

# 环介导等温扩增技术快速检测沙门菌

朱胜梅, 吴佳佳, 徐驰, 屈炯, 成炜, 陈福生

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种在等温条件下高特异、高效、快速地扩增靶序列的DNA扩增新技术。以沙门菌(*Salmonella* spp.)为研究对象,根据其特异性的*invA*基因,设计了一套特异性引物对该基因进行了LAMP,同时优化了其反应条件,建立了沙门菌的LAMP快速检测技术。结果表明,LAMP的最佳反应条件为外引物浓度5 pmol/L、内引物浓度40 pmol/L,  $Mg^{2+}$ 浓度6 mmol/L, dNTP浓度0.8 mmol/L,甜菜碱浓度0.8 mmol/L, *Bst* DNA聚合酶8 U,反应温度63 °C,反应时间1 h。在此条件下,LAMP检测沙门菌DNA的敏感度达10 fg/反应,且与其他常见的细菌无交叉反应。其对牛奶样品的检出量为 $10^2$  cfu/mL,适合于食品中污染沙门菌的快速检测。

**关键词:** 环介导等温DNA扩增; LAMP; 沙门菌; 快速检测

中图分类号: TS207.4; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0725-06

## Rapid Detection of *Salmonella* spp. by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

ZHU Sheng-mei, WU Jia-jia, XU Chi, QU Jiong, CHENG Wei, CHEN Fu-sheng

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstracts:** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel DNA amplification technology which amplifies DNA with high specificity, efficiency, and rapidity under isothermal conditions. According to the specific *invA* gene of *Salmonella* spp., a set of specific primers were designed to amplify the special DNA sequences by LAMP. Moreover, the reaction conditions of LAMP were optimized. The results showed that the optimal concentrations of inner primers, exogenous primers,  $Mg^{2+}$ , dNTP, betaine, *Bst* DNA polymerase, reaction temperature and reaction time were 40 pmol/L, 5 pmol/L, 6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.8 mmol/L, 8 U, 63 °C and 1h, respectively. Under those conditions, the detection limit for *Salmonella* spp. DNA template was 10 fg/tube and no cross reaction with other usual bacteria was found. For *Salmonella* spp. in milk products, the detection limit of the method was  $10^2$  cfu/mL. So this method was suitable for rapid detection of *Salmonella* spp. in contaminated foods.

**Key words:** loop-mediated isothermal amplification; LAMP; *Salmonella* spp.; rapid detection

沙门菌(*Salmonella* spp.)是一类革兰氏阴性杆菌,能引起人胃肠炎、伤寒、败血症等症状<sup>[1]</sup>。根据国家食源性疾病监测网的统计资料显示,食品中污染的微生物是引起食源性疾病的主要因素之一。近十年来,在我国由微生物引起的食源性疾病事件中,沙门菌始终是最常见和最主要的病原因子,尤其在生肉及熟食制品中<sup>[2]</sup>。因此,检测和控制食品中的沙门菌对有效控制其传播和预防食物中毒非常重要。目前沙门菌的检测方法主要依赖于传统的细菌分离鉴定方法,一般需要4~5 d,比较费时费力,而免疫扩散法、免疫荧

收稿日期: 2008-02-29

作者简介: 朱胜梅(1983-),女,在读硕士,主要从事食品微生物与食品安全方面的研究

通讯作者: 陈福生,教授,博士生导师

光法及酶联免疫吸附试验等方法,在操作程序、检测时间、特异性等方面尚不理想<sup>[3]</sup>。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型DNA扩增技术<sup>[4]</sup>。它依赖于一套针对靶基因的4条引物(包括一组内引物FIP和BIP,以及一组外引物F3和B3),利用具有链置换活性的*Bst* DNA聚合酶,在63 °C左右的恒温条件下即可完成对靶基因的特异性扩增。LAMP反应是针对一个目标基因的6个区段设计4条引物进行的DNA扩增,特异性高;其反应温度恒定,不需要PCR仪;反应只需要8~10个拷贝的模板DNA,在60 min以内就能扩增 $10^9$ ~ $10^{10}$ 倍的产物,快速高效<sup>[5]</sup>。另外,在LAMP反应过程中,从dNTPs中析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的镁离子结合,能产生焦磷酸镁的

沉淀物,出现浑浊沉淀,因此用肉眼就判定扩增结果,无需电泳<sup>[6]</sup>。所有这些特性都为其在快速检测食品及临床样品中沙门菌中的应用奠定了基础。

目前,国外关于 LAMP 的研究很多,日本已研制出专门用于 LAMP 检测的实时监控浊度仪,可以实现对 LAMP 扩增过程的全程实时监控<sup>[7]</sup>,而在国内关于 LAMP 方法的报道比较少,2007 年上海水产大学建立了副溶血弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus*) 的 LAMP 检测方法<sup>[8]</sup>,程天印等建立了嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的 LAMP 检测方法<sup>[9]</sup>。本研究以重要的食源性病原微生物沙门菌为研究对象,根据沙门菌的特

异性基因 *invA*, 成功设计了一套沙门菌的 LAMP 引物,并优化了其反应条件,建立了快速、特异、灵敏的检测沙门菌的 LAMP 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

部分常见的食源性病原菌菌株,共 25 株,用于分析引物的特异性,它们的编号及来源如表 1。其中,沙门菌 CMCC50051 用于 LAMP 条件优化及其灵敏度分析的实验。

表 1 实验所用菌株及其 LAMP 反应特异性

Table 1 Examined strains in this study and their specificity of LAMP assay

序号 No.	菌株 Bacterial species	菌株编号 Strain serial	来源 Origin	LAMP 反应特异性结果 Specificity of LAMP assay
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	本实验室保藏菌株	-
2	<i>S. aureus</i> (SEA)	HZFS3001	本实验室保藏菌株	-
3	<i>S. aureus</i> (SEB)	HZFS3002	本实验室保藏菌株	-
4	<i>S. aureus</i>	HZFS3003	湖北省疾病预防控制中心	-
5	<i>S.aureus</i>	HZFS3004	本实验室保藏菌株	-
6	<i>Shigella flxneri</i>	HZFS4001	本实验室保藏菌株	-
7	<i>Shigella sonnei</i>	HZFS4002	本实验室保藏菌株	-
8	<i>Shigella dysenteriae</i>	HZFS4003	本实验室保藏菌株	-
9	<i>Salmonella enteritidis</i>	HZFS1001	湖北省疾病预防控制中心	+
10	<i>Salmonella choleraesuis</i>	HZFS1002	湖北省疾病预防控制中心	+
11	<i>Salmonella derby</i>	HZFS1003	湖北省疾病预防控制中心	+
12	<i>Salmonella agona</i>	HZFS1004	湖北省疾病预防控制中心	+
13	<i>Salmonella spp.</i>	HZFS1005	本实验室保藏菌株	+
14	<i>Salmonella spp.</i>	HZFS1006	本实验室保藏菌株	+
15	<i>Salmonella spp.</i>	HZFS1007	本实验室保藏菌株	+
16	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC50051	武汉市疾病预防控制中心	+
17	<i>Escherichia coli</i>	HZFS2001	本实验室保藏菌株	-
18	<i>E. coli</i>	HZFS2002	本实验室保藏菌株	-
19	<i>E.oli</i> O <sub>157</sub>	HZFS2003	本实验室保藏菌株	-
20	<i>pseudomonas aeruginosa</i>	HZFS5001	本实验室保藏菌株	-
21	<i>Bacillus cereus</i>	HZFS5002	本实验室保藏菌株	-
22	<i>Bacillus subtilis</i>	HZFS5003	本实验室保藏菌株	-
23	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	HZFS5004	本实验室保藏菌株	-
24	<i>Listeria spp.</i>	HZFS5005	本实验室保藏菌株	-
25	<i>Listeria monocytogenes</i>	HZFS5001	湖北省疾病预防控制中心	-

注: +: LAMP 反应阳性结果/LAMP positive result; -: LAMP 反应阴性结果/LAMP negative result.

#### 1.1.2 试剂

*Bst* DNA 聚合酶大片段 (*Bst* DNA polymerase

large fragment), 以下简称为 *Bst* DNA 聚合酶, New England Biolab, dNTP, 美国 Genview 公司; DNA

Marker, 大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖, 西班牙 Biowest 公司; 溴化乙锭 (EB), 甜菜碱 (betaine), Sigma 公司。

1.1.3 仪器

核酸蛋白质分析仪, 德国 Whatman Biometra 公司; DYY-8C 电泳仪, 北京六一仪器厂; 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; GL200 凝胶成像系统, 美国 Eastman Kodak 公司; Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司, 数显恒温水浴锅 HH-2, 国华电器有限公司, 恒温摇床, 武汉瑞华仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

采用引物设计软件 Primer Explorer 4.0, 根据沙门菌 *invA* 基因, 进行引物设计, 得到一套引物, 包括外引物 F3 (forward primer) 和 B3 (backward primer) 以及内引物 FIP (forward inner primer) 和 BIP (backward inner primer), 如表 2。引物委托北京奥科生物技术有限公司合成。

表 2 沙门菌 *invA* 基因的 LAMP 引物

Table 2 Primers of *invA* gene of *Salmonella* spp. for LAMP assay

引物 Primer	长度(bp) Length	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
F3	20	TGTTACGGCTATTTTGACCA
B3	18	TCGAGATCGCCAATCAGT
FIP	41	AGAGTACGCTTAAAACCACC- GATTTCAATGGGAACTCTGCC
BIP	38	TAGCGCCGCCAAACCTAAAA- CCTAACGACGACCCTTCT

1.2.2 细菌 DNA 提取

将营养琼脂斜面上的细菌接种乳糖肉汤 (LB), 37 °C 培养 18 h。取细菌培养物 1 mL 于 12000 r/min 离心 5 min; 沉淀用 0.8 mL 1×TE (100 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗涤, 12000 r/min 离心 5 min, 沉淀加入 100 μL 无菌水, 混匀后, 于 100 °C 沸水浴 15 min, 立即冰浴 5 min, 12000 r/min 离心 5 min, 上清液即为 DNA 模板。

1.2.3 LAMP 反应条件优化

以沙门菌 CMCC50051 的 DNA 为模板, 对 LAMP 反应条件进行优化。初始反应条件 (25 μL) 包括 10×LAMP buffer (200 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 100 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0% Tritonx-100) 2.5 μL, 20 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 5 μL, 10 mmol/L dNTP 2.5 μL, betaine 0.8 mmol/L, 10 μmol/L FIP 和

BIP 各 2 μL, 5 μmol/L F3 和 B3 各 0.5 μL, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 反应温度 63 °C, 反应时间 1 h。然后根据预实验室结果对 Mg<sup>2+</sup> 浓度、dNTP 浓度、引物浓度比和反应时间等因素进行优化。

1.2.4 LAMP 产物电泳检测

取 2 μL LAMP 扩增产物加 0.5 μL 溴酚蓝混匀, 以 DNA Marker 作相对分子质量指示, 用 2.0% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μg/mL) 在 100 V 电压下电泳 30 min, 于凝胶成像系统中分析结果。

1.2.5 LAMP 敏感性测定

测定供试菌株 CMCC50051 的 DNA 浓度, 分别以超纯水 10 倍梯度稀释, 每个梯度各取 2 μL 加入反应管中, 使反应体系中沙门菌 DNA 的量分别为 100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、0.1 fg, 以超纯水作为阴性对照, 电泳分析 LAMP 的结果。

1.2.6 沙门菌污染的牛奶样品的 LAMP

取供试菌株沙门菌 CMCC 50051 接种至营养肉汤中, 37 °C 培养 18 h。1 mL 培养液接种于牛奶样品中, 于缓冲蛋白胨水增菌液中 37 °C 150 r/min 增菌培养 18 h (GB/T4789.4-2003)。按照方法 1.2.2 提取 DNA, 采用 LAMP 分析, 以没有接种沙门菌的牛奶样品作为阴性对照。同时, 稀释平板计数增菌液中的沙门菌。

2 结果与分析

2.1 LAMP 引物的设计及其特异性分析

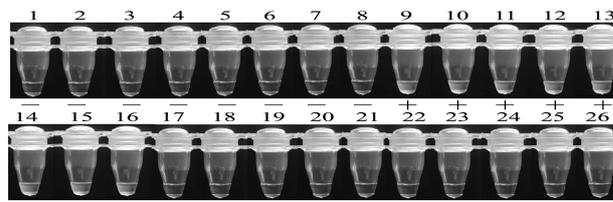


图 1 引物特异性实验浊度比较

Fig.1 Turbidity of LAMP reaction system using specific primers.

Note: Lane 1-25: DNA templates as shown in Table 1; lane 26: ddH<sub>2</sub>O.

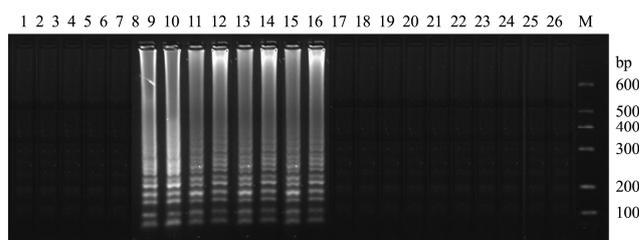


图 2 引物特异性实验凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoretogram of LAMP-amplified DNA using specific primers

Note: Lane 1-25: DNA templates as showed in table 1; lane 26; ddH<sub>2</sub>O; M: DNA marker.

以表 2 设计的引物, 对供试菌株(表 1) 分别进行 LAMP。结果显示, 供试的沙门菌反应管均出现浑浊(图 1), 电泳后有扩增条带, 而其它非沙门菌菌株反应管未出现浑浊, 电泳也未见扩增条带(图 2)。表明所设计的引物有较好的特异性。

## 2.2 LAMP 反应条件优化

按 1.2.1 反应体系进行 LAMP 反应, 在此基础上, 分别对 Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTP 浓度、引物浓度比以及反应时间进行优化, 实验结果如下。

### 2.2.1 Mg<sup>2+</sup>浓度对 LAMP 反应的影响

由于 Mg<sup>2+</sup>浓度影响引物及酶的活性, 所以研究了 Mg<sup>2+</sup>浓度从 2~16 mmol/L 对 LAMP 的影响, 结果见图 3。

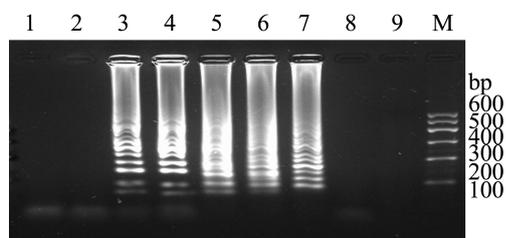


图 3 Mg<sup>2+</sup>浓度对 LAMP 反应的影响

Fig.3 Effect of Mg<sup>2+</sup> concentration on the LAMP reaction

Note: lane 1-8: 2 mmol/L, 4 mmol/L, 6 mmol/L, 8 mmol/L, 10 mmol/L, 12 mmol/L, 14 mmol/L, 16 mmol/L; lane 9: negative control; M: DNA marker.

从图 3 可看出, 在 Mg<sup>2+</sup>浓度为 6 mmol/L 时就可得到均一、稳定、清晰的扩增条带, 这与所报道的 Mg<sup>2+</sup>浓度在 4-8 mmol/L 相符合<sup>[3,6]</sup>。

### 2.2.2 dNTP 浓度对 LAMP 反应的影响

测定了 dNTP 浓度从 0~1.6 mmol/L 对 LAMP 反应的影响, 结果见图 4。

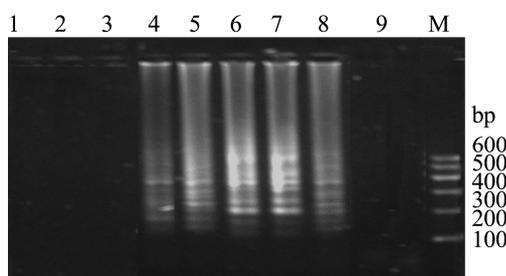


图 4 dNTP 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig.4 Effect of dNTP concentration on the LAMP reaction

Note: Lane 1-9: dNTP 0 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.4 mmol/L, 1.6 mmol/L; lane 10: negative control; M: DNA marker.

由图 4 可看出, dNTP 浓度从 0.6~1.4 mmol/L 均能扩增出靶 DNA, 但是在 0.8 mmol/L 就能得到均一、稳定的条带。这个浓度与其他人报道的用于细菌扩增的浓度相符合<sup>[10,11]</sup>。

### 2.2.3 引物浓度比对 LAMP 反应的影响

由于文献采用了较广泛的引物浓度比, 且其比值对 LAMP 反应的敏感性有很大影响<sup>[10,11]</sup>。2 对引物分别选用了 7 个浓度比分别为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12, 电泳结果见图 5。

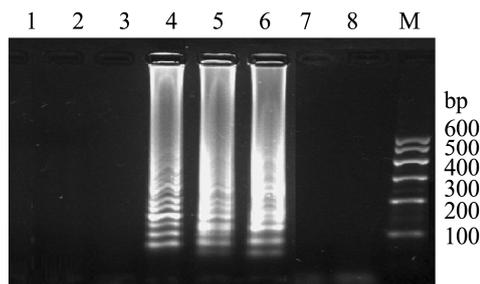


图 5 引物浓度比对 LAMP 反应的影响

Fig.5 Effect of ratio of the exogenous primer to the inner on the LAMP reaction

Note: lane 1-7: 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12; lane 8: negative control; M: DNA marker.

引物浓度在 1:6~1:10 之间时, 扩增条带清晰; 引物浓度比过高或者过低时, 扩增效率不好, 不能产生特异条带。

### 2.2.4 反应时间对 LAMP 反应的影响

有报道称可在少于 60min 时间内观察到 LAMP 反应产物<sup>[11]</sup>。研究了反应时间从 15~60 min 对 LAMP 反应的影响, 如图 6, 我们发现在 45 min 就能观察到特异性电泳条带存在, 但在 60 min 才能得到均一、稳定的电泳条带。

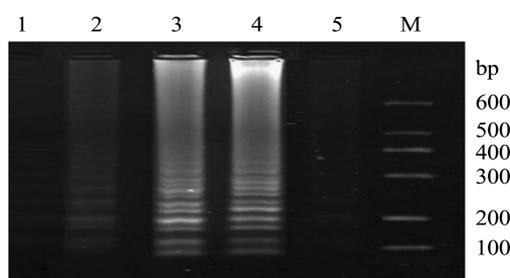


图 6 反应时间对 LAMP 反应的影响

Fig.6 Effect of reaction time on the LAMP reaction

Note: Lane 1-4: 15 min, 30 min, 45 min, 60 min; Line 5: negative control; M: DNA marker.

基于以上分析, 优化的 LAMP 反应条件为: 25 μL 反应体系含 10×LAMP buffer 2.5 μL, 6 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.8 mmol/L dNTP, 0.8 mmol/L betaine, 引物 FIP 和 BIP

各 40 pmol/L、F3 和 B3 各 5 pmol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 反应温度 63 °C, 反应时间 60 min。

2.3 LAMP 敏感性测定

将供试菌株 DNA 经 10 倍梯度稀释后, 使反应体系含 DNA 浓度为 100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、0.1 fg, 以超纯水作为阴性对照, 经优化后的 LAMP 体系扩增后, 电泳照片见图 7。结果表明: 本试验建立的 LAMP 方法能检测到 10 fg 的沙门菌 DNA, 随着模板 DNA 浓度的降低, 条带亮度逐渐变弱。相应的浊度检测如图 8。

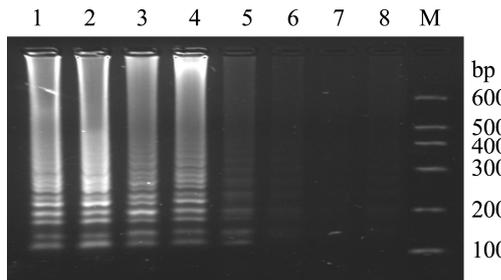


图 7 LAMP 敏感性电泳结果

Fig.7 Agarose gel electrophoretogram of LAMP-amplified DNA of *Salmonella* with different DNA concentration

Note: Lane1-7: DNA concentration of 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, and 0.1 fg; Lane 8, ddH<sub>2</sub>O; M: DNA marker.

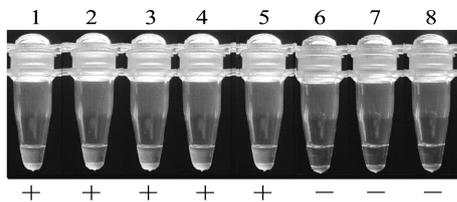


图 8 LAMP 敏感性浊度比较

Fig.8 Turbidity of LAMP reaction system with different DNA concentration of *Salmonella*

Note: Lane1-7: DNA concentration of 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, and 0.1 fg; lane 8: ddH<sub>2</sub>O; M: DNA marker; +: positive; -: negative.

2.4 污染沙门菌的牛奶样品的 LAMP 检测

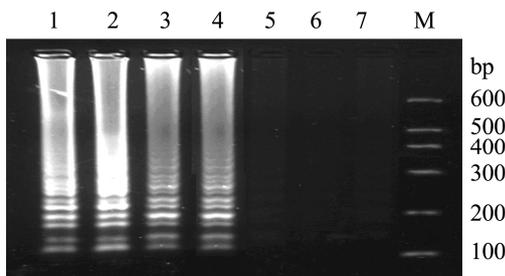


图 9 污染沙门菌的牛奶样品的 LAMP 电泳结果

Fig.9 Agarose gel electrophoretogram of LAMP-amplified *invA* gene in milk samples

Note: Lanes 1-6: 10<sup>5</sup> cfu/mL, 10<sup>4</sup> cfu/mL, 10<sup>3</sup> cfu/mL, 10<sup>2</sup> cfu/mL, 10<sup>1</sup> cfu/mL, 10<sup>0</sup> cfu/mL; lane7: ddH<sub>2</sub>O; M: DNA marker.

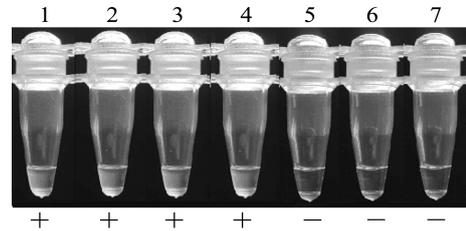


图 10 污染沙门菌的牛奶样品的 LAMP 浊度检测

Fig.10 Turbidity of the LAMP reaction for amplification of the *invA* in milk samples

Note: Lanes 1-6: 10<sup>5</sup> cfu/mL, 10<sup>4</sup> cfu/mL, 10<sup>3</sup> cfu/mL, 10<sup>2</sup> cfu/mL, 10<sup>1</sup> cfu/mL, 10<sup>0</sup> cfu/mL; lane7: ddH<sub>2</sub>O.

首先, 将沙门菌接种于牛奶样品制备沙门菌污染样品, 增菌后系列稀释, 然后按上述优化的 LAMP 条件对沙门菌进行分析, 结果如图 9 和图 10。同时, 以平板计数法测定样品中的沙门菌。

由图 9 和图 10 结果可以看出, LAMP 对污染沙门菌的牛奶样品的检测灵敏度达到 10<sup>2</sup> cfu/mL。

3 小结与讨论

本研究所优化后的 LAMP 方法是一种特异、敏感的检测沙门菌的方法。无论是从纯培养的沙门菌还是从污染了沙门菌的牛奶样品中提取的 DNA 都能被检出。其检出纯培养沙门菌 DNA 的检出限为 10 fg/反应, 从污染沙门菌的牛奶样品中检出 *invA* 基因的灵敏度为 10<sup>2</sup> cfu/mL。

目前, 分子生物学的检测技术得到了快速的发展, 各种核酸扩增技术在病原菌检测方面的研究越来越多。但是, 它们有的需要精密的仪器来扩增, 有的因为对靶序列的选择特异性不高而需要精细的方法来检测扩增产物<sup>[3]</sup>。PCR 尽管操作简单, 但需要高精度的热循环仪, 使得这一有力的技术没有被广泛的应用, 特别是在我国基层的食品安全保障单位不能很好的推广和应用。本研究采用的 LAMP 技术不仅快速灵敏, 且不需要精密仪器, 只需恒温水浴锅即可完成整个反应, 特别适合在基层检验。

但须指出的是, 在具有众多优点的同时, LAMP 方法也有自身的局限性。LAMP 对于实验设计要求很高, 需要设计的引物数目多, 结构复杂, 还要考虑靶序列的片段及茎环结构等因素<sup>[12]</sup>。LAMP 法的扩增靶序列长度控制在 300 bp 以下, 对引物要求高; 反应体系成分复杂, 需要认真挑选基因, 仔细优化条件<sup>[13]</sup>,

且由于 LAMP 法阳性反应呈现梯度条带,并不像 PCR 只呈现单带,一旦产生非特异性扩增,则不易鉴别<sup>[4]</sup>。因此应特别关注反应的特异性,可通过对目标序列特异的限制性酶切割扩增产物来验证<sup>[6]</sup>。

## 参考文献

- [1] 刘华伟,郭蔼光,马立农,等.PCR 技术在沙门氏菌快速检测中的应用[J].动物医学进展,2004,25(6):55-58
- [2] 王茂起,刘秀梅,王竹天.中国食品污染体系的研究[J].中国食品卫生杂志,2006,18(6):491-497
- [3] Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63
- [4] 肖斌,朱永红,邹全明.简便敏感的环介导等温扩增基因诊断新技术[J].中华检验医学杂志,2005,28(6):761-763
- [5] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al.. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J] Biochem. Biophys. Methods, 2004, 59:145-157
- [6] Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T, Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2002, 290(4): 1195-1198
- [7] 刘芳,王丽,李琳.环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻[J].现代食品科技,2007,23(11):71-74
- [8] 徐芊,孙小红,赵勇.副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[C].中国食品科学技术学会第五届年会暨第四届东西方食品业高层论坛论文摘要集,56
- [9] 程天印,刘润,常小斌.嗜水气单胞菌 Lamp 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2007,37(12):1013-1016
- [10] Innis M A, Myambo K B, Gelfand D H, et al. DNA sequencing with Thermusaquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA[J].Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988, 85(24):9436-9440
- [11] Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, et al. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis [J].J Clin Microbiol. 2003, 41(9):4359-4365
- [12] 蔡哲钧.核酸环介导等温扩增技术[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1092-1093
- [13] 岳志芹,梁成珠,吕朋,等.LAMP 技术及其在水生动物疫病诊断中的应用[J].检验检疫科学,2006,16(5):70-74
- [14] 匡燕云,李思光,罗艳萍.环介导等温扩增核酸技术及其应用[J].微生物学通报,2007,34(3):557-560

(上接第 711 页)

### 3.5 大力实施品牌战略,培育集生产、屠宰和流通三位一体的品牌化企业

积极推广无公害、绿色、有机、ISO9000 体系等产品质量安全认证,特别是 HACCP 认证和 ISO22000 的认证工作。加大力度推广冷鲜肉、冷冻肉,积极推进生猪屠宰企业的规模化发展。有条件的地区可培育、扶持一批生猪养殖、生猪屠宰和猪肉配送三位一体的品牌化企业(如双汇、雨润等)。这些企业一方面可减少流通环节的安全问题,另一方面可减少生产和屠宰环节的安全问题。没有条件的地区则可以探索“屠场包租”的发展模式和由屠宰加工企业直接购买生猪,加工成总肉,再由猪肉批发商将总肉推向市场的模式。

大力推广“公司+基地+农户”、“公司+农户”等经营模式(如广东温氏集团),对于发展生猪养殖规模化、提高生猪养殖质量、防治生猪疫病、解决私宰肉问题、确保猪肉安全有很大帮助。

### 3.6 建立高效的猪肉安全沟通机制

建立健全猪肉安全信息统一发布制度,通过各种媒介及时发布猪肉安全风险信息,使经营者、消费者

能够就猪肉安全问题及时进行有效沟通。积极作好科普工作,推广农业标准化。目前,群众对生猪定点屠宰政策还不是十分理解,有的认为是行业垄断,有的认为收费过高,要积极宣传猪肉质量安全知识,使消费者能够正确认识私宰肉,自觉抵制私宰肉。要大力普及国家标准,建立免费提供标准的途径,使生猪饲养者和生猪屠宰者能够知法用法,充分利用国家标准来指导企业的经营生产活动。

## 参考文献

- [1] 何昆.四川发现猪链球菌感染事件[Z].国家生物医学分析中心.SW-AL-动物-004
- [2] 俞丽虹,王蔚.“放心”肉为何“放倒”300 多人? [N]. 江西日报.2006-9-18(B2 版)
- [3] 冯华.高致病性猪蓝耳病疫情得到有效控制[N].人民日报.2007-11-8 (第二版)
- [4] 沪公布“梅林罐头事件”结果[N].京华时报.2007-12-20 (各地·时事)
- [5] 农业部.中国农业年鉴[M].中国农业出版社.2006.24