

DNA 环介导恒温扩增技术快速检测霍乱弧菌

徐义刚¹, 李苏龙¹, 李丹丹², 张洪祥¹, 姜艳春¹

1 黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 哈尔滨 150001

2 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 海口 570125

摘要: 霍乱弧菌是一种重要的食源性致病菌, 主要引起急性肠道传染病, 其快速检测具有重要意义。根据霍乱弧菌的 *mdh* 管家基因序列, 设计 2 对特异性检测引物, 利用 DNA 环介导恒温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 经反应体系优化, 成功建立了霍乱弧菌的 LAMP 快速检测方法。该方法最佳反应温度为 65°C, 60 min 完成检测, 对培养菌的检测限为 25 CFU/mL, 污染食品中霍乱弧菌的检测限为 32 CFU/g。对 33 株同种或近源细菌进行 LAMP 检测, 仅霍乱弧菌得到阳性扩增。LAMP 方法实践应用结果表明, 对 1057 份虾、蟹、牡蛎、肉类、人腹泻物等样本进行检测, 共检出 85 份阳性, 与国际标准 (ISO TS 21872-1-2007) 检测结果的符合率为 100%。结果表明, 本研究建立的霍乱弧菌 LAMP 检测方法特异性强、灵敏度高、操作简便, 有利于霍乱弧菌疫情的监测。

关键词: 环介导恒温扩增, 快速检测, 霍乱弧菌, *mdh* 管家基因

Rapid detection of *Vibrio cholerae* by loop mediated isothermal amplification (LAMP) method

Yigang Xu¹, Sulong Li¹, Dandan Li², Hongxiang Zhang¹, and Yanchun Jiang¹

1 Technical Centre of Heilongjiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China

2 Technical Centre of Hainan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570125, China

Abstract: *Vibrio cholerae* is an important foodborne pathogen, mainly causes acute intestinal infectious disease. The development of rapid method for detecting *Vibrio cholerae* is critical for early diagnosis of its infection. In this study, two pairs of specific primers were designed according to housekeeping gene *mdh* of *Vibrio cholerae*. Following optimization of the reaction, DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapidly detecting *Vibrio cholerae* was successfully established. The optimal reaction for the LAMP assay is 65°C for 60 min, with detection limit for cultivated *Vibrio cholerae* of 25 CFU/mL and for its contaminated food of 32 CFU/g. The specificity of the assay was determined using thirty-three kinds of same species or closely related bacteria, only *Vibrio cholerae* strains were specifically amplified. In practice, 85 pieces of positive samples were detected from 1057 pieces of shrimps, crabs, oysters, meat and human diarrhea complex using the LAMP method, which accorded with the detection result by ISO TS 21872-1-2007. Thus, the LAMP assay established in this study is a sensitive, rapid and simple tool for detecting *Vibrio cholerae* and will facilitate the surveillance for its control.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification (LAMP), rapid detection, *Vibrio cholerae*, *mdh* housekeeping gene

Received: October 13, 2009; **Accepted:** January 5, 2010

Supported by: Program of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (No. 2008IK162), Postdoctoral Fund of Heilongjiang Province (No. LBH-Z09).

Corresponding author: Sulong Li. Tel: +86-451-82337601; E-mail: lislulong2002@yahoo.com.cn

国家质检总局科技计划项目 (No. 2008IK162), 黑龙江省博士后基金 (No. LBH-Z09) 资助。

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*, VC) 是引起霍乱的病原菌, 在世界上曾引起多次大流行, 给人们的生命财产造成巨大的损失^[1-2]。自然情况下, 人类是 VC 的唯一易感者, 主要通过被病原菌污染的水源或食物经口传染, 临床表现为剧烈的呕吐、腹泻、失水, 死亡率高^[3-4], 属于国际检疫传染病, 在我国被列为甲类传染病。快速准确地诊断是及时发现疫情、迅速采取措施控制疫情的关键^[5-7]。

目前, VC 的检测方法主要有传统分离鉴定法、血清学方法、PCR 方法、胶体金法等。传统的分离鉴定方法灵敏度和特异性虽然较高, 但检测时间太长, 至少需要 3~5 d, 不适于快速检测要求^[8]; 血清学方法主要用于 VC 细菌分型, 以现有的血清检测, 当新的血清型出现时, 易发生漏检; PCR 法虽然灵敏度高, 但受设备、试剂盒、试剂等条件的限制, 基层单位较难开展, 不利于霍乱疫情的监测^[9]; 免疫胶体金技术虽检测快速, 没有特殊的实验室条件要求, 但该技术阳性预测值低, 最终确诊仍以细菌培养为准^[10]。因此, 发展操作简便、快速准确、易推广的检测方法对霍乱疫情的监测与控制具有重要意义。

DNA 环介导恒温扩增技术是一种新颖的恒温核酸扩增方法, 其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物, 利用链置换 DNA 聚合酶在恒温条件保温 40~60 min, 即可完成核酸扩增反应, 直接通过扩增副产物焦磷酸镁沉淀的浊度进行判断是否发生反应^[11-13]。该项技术操作简便, 结果观察直观, 具有较强的实用价值。本研究选择 VC 保守性强的 *mdh* 管家基因为靶基因设计引物, 进行 VC LAMP 快速检测方法的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用的试验菌株见表 1; *Bst* DNA Polymerase 购自 NEB 公司; *Taq* DNA Polymerase、甜菜碱 (betaine)、SmartGreen 购自 Sigma 公司; 细菌基因组提取试剂盒购自 TaKaRa 公司; 复合增菌培养基 BPW: 蛋白胨 20.0 g、NaCl 10.0 g、Na₂HPO₄·12H₂O 18.0 g、KH₂PO₄ 3.0 g, 蒸馏水定容至 1000 mL。

表 1 试验菌株和 LAMP 特异性结果

Table 1 Bacteria strains used in this study and specificity of LAMP method

Bacteria	Origin	LAMP results
<i>Vibrio cholerae</i> O1	ATCC 14035	+
<i>Vibrio cholerae</i> O1	CMCC 16010	+
<i>Vibrio cholerae</i> O139	ATCC 51394	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562, ATCC 14033	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 33787, ATCC 17749	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 27519, ATCC 17802	-
<i>Vibrio cholerae non-O1/O139</i>	ATCC 25872	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	-
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	-
<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	-
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	-
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	CMCC 50001	-
<i>Salmonella paratyphi B</i>	CMCC 50004	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	ATCC 10708	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-
<i>Escherichia coli</i> O ₁₅₇ :H ₇	ATCC 35150	-
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	ATCC35401	-
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC49027	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	-
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	CMCC32121	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	-

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中 VC *mdh* 管家基因序列 (Accession No. AF343303), 设计包括两条外引物 Vc: F3 和 Vc: B3 及两条内引物 Vc: FIP(F1c+TTTT+F2) 和 Vc: BIP (B1c+TTTT+B2) 等 4 条 LAMP 扩增引物, 引物序列分别为: Vc:F3: 5'-GGATCGTGCGGATCTGTTC

-3'(152-170); Vc:B3: 5'-AGGTTTCAGAGCGGAT CAC-3'(348-367); Vc:FIP: 5'-GGCCTTCGGACAC-ACCACAG(214-232)-TTTT-AATGTGAACGCTGG CATTGT(171-190)-3'; Vc:BIP: 5'-G-GTCCCTA TCGCAGCCGAAG(268-288)-TTTT-CCAGTGTG GTGACACCAAAT(326-345)-3', 引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取

将表 1 中的细菌株分别接种于 5 mL BPW 培养基中, 根据每种细菌的最适温度过夜培养。分别取 1 mL 培养菌液, 使用细菌基因组提取试剂盒 (TaKaRa), 提取细菌基因组 DNA, -20°C 保存备用。

1.2.3 LAMP 反应条件

LAMP 反应体系为 50 μL : 10 \times ThermoPol Buffer 5 μL (200 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L KCl、20 mmol/L MgSO_4 、100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.0% Tritonx-100)、2.5 mmol/L dNTPs 8 μL 、100 mmol/L MgSO_4 2 μL 、40 mmol/L Vc:FIP 1 μL 、40 mmol/L Vc:BIP 1 μL 、10 mmol/L Vc:F3 1 μL 、10 mmol/L Vc:B3 1 μL 、10 mmol/L 甜菜碱 2 μL 、5 U/ μL *Taq* DNA Polymerase 2 μL 、8 U/ μL *Bst* DNA Polymerase 2 μL 、VC 基因组 DNA 模板 1 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL 。阴性对照不含 VC 基因组 DNA。将此反应混合物装在 1.5 mL 离心管中, 置于水浴锅内, 水浴温度分别设为 60°C 、 63°C 、 65°C 、 67°C , 作用一定时间后, 经琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 以确定最适反应温度。LAMP 反应温度确定后, 体系反应时间分别设定为 30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 和 120 min, 经琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 以确定适宜反应时间。

1.2.4 LAMP 扩增副产物观察

反应结束后, 从水浴锅中取出反应管, 直接通过目视观察反应管中是否产生 LAMP 扩增副产物焦磷酸镁沉淀, 以判断是否发生反应, 与此同时, 利用琼脂糖凝胶电泳和荧光显色法验证。

1.2.5 LAMP 灵敏度试验

将试剂盒提取的 VC 基因组 DNA (细菌浓度相当于 2.5×10^8 CFU/mL) 进行 10 倍梯度稀释, 以此作为模板, 进行 LAMP 扩增, 利用琼脂糖凝胶

电泳检测扩增效果, 同时进行实时荧光 PCR 检测, 将两种方法的灵敏度进行对比。

1.2.6 LAMP 特异性试验

采用本研究建立的 LAMP 方法扩增经试剂盒法提取的表 1 中 33 株细菌的基因组 DNA, 以验证本方法的特异性。

1.2.7 食品污染模型检测试验

取 10 g 经国际标准法检测未检出 VC 的鲜鱼肉样品, 加入 90 mL 碱性蛋白胨水, 经匀浆机制成匀浆; 匀浆中加入 1 mL 细菌浓度为 3.2×10^8 CFU/mL 的 VC 菌株, 充分混匀; 取 1 mL 匀浆 (含细菌浓度约为 3.2×10^6 CFU/mL) 进行 10 倍梯度稀释; 分别取 1 mL 稀释后的匀浆液, 使用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 进行 LAMP 扩增。

1.2.8 验证试验

将所建立的 VC LAMP 快速检测方法应用于检验检疫实践工作中 (注: 疑似人感染霍乱弧菌腹泻物样本及未经化学和物理方法加工处理的食物样本可直接进行检测; 对于经过加工的食物样本需经初步增菌后, 再进行检测), 其结果与国际标准 (ISO TS 21872-1-2007) 进行比较, 验证该方法的可靠性。

2 结果

2.1 LAMP 反应条件的确立

50 μL 的 LAMP 反应体系分别在 60°C 、 63°C 、 65°C 、 67°C 水浴中作用相同时间, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, LAMP 扩增结果见图 1A 所示, 水浴温度为 60°C 时, LAMP 的扩增效果最弱 (图 1A, 泳道 4), 随着反应体系温度的升高, 扩增效果越加明显, 水浴温度为 65°C 时, 扩增效果最佳 (图 1A, 泳道 2), 即反应体系最适温度是 65°C 。LAMP 体系最适温度确定后, 水浴作用时间分别设定为 30 min、45 min、60 min、75 min、90 min 和 120 min, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增结果见图 1B 所示, 水浴时间为 30 min 时, 扩增产物的量最少 (图 1B, 泳道 2), 随着反应时间的延长, 扩增产物的量逐渐增多, 从扩增效率和节省时间的角度考虑, 本 LAMP 方法的适宜恒温水浴扩增时间为 60 min (图 1B, 泳道 4)。

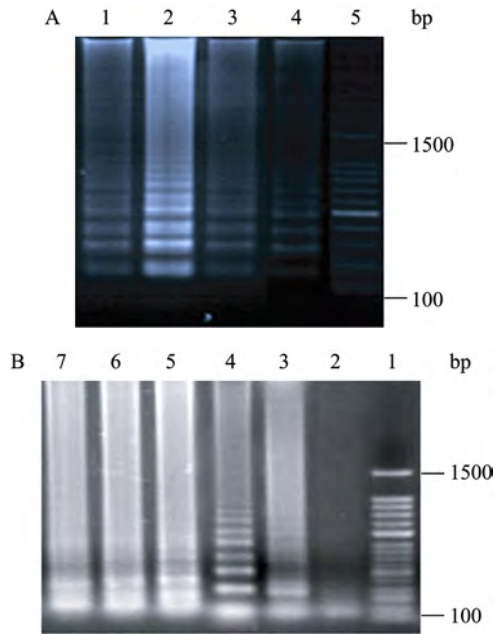


图 1 温度及反应时间对 LAMP 扩增效果的影响

Fig 1 Effect of temperature and reaction time on the efficiency of LAMP. (A) Effect of temperature on the efficiency of LAMP. 1-4: amplification at 67°C, 65°C, 63°C, 60°C, respectively; 5: DNA marker 100 ladder. (B) Effect of reaction time on the efficiency of LAMP. 1: DNA marker 100 ladder; 2-7: amplification for 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min.

2.2 LAMP 扩增副产物检测结果

以 VC 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增 (不含 VC 基因组 DNA 的模板为阴性对照), 通过目测观察, 结果显示反应管中产生 LAMP 扩增副产物焦磷酸镁沉淀 (图 2A), 而阴性对照组未出

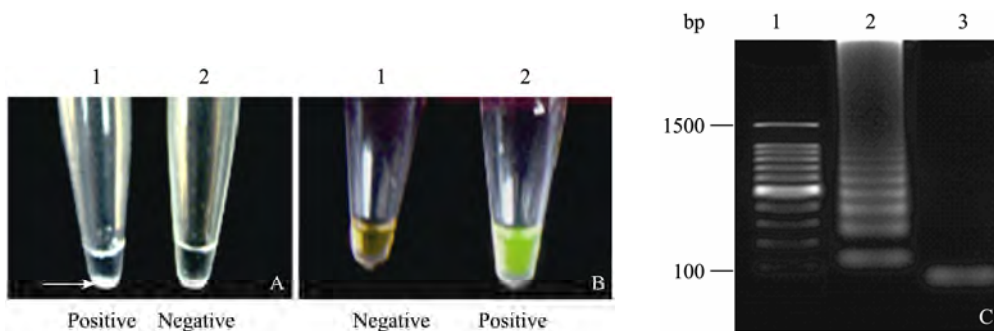


图 2 VC 基因组 DNA LAMP 扩增副产物检测结果

Fig. 2 Detection results of LAMP amplification outgrowth of genomic DNA of *Vibrio cholerae*. (A) Observation of turbidity. 1: precipitation produced by LAMP amplification of *mdh* gene of *Vibrio cholerae*, as arrow showing; 2: negative control. (B) Observation of fluorescence. 1: negative control; 2: result of LAMP amplification of *mdh* gene of *Vibrio cholerae* shows green fluorescence. (C) Detection of electrophoresis. 1: DNA marker; 2: result of LAMP amplification *mdh* gene of *Vibrio cholerae*; 3: negative control.

现, 说明 LAMP 进行有效扩增; 利用荧光显色法检测结果显示, 阳性组出现典型的绿色荧光, 而阴性对照组为浅橙色荧光 (图 2B); 琼脂糖凝胶电泳验证结果亦显示, 阳性组发生 LAMP 扩增反应, 出现典型的 LAMP 扩增电泳条带, 阴性对照组未发生反应 (图 2C)。

2.3 LAMP 灵敏度试验结果

将细菌浓度相当于 2.5×10^8 CFU/mL 的 VC 基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 以每个稀释度作为模板, 进行 LAMP 扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其结果见图 3 所示, DNA 样本经 10^7 倍稀释后, 所建立的 LAMP 方法仍能进行有效扩增 (图 3, 泳道 8), 说明该方法的检测灵敏度为起始 DNA 模板浓度的 10^{-7} , 即相当于 25 CFU/mL 细菌浓度, 与实时荧光 PCR 方法检测灵敏度相比, 相差一个数量级 (实时荧光 PCR 方法检测灵敏度为起始 DNA 模板浓度的 10^{-8} , 结果未显示), 但从实验易操作性、低成本角度出发, 本方法不失为一种理想的选择。

2.4 LAMP 特异性试验结果

使用建立的 VC LAMP 检测方法对 33 株细菌进行检测, 结果见表 1 所示, 仅 VC O1 群 (ATCC 14035)、VC O139 群 (CMCC 16010)、VC 非 O1/非 O139 群 (ATCC 51394) 呈阳性反应, 其他细菌的 LAMP 扩增呈阴性, 说明该方法能特异地检测 VC。

2.5 污染食品检测灵敏度

对细菌起始浓度约为 3.2×10^6 CFU/mL 的模拟污染食品进行 LAMP 检测, 检测结果见图 4 所示, 该 LAMP 方法对污染食品中 VC 的检测灵敏度为 32 CFU/mL。

2.6 实践验证结果

2009年1~9月期间, 使用所建立的VC LAMP方法对1057份虾、蟹、牡蛎、肉类食品样品和来自黑龙江省疾病预防控制中心的人腹泻物样品进行检测, 同时采用国际标准方法进行验证, 结果见表 2所示, 用LAMP方法检出的85份阳性样本, 经国际标准方法验证, 结果为阳性。显示该LAMP方法具有广泛而良好的适用性。

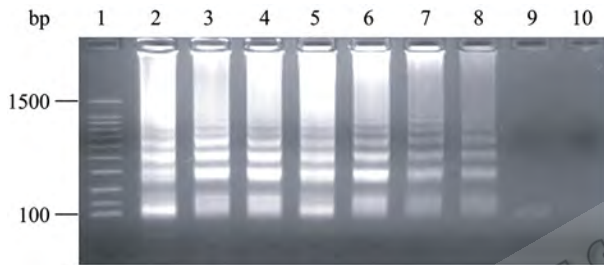


图3 VC基因组DNA LAMP检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of LAMP for genomic DNA of *Vibrio cholerae*. 1: DNA marker; 2: 10^{-1} ; 3: 10^{-2} ; 4: 10^{-3} ; 5: 10^{-4} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-6} ; 8: 10^{-7} ; 9: 10^{-8} ; 10: negative control.

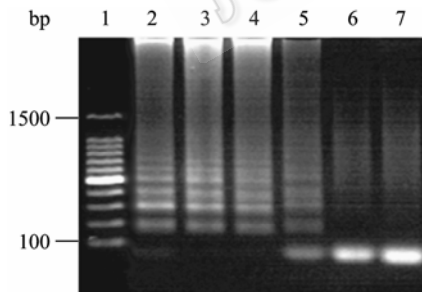


图4 污染食品中VC的LAMP检测灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of LAMP for detecting *Vibrio cholerae* in food. 1: DNA marker; 2: 10^{-2} ; 3: 10^{-3} ; 4: 10^{-4} ; 5: 10^{-5} ; 6: 10^{-6} ; 7: food control.

表2 LAMP方法与国际标准(ISO)对比结果

Table 2 Comparison between LAMP and ISO method in practice

Detection result	LAMP method	ISO method
Positive	85	85
Negative	972	972
Total	1057	1057

3 讨论

霍乱是由VC引起的一种烈性肠道传染病, 在一定条件下, VC进入小肠, 粘附于肠壁上皮细胞, 在肠粘膜表面迅速繁殖, 产生霍乱肠毒素, 进而急骤发病^[14]。目前, 霍乱疫情在国内外仍有不断发生和流行, 由于霍乱流行迅速, 且在流行期间发病率及死亡率均高, 危害极大, 因此早期迅速和正确的诊断, 对治疗和预防本病的蔓延有重大意义。

目前, VC的检测方法仍以分离培养、形态学、生化特征及血清学鉴定为主, 耗时长, 不利于疫情监控。后来发展的探针杂交法^[15]和PCR方法^[16]虽具有较好的特异性和灵敏度, 但由于试剂及实验设备等条件的限制, 难于在基层广泛应用。因此开发一种特异性高、灵敏度好、检测快速、操作简便, 并且成本低廉, 适于基层推广的检测方法, 对霍乱疫情的监控将起到积极作用。Notomi等^[11]于2000年研发出一种新颖的核酸扩增方法-环介导等温扩增法(LAMP), 其特点是针对靶序列的6个特异性区域设计两对引物(确保了反应的高特异性), 利用具有链置换活性的*Bst* DNA polymerase, 恒温条件进行核酸扩增, 在扩增过程中, 产生的焦磷酸盐和镁离子结合, 生成大量的副产物——焦磷酸镁(白色沉淀), 通过观测是否形成白色沉淀, 判断扩增反应是否发生。该方法特异性强、灵敏度高、操作简便、设备要求极低, 自从报道以来, 在核酸研究、疾病诊断、性别鉴定、转基因检测及病原检测等领域得到广泛应用。

本实验利用DNA环介导等温扩增技术进行VC LAMP快速检测方法的研究。首先是检测靶基因的选择, 已有的VC分子生物学检测方法均选择VC的毒力基因*ctxAB*(编码霍乱肠毒素)与*tcpA*(编码毒力协同调节菌毛A亚单位)为目标基因^[15-16], 但由于部分O1群VC缺失这些毒力基因, 而存在局限性。VC*mdh*管家基因在不同群型中具有高度保守性^[17], 是作为检测靶基因的理想选择。因此, 本研究以VC*mdh*管家基因为靶基因开展研究, 经过引物的精确设计及反应体系的条件优化, 建立了VC LAMP快速检测方法。该方法最佳反应温度为65℃, 60 min

内即可完成检测, 结果判定直观, 也可借助电泳检测仪进行结果的判定。该方法具有较高的检测灵敏度(纯培养菌的检测限为 25 CFU/mL, 污染食品中 VC 的检测限为 32 CFU/g) 和特异性(详见表 1)。该方法与实时荧光 PCR 法相比, 其灵敏度虽相差一个数量级, 但 LAMP 方法不需要使用 PCR 仪等昂贵、精密的仪器设备, 操作更简便、检测成本更低, 尤其适用于基层检验检疫机构, 为 VC 的疫情监控和快速检测提供了新的发展方向。

此外, 为了进一步降低检测成本, 病原菌基因组 DNA 提取可采用煮沸法, 亦可达到理想的检测效果。具体方法如下: 取细菌培养液 1 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 300 μ L 无菌水, 充分悬浮混匀, 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冰浴 2 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

REFERENCES

- [1] Colwell RR. Global climate and infectious diseases: the cholera paradigm. *Science*, 1996, **274**: 2025–2031.
- [2] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrio*. *Microbiol and Mol Bio Rev*, 2004, **68**(3): 403–431.
- [3] Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Nair GB, et al. Clinical profile of acute diarrhoeal cases infected with the new epidemic strain of *V. cholerae* O139: designation of the disease as cholera. *J Infect*, 1993, **27**: 11–15.
- [4] Colwell RR, Spira WM. The ecology of *Vibrio cholerae*//Barua D, Greenough WB III, ed. *Cholera*. New York: Plenum, 1992: 107–127.
- [5] Barua D, Merson MH. Prevention and control of cholera//Barua D, Greenough WB III, eds. *Cholera*. New York: Plenum, 1992: 329–349.
- [6] Albert MJ, Islam D, Nahar S, et al. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 Bengal from stool specimens by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**: 1663–1665.
- [7] Colwell RR, Hasan JAK, Huq A, et al. Development and evaluation of rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **76**: 215–219.
- [8] Hong HY, Xu GQ. Exploration of rapid detection for *Vibrio cholerae*. *Chin J Henan Univ*, 2004, **23**(4): 22. 黄红莹, 许国强. 霍乱弧菌快速检测法探讨. 河南大学学报, 2004, **23**(4): 22.
- [9] Albert MJ, Islam D, Nahar S, et al. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 Bengal from stool specimens by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(6): 1633–1635.
- [10] Dong ZH, Hu SX, Zeng YX, et al. Evaluation of clinical effect for rapid detection test-paper of *Vibrio cholerae* O139. *Appl Prev Med*, 2004, **11**(5): 973–974. 邓志红, 胡世雄, 曾亚雄, 等. O139 霍乱弧菌快速检测试纸条临床效果评价. 实用预防医学, 2004, **11**(5): 973–974.
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): E63–e63.
- [12] Mori Y, Nagamine K, Tmita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289**: 150–154.
- [13] Nagamine K, Watanage K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem*, 2001, **47**: 1742–1743.
- [14] Merrell DS, Butler SM, Qadri F, et al. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 2002; **417**(6889): 642–645.
- [15] Nair GB, Bag PK, Shimada T, et al. Evaluation of DNA probes for specific detection of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**(8): 2186–2187.
- [16] Glukhov AI, Onishchenko GG, Gordeev VSA, et al. The determination of the content of the cholera toxin gene in the composition of the DNA from *Vibrio cholerae* strains by means of the nested polymerase chain reaction. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1996, **5**: 20–22.
- [17] Rui YY, Kan B, Gao SY, et al. Sequence analysis of housekeeping genes *recA*, *dnaE*, and *mdh* in different serogroups or biotypes of *Vibrio cholerae* isolated from China. *J South Med Univ*, 2006, **26**(12): 1720–1723. 芮勇宇, 阚飙, 高守一, 等. 不同群型霍乱弧菌 *recA*、*dnaE* 和 *mdh* 管家基因序列分析. 南方医科大学学报, 2006, **26**(12): 1720–1723.