微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn

JUN 20, 2009, 36(6): 923~928
© 2009 by Institute of Microbiology, CAS

生物实验室

空肠弯曲菌 LAMP 快速检测方法的建立

林 超 梁成珠 徐 彪 孙 敏 刘彩霞 高宏伟*

(山东出入境检验检疫局技术中心 山东 青岛 266002)

摘 要: 本研究使用恒温环介导技术，以空肠弯曲菌的促旋酶基因 A(*gyrA*)设计引物，建立空肠弯曲菌的 LAMP 快速检测方法。不同来源的 4 株空肠弯曲菌 LAMP 检测均显示阳性，其他 14 种细菌 LAMP 检测显示阴性。实验结果表明，设计的引物具有良好的特异性。本研究进行了 LAMP 检测方法与细菌平板计数法和 PCR 法的灵敏度比较，结果 LAMP 检测与 PCR 法有相近的灵敏度，比细菌平板计数法灵敏度高 3 个数量级。我们还研究发现提取核酸前加入 DNase 可以有效地减少死菌 DNA 对 LAMP 结果的影响。使用 LAMP 方法对鸡法氏囊的检测表明，结合核酸提取步骤中的 DNase 处理步骤，可以准确的检测出鸡法氏囊中的空肠弯曲菌。

关键词: 恒温环介导，空肠弯曲菌，检测

Establishment of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for *Campylobacter jejuni* Detection

LIN Chao LIANG Cheng-Zhu XU Biao SUN Min LIU Cai-Xia GAO Hong-Wei*

(*Technical Center for Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Qingdao*, *Shandong* 266002, *China*)

Abstract: A rapid LAMP detection method with primers designed on genus-specific region identified in the *gyrA* gene was established in this assay. All four *Campylobacter jejuni* from different sources were detected positive and fourteen non *Campylobacter* bacteria were negative, which shows excellent specificity of the primers. Compared with plate count and PCR method, the LAMP method and the PCR method had equal sensitivity, which were three orders of magnitude higher than plate count. In this assay, we also found out that the treatment of DNase could reduce the dead bacteria DNA effectively. The LAMP detection on chicken indicated relatively good result on detection of *Campylobacter jejuni* combining with treatment of DNase.

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification, *Campylobacter jejuni*, Detection

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是世界上公认的引起急性腹泻和肠胃炎的主要病原菌，具有很强的致病性[1]。该菌通过带病动物、禽类或患病者的粪便进入环境中，并可在水中进入休眠状态(Viable but non-culturable, VNC)[2]。饮用受污染的水和鲜奶，接触畜禽类都有可能感染该菌。国外流行病学调查显示，该菌作为肠炎的病因仅次于沙门氏菌和志贺氏菌，在很多地区甚至有超过沙门氏菌居

基金项目：科技部项目(No. 2006BAD05A06)；国家质检总局科研项目(No. 2007IK167)
*通讯作者: Tel: 86-532-80885622; ✉: ghw75@126.com
收稿日期: 2008-10-25; 接受日期: 2009-01-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

首的趋势[3]。根据英国健康防护委员会的资料, 2000年该委员会在英国和威尔士共收到 57674 例感染空肠弯曲菌的病例, 此后逐年下降, 到 2006 年降到 46603 例(http://www.hpa.org.uk/interfections)。在美国, 调查显示每年约有 240 万民众受感染患病[4]。为了保障公共健康安全, 需要建立快速检测空肠弯曲菌的方法。

根据传染病学研究发现, 空肠弯曲菌病害主要来源于加工或食用生的或未煮熟的鸡肉。空肠弯曲菌可以在绝大多数野生鸟类和家禽体内繁殖而无明显症状, 一旦有一只鸟被空肠弯曲菌感染, 很快整个种群都会被感染。因此, 在很多国家, 高达90%的肉鸡可能在屠宰场表现空肠弯曲菌阳性, 在肉鸡的盲肠菌群中该菌含量为 10^9 CFU/g[5]。

空肠弯曲菌是具有高致病性的病原微生物, 为了防止该菌引起的疾病, 需要快速、灵敏、准确的检测方法。由于空肠弯曲菌致病数量低以及培养增殖缓慢, 所以空肠弯曲菌的检测存在一定的难度。传统的检测方法有分离培养和生化反应, 非常耗时而且耗费人力[6], 且灵敏度和特异性都不高; 而传统的表型分型方法可靠性和重复性不佳[7]。在液体环境下空肠弯曲菌可能因营养成分不足和物理条件因素进入休眠状态(VNC), 使得分离培养失败[8], 造成漏报。相对于能够增殖的菌体形态, 特别是在低温条件下, 休眠状态能够更好的抵御食品加工处理。Pearson[9]等发现水中存在的休眠状态空肠弯曲菌是感染肉鸡的唯一可能途径。

近年来基于 PCR(Polymerase chain reaction)基础的 DNA 检测方法被越来越多的应用到空肠弯曲菌的检测中[10]。PCR技术是体外酶针对某一特定DNA 片段快速扩增的技术。PCR 技术在空肠弯曲菌的检测中有大量的应用。相对与传统方法, PCR 法具有快速、灵敏、准确的特点, 同时 PCR 法也能够检测到休眠状态的细菌。但 PCR 法在检测死菌时也会检测到阳性结果, 对此, Novga等[11]建立了 5′外切酶 PCR 法, 对原有 PCR 法进行了改进。PCR 法的不足是需要专门的昂贵仪器进行扩增, 和使用毒害物质的电泳步骤来验证, 不利于现场检测和实验人员的健康。

本研究应用了恒温环节导技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)[12]进行空肠弯曲菌检测。与PCR检测相比, LAMP检测具有高灵敏性, 高拷贝数, 快速的特点并且无需昂贵的PCR仪, 只需水浴锅这样的恒温设备就可进行检测。目前, LAMP检测技术还未用于空肠弯曲菌的检测。在本研究中, 我们根据*gyrA*基因设计LAMP引物, 用于空肠弯曲菌的检测, 验证了本方法的特异性和灵敏性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: 凝胶成像分析系统(Infinity, EU)、PCR 仪(Eppendorf, 德国)、核酸蛋白分析仪(Eppendorf, 德国)。

1.1.2 主要试剂与试剂盒: *Taq* 酶、dNTPs 购于闪晶生物公司(上海, 中国), No. 2 肉汤(OXOID 公司), mCCDA 琼脂培养基(OXOID 公司), 哥伦比亚琼脂(OXOID 公司), 血液培养基(OXOID 公司), 细菌DNA 提取试剂盒(天根生物公司, 中国)。

1.1.3 引物设计: 空肠弯曲菌的特异性LAMP引物空肠弯曲菌的促旋酶基因*gyrA*(Genbank access number: DQ449664.1|, AJ567822.1|CJE567822)相关数据设计。保守序列进一步用PrimerExploerV4 软件(http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html)分析, 设计LAMP引物如下。所用的引物由闪晶生物公司(上海, 中国)合成。

B3: 5′-TTCCAAATTATGATGGTTCAGA-3′,

F3: 5′-TGGACCTTTA(G)ATAAACTGCATAA-3′,

BIP: 5′-ACAGCTATACCACTTGAACCATTTA-AAGTGAACCTGATGTTTTACCT-3′,

FIP: 5′-ACAAACATCCCGCCTCATAGTTTAA-TCTCTTCTAAGCTTGCATCT-3′。

1.1.4 菌株与样品: 本研究使用了 4 株空肠弯曲菌和 14 种非空肠弯曲菌。鸡肉中的空肠弯曲菌样品为屠宰场的肉鸡鸡尾。研究特异性所用的菌株为保存于密封管中的冻干粉(菌株号 IQCC13603)。

1.2 方法

1.2.1 LAMP法与细菌培养计数法和PCR方法的灵敏度比较: 将空肠弯曲菌(IQCC13603)的冻干粉加入至 1 mL灭菌水中, 充分混匀后, 加入到 9 mL灭菌水中, 制成 10 倍稀释的菌悬液。取 1 mL10 倍稀释的菌悬液加入到 9 mL灭菌水中, 稀释至 100 倍, 依次类推, 直至将菌悬液稀释到 10^6倍。每一稀释倍数取菌悬液 1 mL在mCCDA琼脂培养基上涂平板

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　空肠弯曲菌 LAMP 法特异性实验中使用的菌株与其来源
Table 1　The bacteria strains and their sources in *Campylobacter jejuni* LAMP species-specific experiment

菌种名 Name	菌株 Serial Number	菌种来源 Source
空肠弯曲菌 *Campylobacter jejuni*	2008071101	[b]SDCIQ
空肠弯曲菌 *Campylobacter jejuni*	2008071102	[b]SDCIQ
空肠弯曲菌 *Campylobacter jejuni*	ATCC33560	[c]ATCC
空肠弯曲菌 *Campylobacter jejuni*	IQCC13603	[a]CAIQ
肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*	IQCC10528	[a]CAIQ
副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*	IQCC12310	[a]CAIQ
大肠杆菌 *Escherichia coli*	IQCC10102	[a]CAIQ
猪伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi*	IQCC10593	[a]CAIQ
单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes*	IQCC22201	[a]CAIQ
依氏李斯特菌 *Listeria ivanovii*	IQCC22227	[a]CAIQ
耶尔森氏菌 *Yersinia enterocolitica*	IQCC10901	[a]CAIQ
威氏李斯特菌 *Listeria welshimeri*	IQCC22261	[a]CAIQ
贺志氏菌 *Shigella flexneri*	IQCC10130	[a]CAIQ
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	IQCC22045	[a]CAIQ
植生拉乌尔菌 *Raoultella planticola*	20080913-1	[b]SDCIQ
产酸克雷伯菌 *Klebsiella oxytoca*	20080913-2	[b]SDCIQ
弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii*	20080913-3	[b]SDCIQ
柠檬酸杆菌 *Citrobacter braakii*	20080913-4	[b]SDCIQ

注: a: 中国检验检疫科学研究院; b: 山东出入境检验检疫局; c: 美国典型培养物保藏中心.
Note: a: CAIQ, Chinese Academy of Inspection and Quarantine; b: SDCIQ, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau; c: ATCC, American Type Culture Collection.

30°C过夜培养，进行菌落计数；另取 1 mL菌悬液在30°C过夜培养后，用细菌DNA提取试剂盒(天根生物公司，中国)提取DNA。将提取的细菌DNA以 10倍进行稀释，建立一个从 1 倍到 10^6倍稀释的浓度梯度，用于随后的LAMP法和PCR检测。

LAMP实验在一个 25 µL的反应体系中进行。先加入包括 1.2 mmol/L的gyrA-FIP和gyrA-BIP，0.2 mmol/L的gyrA-F3 和gyrA-B3，2.5 µL的 10×buffer (Biolabs，新英格兰)，12 mmol/L $MgSO_4$，1.0 mol/L甜菜碱，1.0 mmol/L脱氧核糖三磷酸盐(dGTP, dATP, dCTP)，2.0 mmol/L dUTP，3 µL DNA模板，0.024 U/µL 尿嘧啶N糖基化酶(UNG)。这个反应体系在50°C下进行 3 min，95°C 5 min，0°C 1 min，然后 2000 r/min 离心 1 min。最后加入 1 µL (8 U) Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs)，完全混合。将该反应混合物在水浴加热，65°C 放置 60 min，80°C 放置 3 min 终止反应。每个产物取 4 µL，用GelRed (Biotium, USA)染色的 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像分析系统观察结果并拍照。

PCR 扩增实验在一个 25 µL 的反应体系中进行。反应体系包含 10 pmol/L 的 gyrA–F3 和 gyrA–B3，1 mmol/L 的 dNTPs，2.5 µL 的 10×buffer (Biolabs，新英格兰)，2 mmol/L $MgCl_2$，2 mmol/L脱氧核苷酸酶，1.5 U *Taq* DNA聚合酶，和 1 µL DNA模板。扩增反应程序为: 94°C 3 min; 94°C 30 s，56°C 30 s，72°C 30 s，35 个循环；72°C 10 min；于 4°C下保存[11]。扩增后的PCR产物每个产物取 6 µL，用GelRed (Biotium, USA)染色的 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像分析系统观察结果并拍照。

1.2.2　LAMP 法检测 *Campylobacter jejuni* 的特异性: 选取了 4 株空肠弯曲菌和 14 种非空肠弯曲菌的DNA 作为 LAMP 反应的模板，并在反应前使用分光光度计检测模板的浓度和纯度。LAMP 反应后，用琼脂糖电泳分析产物，胶浓度为 2.0%，染色剂为GelRed (Biotium，美国)，电泳上样量为 4 µL。

将空肠弯曲菌分别与肠炎沙门氏菌、耶尔森氏菌、副溶血弧菌、大肠杆菌、贺志氏菌等菌株的一种或多种等比例混合，用 LAMP 法检测由混合菌株提取的 DNA，研究混合菌株是否对 LAMP 结果产生影响。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

1.2.3 用不同方法检测LAMP产物: 在LAMP 产物中加入PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, USA), 通过颜色区别来判断[12]。每管LAMP反应产物中加入 2 μL PicoGreen染料。对多种方法进行考察比较后, 选取PicoGreen法和琼脂糖电泳法检测。

1.2.4 空肠弯曲菌死菌DNA与活菌DNA的稳定性比较: 制备 2.0×10^7 CFU/mL空肠弯曲菌的菌悬液和 50 ng/μL 空肠弯曲菌DNA溶液。建立样品组和对照组各 3 组。每一组分 A、B、C 3 个样品。A为 2.0×10^7 CFU/mL空肠弯曲菌的菌悬液 1 mL, B为 2.0×10^7 CFU/mL空肠弯曲菌的菌悬液 1 mL和 50 ng/μL 空肠弯曲菌 DNA 溶液 100 μL 的混合液, C为灭菌水 1 mL 和 50 ng/μL 空肠弯曲菌 DNA 溶液 100 μL 混合液。分别在样品组中加入 10 单位的 DNase 和 1×DNase buffer, 在室温下孵育 1 h。对照组不加 DNase, 也在室温下孵育 1 h。孵育结束后各组 8000 r/min 离心 5 min, 吸取 100 μL 上清液, 立即在 95°C 水浴 5 min, 分别提取 DNA 作为 LAMP 反应模板进行扩增。对样品组和对照组的结果进行比较。

1.2.5 鸡肉样品中空肠弯曲菌检测: 本研究选取了4家屠宰场的120个鸡法氏囊样品进行实验, 这些样品来自 4 个地区的养鸡场。每个样品被分为 2 份, 一份切碎后加入 10 mL 血液培养基, 41.5°C 振荡培养 48 h[13], 然后在 12000 r/min离心 5 min, 去上清, 用天根试剂盒提取DNA。另一份样品在血液培养基41.5°C振荡培养 48 h后, 混匀菌悬液, 将菌悬液以10倍进行稀释, 建立一个从1倍到10^6倍稀释的浓度梯度。然后各梯度在mCCDA培养基培养并进行菌落计数。

2 实验结果

2.1 LAMP法与细菌培养计数法和PCR方法的灵敏度比较

由图 1 所示, 模板浓度相同的情况下, LAMP法与PCR法对于空肠弯曲菌DNA具有相近的检测低限, 约为 7.6 fg(10^5倍稀释); 相比较细菌培养计数法的检测低限 10^2倍稀释, LAMP法和PCR法的灵敏度要高出 3 个数量级。

2.2 LAMP 反应检测空肠弯曲菌的特异性:

用 4 种空肠弯曲菌和 14 种非空肠弯曲菌的 DNA 来检验反应的特异性。琼脂糖电泳后, 阳性样品有明亮的条带, 而非空肠弯曲菌样品的DNA没有LAMP 扩增条带(图 2)。

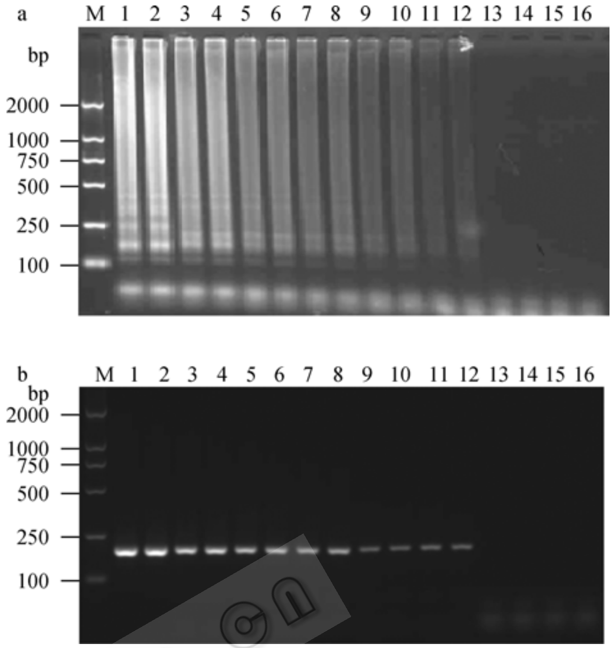

图 1 LAMP 法(a)与 PCR 法(b)检测空肠弯曲菌 *gryA* 基因的灵敏度比较

Fig. 1 Comparison of sensitivity between the LAMP reaction (a) and PCR reaction (b) for detection of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene

注: 1~14 的空肠弯曲杆菌模板 DNA 量分别是: 7.6 ng、7.6 ng、760 pg、760 pg、76 pg、76 pg、7.6 pg、7.6 pg、760 fg、760 fg、76 fg、76 fg、7.6 fg、7.6 fg; 15, 16: 空白对照; M: Marker DL 2000 (TaKaRa, 中国).

Note: 1~14: *Campylobacter jejuni* –DNA: 7.6 ng, 7.6 ng, 760 pg, 760 pg, 76 pg, 76 pg, 7.6 pg, 7.6 pg, 760 fg, 760 fg, 76 fg, 76 fg, 7.6 fg, 7.6 fg; 15, 16: Negative control; M: Marker DL 2000 (TaKaRa, China).

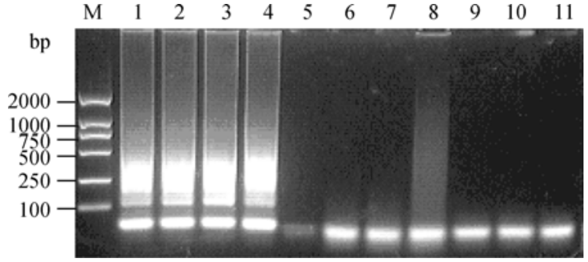

图 2 LAMP 法检测不同细菌中的空肠弯曲菌

Fig. 2 Detection of *Campylobacter jejuni*–samples from non-*Campylobacter jejuni*–samples by LAMP methods

注: 1~4: 空肠弯曲菌; 5: 空白对照; 6-11 从左到右依次为: 肠炎沙门氏菌、耶尔森氏菌、副溶血弧菌、大肠杆菌、贺志氏菌、单增李斯特菌; M: Marker DL 2000 (TaKaRa, 中国).

Note: 1~4: *Campylobacter jejuni*; Lane 5: Negative control; Lanes 6 to 11 from left to right: *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*; M: DL 2000 (TaKaRa, China).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

其他方法如视觉观察法也用于观察 LAMP 的反应结果。在反应产物中加入 PicoGreen 染料后，阳性产物颜色由橙色变为黄色，而阴性样品则保持黄色不变(图 3)。颜色变化的强烈程度与产物的量有关，高产物量的样品颜色变化较早。用电泳检测为阳性的样品用视觉观察法检测均发生颜色变化。含有大量 LAMP 阳性反应产物的管中混合液的颜色由橙色变为黄色。

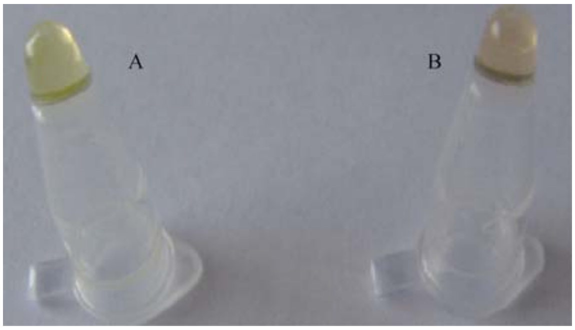

图 3　扩增产物中加入 **2 μL PicoGreen dsDNA** 试剂的颜色比较

Fig. 3　Amplified products visualized by adding 2 μL PicoGreen dsDNA reagent at the end of the reaction

注: A: 76 fg *Campylobacter jejuni*–DNA 的反应产物; B: 空白对照.

Note: A: The LAMP products of 76 fg *Campylobacter jejuni* -DNA; B: Negative control.

2.3　DNase 处理对细菌 DNA 扩增的影响

研究发现，未经 DNase 处理的对照组 A、B、C 的 LAMP 检测均为阳性，而经过 DNase 处理的样品组 A、B 为阳性，C 为阴性。样品组 A 的 LAMP 反应产物和对照组 A 的产物相同，样品组 B 的反应产物少于对照组 B 的反应产物。

3　讨论

在本研究中，通过比较多个基因的序列，我们认为 *gyrA* 基因最为合适。促旋酶基因 *gyrA*(gyrase A)相对比较保守，存在于已知的所有致病空肠弯曲菌亚种中。根据 *gyrA* 基因设计 LAMP 引物，并在 NCBI 上对比发现 24 种空肠弯曲菌与此引物 100%匹配。经过实验验证，LAMP 引物对所有空肠弯曲菌 DNA 显示阳性，而对近缘细菌和其他种类细菌显示阴性，具有良好的特异性。此外，将空肠弯曲菌分别与肠炎沙门氏菌、耶尔森氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌、梭状芽孢杆菌等菌株的一种或多种等比例混合，用 LAMP 法检测由混合菌株提取的 DNA，发现有空肠弯曲菌存在的混合物 LAMP 显示阳性，其他显示阴性，说明 LAMP 检测法对混合菌株也具有良好的特异性。

经过灵敏度比较, LAMP法与PCR法具有接近的检测低限，这与文献记载不完全相同[12]，需要对反应条件和DNA纯化进一步摸索。相对细菌培养计数法, LAMP法的灵敏度要高出 3 个数量级，考虑两种方法所用时间和设备耗材, LAMP法具有明显优势。对于所有检测的鸡肉样品，增菌培养后，有 4 个样品LAMP法检测显示阳性，而用标准方法[14]在这些样品中没有分离出空肠弯曲菌。这可能是因为空肠弯曲菌进入VNC状态，没有进行菌落增殖。

以核酸扩增为基础的检测方法具有快速、灵敏、特异性好的特点，但无法区分检测到的是活菌、死菌或是休眠状态[15]，因为死菌中的DNA也可能参加随后的PCR扩增，影响检测结果。研究针对死菌的DNA是游离状态，而活菌的DNA被保护在细胞膜中这一重要的理化环境区别，设计实验方案，在提取核酸前加入DNA酶，降解死菌释放的DNA，而活菌的DNA受细胞膜的保护不会受到影响[16]。研究发现，DNase能够有效的降解游离的DNA，不会影响活菌DNA，因此DNase处理可以降低死菌DNA对LAMP检测结果的影响。

结果表明，本研究建立的 LAMP 检测法能够快速有效的用于食品和水中空肠弯曲菌的检测。因为 LAMP 检测法可以在 65°C 恒温条件下进行反应，所以方便利用廉价设备进行现场检测，LAMP 检测法速度快、灵敏度高、而且显色反应结果可以用肉眼直接观察，具有良好的应用前景和价值。

参 考 文 献

[1] Solomon, EB, Hoover DG. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *J Food Safety*, 1999, **19**(2): 121–136.

[2] Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **52**(3): 531–538.

[3] Sahin O, Kobalka P, Zhang Q. Detection and survival of *Campylobacter jejuni* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(5): 1070–1079.

[4] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, *et al*. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**(5): 607–625.

[5] Berndtson E, Danielsson-Tham ML, Engvall A. *Campy-*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

lobacter incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol*, 1996, **32**(1): 35−47.

[6] 袁宝君, 吴高林, 乔　昕, 等. 多重 PCR 与传统方法检测空肠弯曲菌的比较研究. 卫生研究, 2007, **36**(1): 98−100.

[7] 阳成波, 黄克和, 蒋　原, 等. 空肠弯曲菌检测与基因分型的研究进展. 国外医学流行病学传染病学分册, 2002, **29**(5): 307−310.

[8] Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**(10): 2477−2482.

[9] Pearson AD, Greenwood M, Healing TD, *et al*. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 987−996.

[10] Winters DK, O'Leary AE, Slavik MF. Rapid PCR with nested primers for direct detection of in chicken washes. *Mol Cell Probes*, 1997, **11**(4): 267−271.

[11] Nogva HK, Bergh A, Holck A, *et al*. Application of the 5′-nuclease PCR assay in evaluation and development of method for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(9): 4029−4036.

[12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): E63−e63.

[13] 何　蕊, 黄金林, 许海燕, 等. 弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用. 扬州大学学报, 2007, **28**(1): 5−8.

[14] ISO 10272-1: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 1: Detection method.

[15] Tomlinson JA, Boonham NK, Hughes JD, *et al*. On-Site DNA extraction and Real-Time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **12**(71): 6702−6710.

[16] Elvers KT, Helps CR, Wassenaar TM, *et al*. Development of a strain-specific molecular method for quantitating individual *Campylobacter* strains in mixed population. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **8**(74): 4029−4036.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009 年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9 月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10 月 14-18 日	200	湖南衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10 月	150	山东济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	湖北武汉	李友国，张忠明 027－87281685，027－87281687
16	2009 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 月	400	待定	王旭 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	250	湖北武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	60	昆明	张克勤 0871-5033790

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn