

荧光定量环介导等温扩增法快速检测 食品中沙门氏菌

章小洪*, 张维波, 姜 川, 范 蕾, 陈 梦, 汪 昕, 卢光英

(丽水市质量检验检测研究院, 丽水 323000)

摘 要: **目的** 建立一种快速简易检测食源性沙门氏菌的实时荧光定量环介导等温扩增(quantitative loop-mediated isothermal amplification, qLAMP)方法。**方法** 依据沙门菌属 *invA* 基因序列设计引物, 并结合短时间增菌构建沙门氏菌快速检测 qLAMP 法, 使用人工污染样品进行验证。**结果** 建立的 qLAMP 法最佳反应时间为 40 min, 最佳反应温度是 65 °C, 最佳 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L, *Bst* 2.0 WarmStart 聚合酶的浓度为 0.40 U/ μ L, 反应特异性良好, 纯培养实验表明方法检出限为 100 CFU/mL。将沙门氏菌人工添加至鸡胸肉、果蔬沙拉、山泉水中, 经过 7 h 缓冲蛋白胨水有效增菌后所建立的 qLAMP 法在食品基质中的检出限达到 5 CFU/25 g。**结论** 该方法准确、简单易行、实验成本低, 可用于食品中沙门氏菌的快速检测。通过 WarmStart Colorimetric LAMP 试剂盒无需昂贵仪器即可快速检测, 为沙门氏菌现场即时检测提供技术支持。

关键词: *invA* 基因; 荧光定量环介导等温扩增; 沙门氏菌; 即时检测

Rapid detection of *Salmonella* in food by fluorescent quantitative loop-mediated isothermal amplification

ZHANG Xiao-Hong*, ZHANG Wei-Bo, JIANG Chuan, FAN Lei, CHEN Meng,
WANG Xin, LU Guang-Ying

(Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a rapid and simple quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) method for detecting food-borne *Salmonella*. **Methods** The primers were designed based on the *invA* gene sequence of *Salmonella*, and the qLAMP method for rapid detection of *Salmonella* was constructed by combining with short-time enrichment, and verified by using artificially contaminated samples. **Results** The optimal reaction time, reaction temperature, Mg^{2+} concentration and *Bst* 2.0 WarmStart DNA polymerase concentration were 40 min, 65 °C, 6 mmol/L and 0.40 U/ μ L, respectively, by using the established qLAMP method, the reaction specificity was good, and the pure culture experiment showed that the detection limit of the method was 100 CFU/mL. *Salmonella* was manually added into chicken breast, fruit and vegetable salad, and mountain spring water, and the limit of detection of the established qLAMP method in the food matrix reached 5 CFU/25 g after 7 h buffer peptone water for effective enrichment. **Conclusion** This method is accurate, simple and low in experimental

基金项目: 浙江省市场监督管理局科研计划项目(20190360、20210177)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Zhejiang Market Supervision Administration (20190360, 20210177)

*通信作者: 章小洪, 硕士, 工程师, 主要研究方向为微生物学和分子生物学检测。E-mail: hong232321@163.com

*Corresponding author: ZHANG Xiao-Hong, Master, Engineer, Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, North No.395, Zhongshan Street, Lishui 323000, China. E-mail: hong232321@163.com

cost, and can be used for rapid detection of *Salmonella* in food. The WarmStart Colorimetric LAMP kit can be used for rapid detection without expensive instruments, which provides technical support for the scene of point-of-care detection of *Salmonella*.

KEY WORDS: *invA* gene; fluorescence quantitative loop-mediated isothermal amplification; *Salmonella*; point-of-care detection

0 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种革兰氏阴性食源性致病菌,会对家禽家畜和人类造成巨大威胁。在世界各类细菌性食物中毒中,沙门氏菌引起的食物中毒高居榜首^[1]。沙门氏菌在肉与肉制品、蛋与蛋制品、乳与乳制品等动物源性食品中检出率较高^[2-3],特别是生肉制品,沙门氏菌较难控制。在进化过程中,家禽肠道中的微生物菌群可能包含沙门氏菌^[4],并可通过粪便传播至整个饲养场所和空气环境,含有沙门氏菌的肉制品一旦进入市场,将会严重威胁消费者和生产商的利益。因此禽肉等肉制品中沙门氏菌的研究一直是国内外研究的主要方向^[4-5]。

GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品中沙门氏菌的检测》中,沙门氏菌检验需多次增菌和平板分离步骤,检验程序复杂,检测周期长达 4~6 d,且需熟练的专业技能,因此急需一种高效低成本快速简易的沙门氏菌检测方法,提高沙门氏菌的检测效率。近年来随着分子生物学技术的快速发展,环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[6]、重组聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)^[7]、跨越式滚环扩增(saltatory rolling circle amplification, SRCA)^[8]等等温扩增技术逐渐摆脱聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)对贵重仪器的依赖,将鉴定工作从数天缩短至 1 h 内。本研究利用沙门氏菌普遍存在的 *invA* 基因建立一种快速检测食品中沙门氏菌的定量环介导等温扩增(quantitative loop-mediated isothermal amplification, qLAMP)技术,并通过变色试剂盒实现现场即时检测,为肉类食品生产与检测企业提供及时有效的检测防控手段。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

LEGEND MICRO21 离心机、QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪、IMH180 培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司);QIAXPERT 核酸含量分析仪[凯杰生物工程(深圳)有限公司];IN260 生化培养箱[美墨尔特(上海)贸易有限公司];HF-Safe-1200JE 生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限

公司)。

1.1.2 主要材料与试剂

鸡胸肉、水果、植物饮料购置于本地超市;山泉水取自本地;缓冲蛋白胨水(buffer protein water, BPW)、胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)、RVS 肉汤(rappaport vassiliadis *Salmonella* broth, RVS)、XLT-4 琼脂(xylose lysine tergitol-4 agar, XLT-4)、血平板(青岛海博生物技术有限公司);*Bst* 2.0 Warm Start DNA 聚合酶(8 U/ μ L)、10X Thermo Pol 反应缓冲液、MgSO₄ (100 mmol/L)、50 X LAMP 荧光染料、2 X WarmStart LAMP 变色预混液(NEB 北京公司);dNTP Mixture (10 mmol/L, 上海生工生物工程有限公司)。

1.1.3 菌种与引物

菌种:本研究主要测试菌种及模拟添加菌种均为鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028,其他菌种均为方法特异性实验使用,详见表 1。

引物:依据沙门氏菌属 *invA* 基因序列(NC_003197.2)设计 LAMP 引物,使用 NEB LAMP Primer Design Tool 软件设计得到 6 条特异性引物,序列如下:

F3: 5'-CGGCAATAGCGTCACCTT-3';

B3: 5'-CGGCCCCGATTTTCTCTGG-3';

FIP: 5'-GAACGGCGAAGCGTACTGGACATCGCAC CGTCAAAGGAA-3';

BIP: 5'-GCGCGGCATCCGCATCAATATGCCCCGTA AACAGATGAGT-3';

LF: 5'-AGGGAAAGCCAGCTTTACG-3';

LB: 5'-CCGGCCTTCAAATCGGCATC-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种制备与核酸快速提取

将待测菌株接种于 TSB 中 36 °C 培养 16 h 得到新鲜菌液。核酸提取采用快速煮沸法,部分参照文献^[9]。吸取 1 mL 样液 12000 r/min 离心 5 min,小心移去上清液 950 μ L,再加入 1 mL 无菌水 12000 r/min 离心 5 min,小心移去上清液 950 μ L,置于 100 °C 温度下加热煮沸 15 min,冷却后 12000 r/min 离心 1 min,上清液直接用于 LAMP 实验。

1.2.2 等温扩增 LAMP 的建立和条件优化

LAMP 反应体系: 10 X ThermoPol Buffer 2 μ L, MgSO₄ 1.2 μ L, dNTP Mixture 2.8 μ L, 50 X LAMP 荧光染料 0.2 μ L, 10 X Primers Mix 2 μ L (F3/B3: 2 mmol/L, FIP/BIP: 16 mmol/L, LF/LB: 4 mmol/L), *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶 0.8 μ L, DNA 粗提液 5 μ L, 加无菌水至 20 μ L。反应条件:

65 °C保温 40 min, 以 1 min 作 1 个循环检测荧光值, 结束后测定溶解曲线(65~94 °C, 0.1 °C/s)。

反应条件优化: 改变 MgSO₄ 浓度为 4~10 mmol/L, 筛选最适 MgSO₄ 浓度; 改变 *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶浓度为 0.16~0.40 U/μL, 筛选最适酶浓度; 改变 10 X Primers Mix 的添加量为 0.5~2.5 μL, 筛选最适引物添加量; 改变反应温度为 57~70 °C, 筛选最适反应温度。

1.2.3 等温扩增 LAMP 的特异性实验和纯培养检出限测定

参照 1.2.1 制备待测菌株进行 LAMP 实验, 检测方法的特异性。参照 1.2.1 制备沙门氏菌菌种, 进行 10 倍系列稀释, 每个浓度取 1 mL 分别进行核酸提取和 qLAMP 实验, 确定方法检出限, 并进行溶解曲线分析。同时取适宜浓度 100 μL 样液进行 XLT-4 平板涂布计数。

1.2.4 增菌液和增菌时间的选择和人工添加沙门氏菌样品的检测

分别取生制鸡胸肉、果蔬沙拉、植物饮料和山泉水置于无菌均质袋中送入实验室, 将生制鸡胸肉和沙拉等适度均质后置于冰箱中保存, 参照 GB 4789.4—2016 进行检验确认无沙门氏菌。将剩余样品每份称取 25 g, 加入依据 1.2.3 稀释得到的新鲜菌液 1 mL(浓度为 10、5、1 CFU/mL), 使用 BPW 和 RVS 进行 10 倍稀释, 分别置于 36 °C水浴锅

和 44 °C水浴锅进行增菌。分别于 5、6、7 h 取样进行 DNA 提取和 LAMP 实验。同时取适宜浓度的增菌液 100 μL 涂布至 XLT-4 平板, 36 °C培养 24 h 计数典型菌落。

1.2.5 显色法等温扩增 LAMP 检测

参照 1.2.4 制备样品和核酸提取。检测体系为 WarmStart LAMP 变色预混液 10 μL, 10 X Primer Mix 2 μL, 加水至 15 μL, 反应前加入样品 DNA 提取液 5 μL。使用金属浴 65 °C加热保温 40 min, 观察样品颜色的变化。

1.2.6 数据统计与处理

以上实验均采用 3 个平行实验结果进行统计, 并使用 SPSS 进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 qLAMP 特异性检测

为了验证所建立的 qLAMP 方法的特异性, 本研究使用 14 个沙门氏菌菌株和 18 个非沙门氏菌菌株进行 qLAMP 实验, 结果如表 1 所示。实验结果表明, qLAMP 的特异性良好, 对于 14 株沙门氏菌菌株均能扩增出 *invA* 基因片段。同时, 对于 18 株非沙门氏菌菌株均未检出 *invA* 基因片段, 符合实验对于沙门氏菌特异性鉴定的要求。

表 1 qLAMP 的特异性实验
Table 1 Specificity experiment of qLAMP

菌种名称	菌种来源	特异性	菌种名称	菌种来源	特异性
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	环凯微生物	+	大肠埃希氏菌 O157:H7 NCTC12900	环凯微生物	-
乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50094	环凯微生物	+	乙型溶血性链球菌 ATCC21059	环凯微生物	-
甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50093	环凯微生物	+	蜡样芽孢杆菌 CMCC(B)63303	环凯微生物	-
肠炎沙门氏菌 CICC10982	CICC	+	副溶血性弧菌 ATCC10782	环凯微生物	-
病牛沙门氏菌 CICC21499	CICC	+	产气荚膜梭菌 ATCC13124	环凯微生物	-
婴儿沙门氏菌 CICC21649	CICC	+	铜绿假单胞菌 ATCC27853	环凯微生物	-
火鸡沙门氏菌 CICC21511	CICC	+	马红球菌 ATCC6939	ATCC	-
肯塔基沙门氏菌 CICC21488	CICC	+	粪链球菌 ATCC29212	ATCC	-
沙门氏菌属亚利桑那亚种	本室分离	+	英诺克李斯特菌 ATCC33090	ATCC	-
沙门氏菌属	本室分离	+	嗜热链球菌 ATCC14485	ATCC	-
德尔卑沙门氏菌	本室分离	+	植物乳杆菌 ATCC8014	ATCC	-
沙门氏菌属 S1	本室分离	+	婴儿双歧杆菌 ATCC15967	ATCC	-
沙门氏菌属 S2	本室分离	+	大肠埃希氏菌 EPEC CICC24189	CICC	-
沙门氏菌属 S3	本室分离	+	大肠埃希氏菌 EAEC CICC24186	CICC	-
单核增生李斯特氏菌 ATCC19115	环凯微生物	-	大肠埃希氏菌 ETEC CICC24186	CICC	-
阪崎肠杆菌 ATCC 29544	环凯微生物	-	大肠埃希氏菌 EHEC CICC24186	CICC	-

注: +表示阳性, -表示阴性; 环凯微生物为广东环凯微生物试剂有限公司, CICC 为中国工业微生物菌种保藏中心(China Industrial Microbial Culture Preservation Center); ATCC 为美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)。

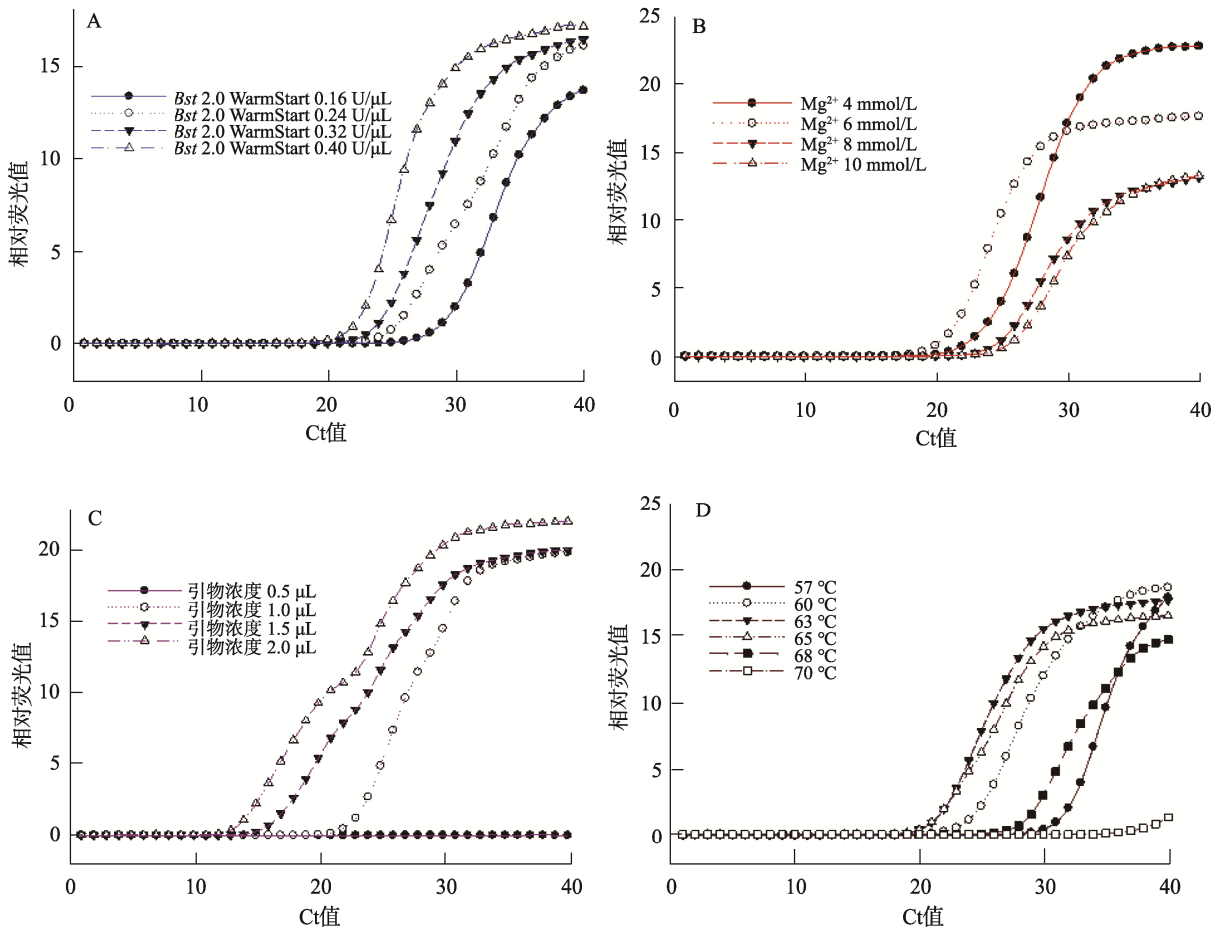
2.2 实验条件的优化

实验结果如图 1 所示。*Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶在反应中起主要作用, 因此其浓度对结果影响较大。实验选取 *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶浓度分别为 0.16、0.24、0.32、0.40 U/ μ L 筛选最适酶浓度。从图 1A 中可以看出, 随着酶浓度的提高, 反应 Ct 值逐渐变小, 反应速度加快, 但考虑到实验成本的影响, 使用 0.40 U/ μ L 作为最佳酶浓度。镁离子对于反应至关重要, 参与到催化反应中, 反应速度受到离子浓度影响, 本研究选取 $MgSO_4$ 浓度分别为 4、6、8、10 mmol/L, 筛选最适 $MgSO_4$ 浓度。从图 1B 中可以看出, 镁离子浓度过高时 Ct 值变大, 镁离子达到 6 mmol/L 时, 反应 Ct 值最小, 因此确定镁离子浓度为 6 mmol/L。图 1C 是引物浓度对反应的影响, 实验分别设置 10 X Primers Mix 的添加量 0.5、1.0、1.5、2.0 μ L, 最终可以看到引物的添加量为 2.0 μ L 时, 反应速度最快, Ct 值最小。温度对酶活性的影

响非常大, 实验分别设置了 57、60、63、65、68、70 $^{\circ}C$ 筛选最适反应温度。从图 1D 可以看出温度对反应结果的影响最大, 当温度达到 70 $^{\circ}C$ 时, 酶活力明显受到抑制, 而 63~65 $^{\circ}C$ 时反应 Ct 值最小, 且 65 $^{\circ}C$ 时最优, 因此, 本研究选择 65 $^{\circ}C$ 作为最佳反应温度。

2.3 纯培养实验检出限的确定

将 1.0×10^9 CFU/mL 新鲜菌液进行 10 倍系列稀释, 得到 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 CFU/mL 的稀释液, 进行 qLAMP 实验, 绘制标准曲线和溶解曲线。结果显示, 标准曲线为 $Y = -3.10X + 6.870$, $r^2 = 0.938$, 检出限为 100 CFU/mL, 溶解曲线分析表明溶解温度为 (88.8 ± 0.5) $^{\circ}C$ (图 2)。实验所建立的染料法 qLAMP 对仪器的要求低、所耗费的试剂成本低廉、操作简易、稳定性良好。结合快速核酸提取, 鉴定过程缩短至 1 h, 实验效率有很大的提升。



注: 图 A 为不同浓度 *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶对 LAMP 的影响; 图 B 为不同浓度 Mg^{2+} 对 LAMP 的影响; 图 C 为不同浓度引物添加量对 LAMP 的影响; 图 D 为不同温度对 LAMP 的影响。

图 1 实验条件优化的结果($n=3$)

Fig.1 Result of optimization of experimental conditions ($n=3$)

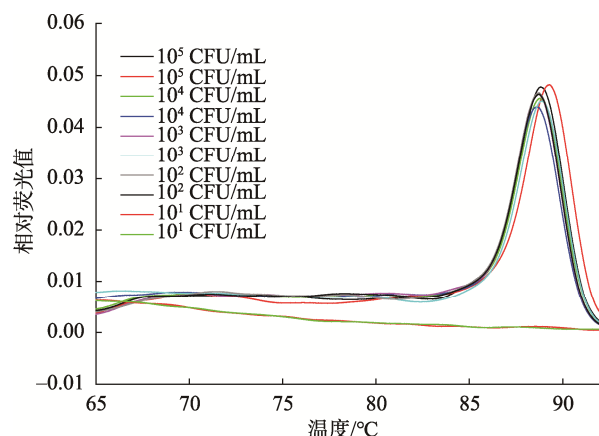


图 2 qLAMP 的溶解曲线
Fig.2 Dissolution curves of qLAMP

2.4 增菌液的选择和食品样品中检出限的确定

本研究所建立的 qLAMP 的检出限为 100 CFU/mL, 对于微量污染沙门氏菌的样品需要通过增菌实现更高的灵敏度。本研究选择了 10、5、1 CFU/25 g 3 个浓度作为沙门氏菌增菌初始浓度, 并选取非选择性的 BPW 和选择性 RVS 作为一步增菌液, 比较两种增菌液的增菌效果。实验结果如图 3 所示, 沙门氏菌浓度以 XLT-4 涂布计数结果表示。RVS 和 BPW 均能有效促进沙门氏菌增殖, 并且各类食品基质中, BPW 的增菌结果在污染较为严重的山泉水中与 RVS 的增菌结果差异极显著 ($P < 0.01$), 原因可能是山泉水中起始菌(含大肠菌群、铜绿假单胞菌等)占主导地位, 而沙门氏菌接种量较少, 无法在营养偏少的 RVS 中获得竞争优势。因此, 考虑到部分食品中优势菌种存在, 实验选择 BPW 作为一步法增菌液。通过实验数据表明沙门氏菌在 BPW 中平均繁殖时间可能为 30 min, 理论条件下增菌 7 h 在最低浓度下能达到 100 CFU/mL 检出限, 并且多次实验得到证明, 因此选择 7 h 作为增菌时间。由于 1 CFU/mL 的实际加菌量不确定较高, 通过平板涂布发现该浓度下 1 mL 菌液中存在无沙门氏菌的情况, 无法准确定量, 因此本研究中, 沙门氏菌在 BPW 增菌 7 h 的样品检出限为 5 CFU/25 g。

2.5 显色法等温扩增 LAMP 检测

为进一步提高沙门氏菌现场检测的可行性, 降低实验成本, 本研究使用 WarmStart LAMP 变色预混液进行测试, 并使用简易电热板进行现场检测, 实验结果如图 4 所示。阳性结果反应液为黄色, 阴性结果反应液为红色, 该反应结果基于扩增反应的微量 pH 变化进行检测^[10], 反应后颜色变化灵敏、特异性高, 可以将实验仪器的要求降至最低, 实现现场即时检测。

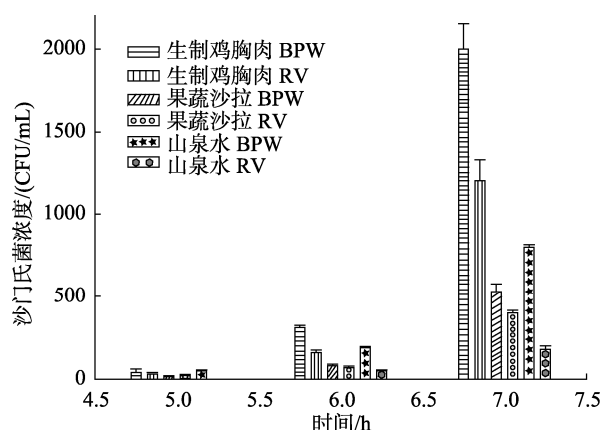
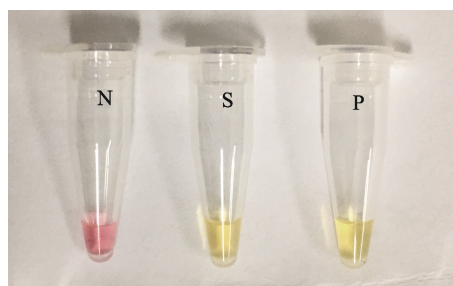


图 3 模拟添加样品(5 CFU/25 g)在 RVS 和 BPW 中的增菌效果($n=3$)
Fig.3 Enrichment results of *Salmonella* analog added samples (5 CFU/25 g) in RVS and BPW ($n=3$)



注: N 为只加无菌水的阴性对照; P 为鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 菌液的阳性对照; S 为添加标准菌株样品的结果。

图 4 沙门氏菌的显色法 LAMP 检测结果

Fig.4 Results of *Salmonella* detection by LAMP method

3 结论与讨论

基因的选择对于沙门氏菌的鉴定至关重要。*invA* 基因是沙门氏菌属检测最常用的目标基因。该基因编码位于沙门氏菌致病岛上的入侵蛋白, 在沙门氏菌致病过程中起着重要的作用, 是侵袭宿主细胞所需的毒力因子, 大多数已发表的文献和商品化的试剂盒都以 *invA* 基因作为靶基因进行检测^[11]。通过生物信息学分析和综合测试评价, *invA* 在沙门氏菌中的特异性能达到 97.6%~97.8%^[12-13], 符合理想检测靶标的要求。因此本研究选择 *invA* 基因进行特异性引物的设计。近年来, KREITLOW 等^[14]发现分离出的 12.3%的 *S. enterica* serovar Kentucky 分离株无法检测出 *invA* 基因, 另外, *S. enterica* serovar Litchfield 和 Senftenberg 等菌株在自然界中也可能缺失 *invA*^[15], 因此结合检测 *ttr* 基因^[16]是本研究下一阶段研究的方向。

LAMP 实验对于引物设计的要求较高, 反应所需 *Bst* 聚合酶可以在一定条件下将寡核苷酸随机掺入有缺口的 DNA 模板进行跨片段扩增^[17]。另外环引物的加入可以加速 LAMP 实验^[18], 但同时增加了引物二聚体形成非特异性

扩增的可能性, 因此引物设计不合理容易出现假阳性的现象。本研究先后设计了 4 套引物进行测试(结果未展示), 最终选择的引物特异性良好, 含有环引物可以在 40 min 内完成 LAMP 实验, 实验过程中始终未出现假阳性的现象。

本研究对 LAMP 进行了优化实验, 最终最佳反应时间为 40 min, 最佳反应温度是 65 °C, 最佳 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L, *Bst* 2.0 WarmStart 聚合酶的浓度为 0.40 U/ μ L, 10 X 引物 2 μ L, 纯培养检出限为 100 CFU/mL。WEN 等^[19]依据 *firmW* 基因建立的沙门氏菌 qLAMP 技术最佳反应温度为 62 °C, 最佳反应时间为 40 min, 纯培养检出限为 73 CFU/mL, 与本实验结果相似。但实验中沙门氏菌核酸提取简单, 能实现更快的检测速度。RVS 作为一种沙门氏菌选择性增菌液, 无法在短时间内使沙门氏菌在污染较为严重的山泉水中获得优势地位, 因此本研究选择营养相对更好的 BPW 进行一步增菌。经过 7 h BPW 增菌后沙门氏菌的检出率显著提高, 得到 5 CFU/25 g 样品的检出限。本研究通过 XLT-4 平板涂布发现无法准确定量 1 CFU/25 g 加菌量, 与 KREITLOW 等^[14]的 1 CFU/25 g 检出限存在一定差异, 但与 GARRIDO-MAESTU 等^[20]的 4~10 CFU/25 g 的检出限结果具有一致性。同时使用显色试剂具有显著优势, 摆脱实验对昂贵仪器的要求, 适用于快速检测的现场检测, 是本研究下阶段的研究方向。

综上所述, 本研究建立的 qLAMP 法是一种可信的沙门氏菌检测方法, 无需特定 PCR 仪器即可进行沙门氏菌的快速检测, 可最大程度提高检测效率, 操作简易, 对于即时检测需求的场景具有重要的作用, 特别适用于肉制品加工企业对于沙门氏菌的监控检测。

参考文献

- [1] XIAO X, WANG W, ZHANG J, *et al.* A quantitative risk assessment model of *Salmonella* contamination for the yellow-feathered broiler chicken supply chain in China [J]. *Food Control*, 2021, 121(6): 107612.
- [2] OSCAR TP. Process risk model for *Salmonella* and ground chicken [J]. *J Appl Microbiol*, 2019, 127(4): 1236–1245.
- [3] WU YN, LIU P, CHEN JS. Food safety risk assessment in china: Past, present and future [J]. *Food Control*, 2018. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.02.049
- [4] MARMION M, FERONE MT, WHYTE P, *et al.* The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge [J]. *Food Microbiol*, 2021, 99(6): 103823.
- [5] YANG X, HUANG J, ZHANG Y, *et al.* Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 713: 136385.
- [6] TECHATHUVANAN C, D'SOUZA DH. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(10): 3509–3516.
- [7] 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.
- [8] MILTON A, MOMIN KM, PRIYA GB, *et al.* Development of novel visual detection methodology for *Salmonella* in meat using saltatory rolling circle amplification [J]. *J Appl Microbiol*, 2021. DOI: 10.1111/jam.15099
- [9] BOZORGMEHR A, YAZDANPARAST R, MOLLASALEHI H. Non-crosslinking gold nanoprobe-LAMP for simple, colorimetric, and specific detection of *Salmonella typhi* [J]. *J Nanopart Res*, 2016. DOI: 10.1007/s11051-016-3657-x
- [10] CALVERT AE, BIGGERSTAFF BJ, TANNER NA, *et al.* Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(9): e185340.
- [11] YANG Q, DOMESLE KJ, GE B. Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: Current applications and future directions [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(6): 309–331.
- [12] TURKI Y, OUZARI H, MEHRI I, *et al.* Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia [J]. *Food Res Int*, 2012, 45(2): 940–946.
- [13] MALORNY B, HOORFAR J, BUNGE C, *et al.* Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 290–296.
- [14] KREITLOW A, BECKER A, SCHOTTE U, *et al.* Evaluation of different target genes for the detection of *Salmonella* sp. by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(4): 420–426.
- [15] SHANG Y, YE Q, CAI S, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets [J]. *LWT*, 2021, 142: 110999.
- [16] KREITLOW A, BECKER A, SCHOTTE U, *et al.* Establishment and validation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the *ttrRSBCA* locus for rapid detection of *Salmonella* spp. in food [J]. *Food Control*, 2021, 126: 107973.
- [17] ZYRINA NV, ZHELEZNAYA LA, DVORETSKY EV, *et al.* N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by *Bst* DNA polymerase [J]. *Biol Chem*, 2007, 388(4): 367–372.
- [18] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223–229.
- [19] WEN J, GOU H, ZHAN Z, *et al.* A rapid novel visualized loop-mediated isothermal amplification method for *Salmonella* detection targeting at *fimW* gene [J]. *Poult Sci*, 2020, 99(7): 3637–3642.
- [20] GARRIDO-MAESTU A, FUCIÑOS P, AZINHEIRO S, *et al.* Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium in food samples [J]. *Food Control*, 2017, 80: 297–306.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



章小洪, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物与分子生物学检测工作。
E-mail: hong232321@163.com