

# 两种基于重组酶介导扩增技术的沙门氏菌检测方法比较

张雅薇\*, 林碧莲, 张芳, 傅德江, 韩涛

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(福州), 福建福州 350015)

**摘要:** 该研究旨在利用重组酶介导扩增技术建立并比较两种食品中沙门氏菌快速检测方法。根据沙门氏菌菌毛蛋白 *fimY* 基因设计引物和探针, 分别采用荧光法和侧向流试纸条法对扩增产物进行检测, 构建重组酶介导等温核酸扩增方法, 验证两种方法的特异性、灵敏度及对人工污染样品的检测效果。该研究构建的两种方法均在 39 °C 下恒温运行, 检测时间 30~40 min。方法特异性良好, 与大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌等常见的其他食源性致病菌无交叉反应, 侧向流试纸条法灵敏度可达到 1 pg/μL, 荧光法灵敏度为 10 pg/μL, 对人工污染样品的检测结果与传统分离培养法检测结果一致。因此该研究建立了两种快速、特异、灵敏的方法用于检测沙门氏菌, 为食品中沙门氏菌污染的快速筛查提供一定的参考价值 and 数据支撑。

**关键词:** 重组酶介导扩增; 侧向流试纸条; 荧光法; 快速检测; 沙门氏菌

文章编号: 1673-9078(2023)03-341-347

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0479

## Comparison of Two *Salmonella* Detection Methods Based on Recombinase Aided Amplification Technology

ZHANG Yawei\*, LIN Bilian, ZHANG Fang, FU Dejiang, HAN Tao

(Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fuzhou 350015, China)

**Abstract:** Two rapid detection methods for *Salmonella* in food were established and compared using recombinase-mediated amplification technology. The primers and probes were designed based on the *fimY* gene of *Salmonella*, and the amplified products were detected using the fluorescence method and lateral flow strip method, respectively. A recombinase-mediated isothermal nucleic acid amplification method was constructed to verify the specificity, sensitivity, and detection effect of the two methods on artificially contaminated samples. The two methods constructed in this study were operated at a constant temperature of 39 °C, and the detection time was 30~40 min. These methods have good specificity and no cross-reaction with other common food-borne pathogens, such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The sensitivity of the lateral flow test strip method reached 1 pg/μL, and the sensitivity of the fluorescence method was 10 pg/μL. The detection results of the artificially contaminated samples were consistent with the detection results of the traditional separation and culture method. Therefore, two rapid, specific and sensitive methods were established in this study for the detection of *Salmonella*, which provide a confirmed reference value and data to support the rapid screening of *Salmonella* contamination in food.

**Key words:** recombinase aided amplification; lateral flow strip; fluorescence method; rapid detection; *Salmonella*

引文格式:

张雅薇, 林碧莲, 张芳, 等. 两种基于重组酶介导扩增技术的沙门氏菌检测方法比较[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 341-347.

ZHANG Yawei, LIN Bilian, ZHANG Fang, et al. Comparison of two *Salmonella* detection methods based on recombinase aided amplification technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 341-347.

沙门氏菌是引起食源性疾病的重要致病菌之

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 福建省产品质量检验研究院院级科技项目 (KY202011A); 福建省市场监督管理局科技项目 (FJMS2020003)

作者简介: 张雅薇 (1989-), 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: zhangyaweiwv@126.com

一<sup>[1]</sup>。我国现行的 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验》为分离培养法, 检测周期一般需要 5~7 d, 操作繁琐。随着分子生物学技术的发展, 出现了聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、环介导等温核酸扩增 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)、依

赖核酸序列的扩增技术 (Nuclear Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) 及相关的衍生技术<sup>[2,3]</sup>。其中 PCR 及衍生技术灵敏度高, 应用较广, 然而该技术依赖高温变性打开 DNA 双链, 需要在精密且昂贵的温度控制仪器中完成。LAMP 技术是在等温条件 (65 °C) 下反应, 需要设计多对引物, 对引物设计要求高、难度大, 扩增产物不易纯化回收。NASBA 技术扩增产物主要为单链 RNA, 在扩增 RNA 模板时具有独特优势, 但单链 RNA 产物容易降解, 尤其是进行琼脂糖凝胶电泳时易有拖尾。重组酶介导扩增 (Recombinase Aided Amplification, RAA) 技术是一种等温核酸扩增技术, 在等温条件下 (一般为 37 °C 至 42 °C) 反应 15~40 min 即可完成对目标片段的扩增<sup>[4-8]</sup>。RAA 技术的扩增原理是利用从细菌或真菌中获得的重组酶, 与引物结合形成复合物, 复合物在模板上定位后引发链交换形成 D 状环结构, 单链结合蛋白与被置换的母链结合以防止进一步替换, 重组酶解离后导致复合物构象改变, 引物 3' 端暴露, 随后在 DNA 聚合酶的作用下完成扩增过程<sup>[9,10]</sup>。RAA 技术的扩增产物可通过琼脂糖凝胶电泳、实时荧光检测、侧向流试纸条等方法进行检测<sup>[11-15]</sup>。琼脂糖凝胶电泳法无需设计探针, 但需要在电泳检测前纯化回收扩增产物; 实时荧光法需要设计特定引物探针, 使用恒温荧光检测仪器进行荧光强度检测; 侧流层析试纸条法需要设计特定引物探针, 通过肉眼即可观察结果, 直观便捷, 但需要对扩增产物进行适当稀释, 避免扩增产物中的成分对层析试纸条上的抗体造成干扰<sup>[16-19]</sup>。RAA 技术目前已成为分子检测技术领域的热点之一, 被广泛应用于动物源性成分检测、病原微生物检测等领域, 尤其适用于设备较缺乏的基层及时限较短的现场检测<sup>[20-24]</sup>。

目前采用 RAA 检测沙门氏菌的研究多数以 *invA* 基因 (侵袭蛋白 A 基因) 为靶基因, 且检测手段以琼脂糖凝胶电泳法和荧光探针法居多, 使用的菌种涉及肠炎沙门氏菌等<sup>[25-29]</sup>。由于沙门氏菌种类繁多, RAA 检测也有多种形式, 本研究根据沙门氏菌特异性菌毛蛋白 *fimY* 基因设计 RAA 引物和探针, 采用荧光探针法和侧流层析试纸条法对扩增产物进行实时荧光检测, 分别建立两种快速、便捷的沙门氏菌 RAA 检测方法, 并比较两种方法的特异性、灵敏度和人工污染沙门氏菌的样品检测应用效果, 旨在通过实验比较两种基于重组酶介导扩增技术的快速检测方法的优缺点, 为食品中沙门氏菌的快速检测提供实验基础和数据支撑。

## 1 材料与amp方法

### 1.1 材料与试剂

菌株: 本研究所用菌株共 10 株, 其中 3 株目标菌株鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* CGMCC 1.1174)、肠沙门氏菌亚种伤寒血清型 (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhi* CMCC(B) 50071)、甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi* ACMCC(B) 50093) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; 其余 7 株对照菌株大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7 CICC 10907)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、阪崎肠杆菌 (*Cronobacter mutijensii* ATCC 51329)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus* ATCC 14579) 购自北京陆桥技术有限责任公司。所有菌株均保存于福建省产品质量检验研究院食品检验研究所菌种保藏库。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、溶菌酶 (50 mg/mL), 天根生化科技有限公司; RAA 核酸扩增试剂盒 (荧光法)、RAA 核酸扩增试剂盒 (试纸条法), 江苏奇天基因生物科技有限公司; HybriDetct 1 侧向流试纸条, 德国 Milenia 公司; 血平板、缓冲蛋白胨水、营养琼脂、营养肉汤等培养基, 北京陆桥技术有限责任公司。5 份食品样品采购自当地超市, 用于制备人工污染沙门氏菌的样品。

### 1.2 仪器与设备

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Life Tech 公司; Ultrospec 2100 Pro 核酸蛋白测定仪, 美国 GE 公司; Mini Spin 小型台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; LRH-150 生化培养箱, 上海一恒公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种培养及细菌 DNA 提取

所有菌种接种至血平板进行活化, 36 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 挑取菌落接种至营养琼脂平板, 36 °C 培养 24~48 h, 依据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行细菌基因组 DNA 提取, 采用核酸蛋白测定仪检测 DNA 浓度, 提取后的 DNA 应立即使用或 -20 °C 保存备用。挑取活化后的菌落接种至营养肉汤, 36 °C

培养 24 h, 可制成菌悬液备用。

### 1.3.2 引物探针设计

在 NCBI 数据库中查询沙门氏菌菌毛蛋白 *fimY* 基因 (Genebank M90677.1), 设计 RAA 特异性引物和探针。荧光法所用探针需在中间插入一个四氢呋喃 (Tetrahydrofuran, THF) 基团, THF 位点两侧分别标记荧光基团 FAM 和淬灭基团 BHQ, 当探针结构完整时荧光强度低, THF 位点一经酶解, 淬灭基团游离后

荧光强度随即增强。侧向流试纸条法所用引物需在一侧标记生物素, 探针上需标记 FAM 基团, FAM 基团与含抗 FAM 抗体的胶体金颗粒会形成免疫复合物, 在试纸条上扩散后, 生物素标记的扩增产物被配体捕获后形成检测线, 游离探针被金标物捕获后形成质控线。所有引物和探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes

名称	序列 (5'-3')
F-fluo	ATATCTGCGGCGTTGGAGAGTGATAACGGC
R-fluo	ATATTAGAGCAATGGAAAAGCAGGATGCG
P-fluo	CAGTCTTTAGCATTTCTTAAACGGCGG(FAM-dT)G(THF)C-(BHQ-dT)TTCCTGCGTGGT-C3spacer
F-strip	ATATCTGCGGCGTTGGAGAGTGATAACGGC
R-strip	Biotin-ATATTAGAGCAATGGAAAAGCAGGATGCG
P-strip	FAM-CAGTCTTTAGCATTTCTTAAACGGCGGTG(THF)-CTTTCCTGCGTGGT-C3spacer

注: F 为正向引物, R 为反向引物, P 为探针, fluo 表示荧光法, strip 表示侧向流试纸条法。

### 1.3.3 两种 RAA 检测方法的建立

以鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 在 50  $\mu$ L 单个反应体系中以 2 $\times$ Buffer 25  $\mu$ L, 280 mmol/L 乙酸镁 2.5  $\mu$ L 为基础, 对 10  $\mu$ mol/L 上下游引物和 10  $\mu$ mol/L 探针的使用量进行优化。引物使用量分别为 1、1.5、2 和 2.5  $\mu$ L, 探针使用量分别为 0.4、0.6、0.8 和 1  $\mu$ L, 模板 DNA 2~5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 50  $\mu$ L, 建立最优 RAA 检测体系。其中 Mg<sup>2+</sup> 决定扩增过程的启动, 因此 2.5  $\mu$ L 280 mmol/L 乙酸镁需添加在反应管盖内侧, 盖紧瞬时离心后与反应体系混合, 立即进行检测。所有实验均设立提取阴性对照和体系空白对照, 阳性对照由试剂盒自带。重复检测三次。

RAA 荧光法反应参数: 39  $^{\circ}$ C, 60 s, 1 个循环; 39  $^{\circ}$ C, 45 s, 40 个循环 (共 30 min), 每个循环均收集荧光信号。RAA 侧向流试纸条法反应参数: 39  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中放置 30 min。扩增产物用检测缓冲液分别稀释 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍和 100 倍, 将试纸条直立放置于稀释产物中, 5~15 min 取出直接观察结果。

### 1.3.4 特异性实验

以鼠伤寒沙门氏菌、肠沙门氏菌亚种伤寒血清型、甲型副伤寒沙门氏菌三株目标菌和 1.1 中其余七株对照菌的基因组 DNA 为模板, 以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照, 采用 1.3.3 优化后的两种 RAA 检测方法进行扩增检测, 比较两种方法的特异性。特异性实验重复检测三次。

### 1.3.5 灵敏度实验

鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 经核酸检测仪测定后确定起始浓度, 使用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍系列稀释, 共设计 7 个稀释度, 分别取各梯度 DNA 溶液进行灵敏度实验, 荧光法以出现扩增曲线的最低 DNA 浓度为检测限值, 侧向流试纸条法以肉眼可辨别出检测线的最低 DNA 浓度为检测限值, 比较两种 RAA 检测方法的灵敏度。灵敏度实验重复检测三次。

### 1.3.6 检测人工模拟污染食品

从当地超市购买鸡蛋、生鸡肉、牛奶、蔬菜沙拉、面包等五种常见食品, 无菌操作称取 25 g 样品, 置于盛有 225 mL 缓冲蛋白胨水的均质袋内, 每种样品各称取 2 份。其中一份样品添加鼠伤寒沙门氏菌菌株培养液 0.2 mL 作为人工污染样品, 另一份为对照样品。所有样品均质后依据 GB 4789.4-2016 进行检验, 同时取预增菌 8 h 后的缓冲蛋白胨水增菌液提取细菌基因组 DNA, 按照 1.3.3 建立的两种 RAA 方法进行检测, 与传统分离培养法检测结果进行比较。

### 1.3.7 数据分析

RAA 荧光法: 出现明显扩增曲线且荧光信号达到系统设定阈值时的扩增循环数 (Cycle Threshold, Ct) 小于等于 30, 判定为阳性; 如 Ct  $\geq$  40, 判定为阴性; 如 40 > Ct > 30, 则结果可疑, 需重新检测。

RAA 侧向流试纸条法: 通过肉眼观察, 同时出现质控线和检测线, 判定为阳性; 有质控线而无检测线, 判定为阴性; 无质控线则结果无效。

## 2 结果与讨论

### 2.1 两种 RAA 检测方法的建立

以鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 根据扩增曲线出现的时间及荧光信号强度对体系进行优化, 结果见图 1, 确定 RAA 荧光法的 50  $\mu\text{L}$  反应体系中引物探针使用量为 10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  探针 0.6  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 5  $\mu\text{L}$ 。RAA 侧向流试纸条法的 50  $\mu\text{L}$  反应体系中引物探针使用量对结果判定影响较小, 根据检测线(下方)和质控线(上方)的颜色深浅及检测成本考虑, 确定为 10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  探针 0.6  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 3  $\mu\text{L}$ , 扩增产物用检测缓冲液稀释 20 倍, 将试纸条置于稀释产物中 10 min 取出观察结果。

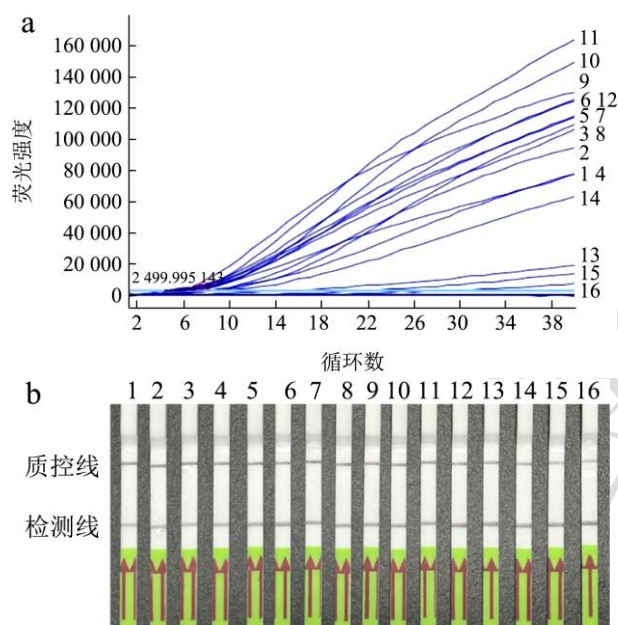


图 1 RAA 荧光法 (a) 和 RAA 侧向流试纸条法 (b) 引物探针使用量优化实验

Fig.1 Usage optimization of primers and probes of RAA fluorescence assay (a) and RAA lateral flow strip assay (b)

注: 1~4: 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 探针分别为 0.4、0.6、0.8、1  $\mu\text{L}$ ; 5~8: 上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , 探针分别为 0.4、0.6、0.8、1  $\mu\text{L}$ ; 9~12: 上下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 探针分别为 0.4、0.6、0.8、1  $\mu\text{L}$ ; 13~16: 上下游引物各 2.5  $\mu\text{L}$ , 探针分别为 0.4、0.6、0.8、1  $\mu\text{L}$ ;

本研究中侧向流试纸条法所用设备为恒温培养箱, 由于 RAA 方法对检测温度要求为 37~42  $^{\circ}\text{C}$ , 无需精准的温度控制, 因此也可采用水浴等更简单的方式进行反应。荧光法采用荧光 PCR 仪收集检测荧光信号, 结果判定是以出现扩增曲线且循环数 Ct 值  $\leq 30$

为阳性结果, 为提高现场检测实用性, 后续研究也可采用成本更低的便携式恒温荧光检测仪进行检测, 相应的结果判定以出现扩增曲线的反应时间小于等于 20 min 为阳性结果。

### 2.2 特异性比较

应用所建立的两种 RAA 检测方法分别对鼠伤寒沙门氏菌、肠沙门氏菌亚种伤寒血清型、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、副溶血性弧菌、阪崎肠杆菌和蜡样芽胞杆菌 10 种菌株提取的 DNA 模板进行检测, 特异性验证结果见图 2。结果显示鼠伤寒沙门氏菌、肠沙门氏菌亚种伤寒血清型、甲型副伤寒沙门氏菌三种沙门氏菌在荧光法检测中出现明显的扩增曲线, 在侧向流试纸条法检测中质控线及检测线清晰可见, 其余对照菌株均未出现扩增曲线及试纸条检测线, 说明本研究建立的两种 RAA 方法特异性均良好, 与常见的非目标菌无交叉反应。

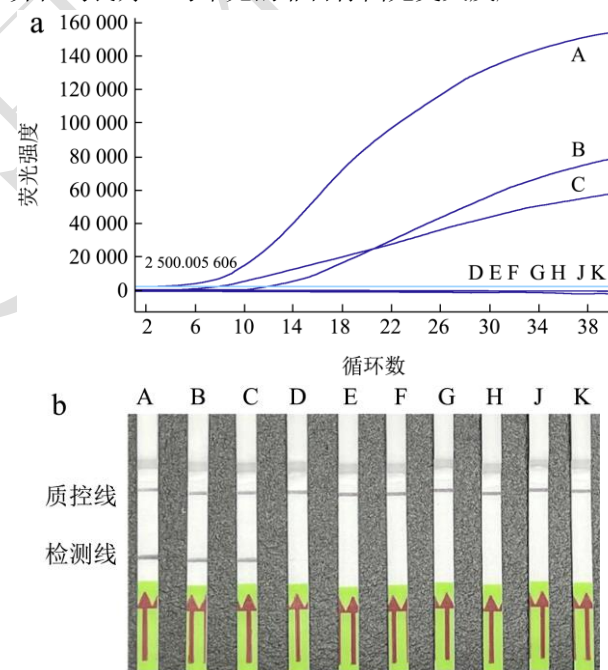


图 2 RAA 荧光法 (a) 和 RAA 侧向流试纸条法 (b) 特异性比较  
Fig.2 Specificity of RAA fluorescence assay (a) and RAA lateral flow strip assay (b)

注: A.鼠伤寒沙门氏菌 (CGMCC 1.1174); B.肠沙门氏菌亚种伤寒血清型 (CMCC(B) 50071); C.甲型副伤寒沙门氏菌 (CMCC(B) 50093); D.大肠埃希氏菌 (ATCC 25922); E.金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923); F.单核细胞增生李斯特氏菌 (ATCC 19115); G.大肠埃希氏菌 O157:H7 (CICC 10907); H.副溶血性弧菌 (ATCC 17802); J.阪崎肠杆菌 (ATCC 51329); K.蜡样芽胞杆菌 (ATCC 14579)。



### 2.3 灵敏度比较

鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA 经核酸检测仪测定的起始浓度为 100 ng/μL, 经 10 倍系列稀释, 共七个稀释度, 对 DNA 模板分别进行 RAA 荧光法检测和 RAA 侧向流试纸条法检测, 结果见图 3。结果显示荧光法检测沙门氏菌灵敏度为 10 pg/μL, 侧向流试纸条法检测沙门氏菌灵敏度为 1 pg/μL, 二者比较, RAA 侧向流试纸条法比荧光法灵敏度高。后续研究需要从靶向基因比较、引物探针筛选、检测体系优化等多方面探索, 提高 RAA 荧光法的检测灵敏度。

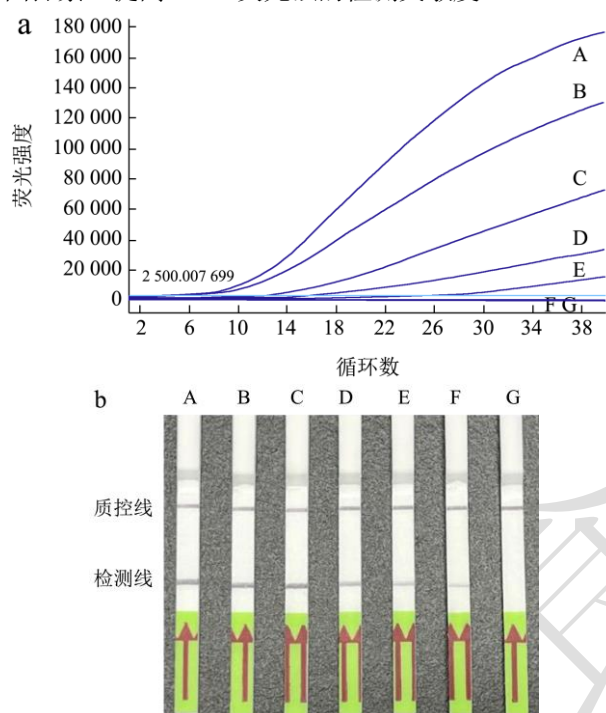


图 3 RAA 荧光法 (a) 和 RAA 侧向流试纸条法 (b) 灵敏度比较  
Fig.3 Sensitivity of RAA fluorescence assay (a) and RAA lateral flow strip assay (b)

注: DNA 浓度分别为 A 100 ng/μL, B 10 ng/μL, C 1 ng/μL, D 100 pg/μL, E 10 pg/μL, F 1 pg/μL, G 0.1 pg/μL。

### 2.4 人工模拟污染食品的检测

以鸡蛋 (P1)、生鸡肉 (P2)、牛奶 (P3)、蔬菜沙拉 (P4)、面包 (P5) 为样品, 各取 2 份进行检测, 其中一份添加鼠伤寒沙门氏菌菌株培养液作为人工污染样品 (Sal), 另一份为对照样品。传统菌检方法依据国家标准进行检测, 同时取预增菌 8 h 后的增菌液提取细菌基因组 DNA 进行两种 RAA 方法检测, 结果见图 4, 添加了菌株培养液的五份样品有明显扩增曲线, 试纸条上检测线呈阳性, 对照样品检测均为阴性。两种 RAA 方法与传统分离培养法检测结果比较见表 2。结果显示, 本研究建立的两种 RAA 检测方法与

传统沙门氏菌分离培养法均检出人工污染样品为沙门氏菌阳性, 对照样品为沙门氏菌阴性, 检测结果一致。但同 PCR 技术一样, RAA 技术在扩增 DNA 片段的过程中也无法区分活菌和死菌, 如果样本中死细菌数量大, 即使经过增菌步骤的稀释后依然容易造成假阳性, 需继续探索相关衍生技术, 如引入逆转录步骤、利用死菌细胞膜穿透性强而添加特定染料等。

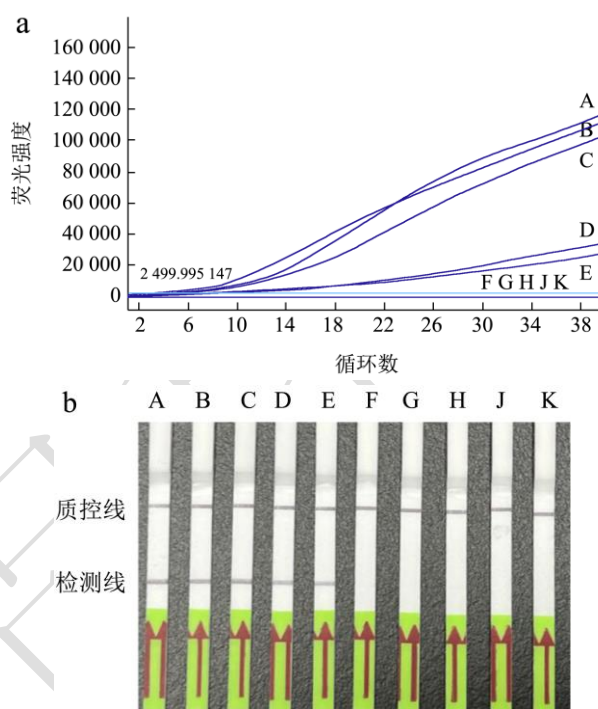


图 4 RAA 荧光法 (a) 和 RAA 侧向流试纸条法 (b) 检测人工污染样品

Fig.4 RAA fluorescence test (a) and RAA lateral flow strip test (b) for artificial contaminated samples

注: A~E: 人工污染样品 P1-Sal~P5-Sal; F~K: 对照样品 P1~P5。

表 2 样品中沙门氏菌检测结果

Table 2 Detection of *Salmonella* in samples

样品	RAA 荧光法	RAA 侧向流试纸条法	国标法
P1-Sal	+	+	+
P2-Sal	+	+	+
P3-Sal	+	+	+
P4-Sal	+	+	+
P5-Sal	+	+	+
P1	-	-	-
P2	-	-	-
P3	-	-	-
P4	-	-	-
P5	-	-	-

注: Sal 为人工污染沙门氏菌的样品, +为检出沙门氏菌, -为未检出沙门氏菌。

### 3 结论

本研究以沙门氏菌菌毛蛋白 *fimY* 基因为目标基因,设计特异性引物探针,建立了两种沙门氏菌 RAA 检测方法。其中荧光法采用恒温荧光检测仪在 39 °C 条件下反应 30 min 左右即可完成,侧向流试纸条法在 39 °C 恒温培养箱中反应 30 min 后经过试纸条检测 10 min 可获得结果。研究显示两种方法特异性均良好,侧向流试纸条法灵敏度可达到 1 pg/μL,荧光法灵敏度为 10 pg/μL,对人工污染样品的检测结果与传统分离培养法检测结果一致。

然而,RAA 技术作为一种新兴技术,发展时间较短,目前仍有不少缺点需要继续探索改进。第一,RAA 技术是依靠多种酶类来完成扩增过程,酶类试剂的纯度及活性会极大程度地影响 RAA 反应效率,因此需要确保酶类试剂合理保存且均一性良好;第二,由于扩增原理不同于 PCR 技术的热循环,RAA 技术的扩增产物并非严格按指数增长,因而不能简单以荧光强度、扩增曲线出现时间、试纸条检测线颜色深浅来推算 DNA 浓度,对定量检测方法的探索不能以 PCR 的定量方法来类比;第三,目前暂无 RAA 技术专用的引物探针设计工具,研究者需以现有设计软件作为辅助,依据 RAA 技术基本规则进行设计调整,并通过大量实验验证引物探针的实际应用效果,因此引物探针设计是该技术的重点和难点之一;第四,为降低检测成本,后续可自行制备侧向流试纸条,在充分比较板材及抗体等原材料后,探索大规模制备的可行性。

综上所述,本研究建立的两种 RAA 检测方法只需要在恒温(39 °C)下进行反应,无需精准的变温模块,简化了对设备的要求。检测时间也由传统分离培养法的五到七天缩短为 DNA 提取后的 30~40 min 左右,对食品中沙门氏菌的快速检测方法探索有重要的参考意义,特别是在现场检测领域体现出巨大的潜力。RAA 技术已经成为了分子检测技术领域的热点之一,已被广泛应用于食品安全、转基因作物鉴定、动物源性成分鉴定等快筛快检领域,相信随着相关技术手段的深入研究和不断的发展,等温扩增技术通过不断的改良完善,该技术有望作为一项便捷、快速的检测技术得到更广泛的应用。

### 参考文献

- [1] Thames H T, Sukumaran A T. A review of *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler meat: Emerging challenges and food safety measures [J]. *Foods*, 2020, 9(6): 1-22.
- [2] Domesle K J, Young S R, Yang Q R, et al. Loop-mediated isothermal amplification for screening *Salmonella* in animal food and confirming *Salmonella* from culture isolation [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2020, 159(5): 1-14.
- [3] 兰海鸥,柯义强,马咸莹,等.重组酶聚合酶等温扩增技术在食品安全检测领域的应用[J]. *食品与发酵工业*,2019,45(14): 233-238.
- [4] Waldman J, Souza M N, Fonseca A S K, et al. Direct detection of *Salmonella* from poultry samples by DNA isothermal amplification [J]. *British Poultry Science*, 2020, 61(6): 653-659.
- [5] Gumaa M M, Cao X A, Li Z C, et al. Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the detection of *Brucella* spp. infection [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 47(10): 101434.
- [6] 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):2063-2071.
- [7] 马巧妮,王萌,朱兴全.重组酶介导扩增技术及其在病原微生物快速检测中的应用进展[J]. *中国生物工程杂志*,2021, 41(6):45-49.
- [8] Ma B, Li J L, Chen K, et al. Multiplex recombinase polymerase amplification assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens in seafood [J]. *Foods*, 2020, 9(3): 278.
- [9] 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.
- [10] 高建欣,藏雨轩,杜欣军,等.重组酶聚合酶恒温扩增结合乳胶微球试纸条快速检测金黄色葡萄球菌[J]. *食品研究与开发*,2019,40(1):168-172.
- [11] Liu S Y, Geng Y Y, Liu L B, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid detection of *Cronobacter* spp. [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(6): 4914-4922.
- [12] Geng Y Y, Tan K, Liu L B, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 1-9.
- [13] Hice S A, Clark K D, Anderson J L, et al. Capture, concentration, and detection of *Salmonella* in foods using magnetic ionic liquids and recombinase polymerase amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(1): 1113-1120.
- [14] 孙晓红,后来旺,李达容,等.重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*,2020,46(24):265-270.

- [15] Fan X X, Li L, Zhao Y G, et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of African swine fever virus [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(6): 1696.
- [16] 魏莹,郭利川,张小平,等.重组酶介导扩增方法快速检测 A 族乙型溶血性链球菌[J].*中国国境卫生检疫杂志*,2018,41(5):314-316.
- [17] 占利,徐昌平,张云怡,等.副溶血性弧菌实时重组酶聚合酶扩增检测技术研究[J].*预防医学*,2019,31(7):653-657.
- [18] Choi G, Jung J H, Park B H, et al. A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(12): 2309-2316.
- [19] 张强,丁昕,吴小珉,等.重组酶介导的华支睾吸虫特异性核酸等温扩增方法的建立及初步评价[J].*中国血吸虫病防治杂志*,2019,31(5):468-473.
- [20] 王金凤,项佳林,孙晓霞,等.铜绿假单胞菌实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增方法建立及应用[J].*中国食品卫生杂志*,2020,32(5):524-529.
- [21] Zhao N, Jia L, Che J Y, et al. Novel molecular marker for RAA-LFD visual detection of *Cynoglossus semilaevis* sex [J]. *Animal Reproduction Science*, 2021, 226: 106713.
- [22] 施奕,徐昌平,余蓓蓓,等.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].*病毒学报*,2020,36(3):522-532.
- [23] Wang W J, Wang C G, Bai Y, et al. Establishment of reverse transcription recombinase-aided amplification-lateral-flow dipstick and real-time fluorescence-based reverse transcription recombinase-aided amplification methods for detection of the Newcastle disease virus in chickens [J]. *Poultry Science*, 2020, 99(7): 3393-3401.
- [24] 钟海霞,周寒嫣,罗欢,等.等温扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展[J].*食品工业科技*,2019,40(7):362-367.
- [25] 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):298-303.
- [26] Hu J Q, Huang R, Sun Y T, et al. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella typhimurium* in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 158(3): 25-32.
- [27] Zhao L W, Wang J C, Sun X X, et al. Development and evaluation of the rapid and sensitive RPA assays for specific detection of *Salmonella* spp. in food samples [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11(2): 631921.
- [28] 程永友,刘雪连,刘滢,等.重组聚合酶扩增技术在沙门氏菌检测中的应用[J].*食品安全质量检测学报*,2020,11(11): 3422-3427.
- [29] Li J L, Ma B, Fang J H, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food [J]. *Foods*, 2020, 9(27): 1-12.