of capillary temperature at 40  $^{\circ}\text{C}$ ; citric acid buffer solution at pH  $3.0 \pm 0.2$ , operating voltage at 27 kV, detection wavelength at 214 nm, and injection time for 5 s. **Results** The average recovery was 75.2% -105.2% and the relative standard deviation (RSD) was 1.09% -3.10% for  $\beta$ -lacto globulin. The detection limit was 0.001 mg/ml. **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive. It is suitable for fast screening and quantitative monitoring  $\beta$ -lacto globulin in dairy products.

收稿日期:2010-03-29

作者简介:孙国庆 男 研发员 研究方向为乳制品研究与开发 E-mail:sgqvictor@163.com

通信作者:康小红 女 工程师