

EMA-LAMP 方法快速鉴别检测单增李斯特菌

吕淑霞, 徐彬, 于晓丹, 金雪花, 林英

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 作者建立一种将叠氮溴化乙锭 (ethidium bromide monoazide, EMA) 结合环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 的新分析方法 (EMA-LAMP), 快速鉴别检测单增李斯特菌。通过对单增李斯特菌 *hly* 基因的六个区域设计 4 条 LAMP 特异性引物, EMA-LAMP 在 63 °C 下反应 1 h, 检测单增李斯特菌的死活细胞。结果表明, 在浓度为 2.0×10^8 CFU/mL 的单增李斯特死菌悬液中, 使 EMA 激活光解进入死细胞中且与 DNA 结合的最佳曝光时间至少为 20 min, 不抑制活菌细胞 DNA 的 LAMP 扩增的最大 EMA 质量浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, 而抑制死菌细胞 DNA 的 LAMP 扩增的最小 EMA 质量浓度为 $4.0 \mu\text{g/mL}$; 活菌细胞的检出限为 20 CFU/mL。

关键词: 单增李斯特菌; EMA-LAMP; 快速鉴别检测; 死活细胞

中图分类号: TQ 920.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)09—0951—06

Rapid Detection and Discrimination Viable Cell of *Listeria monocytogenes* by EMA-LAMP Assay

LU Shu-xia, XU Bin, YU Xiao-dan, JIN Xue-hua, LIN Ying

(College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Viable cells of *Listeria monocytogenes* could be selectively discriminated from dead cells by applying Ethidium bromide monoazide (EMA) cooperated into loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. The EMA-LAMP method was used for the rapid detection and identification of foodborne pathogene *Listeria monocytogenes*. The amplification can be obtained in an hour under the isothermal condition at 63 °C by designing four LAMP specifically primers from the six different sequences on the *hly* gene. The EMA-LAMP assay discriminated the viable and dead cells of *Listeria monocytogenes*. The result showed that the optimized light exposure time to achieve cross-linking of DNA by the EMA in dead cells and to photolyse the free EMA in solution was at least 20 min, and the use of $10 \mu\text{g/ml}$ or less of EMA did not inhibit the LAMP amplification of DNA derived from viable cells, but the minimum concentration of EMA to

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(201102196); 沈阳市大型科学仪器设备共享服务专项项目(090009)。

作者简介: 吕淑霞(1963—), 女, 辽宁瓦房店人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物生物化学与分子生物学方面的研究。Email: lushuxia@hotmail.com

completely inhibit the LAMP amplification of DNA derived from dead cells was 4.0 $\mu\text{g/ml}$; a detection limit of the assay for the viable cells was 20 CFU/ml.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, EMA-LAMP, rapid detection and identification, viable and dead cells

细胞增生性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)属于李斯特氏菌属(*Listeria*),是一种重要的人畜共患病原菌,由于其在自然界分布广泛,极易通过污染食品传播,感染人和动物引起食源性李斯特菌病,使易感人群产生腹泻发热,严重的导致脑膜炎、败血症、流产等,死亡率高达20%~30%^[1]。在北美平均每年有500人死于此病,因此美国和欧盟对此污染非常重视,对即食性食品检出率要求为零。传统的检测方法费时、费力且灵敏度低,多重PCR^[2]、RT-PCR等虽有较高的特异性和敏感性,但需要特殊的仪器设备,不适合在基层推广。此外,在基因水平食源性病原菌检测方面,死菌DNA的存在通常会导致检测结果高于样品中活菌的实际含量。因此,建立快速准确的检测方法意义极为重要。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,简称LAMP)是2000年开发的一种新的核酸扩增方法,针对靶基因的六个区域设计4条LAMP特异性引物,利用一种链置换DNA聚合酶(*Bst* DNA Polymerase)在恒温条件(65 $^{\circ}\text{C}$ 左右)下保温约60 min进行扩增^[3],仅需普通水浴锅即可。叠氮溴化乙锭(ethidium bromide monoazide,EMA)作为一种DNA结合染料,能够渗透到细胞壁(膜)不完整的菌体内,在光激活的条件下,易形成氮宾化合物与DNA结合^[4-5],从而抑制死细胞DNA的扩增,而对活细胞的DNA不起作用,可以有效避免在基因检测中因死菌的存在而对样品污染活菌的高估。已有EMA-LAMP技术成功用于其他病原菌检测的报道^[6-7]。作者在前人研究采用LAMP技术和建议用染料的基础上,使用叠氮溴化乙锭成功提高检测灵敏度,并且通过选择EMA浓度避免了污染性,使检测方法既快速又简易,且灵敏度高、特异性强,为食品安全该领域的检测技术提出了新方法,适合于基层使用。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂与仪器

1.1.1 实验菌株 本研究共采用9株菌株,其中包

括2株单增李斯特菌标准菌株ATCC19111和ATCC19115(阳性菌株),7株非单增李斯特菌(阴性菌株),均为作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 EMA、betaine:美国Sigma公司;dNTPs、DL2000 DNA Marker、LAMP引物:TAKARA宝生物(大连)工程有限公司;Lysozyme:宝泰克生物科技公司;Proteinase K:Roche公司;*Bst* DNA Polymerase, Large Fragment:New England Biolabs公司;电泳仪水平板电泳槽及附件JY600C:北京君意东方电用仪器有限公司;凝胶成像系统UNIVERSAL HOOD -S.N.76S/03822:Bio-Rad公司;500 W卤钨灯:沈阳艺沈器化玻站;立式压力蒸汽灭菌锅LDZX-30KBS:上海申安医疗器械厂;数显恒温水浴锅HH-4:国华电器有限公司;移液枪:Eppendorf公司。

1.2 方法

1.2.1 单增李斯特菌的培养和处理 将单增李斯特菌ATCC19111接种于胰酪胨大豆酵母浸膏培养基(TSA-YE)中,过夜培养(37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min)。取10 mL对数生长期的菌悬液于10 000 r/min离心1 min。菌悬浮在10 mL 0.85%的生理盐水中,10 000 r/min离心1 min。生理盐水稀释使菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL,菌悬液留作检测用。

1.2.2 LAMP反应引物设计与合成 根据GenBank数据库中的单增李斯特菌*hly*基因序列,利用在线LAMP引物设计软件PrimerExplorer V4进行分析,在其保守序列中的六个不同位点设计了4条引物:外引物*hly*-F3、*hly*-B3,内引物*hly*-FIP、*hly*-BIP。内引物*hly*-FIP由F1C通过TTTT连接物与F2相连而组成,内引物*hly*-BIP为B1C通过TTTT连接物与B2相连而组成。引物委托TAKARA宝生物(大连)工程有限公司合成。引物设计原理见图1,引物序列见表1。

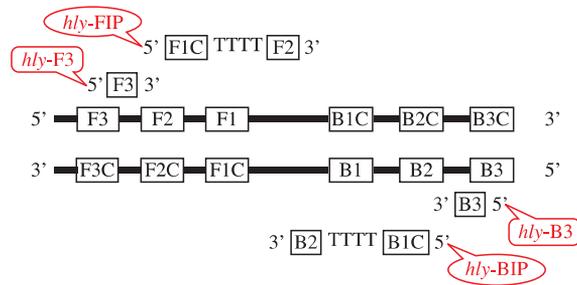


图1 LAMP引物设计原理

Fig.1 Schematic representation of the primer design for EMA-LAMP assay

表1 LAMP引物序列

Tab.1 Nucleotide sequence of primer sets designed for EMA-LAMP assay

靶基因	引物名称	寡核苷酸序列(5'→3')
hly	F3	AAAGCTGCTTTTGACGCT
	B3	ATAGGCAATGGGAACTCCT
	FIP	CACCGTAAATTACGGCTTTGAAG GTTTTCCGTAAGTGGGAAATCTGTC
	BIP	TCATCGACGGTAACCTCGGATTTTCCG GTAAAAGTAGCACCTT

1.2.3 模板DNA的提取 取菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL的菌悬液 $500 \mu\text{L}$ 于 1.5 mL 离心管中, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min ,弃上清液,收集菌体;向每管加入 $90 \mu\text{L}$ ddH₂O重悬,加入 $6 \mu\text{L}$ Lysozyme(50 mg/mL),用枪头混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 15 min ;加入 $4 \mu\text{L}$ Proteinase K(20 mg/mL),振荡数秒,置于 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅内孵育 45 min ;接着 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 8 min ,使酶失活; $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min ,取上清液备用。

1.2.4 LAMP反应体系与产物检测 LAMP反应总体积为 $25 \mu\text{L}$: 0.2 mmol/L 的 hly-F3和 hly-B3, 0.8 mmol/L 的 hly-FIP和 hly-BIP, 4 mmol/L 的 MgSO₄, $1 \times$ ThermoPol Reaction Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100,pH 8.8, $25 \text{ }^\circ\text{C}$), 1.6 mmol/L 的 dNTPs, 1 mol/L 的 betaine, 8 U Bst DNA Polymerase, $2 \mu\text{L}$ 模板DNA,加 ddH₂O至 $25 \mu\text{L}$ 。轻弹混匀, $63 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温反应 1 h 后, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 10 min 。同时设立阴性对照,用 ddH₂O 取代模板DNA,其它反应条件不变。取 $3 \mu\text{L}$ 反应产物与 $1 \mu\text{L}$ $6 \times$ Loading Buffer混匀后点样于 1 g/dL 琼脂糖凝胶(含

溴化乙锭)中, 150 V 电泳 35 min 后于凝胶成像系统中成像,观察扩增产物是否呈阶梯状条带。如果为阳性反应,则产生典型的阶梯状条带,如果为阴性反应,则无条带产生^[8-9]。

1.2.5 热处理杀死菌细胞 取 0.85% 的生理盐水处理的 $500 \mu\text{L}$ 菌悬液放于 1.5 mL 离心管中, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 8 min 。待菌悬液冷却至室温,涂平板,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h ,以确保热处理的菌被完全杀死。

1.2.6 EMA-LAMP检测的特异性试验 用 ddH₂O 溶解EMA,配制成 1 mg/mL 母液,用锡箔纸包裹于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。EMA为致癌物质,操作时注意安全。取 $20 \mu\text{L}$ 质量浓度为 0.1 mg/mL 的EMA溶液分别加入含有 $500 \mu\text{L}$ 菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL的单增李斯特菌 ATCC19111和 ATCC19115以及7株非单增李斯特菌的离心管中,混匀并于黑暗下室温放置 5 min ,后放在冰上,每 5 min 补充一次冰,距 500 W 卤钨灯 16 cm ,曝光 20 min 。按照1.2.3方法提取DNA,作为LAMP反应的DNA模板进行LAMP扩增和电泳检测,验证其特异性。

1.2.7 不同浓度EMA对死菌DNA的LAMP扩增影响 分别向含有浓度为 2.0×10^8 CFU/mL的 $500 \mu\text{L}$ 热杀死菌悬液中加入浓度为 0.1 mg/mL 的EMA溶液,使EMA的终质量浓度分别为 $0, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 8.0, 10 \mu\text{g/mL}$,混匀并于黑暗下室温放置 5 min ,后放在冰上,每 5 min 补充一次冰,防止温度升高,距 500 W 卤钨灯 16 cm ,曝光 25 min 。按照1.2.3方法提取DNA,作为LAMP反应的DNA模板进行LAMP扩增和电泳检测。

1.2.8 不同浓度EMA对活菌DNA的LAMP扩增影响 分别向含有浓度为 2.0×10^8 CFU/mL的 $500 \mu\text{L}$ 活菌悬液中加入 1 mg/mL 的EMA母液,使EMA终质量浓度分别为 $0, 2.0, 4.0, 8.0, 10, 20, 40, 80 \mu\text{g/mL}$,混匀并于黑暗下室温放置 5 min ,然后放在冰上,每 5 min 补充一次冰,距 500 W 卤钨灯 16 cm ,曝光 25 min 。按照1.2.3方法提取DNA,作为LAMP反应的DNA模板进行LAMP扩增和电泳检测。

1.2.9 EMA曝光时间的优化 取 $20 \mu\text{L}$ 质量浓度为 0.1 mg/mL 的EMA溶液,分别加入含有 $500 \mu\text{L}$ 菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL的活菌和热杀死菌的离心管中,混匀并于黑暗下室温放置 5 min ,然后放在冰上,每 5 min 补充一次冰,距 500 W 卤钨灯 16

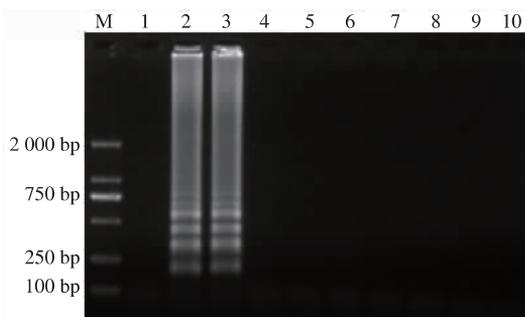
cm, 曝光时间分别为 0、5、10、15、20 min。按照 1.2.3 方法提取 DNA, 作为 LAMP 反应的 DNA 模板进行 LAMP 扩增和电泳检测。

1.2.10 EMA-LAMP 检测的灵敏度试验 取 20 μL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的 EMA 溶液, 分别加入含有 500 μL 菌浓度依次为 2.0×10^7 、 2.0×10^6 、 2.0×10^5 、 2.0×10^4 、 2.0×10^3 、 2.0×10^2 、 2.0×10^1 、 2.0×10^0 CFU/mL 的活菌悬液的离心管中, 混匀并于黑暗下室温放置 5 min, 后放在冰上, 每 5 分钟补充一次冰, 距 500 W 卤钨灯 16 cm, 曝光 20 min。按照 1.2.3 方法提取 DNA, 作为 LAMP 反应的 DNA 模板进行 LAMP 扩增和电泳检测, 检测其灵敏度。

2 结果与分析

2.1 EMA-LAMP 检测的特异性评价

EMA-LAMP 方法检测结果显示, 两株单增李斯特菌标准菌种均出现 LAMP 的特征性条带, 而 7 株非单增李斯特菌及阴性对照均未出现 LAMP 条带。上述结果表明, EMA-LAMP 方法检测单增李斯特菌具有很好的特异性, 见图 2。



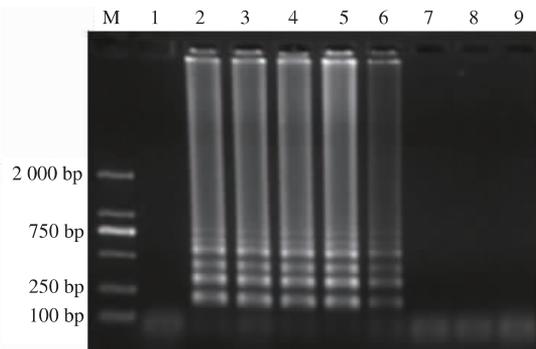
M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: ATCC19111; 3: ATCC19115; 4: 副溶血弧菌; 5: 大肠杆菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 伤寒沙门氏菌; 8: 创伤弧菌; 9: 芽孢杆菌; 10: 热带假丝母

图 2 EMA-LAMP 的特异性检测结果

Fig.2 Specificity of amplification results by EMA-LAMP

2.2 抑制死菌 DNA 的 LAMP 扩增的最小 EMA 质量浓度

不同浓度 EMA 处理菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL 的热杀死的单增李斯特菌后, LAMP 反应可扩增出特异性的阶梯状条带, EMA 质量浓度在 0.2~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内, 扩增产物的电泳条带逐渐减弱; 当 EMA 质量浓度大于等于 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 无扩增产物出现。因此抑制死菌 DNA 的 LAMP 扩增的最小 EMA 质量浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 见图 3。

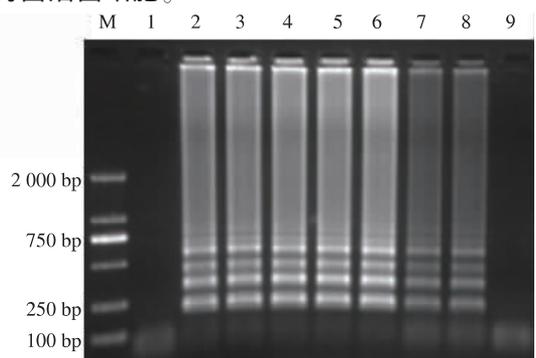


M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 未加EMA; 3: 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4: 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5: 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6: 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7: 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 8: 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 3 不同质量浓度 EMA 对死菌 DNA 的 LAMP 扩增影响
Fig.3 Effect of the differential concentration of EMA on the LAMP for DNA from heat killed bacterial cells

2.3 不抑制活菌 DNA 的 LAMP 扩增的最大 EMA 质量浓度

不同浓度 EMA 处理菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL 的单增李斯特菌活菌细胞后, LAMP 反应都能扩增出特异性的阶梯状条带, EMA 质量浓度在 2~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内, 扩增产物的电泳条带几乎无变化; EMA 质量浓度在 10~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 扩增产物的条带逐渐减弱; 但当 EMA 质量浓度大于等于 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 无扩增产物出现; 所以不抑制活菌 DNA 的 LAMP 扩增的最大 EMA 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 见图 4。因此作者采用质量浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EMA 检测单增李斯特菌活菌细胞。



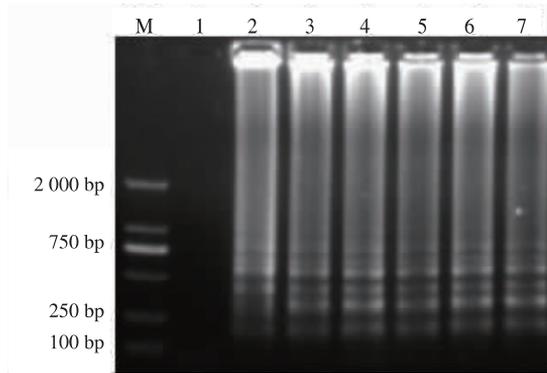
M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 未加EMA; 3: 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4: 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5: 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 8: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9: 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 4 不同质量浓度 EMA 对活菌 DNA 的 LAMP 扩增的影响
Fig.4 Effect of the differential concentration of EMA on the LAMP for DNA from viable bacterial cells

2.4 EMA 激活光解的最佳曝光时间

利用 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMA 处理菌浓度为 2.0×10^8

CFU/mL 的单增李斯特菌活菌细胞,在 500 W 卤钨灯下曝光 0~20 min,LAMP 反应均能够扩增出特异性的阶梯状条带且条带亮度几乎无变化,所以EMA 的曝光时间对活菌 DNA LAMP 扩增无影响,见图5。



M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 0 min; 3: 1 min; 4: 5 min; 5: 10 min; 6: 15 min; 7: 20 min

图5 EMA 的曝光时间对活菌 DNA LAMP 扩增的影响
Fig.5 Effect of the light exposure time on achieving complete photolysis of free EMA in suspensions of viable bacterial cells

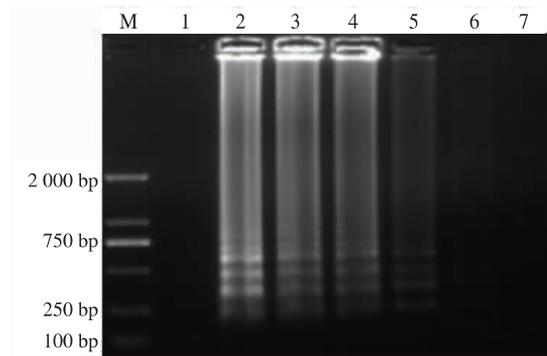
同样,利用 4 $\mu\text{g/mL}$ EMA 处理菌浓度为 2.0×10^8 CFU/mL 的热杀死的单增李斯特菌,在 500 W 卤钨灯下进行曝光 0~20 min,LAMP 反应能够扩增出特异性的阶梯状条带;曝光时间在 0~10 min,扩增产物的条带逐渐减弱;当曝光时间为 15 min 时,条带明显减弱;当日落光时间为 20 min 时,没有扩增条带。所以 EMA 激活光解的最佳曝光时间为 20 min,见图 6。因此作者建立 EMA-LAMP 鉴别检测单增李斯特菌死活菌细胞时,确定 EMA 曝光时间为 20 min。

2.5 EMA-LAMP 检测的灵敏度评价

随着活菌细胞数目的减少,LAMP 的阶梯状条带也逐渐减弱,到活菌浓度为 2.0×10^0 CFU/mL 时,不再出现 LAMP 条带,因此 EMA-LAMP 方法检测活的单增李斯特菌的检出限是 20 CFU/mL,见图 7。

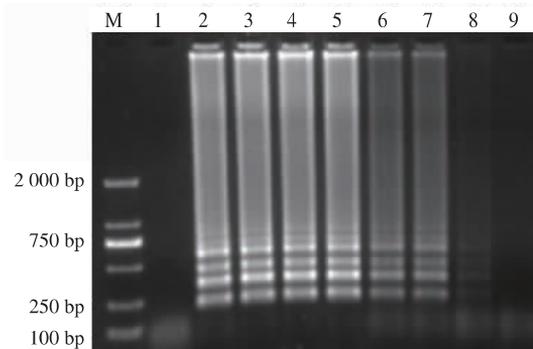
3 结语

本研究表明:抑制活菌 LAMP 扩增的 EMA 质量浓度要大于 $10 \mu\text{g/mL}$,与 Lee 和 Levin^[10]研究的抑制活菌 PCR 扩增的结果相符。抑制死菌 LAMP 扩增的最小 EMA 质量浓度为 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 。Gu 和 Levin^[11]研究的抑制类志贺单胞菌死菌细胞的最小 EMA 质量浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$,Lee 和 Levin^[10]研究的抑制死菌



M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 0 min; 3: 1 min; 4: 5 min; 5: 10 min; 6: 15 min; 7: 20 min

图6 EMA 的曝光时间对死菌 DNA LAMP 扩增的影响
Fig.6 Effect of the light exposure time on activating the DNA-bound EMA and on achieving complete photolysis of free EMA in suspensions of heat killed bacterial cells



M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 2.0×10^7 CFU/mL; 3: 2.0×10^6 CFU/mL; 4: 2.0×10^5 CFU/mL; 5: 2.0×10^4 CFU/mL; 6: 2.0×10^3 CFU/mL; 7: 2.0×10^2 CFU/mL; 8: 2.0×10^1 CFU/mL; 9: 2.0×10^0 CFU/mL

图7 EMA-LAMP 的灵敏度检测结果

Fig.7 Sensitivity of amplification results by EMA-LAMP

PCR 扩增的最小 EMA 质量浓度为 $0.8 \mu\text{g/mL}$,Wang 和 Levin^[12]研究的抑制死菌 PCR 扩增的最小 EMA 质量浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 。因此 EMA-LAMP 检测某种食源性致病细菌死活细胞时,必须选择最佳 EMA 质量浓度。试验结果证明 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 足以抑制 2.0×10^8 CFU/mL 死菌细胞的扩增,而对活菌细胞的扩增无影响。

利用 EMA 与 LAMP 检测相结合的技术,不仅可以有效区分单增李斯特菌病原菌的死活细胞,而且检测单增李斯特菌活菌细胞的灵敏度可达到 20 CFU/mL。同时,EMA-LAMP 法与 EMA-PCR 法、

EMA-实时荧光 PCR 等^[13-15]相比,不需要使用 PCR 等昂贵、精密的仪器设备,避免了 DNA 的热变性、长时间的温度循环等步骤,反应更迅速、操作更简

便、检测成本更低,为单增李斯特菌的快速鉴别检测提供了新的发展方向,有望成为简易的常规检测手段,尤其适用于基层检测和现场检测。

参考文献:

- [1] Mengaud J, Vicente M F, Chenevert J, et al. Expression in *Escherichia coli* and analysis of the *Listeiolysin* determinant of *Listeria monocytogenes*[J]. **Infect Immun**, 1998, 56: 766-772.
- [2] 王娜,陶妍. 水产品三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 397-402.
WANG Na, TAO Yan. Establishment of a multiplex PCR for detection of three types of pathogen in aquatic foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 397-402. (in Chinese)
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuehi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. **Nucleic Acids Research**, 2000, 28(12): e63.
- [4] Nocker A, Ching-ying C, Camper A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2006, 67: 310-320.
- [5] Walters C, Bolkan H, Luo L X, et al. Quantification of viable cells of clavibacter *Michiganensis subsp. Michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay[J]. **Plant Pathology**, 2008, 57: 332-337.
- [6] 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.
LU Yu-xia, GUO Si-yuan, SHI Lei, et al. Rapid detection of live/dead *Salmonella* via EMA-LAMP method[J]. **Food Science**, 2009, 30(22): 324-327. (in Chinese)
- [7] 李月,王丽,钟青萍,等. DNA 染料结合环介导等温扩增技术检测志贺氏菌死活细胞[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 216-219.
LI Yue, WANG Li, ZHONG Qing-ping, et al. Differentiation of the viable and dead cells of *Shigella* by loop-mediated isothermal amplification with a DNA binding dye[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011, 32(8): 216-219. (in Chinese)
- [8] Hisatoshi K, Tomohiro I, Koki A, et al. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005, 43: 3290-3296.
- [9] Hayashi N, Arai R, Tada S, et al. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method[J]. **Food Microbiology**, 2007, 24 (7-8): 780-785.
- [10] Lee J L, Levin R E. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2006, 67: 456-462.
- [11] Gu W M, Levin R E. Quantification of viable *Plesiomonas shigelloides* in a mixture of viable and dead cells using ethidium bromide monoazide and conventional PCR[J]. **F B T**, 2007, 21: 145-159.
- [12] Wang S S, Levin R E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2006, 64: 1-8.
- [13] Knut R, Birgitte M, Signe M D, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(2): 1018-1024.
- [14] Lee J L, Levin R E. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2009, 79: 184-188.
- [15] Nocker A, Camper A K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide [J]. **Applied and Environment Microbiology**, 2006, 72: 1997-2004.