

重组聚合酶扩增技术在沙门氏菌检测中的应用

程永友¹, 刘雪莲², 刘滢², 马凤伟¹, 陈刚^{3*}

(1. 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵阳 550005; 2. 北京大北农科技集团股份有限公司, 北京 100125;
3. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘要: 沙门氏菌是重要的致病菌, 能引起人和动物肠道疾病, 因此检测沙门氏菌具有十分重要的卫生学意义。重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种新型的恒温核酸扩增技术, 具有反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。利用 RPA 技术检测沙门氏菌, 具有较大的应用前景和市场。本文对近年来应用 RPA 技术检测沙门氏菌的研究进行综述, 以期对相关进一步研究及应用提供参考。

关键词: 重组聚合酶扩增; 沙门氏菌; 检测

Application of recombinant polymerase amplification in salmonella detection

CHENG Yong-You¹, LIU Xue-Lian², LIU Ying², MA Feng-Wei¹, CHEN Gang^{3*}

(1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China; 2. Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd, Beijing 100125, China; 3. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: *Salmonella* is an important pathogen that can cause intestinal diseases in human and animal, so the detection of *Salmonella* has very important hygiene significance. Recombinase polymerase amplification (RPA) technology is a new type of constant temperature nucleic acid amplification technology, which has the advantages including fast reaction, high sensitivity and strong specificity. Using RPA technology to detect *Salmonella* has a great application prospect and market. This article summarized the recent studies on the application of RPA technology to detect *Salmonella*, in order to provide references for further research and applications.

KEY WORDS: recombinase polymerase amplification; *Salmonella*; detection

1 引言

沙门氏菌属革兰氏阴性菌, 共有 2000 多个血清型, 在全球范围广泛分布。沙门氏菌不但可以引起家畜、家禽和鼠类等动物的疾病, 还可以通过污染食物传播给人类, 是一种重要的食源性致病微生物。沙门氏菌其菌型繁多^[1], 其中鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌等是具有代表性的沙门氏菌。我国家庭细

菌性食物中毒有近 60%由沙门氏菌导致^[2]。美国疾病预防控制中心估计, 非伤寒沙门氏菌感染在美国每年引起 120 万起病例, 导致经济损失超过 34 亿美元^[3]。

重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是 Piepenburg 等^[4]2006 年报道的一种全新的核酸等温扩增技术, 目前已在多个领域发挥重要作用^[5-9]。基于 RPA 的相关研究近年来较多, 以“recombinase polymerase amplification”为关键词在 PubMed

基金项目: 贵阳市科技局贵阳学院专项[Gyu-KYZ(2019-2020)PT-09-05]、北京市科委资金(Z181100009318007)

Fund: Supported by Guiyang Science and Technology Bureau Special Fund for Guiyang University [GYU-KYZ(2019-2020)PT-09-05], Beijing Science and Technology Commission Fund (Z181100009318007)

*通讯作者: 陈刚, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全。E-mail: chengang01@caas.cn

*Corresponding author: CHEN Gang, Professor, Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No. 12, Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: chengang01@caas.cn

检索文献, 结果显示 2011~2013 年仅 32 篇, 2014~2016 年 111 篇, 2017~2019 年达到 249 篇。

本文介绍了 PRA 方法原理、特点, 并围绕 RPA 在沙门氏菌检测的应用展开综述, 以期为进一步相关研究和应用提供参考。

2 沙门氏菌检测方法

在食品和饲料中, 均要求不得检出沙门氏菌。为了保护动物和人类健康, 需要开发能够简单有效、准确、低成本和短时间消耗的沙门氏菌检测方法。随着科学技术发展, 特别是免疫学、生化技术、分子生物学、传感技术的发展, 沙门氏菌检测技术也在不断进步, 不断向自动化、快速化、高通量、低成本方向发展。目前沙门氏菌检测方法主要有标准培养法和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等。等温环介导扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[10]、依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)^[11,12]等较新方法的应用量也逐步扩大。

传统的细菌培养法需要对样品中细菌进行预增菌、选择性增菌、分离、鉴定等, 根据菌落特征, 加上一系列生化和血清学检测, 才能作出鉴定。操作繁琐, 耗时耗力, 越来越不能满足沙门氏菌的监测需求。

以抗原和抗体的特异性反应为基础, 发展了一系列细菌免疫法检测技术, 包括 ELISA、免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色、免疫组织化学(immunohistochemistry, ZHC)、免疫扩散、乳胶凝集、放射免疫(radio immunoassay, RIA)、免疫磁性分离技术、免疫层析和免疫传感器等。免疫法具有较高灵敏度, 样品在增菌后可在较短时间内完成检测^[3]。

PCR 方法具有特异性强、敏感性高、操作简便、快速高效等特点, 但需要专业知识和昂贵的仪器。且 PCR 方法不能有效区分活菌和死菌^[13]。PCR 技术检测沙门氏菌的特异性, 取决于扩增的靶序列是否为沙门氏菌高度保守的特异性序列。

其他的技术方法包括核酸探针技术、基因芯片技术、噬菌体裂解技术、电阻抗技术、表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)、纳米技术、适配体技术、重组酶介导等温核酸扩增技术等^[14-18]。各种方法均存在局限性, 需要进一步研究完善。

3 RPA 方法原理

RPA 技术主要依赖重组酶 *UvsX*、单链结合蛋白 Gp32 和链置换 DNA 聚合酶 *Bsu*。此外, 该体系中还有一种辅助蛋白 *UvsY*, 反应体系在等温条件下即可完成 DNA 扩增。扩增过程非常高效, 可以在 37~42 °C 环境下, 在 40~60 min

完成数十亿的 DNA 拷贝^[4,19,20]。扩增反应通常在 10~20 min 即可完成。扩增产物可以通过探针法荧光定量进行实时监测, 也可以与侧向流试纸条、生物芯片、凝胶电泳等多种方法相结合进行检测^[21]。

RPA 一个重要的特点是其在恒定且相对较低的温度下工作。这与 PCR 和许多其他等温扩增生物化学(例如 LAMP 或切口酶扩增反应)不同。RPA 不需要严格调节温度, 可以在较宽的温度范围内进行(25~45 °C, 最佳温度是 37~42 °C)^[22]。这使 RPA 方法不需要复杂仪器设备, 降低了仪器成本。RPA 灵敏度和特异性高, 最低可以检测 1 个 DNA 拷贝。

RPA 作为一种新型的快速检测技术, 已经应用到各个领域。比如细菌检测、病毒检测、真菌检测、转基因检测、寄生虫检测、癌症检测等^[23-25]。

4 RPA 在沙门氏菌检测中的应用

4.1 引物设计

沙门氏菌 *invA* 基因(侵袭蛋白 A 基因)具有特异性, 常作为沙门氏菌研究的靶基因, 多数沙门氏菌 RPA 检测方法都依据 *invA* 基因设计引物。Chen 等^[26]针对肠炎沙门氏菌的 *iroB* 基因设计引物检测肠炎沙门氏菌。表 1 是较常使用的以及效果较好的检测沙门氏菌的 RPA 引物。

4.2 扩增产物检测

检测沙门氏菌 DNA 的 RPA 扩增产物的方法有多种。较典型的方法有: 一是将产物纯化后, 进行琼脂糖凝胶电泳。刘立兵等^[23]以此建立的方法, 灵敏度为 1.1×10^{-3} ng/ μ L。人工污染实验表明, 当羊肉、鸡肉和西兰花样品污染量为 4 CFU/25 g, 增菌 8 h, 即可通过该 RPA 方法检出沙门氏菌。但其需要将产物纯化后进行电泳, 以免产物外的其他成分导致拖带^[27]。二是利用引物探针建立实时荧光定量 RPA。Kim 等^[28]建立了鸡蛋和鸡肉中肠炎沙门氏菌荧光定量 RPA 快速检测方法。该方法和荧光定量 PCR 相比, 两者对肠炎沙门氏菌纯培养物的检测灵敏度一致, 但 PCR 需要 40 min 检测时间, 而 PRA 仅需 10 min。对于实际样本检测, RPA 检测肠炎沙门氏菌的灵敏度为: 鸡蛋: 10 CFU/g, 鸡肉样品: 100 CFU/g, PCR 检测灵敏度分别提高了 100 倍和 10 倍。Chen 等^[29]依据肠炎沙门氏菌的 *iroB* 基因设计了 RPA 引物和探针。该方法可以最低检测出 10^2 个模板 DNA。沙门氏菌检测限为 2.0×10^3 CFU/mL。在 36 °C 富集 4~6 h 后, 从有 2.2×10^1 CFU/mL 肠炎沙门氏菌的鸡肉或鸡蛋样品的接种中可以获得阳性信号。三是结合侧向流检测试纸(lateral flow detection, LFD)检测扩增产物。Liu 等^[30]在引物对中的其中一个标记地高辛, 另一个标记生物素。经过扩增过程后, 产生大量的含地高辛和生物素的双链 DNA, 再用含地高辛抗体和链霉亲和素的侧向流试纸进行双链

DNA 检测。方法检测限为 20 fg 靶 DNA, 或 1.05×10^1 个细菌纯培养物。经 2 h 富集, 牛奶和鸡胸肉中的沙门氏菌检测限低至 1.05×10^0 CFU/ mL 和 1.05×10^0 CFU/g, 经 4 h 富集, 鸡蛋中的沙门氏菌检测限为 1.05×10^0 CFU/g。Gao 等^[31]用侧向流试纸结合 RPA 检测贝类中的沙门氏菌。方法灵敏度为 100 fg/20 μ L 反应体系。Hu 等^[32]用 RPA-LFD 建立了牛奶中鼠伤寒沙门氏菌检测方法。方法对靶 DNA 检测限浓度为 1 fg, 这比用凝胶电泳结合 RPA 检测限低 5 倍。RPA-LFD 在人工接种的牛奶样品中可以检测到鼠伤寒沙门氏菌的浓度低至 1.95 CFU/mL, 其灵敏度是 PCR 的 10 倍。

为了提高检测灵敏度, Liu 等^[33]改进了侧向流试纸。他们开发了一种基于表面增强拉曼散射光谱的侧向流试纸。该试纸应用了 AuMBA@Ag 核-壳纳米粒子。通过测量 SERS 标签的特征峰强度可以实现高度灵敏的定量检测。肠炎沙门氏菌的检出限为 27 CFU/mL。

除以上几种典型方法外, Chen 等^[34]利用未修饰的金纳米颗粒(AuNPs)来检测牛奶中的沙门氏菌。制备的胶体金颗粒直径为(16.01 \pm 1.02) nm, 吸收峰在 522 nm 左右。在 RPA 反应体系中加入未修饰的胶体金。大分子酶、单链 DNA 和胶体金颗粒相互吸附, 这种吸附作用会受到溶液中扩增反应的影响, 导致产生肉眼可见的溶液颜色变化。在 37 $^{\circ}$ C 下富集 6 h, 牛奶样品的检出限为 50 CFU/mL, 对

DNA 模板的检测限是 1 pg。Felipe 等^[35]用 ELISA 检测 RPA 扩增产物, 在酶标板上包被链霉亲和素, 与特定的生物素化探针进行反应。RPA-ELISA 和 PCR-ELISA 检测沙门氏菌, 灵敏度分别为 6.00 CFU/ mL 和 5.00 CFU/ mL, 基本一致。

4.3 DNA 提取、扩增、检测集成化

Chan 等^[36]利用 3D 打印技术结合 RPA, 能够有效对核酸进行提取、扩增和检测。表明可以利用低成本, 入门级的 3D 打印机用于自动高质量核酸提取, 提取后可以采用简单的方法进行扩增, 而实时 RPA 的荧光信号可以通过便携式荧光检测器或智能手机相机进行分析。其将肠炎沙门氏菌接种至 2% 低脂牛奶, 作为检测对象, 能够在 10 min 检测出 10^3 CFU/mL 沙门氏菌。

在沙门氏菌 RPA 扩增产物检测方面, Felipe 等^[37]开发了一种通过光盘技术以微阵列形式检测的高通量传感平台。Kim 等^[38]则设计了更为复杂的光盘检测平台, 沙门氏菌 DNA 提取、扩增和检测都在同一个平台完成。平台用激光二极管控制细胞裂解和非接触加热。通过包被抗体的磁珠吸附富集牛奶和磷酸缓冲盐溶液中的细菌。该平台对于 PBS 中的沙门氏菌检测灵敏度为 10 CFU/ mL, 对于牛奶中的沙门氏菌检测灵敏度为 100 CFU/mL。

表 1 用于检测沙门氏菌的 RPA 引物序列
Table 1 RPA primer sequences used to detect *Salmonella* cite

引物序列(5'-3')	参考文献
F-RPA GGCGATAGCCTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTT R-RPA ACTTCATCGCACCGTCAAAGGAACCGTAAA	[31]
RPA ACCAGCAAAGGCGAGCAGCCGCTCAGTATTGAGG R-RPA CGCCATAATCAATAAAGAAGTACTACGTAGACGC	[34]
F-RPA CTACAAGCATGAAATGGCAGAACAGCGTCCG R-RPA CAACCAGATAGGTAGGTAATGGAATGACGA	[43]
F-RPA GCATCCGCACAGATAAAT R-RPA TACACCACCAGATACCGAAGCCCT	[43]
F-RPA TTCCTGATTTACTTAAAGAAGTGCTCAGACATGCC R-RPA CTTTGCGAATAACATCCTCAACTTCAGCAGATACC	[32]
F-RPA CGCCACGTTTCGGGCAATTCGTTATTGGCGATAGGC R-RPA CACCGTCAAAGGAACCGTAAAGCTGGCTTTCCC	[40]
F-RPA TAAATGTGTTTTATCTGATGCAAGAGGGGGAG R-RPA GATTTACTAACTTTTTGATATACTCCCTGAATC	[28]
F-RPA GGAATGTCATACTTAGCGGCAATCAGTGGTCC R-RPA GGTGGTATTTGACGCTGCGCCTGGTTTCCA	[26]
F-RPA GTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTCC R-RPA GCATCGGCTTCAATCAAGATAAGACGACTGGT	[23]

4.4 菌体富集

Hicc 等^[39]应用磁离子液(magnetic ionic liquid, MIL)捕获和浓缩沙门氏菌菌体。将鼠伤寒沙门氏菌接种于牛奶、杏仁奶、蛋清等基质, 然后使用 MIL 萃取菌体。萃取所得菌体用于 PRA 扩增, 扩增产物用凝胶电泳或胶体金试纸检测。该方法可以检测的沙门氏菌浓度低至 10^3 CFU/mL。

Dao 等^[40]开发出一种高灵敏度纳米生物传感器, 该传感器在 RPA 基础上, 结合了伴刀豆球蛋白 A 功能化的微通道和不对称人字形凹槽阵列的富集微流控。对于尿液分析, 该传感器在无标记情况下的检测灵敏度可以达到 5 CFU/mL。使用富集微流控将灵敏度提高了 1.76 个数量级。该方法的特点是快速准确、实时、无需标记。方法采用的微流体芯片与基于培养物、过滤或基于磁性颗粒的富集方法相比, 是一种独特的富集方法。方法原理为, 伴刀豆球蛋白 A 是一种甘露糖/葡萄糖结合凝集素, 能识别细菌脂多糖, 可以与包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和牛分枝杆菌在内的多种革兰氏阴性菌相互作用。因此, 使用伴刀豆球蛋白 A 的微流控芯片可以提高低浓度靶细菌的富集效率。但是, 由于沙门氏菌的鉴定缺乏特异性, 因此采用纳米生物传感器进行特异性检测。

Dao 等^[41]利用蛙皮素-1(magainin-1)建立了一个与上述类似的富集平台。magainin-1 是一种具有抗菌和抗寄生虫活性的肽类抗生素, 提取自非洲爪蟾的皮肤, 可以半选择性结合革兰氏阴性菌。固定的 magainin-1 可直接用于检测和捕获沙门氏菌。该平台结合 RPA, 对尿液中沙门氏菌的检测限为 5 CFU/mL。

4.5 多重检测

Santiago 等^[42]较早应用 RPA 同时扩增沙门氏菌和克罗诺杆菌基因序列。Liu 等^[43]开发的 RPA 方法可以同时检测单增李斯特菌和肠炎沙门氏菌血清型沙门氏菌。Kersting 等^[44]设计了一种基于 RPA 的微芯片平台, 实现同时检测沙门氏菌、淋病奈瑟菌和耐甲氧西林葡萄球菌。Choi 等^[45]的光盘检测平台可以同时检测沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 和副溶血弧菌。该平台将 RPA 试剂固定在芯片上部, 样品注入芯片底部, 并在每个反应仓内固定不同致病菌的特异性引物和探针, 从而实现多种致病菌的快速、多重检测。Chen 等^[46]设计的光盘检测平台, 同时检测尿液样本中的鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌。

5 问题与展望

5.1 检测样本

以上文献中涉及的检测样本有牛奶、鸡肉、鸡蛋、羊

肉、西兰花、贝类、尿液等。和沙门氏菌 PCR 检测方法相比, 检测样本的种类没有 PCR 丰富。需要对更多的样本展开 RPA 检测研究。样本基质成分的复杂程度是影响检测方法灵敏度、特异性和稳定性的关键因素。开发适宜高效的样本前处理方法与 RPA 相结合, 也是今后研究的重点之一。

5.2 检测目标物

当前建立的沙门氏菌 RPA 检测方法中, 基本都依据 *invA* 设计特异性引物, 以检测出沙门氏菌属为目的。Chen 等^[29]针对肠炎沙门氏菌的 *iroB* 基因设计了 RPA 引物和探针。Kim 等^[28]依据 *sdfl* 基因设计 RPA 引物, 能够特异性鉴别检测肠炎沙门氏菌血清型。PCR 检测沙门氏菌, 在设计引物时, 依据的基因有: *fimY* 基因、*invA* 基因、沙门氏菌属特异性基因 *ompC*、肠炎沙门氏菌 *sdfl* 基因、伤寒沙门氏菌 *viaB* 基因、鼠伤寒沙门氏菌 *spy* 基因、鼠伤寒沙门氏菌肠毒素 *stn* 基因等^[15]。此外, PCR 方法已被用于沙门氏菌分型^[47-49]。由此可见, RPA 方法在沙门氏菌检测应用中还有很多可以深度研究之处。多数 RPA 技术是针对单一靶标, 仅有少数研究针对多种目标物。可以开发包含沙门氏菌的多种致病菌检测 RPA 技术, 或者沙门氏菌血清型和耐药基因同时检测技术。但多重 RPA 技术的开发难度较大, 需要对碱基序列和浓度、引物单针浓度、反应时间和温度等多因素优化。需克服上述困难, 开发出高通量, 可同时针对多目标成分同时检测的快速 RPA 技术。

5.3 RPA 技术创新

虽然 RPA 是一种较新的还未被广泛接受的技术, 但是在技术改进方面的创新性研究使人们看到这项技术的巨大应用潜力。通过技术创新, 包括采用水包油技术控制反应体积, 光盘点样技术实现 DNA 富集、扩增和检测在同一平台进行, 自回避分子识别系统能够避免引物二聚体发生^[50]。这些研究在某些方面或某种程度上弥补了 RPA 技术本身的不足。因此, RPA 的创新研究具有非常重要的意义, 为 RPA 的更广泛应用提供保障。

样本前处理、DNA 扩增和检测一体化研究方面。将 DNA 扩增和检测放在一个芯片或设备进行, 已经有成熟产品。但样本前处理步骤由于各种基质的复杂性, 限制了三者一体化产品开发。Kim 等^[38]开发的一体化平台是一个有益的示范, 但还需要更多研究。

综上所述, RPA 作为一种较新的技术, 用于检测沙门氏菌可以得到更高的灵敏度、更快的速度和更易使用的方法, 极具研究价值和应用价值。尽管 RPA 在检测沙门氏菌检测应用上已经做了较多研究, 但也存在不足, 包括检测样本种类不够丰富, 目标物多重检测方法不够多, 因此, 需要开展更多研究工作。

参考文献

- [1] 陈玲. 沙门氏菌分型研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 648–654.
Chen L. Research progress in salmonella typing [J]. Microbiol Bull, 2016, 43(3): 648–654.
- [2] 张晶, 李薇薇, 杨淑香, 等. 中国 2010–2016 年家庭食源性疾病暴发事件流行特征分析[J]. 中国公共卫生, 2019, 35(10): 1379–1382.
Zhang J, Li WW, Yang SX, *et al.* Epidemiological characteristics of family foodborne disease outbreaks in China from 2010 to 2016 [J]. China Pub Health, 2019, 35 (10): 1379–1382.
- [3] 石永琼. 沙门氏菌的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(25): 37–38.
Shi YQ. Advances in salmonella research [J]. World Latest Med Inform Digest, 2016, 16(25): 37–38.
- [4] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, *et al.* DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): 1115–1121.
- [5] 胡金强, 魏向珂, 黄润娜, 等. 食源性致病菌 RPA 检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 329–334.
Hu JQ, Wei XH, Huang RN, *et al.* Research progress of RPA detection technology for foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(7): 329–334.
- [6] 刘立兵, 南汇珠, 孙晓霞, 等. 食品中蜡芽杆菌实时荧光 RPA 检测方法的建立与应用[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(1): 89–94.
Liu LB, Nan HZ, Sun XX, *et al.* Establishment and application of real-time fluorescent RPA detection method for bacillus cereus in food [J]. Chin J Food Sci Technol, 2018, 36(1): 89–94.
- [7] 彭华康, 吴兴泉. RPA 技术及其在食品检测中的应用[J]. 分子植物育种, 2018, 16(7): 2244–2248.
Peng HK, Wu XQ. RPA technology and its application in food testing [J]. Mol Plant Breeding, 2018, 16(7): 2244–2248.
- [8] Daher RK, Gale S, Maurice B, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2016, 7(7): 947–958.
- [9] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, *et al.* Isothermal recombinase polymerase amplification assay applied to the detection of group B streptococci in vaginal/anal samples [J]. Clin Chem, 2014, 60: 660–666.
- [10] 黄金海, 孙跃辉, 陈瑞, 等. 食品中沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 天津大学学报, 2012, 45(5): 468–472.
Huang JH, Sun YH, Chen R, *et al.* Establishment of LAMP method for rapid detection of salmonella in food [J]. J Tianjin Univ, 2012, 45(5): 468–472.
- [11] 王建广, 姜英辉, 雷质文, 等. 应用依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术检测沙门菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, (12): 227–229.
Wang JG, Jiang YH, Lei ZW, *et al.* Detection of salmonella by constant temperature amplification of helicase dependent DNA [J]. Chin J Health Lab Sci, 2010, (12): 227–229.
- [12] 董冠波, 孙岩, 程小果. 沙门氏菌分子生物学检测方法研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2017, 9: 76–78.
Dong GB, Sun Y, Cheng XG. Advances in detection methods of salmonella molecular biology [J]. Feed Animal Husband, 2017, 9: 76–78.
- [13] Jacobsen CS, Holben WE. Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR [J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(2): 315–321.
- [14] 赵平, 杨光, 丁松乔, 等. 食品中沙门氏菌检测研究进展[J]. 食品安全导刊, 2016, (5X): 100–101.
Zhao P, Yang G, Ding SQ, *et al.* Research progress of salmonella detection in food [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (5X): 100–101.
- [15] 张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 5: 1834–1841.
Zhang P, Feng F. Research progress of detection technology and method of salmonella [J]. J Food Saf Qual, 2015, 5: 1834–1841.
- [16] 杨柳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 分子生物学方法检测沙门氏菌的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 372–375.
Yang Liu, Hu WZ, Jiang AL, *et al.* Advances in detection of salmonella by molecular biological methods [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, 37(9): 372–375.
- [17] 戴邵亮. 基于适配体的沙门氏菌检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 14: 4589–4596.
Dai SL. Advances in the detection of salmonella based on aptamer [J]. J Food Saf Qual, 2019, 14: 4589–4596.
- [18] Zhang X, Guo L, Ma R, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification [J]. J Microbiol Methods, 2017, 139: 202–204.
- [19] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. Biosensors Bioelectronics, 2015, 64: 196–211.
- [20] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627–634.
Gao WF, Zhu P, Huang HL. Recombinant enzyme polymerase amplification technology: A new nucleic acid amplification strategy [J]. Chin J Biochem Molecular Biol, 2016, 32(6): 627–634.
- [21] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 47–53.
Jing ZG, Dong H, Di DD, *et al.* Research progress of polymerase amplification technology for recombinant enzymes [J]. Biotechnol Bulln, 2016, 32(6): 47–53.
- [22] Antonio TGL, O' SCK, Olaf P, *et al.* Editorial for analytical biochemistry special issue on RPA [J]. Anal Biochem, 2018, 556: 125–128.
- [23] 刘立兵, 耿云云, 姜彦芬, 等. 沙门氏菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 306–311.
Liu LB, Geng YY, Jiang YF, *et al.* Establishment and application of a method for the detection of recombinant salmonella polymerase [J]. Food Sci, 2019, 40(2): 306–311.
- [24] 任君安, 满燕, 李安, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 89–97.
Ren JA, Man Y, Li A, *et al.* Recombinant enzyme polymerase amplification technology and its application in food testing [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 89–97.
- [25] 李轲, 郭华麟, 禹建鹰, 等. 3 种病原菌多重 IMS-荧光 RPA 检测体系的建立及初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(3): 113–119.
Li K, Guo HL, Yu JY, *et al.* Establishment and preliminary application of multiple ims-fluorescence RPA detection system for three pathogenic bacteria [J]. Animal Husband Veter Med, 2019, 51(3): 113–119.
- [26] Chen J, Liu X, Chen J, *et al.* Development of a rapid test method for *Salmonella enterica* Detection based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification [J]. Food Anal Methods, 2019, 12(8): 1791–1798.

- [27] 杜亚楠, 赵笑, 范小瑞, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展及其应用[J]. 上海农业学报, 2018, 34(6): 122–127.
Du YN, Zhao X, Fan XR, *et al.* Research progress and application of polymerase amplification technology for recombinant enzymes [J]. Acta Agric Sinica, 2018, 34(6): 122–127.
- [28] Kim JY, Jung L. Rapid Detection of *Salmonella Enterica Serovar Enteritidis* from eggs and chicken meat by real-time recombinase polymerase amplification in comparison with the two-step real-time PCR [J]. J Food Saf, 2016, 36: 402–411.
- [29] Chen J, Liu X, Chen J, *et al.* Development of a rapid test method for *Salmonella enterica* detection based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification [J]. Food Anal Methods, 2019, 12: 1791–1798.
- [30] Liu HB, Zang YX, Du XJ, *et al.* Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(9): 7016–7025.
- [31] Gao W, Huang H, Zhu P. *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for equipment-free detection of *Salmonella* in shellfish [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2018, 41: 603–611.
- [32] Hu J, Huang R, Sun Y, *et al.* Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella Typhimurium* in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks [J]. J Microbiol Methods, 2019, 158: 25–32.
- [33] Liu HB, Du XJ, Zang YX, *et al.* A SERS-based lateral flow strip biosensor for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica serotype Enteritidis* [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(47): 10290–10299.
- [34] Chen ZG, Zhong HX, Luo H, *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with unmodified gold nanoparticles for *Salmonella* detection in milk [J]. Food Anal Methods, 2019, 12: 190–197.
- [35] Santiago FS, Tortajada GLA, Puchades R, *et al.* Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis [J]. Anal Chim Acta, 2014, 811: 81–87.
- [36] Chan K, Wong PY, Parikh C, *et al.* Moving toward rapid and low-cost point-of-care molecular diagnostics with a repurposed 3D printer and RPA [J]. Anal Biochem, 2018, 545: 4–12.
- [37] Santiago FS, Tortajada GLA, Morais S, *et al.* One-pot isothermal DNA amplification-hybridisation and detection by a disc-based method [J]. Sensors Actuators B: Chem, 2014, 204: 273–281.
- [38] Kim TH, Park J, Kim CJ, *et al.* Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens [J]. Anal Chem, 2014, 86(8): 3841–3848.
- [39] Stephanie A, Hice, Kevin D. *et al.* Capture, concentration, and detection of *Salmonella* in foods using magnetic ionic liquids and recombinase polymerase amplification [J]. Anal Chem, 2019, 91: 1113–1120.
- [40] Dao TNT, Yoon J, Jin CE, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Salmonella*, based on microfluidic enrichment with a label-free nanobiosensing platform [J]. Sensors Actuators B, 2018, 262: 588–594.
- [41] Nguyen DTT, Lee EY, Koo B, *et al.* A microfluidic enrichment platform with a recombinase polymerase amplification sensor for pathogen diagnosis [J]. Anal Biochem, 2018, 544: 87–92.
- [42] Santiago FS, Tortajada GLA, Morais S. Analytical methods isothermal DNA amplification strategies for duplex microorganism detection [J]. Food Chem, 2015, 174: 509–515.
- [43] Liu HB, Du XJ, Zang YX, *et al.* A SERS-based lateral flow strip biosensor for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica serotype Enteritidis* [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65: 10290–10299.
- [44] Kersting S, Rausch V, Bier FF, *et al.* Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. Microchim Acta, 2014, 181(13–14): 1715–1723.
- [45] Choi G, Jung JH, Park BH, *et al.* A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria [J]. Lab Chip, 2016, 16(12): 2309–2316.
- [46] Junge C, Youchun X, He Y, *et al.* Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification [J]. Lab Chip, 2018, 18: 2441–2452.
- [47] 钟伟军, 赵明秋, 邓中平, 等. 荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, (3): 220–224.
Zhong WJ, Zhao MQ, Deng ZO, *et al.* Establishment and preliminary application of rapid detection of salmonella in food by fluorescence quantitative PCR [J]. Chin J Prev Veter Med, 2008, (3): 220–224.
- [48] Cardona-Castro N, Miryan SJ, Lavalett L, *et al.* Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes [J]. Diagnostic Microbiol Infectious Disease, 2009, 65(3): 0–330.
- [49] Tennant SM, Diallo S, Levy H, *et al.* Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* Serovars associated with invasive infections among febrile patients in mali [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(3): e621.
- [50] Sharma N, Hoshika S, Hutter D, *et al.* Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS) [J]. Chem Bio Chem, 2014, 15(15): 2268–2274.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

程永友, 博士, 主要研究方向为食品质量安全。

E-mail: yongyou0925@sina.com

陈 刚, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全。

E-mail: chengang01@caas.cn