

LAMP 实时浊度法快速检测大肠杆菌方法的建立与优化研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.02.008

陈柱 贺子瑜 何农跃
邓燕 李松

湖南工业大学
生物医用纳米材料与器件
湖南省重点实验室
湖南 株洲 412007

摘要: 根据大肠杆菌的特异性基因 (*malB*), 设计与筛查环介导等温扩增 (LAMP) 的引物, 通过对甜菜碱用量、环引物的浓度、反应温度、dNTPs 用量等反应条件的优化, 得到较佳的 LAMP 反应体系, 建立了 LAMP 实时浊度法快速检测大肠杆菌; 在较优条件下, 先后对 9 株非大肠杆菌菌株进行特异性检测和 5 株大肠杆菌的进行同源性检测。此外, 结合课题组自行研制的多通道浊度仪, 对 LAMP 扩增产物进行实时浊度监测。结果表明: LAMP 实时浊度法检测大肠杆菌的灵敏度达 16.010 ng/L, 与实时荧光定量 PCR 的检测限相当。因此, 建立与优化 LAMP 实时浊度法可为食品中大肠杆菌的现场快速检测提供了有力手段。

关键词: 环介导等温扩增; 大肠杆菌; 实时浊度检测

中图分类号: TP273 **文献标志码:** A

文章编号: 1674-7100(2019)02-0052-07

引用格式: 陈柱, 贺子瑜, 何农跃, 等. LAMP 实时浊度法快速检测大肠杆菌方法的建立与优化研究 [J]. 包装学报, 2019, 11(2): 52-58.

1 研究背景

大肠埃希氏菌又名大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*), 于 1885 年被发现, 在相当长的时间内一直被认为是正常寄生于人和动物肠道的非致病菌, 直到 20 世纪中叶, 人们逐渐意识到一些特殊血清型大肠杆菌具有病原性^[1]。其中, 大肠杆菌 O157:H7 的致病性较强, 它属于肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC), 可引发出血性结肠炎, 进而转变为溶血性尿毒综合征

(hemolytic uremic syndrome, HUS) 和血小板减少性紫癜, 严重者可导致死亡^[2]。目前, *E.coli* 是检测食品是否受到污染的指标, 也是卫生检测的重要指示菌种^[3]。

传统分离培养方法是检测 *E.coli* 的常用标准, 但其检测时间长, 操作繁琐, 易受环境和其他因素影响, 难以适应快速便捷检测的需求^[4]。而核酸技术的出现, 特别是以聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 为代表的变温核酸扩增技术在食源性致病菌检测方面发挥着重大作用^[5-6]。虽然 PCR 检测方法操作

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 湖南省重点研发计划基金资助项目 (2017SK2174), 国家自然科学基金资助项目 (61871180), 中国博士后科学基金一等资助项目 (2018M630498)

作者简介: 陈柱 (1986-), 男, 湖南衡阳人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事分子诊断技术及器件方面的研究,
E-mail: chenzhu220@163.com

通信作者: 邓燕 (1971-), 女, 湖南武冈人, 湖南工业大学教授, 博士, 主要从事生物传感器与生物分析方面的研究,
E-mail: hndengyan@126.com

简单, 能实现高灵敏检测目的, 但其需要借助高精密的仪器设备, 不便于基层推广。

2000年, 日本学者 Notomi T. 等^[7]发明的新型核酸体外扩增技术, 即环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术。其扩增原理是根据在靶基因的 8 个区域设计出 6 条引物 (包括两条内引物, 两条外引物和两条环引物), 再利用一种链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在恒温条件下 (60~65 °C) 保温 60 min (环引物的增加可使保温时间缩短至 30 min 左右), 即可完成核酸扩增反应。LAMP 扩增产物的检测方法主要包括: SYBR Green I 检测、可视化焦磷酸镁的浊度检测、琼脂糖电泳检测^[8-9]。DNA 在复制过程中, 每个脱氧核苷三磷酸 (deoxynucleoside triphosphate, dNTP) 分子结合到 DNA 链上时会解离下一个焦磷酸根离子 (pyrophosphate ion, PPi), 而 PPi 与反应液中的镁离子结合产生白色沉淀焦磷酸镁, 由于 DNA 在短时间内即可发生 $10^9\sim 10^{10}$ 倍模板扩增, 从而形成大量的焦磷酸镁沉淀, 致使溶液出现浑浊, 经离心处理后肉眼即可判定扩增结果。Chen Z. 等^[10]研制了多通道浊度检测系统, 利用反应中产生的沉淀与扩增反应进程具有一定的线性关系, 通过检测反应中产生的沉淀实现对核酸的半定量检测。

LAMP 技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上均能媲美甚至优于 PCR 技术, 且可以不依赖高精密的仪器设备实现现场快速检测, 检测成本也远低于实时荧光定量 PCR^[11]。V. Pal 等^[12]利用日本荣研公司生产 Loopamp® 实时浊度检测系统检测血液中的病原体, 可最低检测到血样中 1 pg 的病原体基因组和 5.5×10^3 CFU/mL 的病原体。Ye L. 等^[13]利用 LAMP 实时浊度法检测食品中的单核细胞增生李斯特菌, 检测灵敏度为 6.4×10^3 CFU/mL。张蕴哲^[14]利用实时荧光环介导等温扩增技术快速检测肠出血性大肠杆菌 O157, 检测限可达到 5.1 CFU/mL 等。

LAMP 技术与其他分子生物学方法相比, 具有较高的灵敏度。E. Yokoyama 等^[15]报道了 LAMP 扩增技术与 PCR 扩增相比具有较高灵敏度。LAMP 技术的灵敏度与很多因素有关, 在不同的试验中检测灵敏度存在较大差别, 其可能与引物设计时选择的靶基因不同有关, 也可能与反应体系中化学试剂、酶活性、金属离子浓度有关。靶基因的选择与实验的成功实施有直接关系。目前, 在食品致病菌方面报道的大肠杆

菌基因有 *stx*^[9]、*fliC*^[16]、*rfbE*^[17] 和 *LT*^[18], 本研究选择的 *malB* 基因具有高度保守性, 可以特异性地扩增出大肠杆菌, 并通过对 LAMP 体系的反应温度、环引物的浓度、dNTPs 及甜菜碱的用量等条件进行优化, 建立一种 LAMP 快速检测大肠杆菌的方法, 并对该方法的灵敏度和特异性进行评价, 以实现大肠杆菌的半定量检测。

2 实验

2.1 实验原料及仪器

2.1.1 菌株

本研究所用菌种包括 5 株大肠杆菌目标菌株和金黄葡萄球菌等 9 株非目标菌株, 菌株信息详见表 1。

表 1 实验所用菌株

Table 1 All strains for test

序号	菌株编号	菌种
1	CICC 10421	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
2	CICC 10411	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
3	ATCC 35150	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> O157: H7
4	CICC 10899	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
5	CMCC 44817	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
6	CICC 10786	金黄葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
7	ATCC 12344	化脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>
8	ATCC 6633	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
9	ATCC 14485	嗜热乳酸链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>
10	ATCC 9027	铜绿假单胞菌 <i>Seudomonas aeruginosa</i>
11	CICC 21298	赫氏埃希氏菌 <i>Escherichia hermannii</i>
12	ATCC 12344	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>
13	CICC 10010	多粘类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus ploymyxa</i>
14	CICC 10011	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>

2.1.2 主要试剂

10 倍浓度的 LAMP Buffer 缓冲液、Pfu DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL5000、电泳上样缓冲液、引物、甜菜碱、柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒等均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 2 倍浓度的 talent qPCR premix (SYBR Green) 荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Bst DNA 聚合酶购自 New England Biolabs (北京) 有限公司。

2.1.3 主要仪器

凝胶成像系统, Gel Doc XR+ 型, 购自上海伯乐生命医学产品有限公司 (BIO-RAD); 实时荧光定量 PCR 仪, LightCycler 96 型, 购自美国罗氏 (Roche)

公司;普通PCR仪(6331型)、核酸蛋白测定仪(D30型)和高速离心机(5424D型)均购自德国艾本德Eppendorf公司;LAMP多通道浊度仪,实验室研制。

2.2 实验方法

2.2.1 引物设计与合成

根据GenBank公布的大肠杆菌麦芽糖孔蛋白的*malB*基因序列(GenBank NC_019072.1),设计两套各3对引物,分别包括内引物FIP(forward inner primer)和BIP(backward inner primer)、外引物F3(forward outer primer)和B3(backward outer primer)、环引物loopF和loopB,详细信息见表2。

表2 *malB*基因的LAMP反应引物序列信息

Table 2 LAMP primer sequence information of *malB* gene

引物	序列信息(5' -3')
FIP	GTTTGTGCGGACCGTCTGGCTGGTCTCAAGCCCGGC AATC
BIP	TTCGATACCACGACCTCGCCCCAAAGGGAGAAGGG CATGG
F3	CCGTTTCTCACCGATGAACA
B3	GCTGTGATGACAGGTTGTT
loopF	CGGTAAATCGACTTTACTGCGC
loopB	TTTTCAGCTGTACGCTCG

2.2.2 DNA模板的制备

将大肠杆菌菌株接种于LB(Luria-Bertani)培养基上,37℃下过夜培养,并将培养好的菌株按照柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒说明书要求进行基因组DNA的提取。利用核酸蛋白快速分析仪测定所提取基因组DNA的浓度与纯度(用A260/A280值表示),并将基因组DNA于-20℃保存备用。

2.2.3 LAMP反应体系的优化

LAMP反应体系由内引物(FIP/BIP)、外引物(F3/B3)、环引物(loopB/loopF)、Bst DNA聚合酶、LAMP Buffer缓冲液、dNTPs、甜菜碱、双蒸水(ddH₂O)和目标核酸组成。本研究通过固定某些反应参数,如选用1 μL浓度为0.2 μmol/L的F3/B3,1 μL浓度为1.6 μmol/L的FIP/BIP,Bst DNA聚合酶用量为1 μL,LAMP Buffer缓冲液用量为2.5 μL,DNA模板用量为2 μL,补充ddH₂O至反应体系总体积为25 μL;然后对反应温度、环引物的浓度、dNTPs(浓度为10 mmol/L)及甜菜碱(浓度为4 mol/L)体积用量等条件进行优化(见表3),确定

最佳反应体系。

表3 LAMP反应体系条件优化

Table 3 Condition optimization of LAMP reaction system

反应温度 / ℃	环引物浓度 / (μmol·L ⁻¹)	dNTPs 体积 / μL	甜菜碱体积 / μL
57	0	1	0
59	0.2	2	1
61	0.4	3	2
63	0.6	4	3
65	0.8	5	4

如表3所示,LAMP反应温度设置在57~65℃之间,按照2℃梯度递增;将环引物浓度、dNTPs及甜菜碱用量分别设置5个梯度。在其他条件固定的前提下,保持等量模板和一个变量进行试验,取5.0 μL的LAMP扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,确定最佳的反应条件。

2.2.4 LAMP特异性验证

利用优化后的反应条件,对5株大肠杆菌目标菌株和金黄葡萄球菌等9株非目标菌株进行LAMP扩增,将产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,验证LAMP方法的特异性。

2.2.5 实时荧光定量PCR检测大肠杆菌

实时荧光定量PCR的反应体系如下:talent qPCR premix的体积为12.5 μL,浓度为10 μmol/L外引物F3和B3的体积均为0.75 μL,2 μL的DNA模板(将质量浓度为1.601 mg/L的模板按10倍浓度梯度稀释至1.601 ng/L),最后补充ddH₂O至总体积为25 μL。将整个反应体系在95℃条件下解链3 min;然后在95℃下解链5 s,60℃下结合10 s,72℃下延伸15 s,此三步执行45个循环;最后通过实时荧光定量PCR仪,分析实验结果。

2.2.6 实时浊度检测大肠杆菌

取适量提取好的基因组DNA,测定其质量浓度为160.100 mg/L,A260/A280值为1.88。从DNA质量浓度为16.010 mg/L开始,按10倍浓度梯度将其稀释至1.601 ng/L。将模板DNA加入优化后的体系中,结合LAMP实时浊度仪检测该方法的灵敏度,并与实时荧光定量PCR比较。

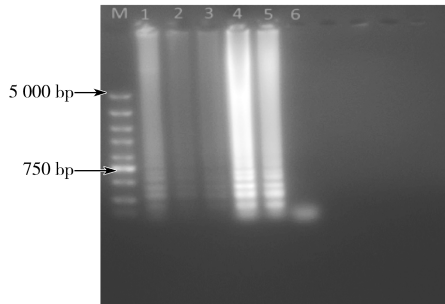
3 结果与分析

3.1 LAMP反应体系的优化

3.1.1 反应温度

为了探究反应温度对LAMP扩增效率的影响,

如 2.2.3 所述, 本研究在固定某些反应参数的基础上, 选用 1 μL 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的环引物, 2 μL 浓度为 4 mol/L 的甜菜碱, 3 μL 浓度为 10 mmol/L 的 dNTPs; 通过改变 LAMP 的反应温度, 利用凝胶电泳成像获得实验结果, 如图 1 所示。



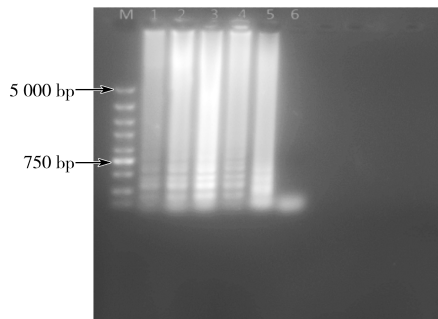
M: 100~5 000 bp DNA marker; 1: 57 $^{\circ}\text{C}$; 2: 59 $^{\circ}\text{C}$;
3: 61 $^{\circ}\text{C}$; 4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 65 $^{\circ}\text{C}$; 6: 阴性对照组。

图 1 不同反应温度对大肠杆菌 LAMP 反应的影响
Fig. 1 Effect of different reaction temperatures on LAMP reactive in *E. coli*

由图 1 可知, LAMP 的最佳反应温度是 63 $^{\circ}\text{C}$ 。在此温度下反应, 得到的条带最亮, 表明反应效率最好, 这是因为酶有最适宜的反应温度, 不同的反应温度下酶的活性不同, 温度过低酶的活性无法完全激活, 过高则会使酶失去活性, 因而 LAMP 扩增效率与反应温度有着较大的联系。

3.1.2 环引物的浓度

为了探究环引物浓度对 LAMP 扩增效率的影响, 本研究选用 2 μL 浓度为 4 mol/L 的甜菜碱, 3 μL 浓度为 10 mmol/L 的 dNTPs, LAMP 反应条件为: 63 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min, 再 80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 终止反应。通过改变环引物的浓度, 利用凝胶电泳成像获得实验结果, 如图 2 所示。



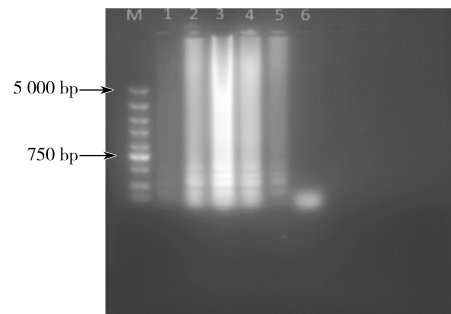
M: 100~5 000 bp DNA marker; 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.2 $\mu\text{mol/L}$;
3: 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 4: 0.6 $\mu\text{mol/L}$; 5: 0.8 $\mu\text{mol/L}$; 6: 阴性对照组。

图 2 不同环引物浓度对大肠杆菌 LAMP 反应的影响
Fig. 2 Effect of different loop primer concentrations on LAMP reactive in *E. coli*

由图 2 可知, LAMP 所需的最佳环引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。在此反应条件下, 得到的条带最亮, 表明其反应效率最好, 这是因为环引物的浓度与 LAMP 反应的“哑铃型”部分有关, 合适的环引物浓度不仅能缩短 LAMP 反应时间, 还能增加反应效率。

3.1.3 dNTPs 的用量

为了探究 dNTPs 对 LAMP 扩增效率的影响, 本研究选用 1 μL 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的环引物, 2 μL 浓度为 4 mol/L 的甜菜碱, LAMP 反应条件为: 63 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min, 再 80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 终止反应。通过改变 dNTPs 的用量, 利用凝胶电泳成像获得实验结果, 如图 3 所示。



M: 1000~5 000 bp DNA marker; 1: 1 μL ; 2: 2 μL ;
3: 3 μL ; 4: 4 μL ; 5: 5 μL ; 6: 阴性对照组。

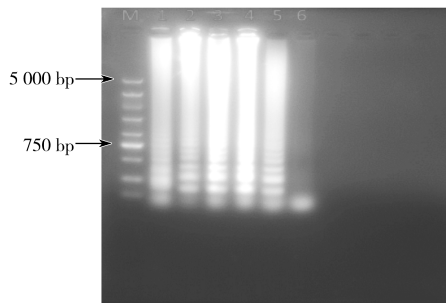
图 3 dNTPs 用量对大肠杆菌 LAMP 反应的影响
Fig. 3 Effect of different dNTPs concentrations on LAMP reactive in *E. coli*

由图 3 可知, LAMP 所需 dNTPs 的最佳体积为 3 μL 。在此反应条件下, 得到的条带最亮, 表明反应效率最好, 这是因为 dNTPs 的浓度与反应过程中链的延伸有关, 浓度过低会导致扩增反应提前终止, 过高则会导致非特异性扩增。

3.1.4 甜菜碱的用量

为了探究甜菜碱对 LAMP 扩增效率的影响, 本研究选用 1 μL 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的环引物, 3 μL 浓度为 10 mmol/L 的 dNTPs, LAMP 反应条件为: 63 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min, 再 80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 终止反应。通过改变甜菜碱的用量, 利用凝胶电泳成像获得实验结果, 如图 4 所示。

由图 4 可知, LAMP 所需甜菜碱的最佳体积为 2 μL 。在此反应条件下, 得到的条带最亮, 表明反应效率最好, 这是因为甜菜碱的浓度与酶的活性有关, 甜菜碱浓度过高时会与反应中的金属离子相互作用, 从而抑制酶的活性。



M: 100~5 000 bp DNA marker; 1: 0 μL ; 2: 1 μL ;
3: 2 μL ; 4: 3 μL ; 5: 4 μL ; 6: 阴性对照组。

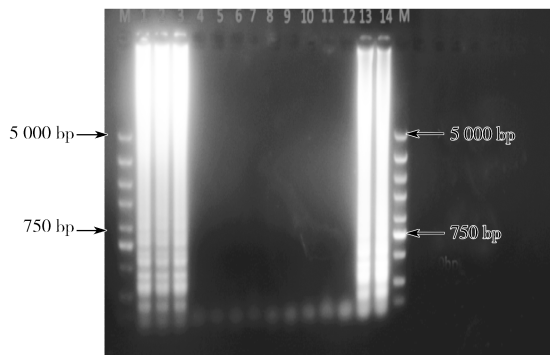
图4 甜菜碱用量对大肠杆菌 LAMP 反应的影响

Fig. 4 Effect of different betaine concentrations on LAMP reactive in *E. coli*

综上, 本研究确定大肠杆菌最佳的 LAMP 反应体系(除固定参数外): 3 μL 浓度为 10 mmol/L 的 dNTPs, 2 μL 浓度为 4 mol/L 的甜菜碱, 环引物的浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 反应体系在 63 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 60 min, 再 80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 终止反应。

3.2 LAMP 特异性验证

利用上述实验得到的 LAMP 最佳反应条件, 对大肠杆菌和非目标菌等 14 种菌株进行 LAMP 扩增, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测, 实验结果如图 5 所示。



M: 100~5 000 bp DNA marker; 1, 2, 3, 13, 14: 大肠杆菌;
4: 金黄葡萄球菌; 5: 化脓链球菌; 6: 枯草芽孢杆菌;
7: 嗜热乳酸链球菌; 8: 铜绿假单胞菌; 9: 赫氏埃希氏菌; 10:
化脓链球菌; 11: 多粘类芽孢杆菌; 12: 苏云金芽孢杆菌。

图5 LAMP 对 5 株大肠杆菌的同源性和 9 株非目标菌株的特异性验证

Fig. 5 Homology verification of five *E. coli* and specificity of nine non-*E. coli* by LAMP

从图 5 可以看出, 5 株大肠杆菌扩增出清晰的阶梯状条带, 9 株非目标菌株均未出现扩增条带, 由此说明利用 *malB* 基因建立的 LAMP 反应体系, 可以扩增大多数的大肠杆菌属, 而对非目标菌株保持较好的

特异性。

3.3 灵敏度分析

本研究结合测定仪器, 分别对大肠杆菌建立了实时荧光定量 PCR 检测和 LAMP 实时浊度法检测, 其检测结果如图 6~7 所示。

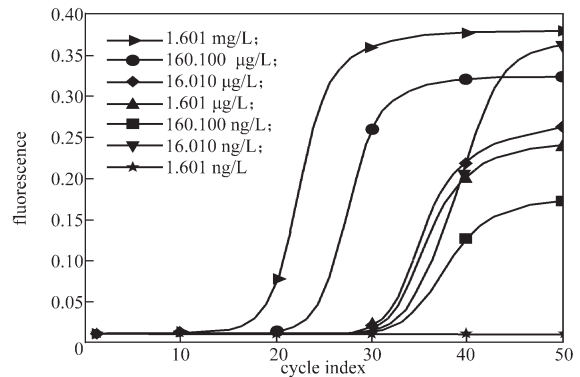


图6 实时荧光定量 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 6 Results of real-time fluorescence quantitative PCR sensitivity

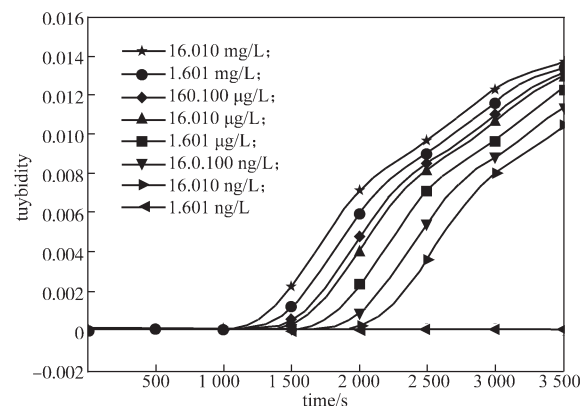


图7 实时浊度 LAMP 灵敏度检测结果

Fig. 7 Results of real-time turbidity LAMP sensitivity test

从图 6~7 可以看出, 实时荧光定量 PCR 与 LAMP 实时浊度法的检测限均为 16.010 ng/L, 继续稀释至 1.601 ng/L 时, 两者均不能检测到目标核酸。实验结果表明 LAMP 实时浊度法与实时荧光定量 PCR 的检测限相当, LAMP 实时浊度法对大肠杆菌的检测亦具有较高的灵敏度。

4 结论

本研究针对大肠杆菌的 *malB* 基因设计 LAMP 特异引物, 通过对 LAMP 体系的反应温度、环引物的浓度、dNTPs 及甜菜碱的用量等条件进行优化, 建立 LAMP 实时浊度法检测大肠杆菌, 该方法具有以

下特点:

1) 通过仪器可以对大肠杆菌的扩增过程进行实时监测, 有效避免开盖过程引起的核酸交叉污染, 从而出现假阳性结果;

2) 实验所需设备要求低, 操作简单。LAMP 反应只需要恒温器, 甚至水浴锅即可完成反应, 与 PCR 相比, 无需昂贵的检测设备;

3) 特异性强, 灵敏度高。本研究所建立的 LAMP 实时浊度法的检测限为 16.010 ng/L, 能够准确地检测出大肠杆菌, 为食品中大肠杆菌现场快速检测提供了一种可靠的手段。

参考文献:

- [1] 何晓华, 顿玉慧, 卢力, 等. 环介导等温扩增技术在肠杆菌科致病菌检测中的研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(19): 312-317.
HE Xiaohua, DUN Yuhui, LU Li, et al. Recent Progress in Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Enterobacteriaceae Pathogens[J]. Food Science, 2014, 35(19): 312-317.
- [2] 樊杰, 伏小平. O157:H7 型大肠杆菌荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(1): 15-19.
FAN Jie, FU Xiaoping. Establishment of Fluorescent Quantitative PCR Assay for Detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(1): 15-19.
- [3] 韩小姣, 黄正. 自来水消毒对内毒素及微生物处理效果分析 [J]. 中国公共卫生, 2016, 32(2): 215-217.
HAN Xiaojiao, HUANG Zheng. Effect of Disinfection Treatment on Endotoxin and Microorganism in Drinking Water in Wuhan City[J]. Chinese Journal of Public Health, 2016, 32(2): 215-217.
- [4] GABRIEL A A. Combinations of Selected Physical and Chemical Hurdles to Inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in Apple and Orange Juices[J]. Food Control, 2015, 50: 722-728.
- [5] 马凯, 白羽, 陈尔凝, 等. 鲜猪肉中沙门和金葡萄球菌荧光定量 PCR 检测 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 117-122.
MA Kai, BAI Yu, CHEN Erning, et al. Real-Time PCR Assay for *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Pork[J]. Food Research and Development, 2015, 36(17): 117-122.
- [6] 许一平. 多重 PCR 检测沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
XU Yiping. Study on the Detection of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.
- [7] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [8] 吕恒, 张锦海, 顾海涛, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的快速可视化检测 [J]. 东南国防医药, 2013, 15(4): 321-324.
LÜ Heng, ZHANG Jinhai, GU Haitao, et al. A Quicker and Visual Method for Detecting *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157: H7[J]. Military Medical Journal of Southeast China, 2013, 15(4): 321-324.
- [9] 洪艳, 贺凡, 王晓闻. LAMP 检测沙门氏菌方法的建立 [J]. 山西农业科学, 2014, 42(4): 340-342.
HONG Yan, HE Fan, WANG Xiaowen. Detection of *Salmonella* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2014, 42(4): 340-342.
- [10] CHEN Z, YANG T, YANG H W, et al. A Portable Multi-Channel Turbidity System for Rapid Detection of Pathogens by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2018, 14(1): 198-205.
- [11] 梁玉林, 刘秀, 丁梦璇, 等. 环介导等温扩增技术在典型食源性致病菌检测中的应用进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18): 219-224.
LIANG Yulin, LIU Xiu, DING Mengxuan, et al. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification in the Detection of Typical Foodborne Pathogens[J]. Food Research and Development, 2017, 38(18): 219-224.
- [12] PAL V, SAXENA A, SINGH S, et al. Development of a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Burkholderia mallei*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): e32-e39.
- [13] YE L, LI Y, ZHAO J, et al. Development of a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Sensitive and Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(1): 85-90.
- [14] 张蕴哲. 快速检测肠出血性大肠杆菌 O157 实时荧光环介导等温扩增技术的建立 [D]. 保定: 河北农业大学, 2016.
ZHANG Yunzhe. Establishment of Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification

- Technology for Rapid Detection of *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2016.
- [15] YOKOYAMA E, UCHIMURA M, ITO K. Detection of *Enterotoxigenic Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(6): 1064-1072.
- [16] 易海华, 赵金伟, 徐波, 等. 使用环介导等温扩增技术快速检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的初步研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 206-213.
- YI Haihua, ZHAO Jinwei, XU Bo, et al. Rapid Detection of *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157:H7 in Food by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22(3): 206-213.
- [17] 梁磊. 环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测牛肉中大肠杆菌 O157 的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- LIANG Lei. Study on a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Beef[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2011.
- [18] 张小飞, 张召军, 张广州, 等. 产肠毒素大肠杆菌快速检测方法的建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(5): 31-35.
- ZHANG Xiaofei, ZHANG Zhaojun, ZHANG Guangzhou, et al. Establishment and Evaluation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay in Detection of *Enterotoxigenic Escherichia coli*[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2013, 21(5): 31-35.

(责任编辑: 李玉华)

Establishment and Optimization of LAMP Real-Time Turbidity Method for Rapid Detection of *Escherichia coli*

CHEN Zhu, HE Ziyu, HE Nongyue, Deng Yan, LI Song

(Hunan Key Laboratory of Biomedical Nanomaterials and Devices, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: According to the specific gene (*malB*) of *Escherichia coli* (*E.coli*), the primers of loop mediated isothermal amplification (LAMP) were designed and screened, and the optimum LAMP reaction system was obtained by optimizing the reaction conditions such as betaine dosage, concentration of loop primer, reaction temperature and dNTPs dosage. Then the optimal method was established for rapid detection of *E.coli* by LAMP real-time turbidity method. In the optimal conditions, 9 strains of non-*Escherichia coli* strains were tested for specificity and 5 strains of *Escherichia coli* were tested for homology. Moreover, using the multichannel turbidity device developed by the research group, the produce of LAMP could be real-time monitored. The results showed that the sensitivity of *E.coli* was 16.010 ng/L, in line with the detection limit of real-time fluorescence quantitative PCR. Therefore, the optimization and establishment of real-time turbidity LAMP method could provide a powerful approach to rapid field-detection of *E.coli* in food.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification; *E.coli*; real-time turbidity detection