

空肠弯曲菌环介导等温扩增检测方法的建立和优化

许紫建 杨 兵 苏 霞 周宏专 史爱华 徐福洲

(北京市农林科学院 畜牧兽医研究所 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室 北京 100097)

摘要: 首先根据空肠弯曲菌 *mapA* 基因序列设计 LAMP 引物,建立检测空肠弯曲菌的 LAMP 检测方法。继而对 LAMP 方法中不同反应组分的浓度分别进行筛选 结果显示 当内外引物浓度分别为 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 、 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 浓度为 8 mmol/L、dNTP 浓度为 1.4 mmol/L、Betaine 浓度为 0.8 mol/L 时获得最佳的反应结果。最后对 LAMP 反应的特异性和敏感性进行检测 特异性检测结果显示 对其他 13 种革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌扩增结果均为阴性;敏感性检测结果显示 对空肠弯曲菌基因组 DNA 的检测限为每个反应管 100 fg 对空肠弯曲菌培养菌液检测限为每个反应管 7.5 cfu。试验建立的 LAMP 方法为快速简便地自动物源性产品中检测空肠弯曲菌奠定了基础。

关键词: 空肠弯曲菌; 环介导等温扩增方法; 检测; 优化

中图分类号: S855.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0222-05

Development and Optimization of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Campylobacter jejuni*

XU Zi-jian, YANG Bing, SU Xia, ZHOU Hong-zhuan, SHI Ai-hua, XU Fu-zhou

(Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In this study, the specific *mapA* gene was used to design a set of primers to develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *C. jejuni*. To optimize the LAMP assay, the reaction components in the assay were screened to determine the optimal concentration. The final LAMP assay comprised 1.6 $\mu\text{mol/L}$ each of inner primers FIP and BIP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ each of outer primers F3 and B3, 8 mmol/L Mg^{2+} , 1.4 mmol/L dNTP, 0.8 mol/L Betaine. The specificity test showed that the assay correctly identified all *C. jejuni* strains but not 13 other bacterial species. The sensitivity of the assay was 100 fg per test tube for *C. jejuni* genomic DNA and 7.5 cfu per test tube for *C. jejuni* bacterial culture. This LAMP assay is a rapid and simple tool for detection of *C. jejuni* and will provide an essential role in facilitating early diagnosis of this organism from animal products.

Key words: *Campylobacter jejuni*; Loop-mediated isothermal amplification assay; Detection; Optimization

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是一种主要引起人和动物肠道感染的食源性病原细菌,在范围内广泛存在^[1]。感染人主要引起细菌性肠炎,同时与人自身免疫性疾病如格林-巴利综合征等密切相关;感染动物可引起母畜流产、不孕和乳房炎以及幼畜腹泻等临床表现;该菌在家禽肠道内正常定植,不引起任何临床症状,但成为人感染该菌的主要污染源^[1-3]。弯曲菌感染给人类带来巨大的损失,

该病在美国每年有 200 万以上的病例发生,造成的经济损失约 15 亿~80 亿美元,其中空肠弯曲菌感染所占比例在 90% 以上^[2]。因此,防止动物源性产品中空肠弯曲菌污染对保障人类健康和食品安全具有重要意义。

空肠弯曲菌感染虽然带来严重的人类健康和公共安全问题,但目前尚未有行之有效的控制措施。首先,目前尚未出现商品化的疫苗来控制 and 预防这

收稿日期: 2013-03-05

基金项目: 北京市优秀人才项目(2011D002020000004); 2011 年度北京市留学人员科技活动择优资助项目; 北京市农林科学院青年科学基金项目

作者简介: 许紫建(1982-),男,山东青岛人,在读硕士,主要从事动物病原细菌学研究。

通讯作者: 徐福洲(1973-),男,山东单县人,副研究员,博士,主要从事动物病原细菌学及免疫学研究。

种病原菌^[4];其次,抗生素的过量使用导致该菌的耐药性非常普遍^[5]。因而,建立空肠弯曲菌检测方法对控制该菌的感染具有重要意义。由于空肠弯曲菌生长条件要求比较苛刻,常规的细菌分离培养鉴定方法费时费力,不适用于动物源性产品的现地、快速、准确的检测要求。基于此,建立一种快速、简便、可靠的检测方法对控制空肠弯曲菌感染十分必要,近年来,一些基于基因的检测方法如 PCR 等被用于空肠弯曲菌检测^[6]。

环介导等温扩增方法(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 2000 年 Notomi 等^[7]发明的一种新的基于核酸水平的检测方法,具有简便、快速、成本低、可现场使用、特异性和灵敏度高等优点,近几年在多种病原检测中得到广泛使用^[8-9]。鉴于 LAMP 检测方法的诸多优点,非常适用于动物源性产品安全检测,在食源性病原微生物如弯曲菌等的检测已见报道^[10-13]。在这些报道中均使用一种商品化的检测试剂盒(Loopamp DNA Amplification Kit, Eiken Chemical 公司产品)对样品进行弯曲菌检测,每份检测样品成本在百元人民币以上,不适用于大量临床样品的检测。在本试验中,我们参照 LAMP 检测方法中的组分和条件,利用自配试剂进行筛选和优化,并选择空肠弯曲菌特异性 *mapA* 基因进行

检测^[14],以期降低检测成本,建立快速、简便、准确检测空肠弯曲菌的 LAMP 检测方法。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养

空肠弯曲菌参考菌株 NCTC 11168 由中国疾病预防控制中心张茂俊博士惠赠,禽和猪空肠弯曲菌及结肠弯曲菌分离菌株由畜禽疫病防控技术北京市重点实验室分离鉴定。所有菌株培养于 Mueller-Hinton (MH) 固体或液体培养基中,培养条件为 42 ℃ 微需氧环境(85% N₂、10% CO₂、5% O₂)。

1.2 主要试剂

Betaine、Tween 20、SYBR Green I 染色液购自 Sigma 公司, *Bst* DNA 聚合酶、dNTP 购自 NEB 公司,其他化学试剂为国产分析纯,细菌基因组 DNA 提纯试剂盒购自 Promega 公司,国产 LAMP DNA 扩增试剂盒购自荣研生物科技(中国)有限公司。

1.3 细菌基因组 DNA 提取

新鲜培养的弯曲菌培养物经离心洗涤后菌沉淀用于细菌基因组 DNA 的抽提,抽提过程参照细菌基因组 DNA 提纯试剂盒说明书进行。最后将基因组 DNA 溶于纯水中经定量后分装冻存储备用。

表 1 检测空肠弯曲菌 *mapA* 基因所用 LAMP 引物

Tab. 1 LAMP primers used to detect the *mapA* gene of *C. jejuni*

| 引物 Primer | 长度/bp Size | 序列 Sequence(5'-3') |
|--------------|---------------|---|
| F3 | 21 | CTCTAGCTTCAAGTTCTTGTT |
| B3 | 19 | GCTGGTTTTGAAGCAAAGA |
| FIP | 44 | AGGGCAAAAAGGTTTTAAATGCTA - TACCGCATTAATAATTCACATC |
| BIP | 44 | AGCAATACCACTGTCTAAAGTGC - AAGGGCTTTTATACATTAGCG |

1.4 引物设计及合成

根据空肠弯曲菌 NCTC 11168 参考菌株 *mapA* 基因序列(序列号 AL111168)^[15],在 LAMP 引物设计在线网站 <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html> 上设计 4 条引物,引物序列和长度如表 1 所示。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.5 LAMP 反应体系

根据 LAMP DNA 扩增试剂盒说明书中反应缓冲液的配方,自配 2 × 反应缓冲液,组成成分及浓度为 40 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.8)、20 mmol/L KCl、20 mmol/L (NH₄)₂SO₄、16 mmol/L MgSO₄、0.2% Tween 20、1.6 mol/L Betaine、2.8 mmol/L dNTPs。常规的 25 μL 反应体系为:2 × 反应缓冲液 12.5 μL、内引物 FIP/BIP 各 1.6 mmol/L、外引物 F3/B3 各 0.2 mmol/L、*Bst* DNA 聚合酶 1 μL、模板

DNA 50 ~ 100 ng, 65 ℃ 反应 60 min。反应结果通过 1% 琼脂糖凝胶电泳或在反应液中加入 SYBR Green I 染色液来进行检测。

1.6 LAMP 反应中不同组分浓度的筛选

LAMP 方法中反应的组分、时间和温度等因子均影响反应的结果。在本试验中,对参与反应的主要组分如引物、Mg²⁺、dNTP 和 Betaine 的浓度分别进行筛选,以获得最佳反应浓度,不同组分用于筛选的反应浓度如表 2 所示。在筛选和优化某一种影响因子的时候固定其他因子,最后通过对不同因子筛选获得空肠弯曲菌 LAMP 检测方法的最优反应条件。

1.7 LAMP 特异性检测

利用畜禽疫病防控技术北京市重点实验室保存的沙门氏菌、大肠杆菌、耶尔森氏菌、小肠耶尔森氏

菌、变形杆菌、巴氏杆菌、副鸡禽杆菌、葡萄球菌、链球菌、副猪嗜血杆菌、胸膜肺炎放线杆菌、波氏杆菌、结肠弯曲菌等的细菌基因组 DNA 或菌液抽提获得

的基因组 DNA 通过 LAMP 反应对这些细菌进行检测,以鉴定本试验建立的空肠弯曲菌 LAMP 检测方法的特异性。

表 2 LAMP 反应中不同反应组分最佳浓度的筛选

Tab.2 Screening the optimal concentration of the components in LAMP assay

| 组分 Components | 单位 Units | 储存浓度 Stocking concentration | 工作浓度 Working concentration | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|------|-----|------|-----|-----|-----|---|
| 引物 Primers FIP/BIP F3/B3 | $\mu\text{mol/L}$ | 40 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2.0 | 2.4 | — | — | — |
| | | | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | — | — | — |
| Mg^{2+} | mmol/L | 250 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | — |
| dNTP | mmol/L | 10 | 0.8 | 1 | 1.2 | 1.4 | 1.6 | 1.8 | 2.0 | — |
| Betaine | mol/L | 5 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 | — |

注: 储存浓度为反应缓冲液配比前的各个溶液的浓度,工作浓度为 25 μL 反应液中各个组分的反应浓度。

Note: The stocking concentration showed the concentration of each component before using for master mix. The working concentration showed the concentration of each component in the 25 μL master mix.

1.8 LAMP 敏感性检测

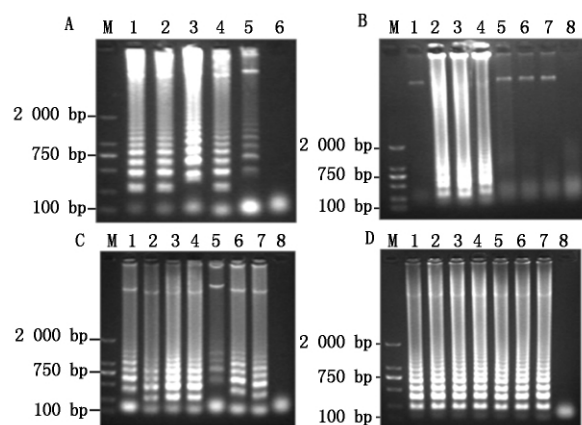
1.8.1 基因组 DNA 敏感性检测 通过 10 倍系列稀释,在反应液中分别加入空肠弯曲菌基因组 DNA 的质量分别为 100 ng、10 ng、1 ng、100 ng、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg,利用建立的 LAMP 方法检测出现阳性反应的最低基因组 DNA 的质量,通过琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 染色检测反应结果,以确定建立的 LAMP 方法检测基因组 DNA 的灵敏度。

1.8.2 菌落敏感性检测 将新鲜培养的空肠弯曲菌培养菌液用 MH 肉汤进行 10 倍系列稀释,各个稀释度分别取 100 μL 涂布于 MH 平板过夜培养进行菌落计数。同时所有稀释度的菌液经沸水浴 5 min 后直接取 2 μL 作为模板进行 LAMP 反应,通过琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 染色检测反应结果,以确定建立的 LAMP 方法检测空肠弯曲菌培养菌液的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应体系中不同组分的筛选结果

通过对扩增产物电泳结果比较,确定在 25 μL LAMP 反应体系中,引物在使用的几种浓度条件下均出现阳性结果,但 FIP/BIP 各为 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 、F3/B3 各为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时出现最佳反应结果(图 1-A); Mg^{2+} 浓度筛选结果显示在 8、12、16 mmol/L 时出现阳性扩增结果,而其他浓度下扩增结果为阴性(图 1-B); dNTP 在所用的各种浓度条件下扩增结果均为阳性,但浓度为 1.4 mmol/L 时扩增效果最佳(图 1-C); Betaine 在所用的不同浓度条件下扩增结果均为阳性,但以 0.8 mol/L 时扩增结果最佳(图 1-D)。通过比较发现,本试验中筛选的几种组分浓度最佳扩增结果与商品化试剂盒中相应组分的使用浓度完全一致。



M. DL2000 DNA Marker; A1 ~ A5. 内引物 FIP/BIP 浓度分别为 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 及外引物 F3/B3 浓度分别为 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 $\mu\text{mol/L}$; A6. 阴性对照; B1 ~ B7. Mg^{2+} 浓度分别为 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 mmol/L ; B8. 阴性对照; C1 ~ C7. dNTP 浓度分别为 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mmol/L ; C8. 阴性对照; D1 ~ D7. Betaine 浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mol/L ; D8. 阴性对照。

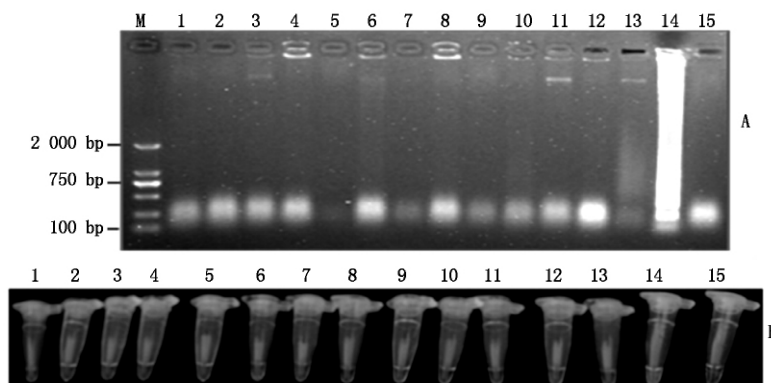
M. DL2000 DNA Marker; A1 ~ A5. Inner primers FIP/BIP concentration 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 $\mu\text{mol/L}$ and outer primers F3/B3 concentration 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ respectively; A6. Negative control; B1 ~ B7. Mg^{2+} concentration 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 mmol/L respectively; B8. Negative control; C1 ~ C7. dNTP concentration 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mmol/L respectively; C8. Negative control; D1 ~ D7. Betaine concentration 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mol/L respectively; D8. Negative control.

图 1 LAMP 反应体系中不同组分最佳浓度的筛选结果

Fig.1 Screening results of the optimal concentration of the components in LAMP assay

2.2 LAMP 方法特异性检测结果

通过检测其他 13 种细菌基因组 DNA 来判定本试验建立的 LAMP 方法的特异性。在利用等量的不同细菌基因组 DNA 作为模板进行 LAMP 扩增时,凝胶电泳结果显示,只有空肠弯曲菌出现明显的扩增产物,而其他 13 种细菌扩增结果均为阴性(图 2-A);在扩增产物中加入 SYBR Green I 染色液显示只有空肠弯曲菌反应管 14 号管出现绿色阳性反应,其他反应管均呈现橙红色阴性反应(图 2-B)。结果提示,此 LAMP 检测方法具有较好的特异性。



A. 琼脂糖凝胶电泳结果; B. SYBR Green I 染色结果; M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 15. 表示沙门氏菌、大肠杆菌、耶尔森氏菌、小肠耶尔森氏菌、变形杆菌、巴氏杆菌、副鸡禽杆菌、葡萄球菌、链球菌、副猪嗜血杆菌、胸膜肺炎放线杆菌、波氏杆菌、结肠弯曲菌、空肠弯曲菌 NCTC 11168、阴性对照。A. Agarose gel electrophoresis results; B. SYBR Green I dye results; M. DL2000 DNA Marker; Lane 1 ~ 15. The LAMP results of *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus proteus*, *Pasteurella*, *Avibacterium paragallinarum*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella*, *C. coli*, *C. jejuni* NCTC 11168 and negative control respectively.

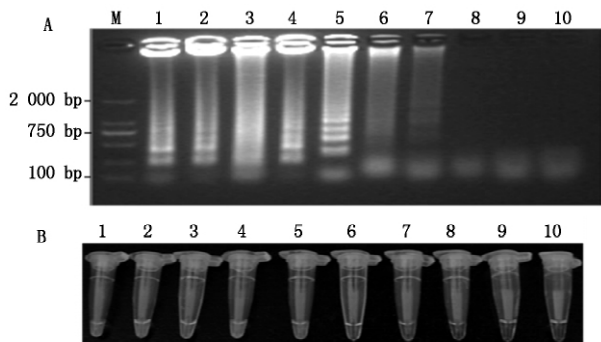
图2 空肠弯曲菌 LAMP 方法特异性检测结果

Fig. 2 Specificity results of the LAMP assay for detection of *C. jejuni*

2.3 LAMP 方法敏感性检测结果

2.3.1 空肠弯曲菌基因组 DNA 敏感性检测结果

当添加空肠弯曲菌基因组 DNA 模板的量为 100 fg 时,凝胶电泳结果显示扩增产物仍可判定为阳性。模板低于 100 fg 时未见扩增产物(图 3-A); SYBR Green I 染色扩增产物的结果与电泳结果一致(图 3-B),因而判定本试验 LAMP 检测方法对空肠弯曲菌基因组 DNA 的检测限为每个反应管 100 fg。



A. 琼脂糖凝胶电泳结果; B. SYBR Green I 染色结果; M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 10. 表示空肠弯曲菌基因组 DNA 的质量分别为 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 ng, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0 fg 时的扩增结果。

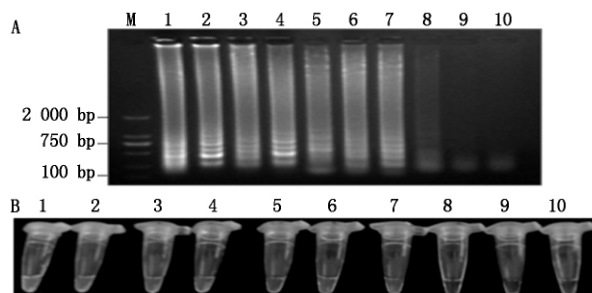
A. Agarose gel electrophoresis results; B. SYBR Green I dye results; M. DL2000 DNA Marker; Lane 1 ~ 10. The LAMP results of the *C. jejuni* genomic DNA of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 ng, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0 fg respectively.

图3 LAMP 方法检测空肠弯曲菌基因组 DNA 的敏感性结果

Fig. 3 Sensitivity results of the LAMP assay for detection of the genomic DNA of *C. jejuni*

2.3.2 空肠弯曲菌菌液敏感性检测结果 通过对用于模板的菌液进行菌落计数结果显示,在所用的 10 个反应管中加入的空肠弯曲菌菌落数分别为 7.5×10^7 , 7.5×10^6 , 7.5×10^5 , 7.5×10^4 , 7.5×10^3 , 7.5×10^2 , 7.5×10^1 , 7.5 , 0 cfu。LAMP 检测结果显示,当添加空肠弯曲菌菌落数低至 7.5 cfu 时,凝胶电

泳结果显示扩增产物仍为阳性。模板低于 7.5 cfu 时未见扩增产物(图 4-A); SYBR Green I 染色扩增产物的结果与电泳结果一致(图 4-B),因而判定本试验 LAMP 检测方法对空肠弯曲菌菌液的检测限为每个反应管 7.5 cfu。



A. 琼脂糖凝胶电泳结果; B. SYBR Green I 染色结果; M. DL2000 DNA Marker; 1 ~ 10. 表示空肠弯曲菌菌落数为 7.5×10^7 , 7.5×10^6 , 7.5×10^5 , 7.5×10^4 , 7.5×10^3 , 7.5×10^2 , 7.5×10^1 , 7.5 , 0 cfu 时的扩增结果。

A. Agarose gel electrophoresis results; B. SYBR Green I dye results; M. DL2000 DNA Marker; Lane 1 ~ 10 showed the LAMP results of the *C. jejuni* colony of 7.5×10^7 , 7.5×10^6 , 7.5×10^5 , 7.5×10^4 , 7.5×10^3 , 7.5×10^2 , 7.5×10^1 , 7.5 , 0 cfu respectively.

图4 LAMP 方法检测空肠弯曲菌菌液的敏感性结果

Fig. 4 Sensitivity results of the LAMP assay for detection of the bacterial culture of *C. jejuni*

3 讨论

接触或食用污染的动物源性产品是人感染空肠弯曲菌的主要来源^[2],因而对动物源性产品进行空肠弯曲菌检测是控制感染的有效策略。经过 30 多年的发展,空肠弯曲菌的检测已从 20 世纪 70 ~ 80 年代的细菌分离鉴定方法、90 年代的免疫学方法发展到近几年基于分子生物学的检测方法^[1,6],检测方法不但敏感性、特异性和准确性大为提高,而且检测时间由最初的几天发展到目前的几个小时。鉴于

动物源性产品的特点,现地检测对保障食品安全同样非常重要,因而发展简便、快速的空肠弯曲菌检测方法同样具有重要意义。基于此,较常规的 PCR 方法更为简便快速的 LAMP 检测方法被用于空肠弯曲菌的检测^[11,13]。

LAMP 技术由于其检测灵敏度高、成本低、快速、简便等一系列优点而特别适用于现地检测,对动物源性产品安全检疫具有重要意义。目前,已有一些关于弯曲菌 LAMP 检测方法的报道^[10-13],如 Yamazaki 等^[11,13]建立的检测空肠弯曲菌 *cj0414* 基因的 LAMP 方法,自人粪便样品中检测空肠弯曲菌的灵敏度可达每个反应管中 1.4 cfu(每克粪便的检测限为 5.6×10^3 cfu)^[11];而自培养空肠弯曲菌的 Preston 培养基中检测空肠弯曲菌的灵敏度为每个反应管中 7.9 cfu^[13],与本试验中检测空肠弯曲菌培养菌液的灵敏度 7.5 cfu 比较接近。Yamazaki 等^[12]检测胎儿弯曲菌的 LAMP 方法灵敏度显示,利用细菌纯培养物在每个反应管中可检测 2.5 cfu。Luo 等^[10]对引起美国绵羊流产的一个空肠弯曲菌分离株建立了 LAMP 检测方法,敏感性结果显示,以细菌基因组 DNA 为模板每个反应管中灵敏度达到 3.2×10^{-2} nmol/L (4.4×10^2 cfu/mL)。所有研究结果显示,LAMP 检测方法灵敏度高,非常适用于肉品中微量空肠弯曲菌污染的快速检测。

由于目前报道的空肠弯曲菌 LAMP 检测方法均使用商品化的 LAMP 检测试剂盒对样品进行检测,按照目前价格该试剂盒检测每个样品的成本在 100 元人民币以上,检测成本比较高,不适用于临床上大量样品的检测,因而根据 LAMP 方法自配试剂将会大大降低检测的成本。本试验利用实验室自配的化学试剂建立和优化了空肠弯曲菌 LAMP 检测方法,其目的就是降低检测的成本,使检测试剂可高通量应用于动物源性产品的检测。试验结果显示,本试验自配试剂检测灵敏度和特异性基本可达到商品化试剂盒的水平,但自配试剂的稳定性、自不同临床样品中检测效果等尚需继续研究,有希望在进一步优化和提高的基础上应用于临床空肠弯曲菌的检测。

参考文献:

- [1] Snelling W J, Matsuda M, Moore J E, et al. *Campylobacter jejuni* [J]. Lett Appl Microbiol, 2005, 41(4): 297-302.
- [2] Lin J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry [J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 6(7): 755-765.
- [3] Poly F, Guerry P. Pathogenesis of *Campylobacter* [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008, 24(1): 27-31.
- [4] Jagusztyn-Krynicka E K, Laniewski P, Wyszynska A. Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis [J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(5): 625-645.
- [5] Chen X, Naren G W, Wu C M, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China [J]. Vet Microbiol, 2010, 144(1-2): 133-139.
- [6] Denis M, Soumet C, Rivoal K, et al. Development of am-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* [J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 29(6): 406-410.
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [8] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases [J]. J Infect Chemother, 2009, 15(2): 62-69.
- [9] Parida M, Sannarangaiah S, Dash P K, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases [J]. Rev Med Virol, 2008, 18(6): 407-421.
- [10] Luo Y, Sahin O, Dai L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive and specific detection of a *Campylobacter jejuni* clone [J]. J Vet Med Sci, 2012, 74(5): 591-596.
- [11] Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 4): 444-451.
- [12] Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus* [J]. Vet Microbiol, 2009, 136(3-4): 393-396.
- [13] Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(6): 1597-1603.
- [14] Stucki U, Frey J, Nicolet J, et al. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(4): 855-859.
- [15] Parkhill J, Wren B W, Mungall K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences [J]. Nature, 2000, 403(6770): 665-668.
- [16] 黄金林. 我国部分地区鸡源空肠弯曲菌流行病学及运送 *flaA* 基因的壳聚糖纳米 DNA 疫苗免疫生物学特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.