

食品沙门氏菌环介导等温扩增技术应用研究进展

章小洪¹, 范 蕾¹, 邹小龙¹, 郑连宝², 沈佩佩¹, 张夏翊¹, 王伟影^{1*}

(1. 丽水市质量检验检测研究院, 丽水 323000; 2. 德清县食品药品检验检测中心, 湖州 313200)

摘 要: 沙门氏菌是一种食源性致病菌, 可导致胃肠炎、败血症等严重疾病, 引发人员健康和财产损失, 快速、简便的检测方法对于食品中沙门氏菌的检验至关重要。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为传统聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的有力替代工具, 经历多年发展已在等温扩增领域显示出明显优势, 在沙门氏菌检测应用方面日渐成熟。本文对近 5 年来 LAMP 技术在沙门氏菌检测方法及应用进行了分析汇总。在沙门氏菌 LAMP 检测技术的特异性方面, 对现有靶标基因和新靶标基因的有效性进行了探讨, 对不同血清型的特异性检测和多重 LAMP 的应用进行了总结, 分析其优点与不足之处, 阐述了探针法、多重检测、微流控技术和即时检测(point-of-care testing, POCT)是沙门氏菌 LAMP 技术的未来发展方向, 为 LAMP 技术更好地应用于食品中沙门氏菌检测提供参考依据, 对于提高食品中沙门氏菌的检验能力具有重要意义。

关键词: 环介导等温扩增; 沙门氏菌; 血清型; 多重环介导等温扩增; 检测方法; 特异性探针; 即时检测

Research progress of loop-mediated isothermal amplification in the detection of *Salmonella* in food

ZHANG Xiao-Hong¹, FAN Lei¹, ZOU Xiao-Long¹, ZHENG Lian-Bao², SHEN Pei-Pei¹,
ZHANG Xia-Yi¹, WANG Wei-Ying^{1*}

(1. Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China;

2. Deqing Food and Drug Inspection and Testing Center, Huzhou 313200, China)

ABSTRACT: *Salmonella* is a food-borne pathogen that can cause serious diseases such as gastroenteritis and sepsis, and cause loss of health and property. Fast and simple detection methods are essential for the detection of *Salmonella* in food. As a powerful alternative to polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has achieved obvious advantages in the field of isothermal amplification after years of development, and has also got significant achievement in the detection of *Salmonella*. This article analyzed and summarized the progress and the application of LAMP technology in the detection of *Salmonella* in the past five years. In terms of the specificity of LAMP technology for *Salmonella* detection, the existing target genes and new target genes were discussed for its effectiveness, the specific detection of different serotypes and the application of multiple LAMP were summarized, and its advantages and disadvantages were analyzed, which mean the probe method, multiple detection, microfluidic technology and point-of-care testing (POCT) are the guidance of *Salmonella* LAMP technology. It provides a reference for the better application of LAMP technology in the detection of *Salmonella*, and

基金项目: 浙江省市场监督管理局科研计划项目(20210177)

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

*通信作者: 王伟影, 副主任中药师, 主要研究方向为检验检测技术和标准化研究。E-mail: 18790821@qq.com

*Corresponding author: WANG Wei-Ying, Deputy Chief Chinese Pharmacist, Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, No.395, Zhongshan North Street, Liandu District, Lishui 323000, China. E-mail: 18790821@qq.com

is of great significance for improving the detection ability of *Salmonella* in food.

KEY WORDS: loop-mediated isothermal amplification; *Salmonella*; serotype; multiplex loop-mediated isothermal amplification; detection methods; specific probe; point-of-care testing

0 引 言

沙门氏菌是肠杆菌科中最主要的食源性致病菌之一,沙门氏菌污染的食物可导致胃肠炎、败血症等严重疾病。世界卫生组织统计,沙门氏菌在 22 种细菌、原生动物和病毒食源性病原体中排名第一^[1],沙门氏菌对人类造成了严重危害,世界各国对于食品中沙门氏菌都有严格的限量要求^[2]。GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品中沙门氏菌检验》中沙门氏菌检验需多次增菌和分离,检测过程烦琐、耗时长,不能满足现代化快速检测的需求。分子生物学检测技术可以大大缩短检验周期、简化实验操作,如已被广泛用于检测食源性沙门氏菌的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和实时荧光定量 PCR。目前,PCR 需要专门的实验室、昂贵复杂的热循环仪和专业技术人员等,无法满足即时检测(point-of-care testing, POCT)的需求。等温扩增是一种新型的 DNA 扩增技术,只需达到恒温条件即可实现数百万倍以上的核酸扩增,从而避免了对热循环仪器的需要,且扩增反应速度快,适用于即时检测。目前,环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、解旋酶-依赖扩增、链置换扩增反应、重组聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、跨越式滚环等温扩增等技术^[3-5]都是等温扩增方法中常见的技术。其中 LAMP 技术发展相对成熟,从技术和成本上均已实现工业化,成为沙门氏菌检验研究的重要方向之一。本文对近年来沙门氏菌 LAMP 技术应用的研究进展进行汇总分析,以期 LAMP 技术更好地应用于食品中

沙门氏菌检测提供参考依据,对于提高食品中沙门氏菌的检验能力具有重要意义。

1 LAMP 的检测原理

LAMP 是 2000 年 NOTOMI 等^[6]发明的一种等温核酸扩增技术,经过多年发展,已应用于快速检测致病菌、寄生虫^[7]、病毒^[8]等众多领域。LAMP 技术是针对目标序列 6 个不同区域设计 2 对特殊的内、外引物(内引物 FIP 与 BIP,外引物 F3 与 B3),特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,同时设计 1 对环引物(LF 与 LB)增加反应速度。利用 Bst DNA 聚合酶启动循环链置换反应,在基因序列启动互补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成多环花椰菜结构的茎环状 DNA 混合物。反应具有高度特异性、灵敏度高,整个反应仅需恒温 65 °C 维持 1 h 即可完成,方便快捷,适用于 POCT。

2 LAMP 检测技术在沙门氏菌检验中的应用

LAMP 技术于 2005 年首次应用于沙门氏菌检测^[9],日本荣研化学公司最先开发了实时浊度仪和试剂盒用于沙门氏菌的检测。目前美国 3M 公司的 MDA 系统、英国 OptiGene 公司的 Genie III 系统、美国 Meridian Bioscience 公司的 Illumigene 系统、北京博奥晶典公司的 RTisochip-A 系统等^[10]基于 LAMP 技术开发的产品广泛应用于食品以及相关产品的检测,展示出巨大商业潜力。近年来沙门氏菌 LAMP 技术在靶标基因的选择、多种技术如微流控制等技术结合方面都提出了新的研究方向^[11],研究概况见表 1 所示。

表 1 近年来沙门氏菌 LAMP 检测方法分析
Table 1 Recent analysis of *Salmonella* LAMP detection

靶基因	使用技术	纯培养检出限	特异性		样品检测检出限	文献
			包容性	排他性		
invA	AGE, SYBR Green I 比色法	100 CFU	100% (15)*	100% (101)	N/A	[12]
	qLAMP	80 CFU	100% (140)	100% (27)	鸡肉洗液 1000 CFU/mL	[13]
	微流控芯片, AuNP 比色法, AGE	N/A	N/A	N/A	鸡肉、火鸡和鸡蛋 10 CFU/25 g	[14]
	DNAzyme 比色法, AGE	0.5 pg	N/A	100% (2)	N/A	[15]
	3M MDS, qLAMP	N/A	N/A	N/A	蛋制品 1.63~4.18 CFU/25 g	[16]
	离心微流体芯片, LAMP-LFD	50 CFU	N/A	N/A	牛奶 10000 CFU/mL	[17]
	实时浊度仪, qLAMP	1.3~28 CFU	100% (247)	100% (53)	宠物食品 0.0062 MPN/g	[18]
	PMA, qLAMP, 钙黄绿素比色法	1.6 CFU	100% (3)	100% (28)	63 CFU/mL	[19]
	免疫捕获-LAMP	N/A	N/A	N/A	牛奶 5 CFU/mL	[20]
	比色法-钙黄绿素, AGE	5.4 fg/μL	100% (42)	100% (18)	肉 log10 2.5 CFU/g	[21]
	mLAMP-LFD, AGE	5.2 CFU/mL	100% (15)	100% (21)	婴儿配方奶粉 4.3 CFU/g	[22]

表 1(续)

靶基因	使用技术	纯培养检出限	特异性		样品检测检出限	文献
			包容性	排他性		
<i>siiA</i>	LAMP-LFD	3.7 CFU/mL	100% (21)	100% (31)	婴儿配方奶粉 2.2 CFU/g	[23]
<i>invA, safA, STM4497</i>	qLAMP	0.32 ng	100% (12)	100% (12)	鸡肉鸡蛋 4~10 CFU/25 g	[24]
<i>prot6E</i>	钙黄绿素比色法	1.2~12 CFU	97.4% (114)	100% (69)	蛋制品 1~5 CFU/25 g	[25]
<i>hilA</i>	LAMP-LFD	6.7 CFU/mL	100% (52)	100% (37)	1.44 CFU/mL	[26]
<i>fimW</i>	qLAMP、酚红比色法	73 CFU/mL	100% (22)	N/A	N/A	[27]
<i>gene 62181533</i>	钙黄绿素比色法, qLAMP	1.8 CFU/mL	100% (29)	100% (23)	鲜切果蔬 1.7 CFU/10 g 增菌 10 h	[28]
<i>ssaQ</i>	AGE	210~2100 CFU/mL	100% (23)	100% (22)	210~2100 CFU/mL	[29]
<i>ttrRSCA</i>	qLAMP	1 CFU/25 g 增菌 20 h	100% (88)	100% (92)	1 CFU/25 g 增菌 20 h	[30]
<i>STM3098, STM4057, STM4497</i>	mLAMP, qLAMP	0.25~2.5 pg	100% (15)	N/A	鸡肉 64~10000 CFU/g	[31]

注: *特异性中括号里面表示测试菌株的数量; AGE: 琼脂糖凝胶电泳; qLAMP: 实时荧光定量环介导等温扩增; PMA: 叠氮溴化丙锭; AuNP: 纳米金颗粒; LFD: 横向流动试纸条; mLAMP: 多重环介导等温扩增; N/A: 不适用。

2.1 沙门氏菌 LAMP 技术检测方法

2.1.1 非仪器的可视化检测方法

LAMP 技术通过非仪器的可视化检测方法可实现 POCT 应用。浊度法是其中一种经典的判断方法,该方法基于 LAMP 反应副产物焦磷酸镁沉淀识别;但肉眼识别能力有限,需配套专用实时浊度仪检测,因此推广度不高。根据反应前后颜色变化的比色法具有更多的应用优势,其中最先应用的是基于双链 DNA 核酸染料法,即在反应结束后加入高浓度 SYBR Green I 对 LAMP 产生的双链 DNA 产物进行染色^[12],染色效果明显,但 SYBR Green I 对聚合酶有明显抑制作用,因此该法需反应结束后开盖加入染色剂,易引起气溶胶污染;另一种常见染料是离子浓度显色剂, LAMP 反应过程中镁离子浓度减少,在体系中加入钙黄绿素、羟基溴酚蓝、络黑 T 等离子浓度指示剂可以观察到显色反应,该法具有无需开盖的优势,比色效果显著^[19,32-33];此外,金纳米颗粒也具有离子浓度指示作用,且具有较好的生物相容性,对 DNA 聚合酶无明显抑制作用,能够通过自身的分散和聚集产生显色效应, LAMP 反应中镁离子减少可引起纳米金粒子的聚集,使溶液发生颜色变化^[14],灵敏度高,但其价格昂贵。近年来发现, LAMP 反应会释放氢离子导致体系 pH 值降低,一些 pH 指示剂可以显著指示反应的进行^[34],如酚红、中性红等,这些指示剂对 *Bst* DNA 聚合酶无明显抑制作用^[27],可显著降低 LAMP 技术的开发成本^[35]。

横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)技术是一种新型的 LAMP 检测技术。该方法通常在 LAMP 的 2 条引物或探针的 5'端分别用生物素和异硫氰酸荧光素标记。

在 LFD 组装过程中,与抗异硫氰酸荧光素抗体偶联的金纳米颗粒嵌入偶联垫中,在检测区域添加链霉亲和素和抗小鼠二抗,分别形成测试线和对照线。LAMP 扩增产物与缓冲液混合后,使用 LFD 进行层析检测。ZHAO 等^[23]在 FIP 和 LB 引物序列标记了生物素和荧光素,建立了特异性 LAMP-LFD 技术,可以实现快速 POCT。值得注意的是,该方法需要开盖操作,应防止发生交叉污染。

LAMP 反应具有高度特异性,一般核酸的扩增即意味 LAMP 反应的发生。但近年有研究表明 LAMP 反应存在引物二聚体或非特异性扩增的可能^[36],因此利用特异性探针针对反应产物实现精准检测是 LAMP 技术的发展方向。DNAzyme 是一种含 G-四链体结构的短链小 DNA 分子,可以定制到特异性探针中进行 LAMP 反应,实现比色法检测沙门氏菌^[15]。这些方法将会随着技术的成熟应用更加广泛。

2.1.2 仪器检测方法

仪器检测方法包括琼脂糖凝胶电泳法、浊度法、荧光检测法、电化学生物传感器检测法、微流控芯片检测法等技术。琼脂糖凝胶电泳法基于 PCR 的基础方法,染色后电泳可见梯状条带,但操作烦琐且易产生气溶胶污染,较少使用;实时浊度法是一种经典的检测方法,缺点是所需的实时浊度仪价格昂贵,且用途单一;荧光检测法是比较通用的检测方法,可分为嵌入性荧光染料法和荧光探针法。SYTO-9、Midori Green 是 2 种常用的嵌入式 LAMP 荧光染料,适合使用荧光检测仪进行实时荧光定量环介导等温扩增 (quantitative loop-mediated isothermal amplification, qLAMP)反应^[24,37]。荧光探针法与 Taqman 荧光定量 PCR 相似,具有高度特异性,可防止非特异性扩增的假阳性结

果, 通常需要另外设计一条特异性探针, 实现高灵敏度检测。除此之外, 一些新型的荧光探针结合法也应用于 LAMP 检测, 如 DRAZ 等^[38]将 LAMP 扩增产物与拉曼活性的金纳米探针杂交, 实现 LAMP 与表面增强拉曼光谱结合 (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) 检测, 是一种有效的沙门氏菌探针法 LAMP 技术。

微流控芯片技术是把样品制备、反应、分离、检测等流程集成到一块微米级管道的芯片上, 通过控制流体在各种构型的微流通道和反应池内的流动完成自动化的检测流程, 具有微型化、集成化、高灵敏度的特点, 提高了检测效率并节约成本。NGUYEN 等^[33]提出了一种基于智能手机和微流控芯片组成的 LAMP 分析仪, 通过手机电源提供反应温度, 摄像头实时监控反应结果绘制定量曲线, 实现了实时定量的微流控检测技术。利用离心技术将芯片中的液体经微孔道分散达到检测位点, 摆脱了传统微流控芯片对压力泵的限制, 操作简单, 容易实现高通量和便携式 POCT 应用。SAYAD 等^[39]利用钙黄绿素比色法开发了一种离心微流体自动无线蓝牙终点检测系统, 用于检测食品中沙门氏菌。近年来芯片实验室技术集成了细菌免疫亲和捕获富集、核酸提取、LAMP 反应及检测^[40], 可模拟体内环境, 相比普通微流控芯片更具优势, 可应用于医学、食品等众多领域。

2.2 沙门氏菌 LAMP 检测靶基因的研究

2.2.1 沙门氏菌属靶基因的选择

沙门氏菌的毒力基因具有稳定表达的特点, 因此毒力基因通常作为沙门氏菌检测基因使用。沙门氏菌毒力岛在其致病过程中扮演重要角色, 其中包括 SPI、SPI-1、SPI-2、SPI-3、SPI-4、SPI-5 基因座。沙门氏菌侵袭相关毒力基因的研究主要集中在 SPI-1 毒力岛上, 如 *inv*、*sip*、*hil* 等基因都是沙门氏菌研究的热门基因。*invA* 基因是沙门氏菌 LAMP 技术中最常用的靶基因, 其编码的蛋白是宿主细胞侵袭所必需的毒力因子, 表达稳定而被大部分研究和商品化的试剂盒作为靶基因^[14], 被认为是沙门氏菌检测的金标准。但 TURKI 等^[41]分离出的肯塔基沙门氏菌中 *invA* 基因缺失率为 22%, 包括利齐菲尔德沙门氏菌和山夫登堡沙门氏菌等血清型都可能缺失 *invA*^[30], 因此基于 *invA* 基因的检测标准受到质疑。*hilA* 在 SPI-1 中编码激活入侵分泌系统, 高度保守, 实验证明利用 *hilA* 建立的 LAMP 检测技术对 52 株沙门氏菌和 37 株非沙门氏菌的特异性为 100%^[26]。*siiA* 基因编码毒力岛 SPI-4 的调控蛋白, 可影响沙门氏菌毒力基因的表达。KREITLOW 等^[42]研究表明基于 *siiA* 基因开发的 LAMP 方法在沙门氏菌属中的包容性仅为 87%。

近年来基因组学和泛基因组技术在沙门氏菌检测中得到了应用。LI 等^[43]利用 *gene 62181533* 基因开发的沙门氏菌 LAMP 技术, 是一种利用比较基因组学挖掘的高特异性基因。SHANG 等^[29]使用泛基因组分析得到沙门氏菌特

异性的新靶标 *ssaQ* 基因, 利用生物信息学发现 851 株沙门氏菌中的包容性为 98%。*ttr* 转座子是沙门氏菌无氧代谢和生存至关重要的基因, KREITLOW 等^[30]通过 *ttr* 基因设计的 LAMP 检测方法对 88 株沙门氏菌和 92 株非沙门氏菌具有 100% 的特异性, 通过生物信息学分析显示 *ttr* 在沙门氏菌属中的包容性 100%^[42], 未来可能取代 *invA* 基因成为沙门氏菌 LAMP 技术的金标准。

2.2.2 不同血清型沙门氏菌 LAMP 检测的应用

依据 O 抗原和 H 抗原的不同, 沙门氏菌可分为 50 多个血清组, 超过 2500 个血清型^[44]。鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌是导致人类疾病的主要血清型, 快速鉴别该血清型对食物中毒的治疗至关重要, 利用 LAMP 技术进行血清型鉴定主要集中于鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌。已知肠炎沙门氏菌的 LAMP 检测基因包括 *lygD*、*sfdI*、*safA* 等^[24], 近年来又发现 *prot6E* 基因是一个只存在于肠炎血清型的高度保守低拷贝数毒性质粒基因, 以此基因建立的 LAMP 技术能特异性鉴定肠炎沙门氏菌^[25]。鼠伤寒沙门氏菌的 LAMP 技术特异性基因包括 *STY1607*、*STM4495*、*typH* 和 *STM4497* 等^[45], KIM 等^[31]成功利用 *STM4057* 和 *STM4497* 基因分别鉴定沙门氏菌 I 型和鼠伤寒沙门氏菌。

2.3 多重环介导等温扩增在沙门氏菌检测中的应用

多重环介导等温扩增 (multiplex LAMP, mLAMP) 与多重 PCR 一样, 可实现多重基因检测的需求。LAMP 的琼脂糖凝胶电泳呈现梯形多条带模式, 无法与多重 PCR 一样区分目标条带。使用限制性内切酶技术对 LAMP 扩增的目标基因片段进行酶切, 得到不同分子量的条带可以有效区分目标产物^[46], 但该方法步骤烦琐, 需要测序, 使用极少。随着染料法 qLAMP 技术的发展, mLAMP 也可以和多重 qPCR 一样通过溶解曲线分析实现多重目标检测。KIM 等^[31]利用 *STM3098*、*STM4057* 和 *STM4497* 建立的三重 qLAMP 技术, 使用溶解曲线有效区分了 3 种不同血清型。但 LAMP 技术的目标产物通过溶解曲线分析存在无法有效区分的可能, 因此, 使用探针法实现 mLAMP 技术成为主流方向。应用探针法 qLAMP 检测可以与 Taqman qPCR 一样实现多重 qLAMP 技术^[47]。而且探针法还能与表面增强拉曼光谱、金纳米粒子、酶联免疫吸附、表面等离子体共振等^[48]技术相结合进行 mLAMP 检测。

为实现 mLAMP 的即时检测, 近年来 LAMP-LFD 技术深受关注, 该方法对 FIP、LB 和探针等引物分别用生物素、地高辛和异硫氰酸荧光素标记, 可实现 2 个基因同时检测。标记探针的使用可提高检测的特异性和灵敏度, 减少非特异性扩增引起的假阳性数量, 可保证结果准确性。YANG 等^[22]利用多重 LAMP-LFD 技术实现了婴幼儿配方奶粉中沙门氏菌与克罗诺杆菌的同时检测。

微流控芯片实现了封闭空间的 mLAMP 技术, 可防止样品在处理过程被污染, 是 LAMP 技术研究的主流方向。

此外,微流体凝胶环介导等温扩增(gLAMP),作为一种独立的微流体装置,用于现场同时检测多种致病菌基因^[49]。

2.4 沙门氏菌 LAMP 技术在实际检测中的应用

LAMP 反应效率较高,灵敏度相比普通 PCR 通常提高 10 倍以上,检出限可达到 100 CFU/mL 以下。从表 1 中可以看出,相同条件下,纯培养时最低检出限能达到 100 CFU/mL 以下,但在食品基质中,灵敏度往往降低 10 倍以上。这与沙门氏菌检验的稀释增菌有关,通常沙门氏菌检验需要进行预增菌,根据增菌时间的不同,检出限差异巨大。依据不同方法构建的沙门氏菌 LAMP 对于不同食品检测性能差异巨大,方法的检测性能一般与特定基因引物、检测方法有直接关系。LAMP 的反应时间相同,在最佳反应温度下,通常比色法在灵敏度上优于琼脂糖凝胶电泳法。通过琼脂糖凝胶电泳检测的检出限在 100 CFU/mL 以上^[12,29],而通过比色法检测得到的灵敏度一般在 100 CFU/mL 以下^[25,27]。通过纳米金颗粒实现的 LFD 技术能达到更高的灵敏度,可以实现 10 CFU/mL 以下的检出限^[22-23]。一些免疫捕获富集方法可以大幅提高检出限,这种方法特别适用于液体样品的检测,在牛奶中灵敏度可达到 5 CFU/mL^[20]。通过免疫富集等手段与 LFD 方法结合,可进一步提高沙门氏菌在食品中的检测灵敏度,为食品安全提供保障。

3 总结与展望

本文对近 5 年沙门氏菌 LAMP 检测技术的最新研究成果进行了汇总分析。此前被认为是沙门氏菌靶基因金标准的 *invA* 基因对少数沙门氏菌血清型无法检测,这对沙门氏菌检验的准确性提出了更高的要求。而一些新型检测基因包括 *ssaQ*、*ttr* 等基因表现出优越的检测能力,表明更适合沙门氏菌的检验。未来会有更多的特异性基因被发现和验证,将进一步提升沙门氏菌的检测准确性。

沙门氏菌 LAMP 非仪器可视化检测技术具有即时、高效、廉价的特征。离子浓度比色法、金纳米颗粒比色法、pH 比色法都是比较常见的可视化检测方法,其中 pH 比色法成本最低,优势明显,目前已开发商业化 pH 比色法试剂盒,可实现低于 100 CFU/mL 沙门氏菌样品的检测。qLAMP 在相同条件下可获得更高的灵敏度,而探针法可对扩增产物进行特异性识别,避免非特异性扩增的假阳性结果,更准确可靠,且可实现多重目标产物的检测。目前探针法 LAMP 特异性检测已取得重大进展,包括猝灭探针技术、氧化石墨烯技术、扩增猝灭释放技术、一步链置换技术、多重核酸限制性内切酶技术、SERS、纳米金、酶联免疫吸附、表面等离子体共振等^[48]。这些技术可整合至微流控检测平台,利用芯片实验室集成样品富集、前处理、核酸提取、LAMP 反应和结果检测等,实现一步自动化检测,真正实现 POCT,使沙门氏菌 LAMP 技术更具优势。

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] 钟立霞, 霍胜楠, 孟静. 国内外食品卫生标准中沙门氏菌限量比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5266–5270.
ZHONG LX, HUO SN, MENG J. Comparative analysis of *Salmonella* limits in food hygiene standards at home and abroad [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(16): 5266–5270.
- [3] TECHATHUVANAN C, DSOUZA 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.
- [4] ZHAO L, WANG J, SUN XX, *et al.* Development and evaluation of the rapid and sensitive RPA assays for specific detection of *Salmonella* spp. In food samples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 631921.
- [5] 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, 131: 2361–2371.
- [6] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12): 63.
- [7] DIEGO GB, FERNÁNDEZ-SOTO P, MURO A. LAMP in neglected tropical diseases: A focus on parasites [J]. Diagnostics, 2021, (11): 521.
- [8] WILSON-DAVIES E, MAHANAMA A, SAMARAWEEERA B, *et al.* Concerns regarding the sensitivity of the OptiGene direct SARS-CoV-2 LAMP assay and its suitability for use in at-risk groups and hospital staff [J]. J Infect, 2021. 82(1). DOI: 10.1016/j.jinf.2021.01.013
- [9] OHTSUKA K, YANAGAWA K, TAKATORI K, *et al.* Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6730–6735.
- [10] HU L, DENG X, BROWN EW, *et al.* Evaluation of Roka Atlas *Salmonella* method for the detection of *Salmonella* in egg products in comparison with culture method, real-time PCR and isothermal amplification assays [J]. Food Control, 2018, 94: 123–131.
- [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] YAN M, LI W, ZHOU Z, *et al.* Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony [J]. Microb Pathogen, 2017, 102: 1–7.
- [13] YOUN SY, JEONG OM, CHOI BK, *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification with propidium monoazide treatment to detect live *Salmonella* in chicken carcasses [J]. Poult Sci, 2017, 96(2): 458–464.
- [14] GARRIDO-MAESTU A, AZINHEIRO S, CARVALHO J, *et al.* Combination of microfluidic loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles for rapid detection of *Salmonella* spp. in food samples [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2159.
- [15] ZHU L, XU Y, CHENG N, *et al.* A facile cascade signal amplification strategy using DNAzyme loop-mediated isothermal amplification for the

- ultrasensitive colorimetric detection of *Salmonella* [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2017, 242: 880–888.
- [16] HU L, MA LM, ZHENG S, *et al.* Evaluation of 3M molecular detection system and ANSR pathogen detection system for rapid detection of *Salmonella* from egg products [J]. *Poult Sci*, 2017, 96(5): 1410–1418.
- [17] PARK BH, OH SJ, JUNG JH, *et al.* An integrated rotary microfluidic system with DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and lateral flow strip based detection for point-of-care pathogen diagnostics [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 334–340.
- [18] DOMESLE KJ, YANG Q, HAMMACK TS, *et al.* Validation of a *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assay in animal food [J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 264: 63–76.
- [19] FANG J, WU Y, QU D, *et al.* Propidium monoazide real-time loop-mediated isothermal amplification for specific visualization of viable *Salmonella* in food [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2018, 67(1): 79–88.
- [20] ZHANG L, DU X, CHEN C, *et al.* Development of a rapid, one-step-visual method to detect *Salmonella* based on IC-LAMP method [J]. *Iran J Vet Res*, 2020, 21(1): 20–25.
- [21] PRIYA GB, AGRAWAL K, PRINCE MILTON AA, *et al.* Rapid and visual detection of *Salmonella* in meat using *invasin* (*invA*) gene-based loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *LWT*, 2020, 126: 109262.
- [22] YANG X, JIANG Y, SONG Y, *et al.* Point-of-care and visual detection of *Salmonella* spp. and *Cronobacter* spp. by multiplex loop-mediated isothermal amplification label-based lateral flow dipstick in powdered infant formula [J]. *Int Dairy J*, 2021, 118: 105022.
- [23] ZHAO Y, JIANG X, QU Y, *et al.* *Salmonella* detection in powdered dairy products using a novel molecular tool [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(5): 3480–3496.
- [24] 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.
- [25] HU L, MA LM, ZHENG S, *et al.* Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. enteritidis from egg products [J]. *Food Control*, 2018, 88: 190–197.
- [26] MEI X, ZHAI X, LEI C, *et al.* Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples [J]. *Food Control*, 2019, 104: 9–19.
- [27] 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.
- [28] WAN J, GUO J, LU Z, *et al.* Development of a test kit for visual loop-mediated isothermal amplification of *Salmonella* in spiked ready-to-eat fruits and vegetables [J]. *J Microbiol Meth*, 2020, 169: 105830.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] KIM M, KIM H, KIM H. Direct triplex loop-mediated isothermal amplification assay for the point-of-care molecular detection of *Salmonella* genus, subspecies I, and serovar typhimurium [J]. *Food Control*, 2021, 120: 107504.
- [32] SOLI KW, KAS M, MAURE T, *et al.* Evaluation of colorimetric detection methods for *Shigella*, *Salmonella*, and *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 77(4): 321–323.
- [33] NGUYEN HV, NGUYEN VD, LIU F, *et al.* An integrated smartphone-based genetic analyzer for qualitative and quantitative pathogen detection [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(35): 22208–22214.
- [34] TANNER NA, ZHANG Y, EVANS TJ. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes [J]. *Biotechniques*, 2015, 58(2): 59–68.
- [35] POOLE CB, LI Z, ALHASSAN A, *et al.* Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e169011.
- [36] 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.
- [37] ZHANG Y, REN G, BUSS J, *et al.* Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride [J]. *Biotechniques*, 2020, 69(3): 178–185.
- [38] DRAZ MS, LU X. Development of a loop mediated isothermal amplification (LAMP)-surface enhanced raman spectroscopy (SERS) assay for the detection of *Salmonella enterica* serotype enteritidis [J]. *Theranostics*, 2016, 6(4): 522–532.
- [39] SAYAD A, IBRAHIM F, MUKIM US, *et al.* A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 100: 96–104.
- [40] TSOUGENI K, KAPROU G, LOUKAS CM, *et al.* Lab-on-Chip platform and protocol for rapid foodborne pathogen detection comprising on-chip cell capture, lysis, DNA amplification and surface-acoustic-wave detection [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2020, 320: 128345.
- [41] 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.
- [42] KREITLOW A, BECKER A, SCHOTTE U, *et al.* Evaluation of different target genes for the detection of *Salmonella* spp. by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(4): 420–426.
- [43] LI J, ZHAI L, BIE X, *et al.* A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting gene62181533 for the detection of *Salmonella* spp. in foods [J]. *Food Control*, 2016, 60: 230–236.
- [44] GRIMONT PAD. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th

edition [Z].

- [45] CHEN Z, ZHANG K, YIN H, *et al.* Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Sci Human Welln, 2015, 4(2): 75–79.
- [46] SHAO Y, ZHU S, JIN C, *et al.* Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 148(2): 75–79.
- [47] MASHOOQ M, KUMAR D, NIRANJAN AK, *et al.* Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: A new tool for DNA quantification [J]. J Microbiol Meth, 2016, 126: 24–29.
- [48] BECHERER L, BORST N, BAKHEIT M, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection [J]. Anal Methods, 2020, 12(6): 717–746.
- [49] CHEN C, LIU P, ZHAO X, *et al.* A self-contained microfluidic in-gel loop-mediated isothermal amplification for multiplexed pathogen

detection [J]. Sensor Actuat B Chem, 2017, 239: 1–8.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



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



王伟影, 副主任中药师, 主要研究方向为检验检测技术和标准化研究。
E-mail: 18790821@qq.com