

G-四链体与 As-PCR 联用可视化检测沙门氏菌

刘健慧^{1,2}, 张先舟¹, 张蕴哲¹, 王红静¹, 李雪瑶¹, 耿凤珍^{3*}, 檀建新^{1*}

(¹河北农业大学食品科技学院 河北省农业微生物生物信息利用技术创新中心 河北保定 071000

²河北民族师范学院 生物与食品科学学院 河北承德 067000

³河北大学附属医院 河北保定 071000)

摘要 沙门氏菌是食源性病原菌,常在食品媒介中传播,因此快速检测是控制该病原菌的关键。本研究用沙门氏菌基因组 DNA 作模板,通过对不对称 PCR(As-PCR)扩增条件的优化,证明当非限制性引物 HF 终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$,与限制性引物 GR 终浓度比 10:1、退火温度 58 $^{\circ}\text{C}$,扩增 40 个循环时可获得最大浓度的单链 DNA(ssDNA)产物。带有 G-四链体序列的 ssDNA 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 氯化血红素作用 60 min 时,G-四链体显示出最高的过氧化物酶活性。在此基础上,将 As-PCR 和 G-四链体联用,实现了可视化检测沙门氏菌 *invH* 基因,在 2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ~258 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的质量浓度区间,质量浓度对数与吸光值 $A_{421\text{nm}}$ 呈线性关系($y = 0.0691x + 0.3085, R^2 = 0.9729$)。对污染的牛奶样品检测,检出灵敏度高,为 35 CFU/mL,且操作便捷,为病原微生物检测提供了新技术支撑。

关键词 不对称 PCR; 可视化检测; 沙门氏菌; G-四链体

文章编号 1009-7848(2023)05-0371-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.037

沙门氏菌(*Salmonella*, SALM)在人类和动物中广泛分布,菌体呈短棒状,末端钝圆,是一种不形成孢子的革兰氏阴性菌,其作为肠道病原体,可诱发肠胃炎和菌血症^[1-2]。据统计,沙门氏菌每年可导致 9 300 万例肠道感染和 15.5 万例死亡^[3]。在我国,每年由沙门氏菌引发的致病人超 300 万,占食物中毒事件的 60%^[4-5]。沙门氏菌的污染物主要是家禽肉、蛋、奶等畜产品,因此,快速、准确检测食品中病原体对预防食物中毒,确保食品安全至关重要^[6]。

近年来,因效率低、准确率低、富集时间长等弊端,而导致传统的生化分析方法难以满足当前的检测需求^[7]。基于抗体与抗原识别的免疫学检测法,虽特异性强,但抗体的制备费时且昂贵,不易得到^[8]。相比之下,核酸检测技术因在较短时间内可以较低成本地对病原体进行灵敏、特异的检测,故受到越来越多的青睐^[9]。核酸扩增技术根据温度变化,分为 PCR 反应^[10]、LCR 反应^[11]等非等温扩增和 LAMP 扩增、RCA 扩增^[12]、SDA 扩增^[13]、HCR 反

应^[14]等等温扩增,这些核酸扩增手段均已应用到食源性病原菌检测中。等温扩增相比于非等温扩增技术不依赖于反应过程中的温度变化,在金属浴、水浴锅等恒温仪器中即可完成,更适用于现场样品检测,然而其有引物设计复杂、所用酶昂贵,特别是大规模试验时存在假阳性风险等弊端^[15]。PCR 高效、稳定的性能,已成为分子诊断中应用广泛的手段之一,然而大多数用于 PCR 产物的检测方法需要凝胶成像仪等设备,为现场实际检测设置了障碍^[16-17]。

快速而直观的检测手段在实际检测中一直是首选因素。目前荧光染料的嵌入^[18]、pH 敏感剂的指示^[19]、纳米金粒子的团簇^[20]、偶联过氧化物酶催化底物显色^[21]等信号放大策略与核酸扩增技术结合紧密,所构建的生物传感器已实现对病原体的检测。然而,由于其需要额外引入信号放大因子,使得整体试验操作更加繁琐,且加入物质的浓度直接影响检测的灵敏度^[22-23]。G-四链体(G-quadruplex)是通过氢键(Hoogsteen)形成的富含鸟嘌呤(G)的单链核酸的高级结构,因此可将其相关序列结构设计到核酸序列上,通过核酸扩增而放大检测信号^[24-25]。作为功能核酸,G-四链体结合氯化血红素(Hemin)可形成脱氧核酶(DNAzyme),具有类似过氧化物酶的活性,促使底物及荧光染料

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 河北省自然科学基金重大项目(C2019204342)

第一作者: 刘健慧,女,硕士生

通信作者: 耿凤珍 E-mail: 18931229862@163.com

檀建新 E-mail: jianxintan@sina.com

显色或强度变化,常应用在生物传感器中^[26-27]。

本研究采用不对称 PCR (Asymmetric PCR, As-PCR)方法,通过控制上、下游引物浓度比例,保证产物中产生单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA),浓度高的引物称为非限制性引物,用于反应后期扩增出大量 ssDNA,浓度低的引物称为限制性引物,用于反应前期扩增模板,为非限制性引物提供结合位点^[28-29]。在限制性引物的 5' 末端标记 G-四链体的互补序列,只有当沙门氏菌的基因组 DNA 存在时,才可启动 As-PCR 产生无数条包含 G-四链体的 ssDNA 产物,此时显色底物 ABTS²⁻和 H₂O₂ 在氯高铁血红素和 K⁺的存在下转化为比色信号,实现 DNAzyme 视觉信号输出的级联放大,通过肉眼观察即可实现对沙门氏菌的半定量检测。由于该方法在扩增前的预混液中不存在 G-四链体序列,因此其背景值大大降低,且不需要额外的酶或缓冲液修饰。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ABCC 0927), 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* CMCC 44752), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CICC 21600), 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* CICC 21484), 丙、甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi C* CICC 21501、*Salmonella paratyphi A* CICC 21512), 单增李斯特氏菌 (*Listeria Monocytogenes* CICC 21633), 志贺氏菌 (*Shigella Castellani* ATCC 12022), 河北农业大学食品生物安全与生物技术创新实验室提供; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; tPAGE 纯化方式合成序列, 金唯智生物科技有限公司; 2×Es Taq Master Mix, 北京康为世纪有限公司; DNA 纯化试剂盒, 宝生物工程有限公 司; 氯高铁血红素、30%过氧化氢、甲基亚砷、ABTS²⁻, 北京 Solarbio 公司; K⁺缓冲液参考文献^[30] 配制, 均为国产分析纯级试剂。

1.2 仪器与设备

MTH-012 漩涡混合仪, 海门其林贝尔有限公司; 070-851PCR 仪, 德国 Biometra 公司; DYY-10C 电泳仪, 北京六一仪器厂; JY04S-3E 凝胶成

像仪, 北京科普尔有限公司; K5500 核酸测量仪, 北京凯奥科技有限公司; iMark 酶标仪, Bio-Rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组提取 取 Luria-Bertani (LB) 肉汤中 37 °C 过夜培养的菌液 1 mL, 按说明书方法提取基因组 DNA 后, 于核酸测量仪中测定浓度及纯度, -20 °C 保存。

1.3.2 引物选用 设计出识别 *invH* 序列的特异性上、下游引物 (HF: 5'-GAAAGAGCAACTGGC CAACG-3' 和 HR: 5'-ATGCTTGAGCTGATTGCGC-3')^[31]。在 HR 引物 5' 末端标记 G-四链体 [(G₃T)₃G₃] 的反向互补序列 [(C₃A)₃C₃] 构成引物 GR (5'-CCCACCCACCCACCC - ATGCTTGAGCTGATTGCGC-3'), GR 扩增后可获得 G-四链体序列, 其可在 K⁺溶液中形成平行 G-四链体结构^[32]。

1.3.3 As-PCR 反应体系与条件优化 进行 As-PCR 反应条件优化时, 首先, 优化非限制性引物 HF 浓度来保证检测灵敏度, 设置 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 μmol/L 梯度以确定 HF 绝对量; 其次, 对限制性引物 GR 与 HF 的浓度比进行探究, 其梯度设置如表 1 所示; 选定最适引物浓度及比例后, 对退火温度与循环数进行梯度优化: 退火温度设置为 56, 58, 60, 62, 64 °C, 循环数设置为 35, 38, 40, 43, 45 个。140 V 电压下 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用照胶仪观察结果并分析。

对各优化组判断, 终选取: 2×Es Taq Master Mix 50 μL, HF (0.4 μmol/L) 和 GR (0.04 μmol/L) 各 4 μL, 各浓度基因组 DNA 5 μL, ddH₂O 37 μL。条件: 95 °C 变性 30 s; 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 7 s, 40 个循环; 95 °C 预变性 5 min, 72 °C 终延伸 5 min。

表 1 As-PCR 引物浓度和比例

Table 1 The concentration and ratio of the primers

for As-PCR		
非限制性引物、限制性引物浓度比	HF 终浓度/ μmol·L ⁻¹	GR 终浓度/ μmol·L ⁻¹
1:1	0.4	0.400
5:1	0.4	0.080
10:1	0.4	0.040
25:1	0.4	0.016
50:1	0.4	0.008
100:1	0.4	0.004

1.3.4 G-四链体与 As-PCR 联用可行性分析 分别以沙门氏菌基因组 DNA 和 ddH₂O (空白对照) 为模板,用终浓度均为 0.04 μmol/L 的 HF/HR、HF/GR 引物对按 1.3.3 节反应体系进行 PCR 反应,将所得产物与 As-PCR 及空白对照产物进行 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳和 G-四链体显色分析,以验证 G-四链体与 As-PCR 联用的可行性。在显色步骤中,对 As-PCR 产物分别进行 95 °C 热变性 5 min 后以 2 °C/s 的速率降温至 4 °C 保持 5 min 的处理和不加热变性处理,之后加入氯高铁血红素工作液进行可视化显色,判定 As-PCR 产物变性与否对显色反应的影响。

1.3.5 G-四链体与 As-PCR 联用的可视化反应条件优化 在 PCR 纯化产物中加入 27.5 μL K⁺缓冲液,22.5 μL 氯高铁血红素工作液,其浓度设置为 10,20,30,40,50 μmol/L。将混合液室温分别孵育 30,40,50,60,70 min。孵育完成,加入 ABTS²⁻、H₂O₂(1.28 mmol/L)各 50 μL,室温稳定 5 min,读取波长 421 nm 处的吸光值判断最优值,以进行后续试验。

1.3.6 G-四链体与 As-PCR 联用可视化的特异性检测 将 1.1 节材料菌分别过夜培养,提取基因组 DNA。应用试验最优条件检测方法,根据酶标仪读取波长 421 nm 处的吸光值及视觉观察结果,验证方法特异性。

1.3.7 G-四链体与 As-PCR 联用可视化的灵敏度检测 沙门氏菌培养过夜,提取 1 mL 菌液的总

DNA,梯度稀释制得 20 fg/μL,0.2,2,20 pg/μL,0.2,2.5,25,258 ng/μL 的 DNA 模板,按优化结果进行 As-PCR 扩增及纯化产物的 G-四链体比色检测,读取波长 421 nm 处的吸光值,确定反应灵敏度。

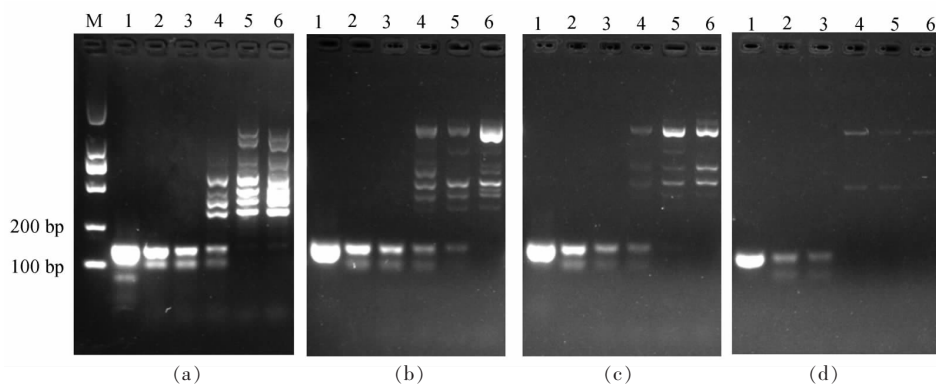
1.3.8 G-四链体与 As-PCR 联用可视化的实样检测 取 10 倍系列稀释的标准菌进行菌落计数,后将已知的各浓度 5 mL 菌液添加到 45 mL 灭菌牛乳中,混匀后以 1 mL 为样品,充当实样检测模板提取基因组 DNA。根据检测限 (Limit of detection, LOD) 计算法则^[33]:最低检测限对应的吸光度=空白样品吸光度的平均值-3σ (σ 为最低分析浓度的标准差)进行检测限的计算,确定检出限。

2 结果与分析

2.1 As-PCR 反应体系与条件优化

2.1.1 As-PCR 体系中引物绝对量及比例的确定

由于在 As-PCR 中引物之间的浓度比是能否产生足够多 ssDNA 的关键,所以本文先确定非限制性引物的初始浓度,然后逐级稀释限制性引物的浓度,确定上、下游引物之间的最优比例,以此获得较多的 ssDNA 产物。图 1a~1d 表示非限制性引物 HF 终浓度为 0.5,0.4,0.3,0.2 μmol/L 时,非限制性引物、限制性引物浓度比为 1:1,5:1,10:1,25:1,50:1,100:1 的 As-PCR 产物的电泳图。如图 1 所示,As-PCR 扩增呈现良好的效果,已明显观察出在双链 DNA 下方迁移较快的 ssDNA 产物。随着



注:a~d 分别为非限制性引物 HF 终浓度为 0.5,0.4,0.3,0.2 μmol/L 的电泳图;M. Marker DL2000;1~6 代表 HF 与 GR 的浓度比分别为 1:1,5:1,10:1,25:1,50:1,100:1。

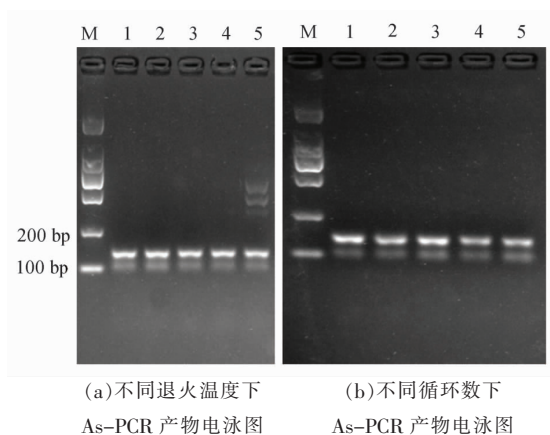
图 1 As-PCR 引物绝对量及比例的优化

Fig.1 Optimization of the absolute amount and ratio of primers for As-PCR

非限制性引物浓度逐渐升高,As-PCR产物也随之增加,并在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时出现严重的引物二聚体现象;当引物浓度比例为25:1,50:1,100:1时,出现了明显的非特异扩增,而在5:1与10:1时能清晰分辨As-PCR扩增产物,观察图1b发现,引物比例为5:1与10:1的ssDNA产物量相当,且不受引物绝对量与比例的干扰。综上,选择HF 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、GR 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度进行后续试验。

2.1.2 As-PCR条件中退火温度与循环数的优化

由于下游引物的5'端引入G-四链体 $[(G_3T)_3G_3]$ 的反向互补序列,导致上下游引物不等长,其中HF的熔解温度(Melting temperature, T_m)为62 $^{\circ}\text{C}$,GR的 T_m 值为73.7 $^{\circ}\text{C}$,而HF作为非限制性引物,在后续的As-PCR反应中起着主导作用,故在HF的 T_m 值附近寻找As-PCR的最佳退火温度。



注:M: Marker DL2000;a图1~6依次代表56,58,60,62,64 $^{\circ}\text{C}$;b图1~6依次代表35,38,40,43,45;c图为空白为以 ddH_2O 作模板,40个循环条件下的比色结果。

图2 As-PCR反应条件的优化

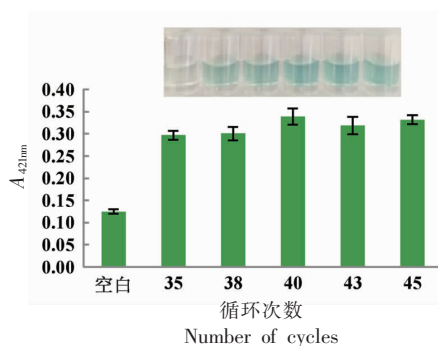
Fig.2 Optimization of As-PCR reaction conditions

2.2 G-四链体与As-PCR联用产物可行性分析

按照已经优化好的体系(参照1.3.3节)进行等浓度的HF/HR、HF/GR引物对的普通PCR反应和As-PCR反应,以 ddH_2O 模板为空白对照,其产物的电泳结果和可视化显色情况分别见图3a和图3b。PCR扩增效果良好,条带单一,引物HF/HR的PCR产物位置在144 bp左右,引物HF/GR的PCR产物位置在159 bp左右,引物HF/GR的As-PCR产物在159 bp附近出现了明显的2条条带,

由图2a可知,当退火温度为64 $^{\circ}\text{C}$ 时,出现了明显非特异扩增,可能是温度高于HF的 T_m 值致使特异性碱基配对受到了影响。当退火温度为58 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增的两条产物相对较亮,且无杂带,于是选取了58 $^{\circ}\text{C}$ 为最优退火温度,用于后续试验。

As-PCR的循环数对整个试验的灵敏度起着及其重要的作用,循环数较低,则扩增产物少,信号强度低;循环数较高,又会延长反应时间,增大非特异扩增风险。由图2b可知,循环数为35,38,40,43,45的条件下,As-PCR产物都呈现出两条相对较亮的目的条带,且40个循环条件下条带最亮。对比图2c,421 nm处的OD值与不同循环数下显色结果一致,当循环数达到40个循环及以后,颜色几乎无明显差异,也更加印证电泳图的结论。综上,选择40个循环用作后续试验。



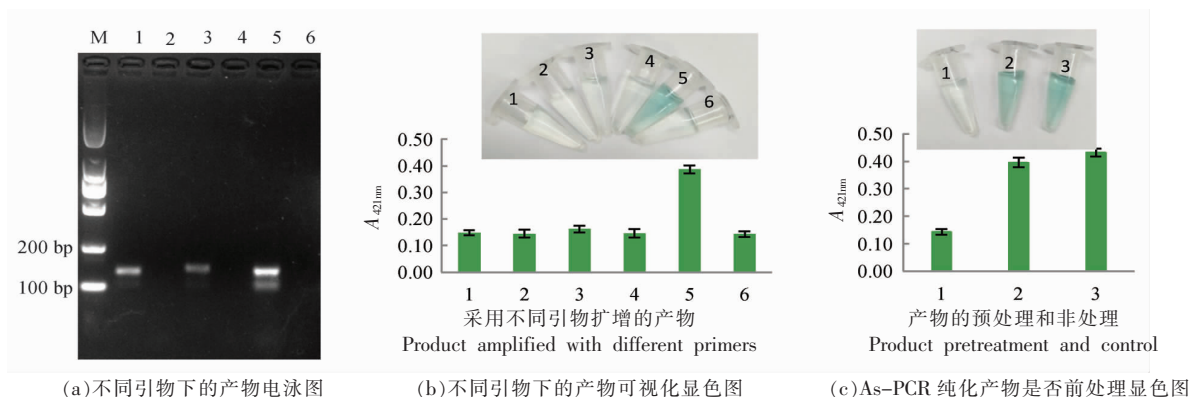
(c)不同循环数下As-PCR纯化产物的G-四链体比色结果图

ssDNA较双链DNA迁移速率较快,位于双链DNA条带正下方,清晰可分辨。对照显色图分析,只有As-PCR产物出现了明显的绿色变化,表明只有G-四链体在产物序列中,且以ssDNA形式存在时才会发挥其DNAzyme的作用,而其它PCR产物及空白对照无明显的颜色变化,证明此方法可行。

将As-PCR产物进行95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min并以2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的速率降温至4 $^{\circ}\text{C}$ 保持5 min的前处理与不

经前处理直接室温孵育的可视化比色反应相比,由图 3c 可知,变性的吸光值略大于未经变性的,可能是由于变性操作将部分包含 G-四链体序列的双链 DNA 模板解旋造成的,而两者比色效果大

致相同,对检测结果影响不大。因此,后续试验将不经过前处理,直接对 As-PCR 纯化产物进行 G-四链体显色分析。



注:a 图中:M. Marker DL2000,1. HF/HR 的 PCR 产物,2. HF/HR 的 PCR 空白对照产物,3. HF/GR 的 PCR 产物,4. HF/GR 的 PCR 空白对照产物,5. As-PCR 产物,6. As-PCR 空白对照产物;b 图中:1. HF/HR 的 PCR 产物,2. HF/HR 的 PCR 空白对照产物,3. HF/GR 的 PCR 产物,4. HF/GR 的 PCR 空白对照产物,5. As-PCR 产物,6. As-PCR 空白对照产物;c 图中:1. 空白对照(不经变性处理),2. 未经变性处理的 As-PCR 产物显色图,3. 经变性处理的 As-PCR 产物显色图。

图 3 As-PCR 产物可行性分析

Fig.3 Feasibility analysis of AS-PCR products

2.3 G-四链体与 As-PCR 联用的可视化反应条件优化

氯高铁血红素浓度会直接影响复合体催化的活力。为探究比色法检测中氯高铁血红素的最适浓度,分别将其稀释为 10,20,30,40,50 $\mu\text{mol/L}$ 。

由图 4a 可知,在氯高铁血红素浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时已呈现良好的显色效果,且随着浓度增到 40 $\mu\text{mol/L}$ 后,吸光值颜色几乎饱和,于是选择 40 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度进行后续试验。

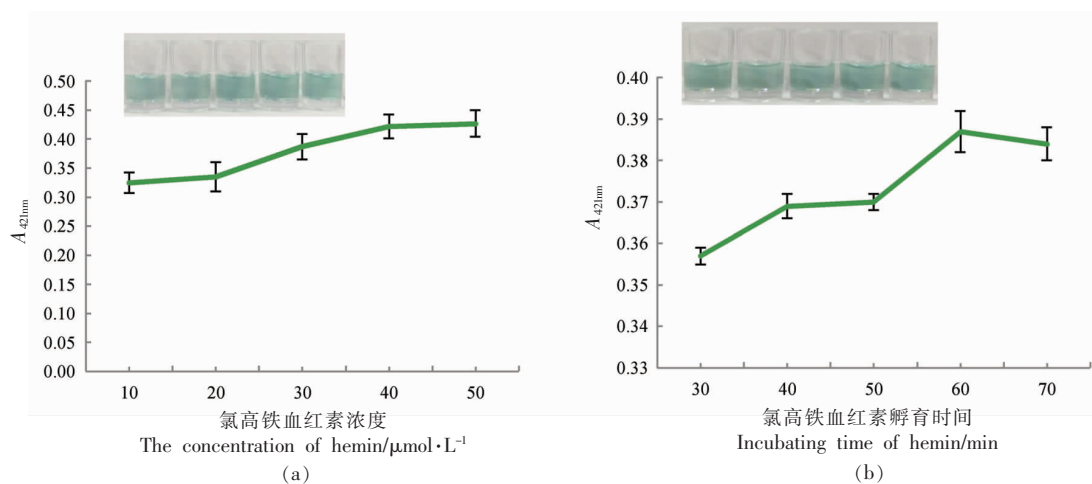


图 4 氯高铁血红素浓度(a)和孵育时间(b)的优化

Fig.4 Optimization of hemin concentration (a) and incubation time (b)

氯高铁血红素的孵育时间对 G-四链体比色检测也起到至关重要的作用,孵育时间过短,会影

响氯高铁血红素嵌入 G-四链体的效率,影响比色结果,而孵育时间过长会造成检测时间的浪费。由

4b可知,随着孵育时间的增加,酶标仪在波长421 nm处的吸光值增大,当60 min时达到最大,故以60 min作为As-PCR产物与氯高铁血红素作用时间。

2.4 G-四链体与As-PCR联用可视化的特异性检测

分别提取1.1节标准菌基因组DNA,根据视觉现象判断特异性,结果见图5。含目标菌体系发生明显地颜色变化,其它非目标菌无变化。因此,该法对沙门氏菌可视化检测高度特异。

2.5 G-四链体与As-PCR联用可视化的灵敏度检测

将沙门氏菌DNA按1.3.7节方法逐级稀释后作模板,在最优的反应条件体系下可视化检测,确定检测灵敏度。如图6a所示,当基因组模板DNA的质量浓度为20 fg/ μ L与0.2 pg/ μ L时,比色现象与阴性对照区分不大;而在基因组模板DNA质量浓度由2 pg/ μ L增加到258 ng/ μ L的情况下,比色逐渐增强,颜色越来越深。由6b可知,在2 pg/ μ L~

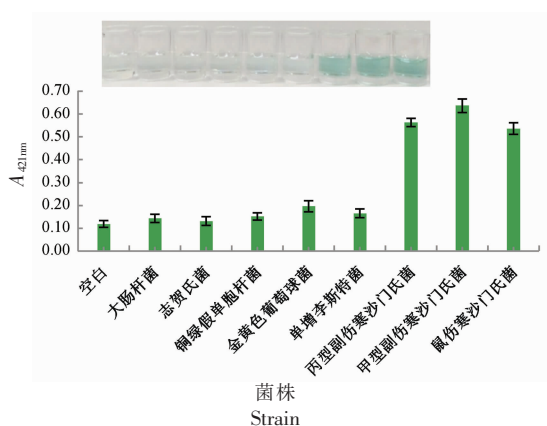
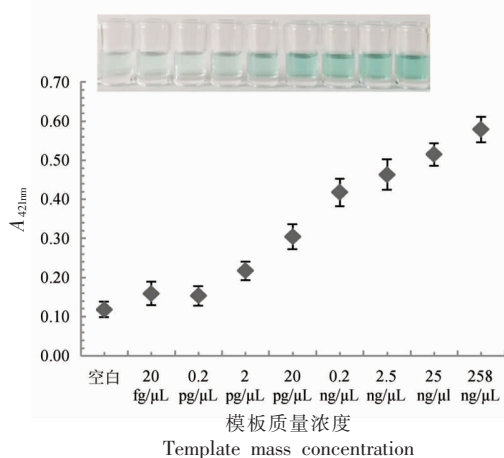


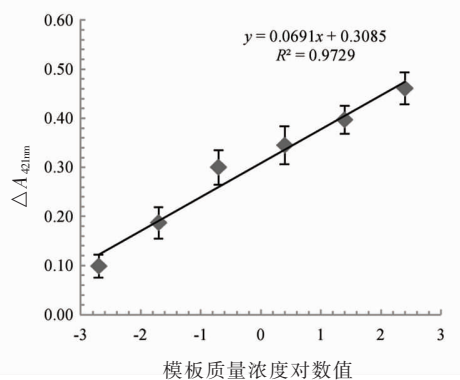
图5 G-四链体与As-PCR扩增联用可视化检测方法的特异性

Fig.5 Specificity of the detection method combining G-quadruplex and As-PCR amplification

258 ng/ μ L的基因组DNA模板下时,吸光值与质量浓度对数存在 $y = 0.0691x + 0.3085$ ($R^2 = 0.9729$)的良好线性回归关系,灵敏度2 pg/ μ L,说明该检测法可实现有效鉴别及定量分析。



(a)不同模板质量浓度下G-四链体可视化检测灵敏度显色图及吸光值



(b)模板质量浓度对数与吸光值之间线性关系

图6 G-四链体与As-PCR扩增联用可视化检测方法的灵敏度

Fig.6 Sensitivity of the visual detection method of G-quadruplex and As-PCR amplification

2.6 G-四链体与As-PCR联用可视化检测方法的实样检测

利用1.3.8节方法人工污染牛奶,使其菌浓度为 $10^8 \sim 10^1$ CFU/mL,并在最优条件下可视化检测标准菌株污染的牛奶并计算其灵敏度。由图7a可

知,沙门氏菌基因组DNA浓度增加,颜色也随之加深,肉眼即可实现 10^2 CFU/mL及以上的分辨。由图7b可知,方法可视化检测浓度的线性范围为 $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL,检测限35 CFU/mL。实样结果说明,本文创建的方法可用于沙门氏菌的定量检测。

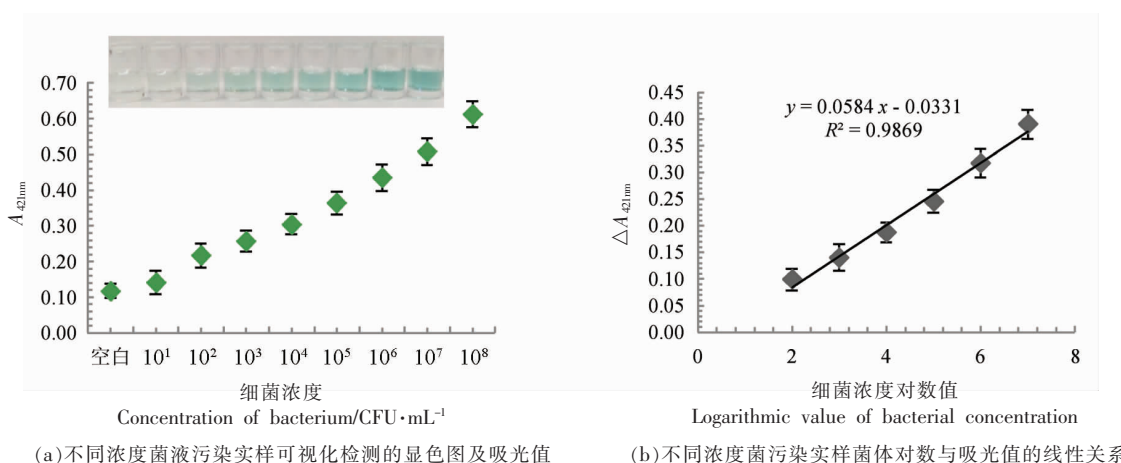


图 7 G-四链体与 As-PCR 扩增联用可视化检测人工污染沙门氏菌的牛奶试样

Fig.7 The G-quadruplex and As-PCR amplification were used to visually detect the *Salmonella* in the samples artificially contaminated samples

3 结论与讨论

近年来,基于简易快速、低成本、高特异等优点,核酸检测技术广泛应用于食源性病原体的检测中来。G-四链体的 DNAzyme 功能虽发现较晚,但区别于生物酶成本高、稳定性差的特性,更因稳定、易于修饰合成等特点受到重视^[32]。本研究结合 As-PCR 与 G-四链体,针对沙门氏菌进行可视化检测,其优势在于:一方面,利用了核酸序列可高效扩增且特异识别的特点,在沙门氏菌的目标基因组 DNA 存在下才能启动 As-PCR 的特异性扩增,又可借助 DNA 的高效扩增积累大量 5' 末端包含 G-四链体的产物 ssDNA。另一方面, DNAzyme 的信号二次放大作用,利用其高效酶活力使 H₂O₂ 氧化 ABTS²⁻ 为绿色。最终,在肉眼观察颜色时,就可做出半定量或定性判断,若借助酶标仪即可实现定量分析。

目前联用 G-四链体与 As-PCR 可视化检测的报道甚少,本文所建立的可视化比色可对沙门氏菌成分进行准确检测,相比于 PCR 方法避免了凝胶电泳及 EB 污染等问题,在室温下即可显色。此研究在操作性上优于传统的生化和免疫学方法,在灵敏度上虽不及核酸恒温扩增技术,但具有的不需要贵重仪器、检测方式灵活等优势更适用实地检测或基层应用。

G-四链体的稳定形成是该方法关键因素,在设计引物时选择了显色明显的平行 G-四链体结

构,有利于提高灵敏度^[32]。相比于其它 As-PCR 与 G-四链体反应相结合的方法^[34],本研究的优势为: 1) 对非限制性引物的初始浓度进行选择,既减少了非特异错配,增加引物的专一性,又保证 5' 末端包含 G-四链体序列的 ssDNA 大量积累,提高方法的灵敏度。最终选择了非限制引物终浓度为 0.4 μmol/L, 限制性引物终浓度为 0.04 μmol/L 的引物条件进行反应。2) As-PCR 扩增的循环数对生成 5' 末端包含 G-四链体序列的 ssDNA 产物量起到绝对作用,As-PCR 虽前期主要在限制性引物的作用下产生大量双链 DNA 模板,但后期的循环才是 ssDNA 生成的主导,循环数少,5' 末端包含 G-四链体序列的 ssDNA 产物量少,直接影响 ABTS²⁻ 显色效果及梯度变化,循环数多,就会增加引物的错配几率,甚至出现假阳性,提高本底信号的颜色。最终选择了 40 个循环进行反应。3) 通过试验,发现 As-PCR 扩增后的纯化产物在经过变性处理与不经过变性处理的显色效果相当,说明本试验包含 G-四链体序列的游离 ssDNA 产物几乎未形成阻碍富 G 序列折叠成 G-四链体的二级结构或产生的二级结构对 G-四链体的形成影响不大。4) 通过对比采用核酸外切酶酶切或将 PCR 产物热裂解等获取的 ssDNA 的方式^[35-36],本文直接通过 As-PCR 扩增产生的 ssDNA 进行 G-四链体的检测,检测操作简便、成本低、时间短。

总之,合理地利用 As-PCR 的特异与高效扩

增及G-四链体的 DNAzyme 的过氧化物酶活性和 ABTS²⁻自由基的颜色变化, 最终建立可视化检测沙门氏菌的 G-四链体与 As-PCR 联用方案。该方法稳定性好、易于操作观察, 适合实地半定量及定性鉴定, 也可通过酶标仪来实现一定菌落范围的定量分析。该创新的核酸信号放大策略, 为检测病原微生物提供了有效的思路。

参 考 文 献

- [1] ZHOU Y Y, KANG X L, MENG C, et al. Multiple PCR assay based on the *cigR* gene for detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella Pullorum*/Gallinarum identification[J]. Poultry Science, 2020, 99(11): 5991-5998.
- [2] STAES I, PASSARIS I, CAMBRE A, et al. Population heterogeneity tactics as driving force in *Salmonella* virulence and survival[J]. Food Research International, 2019, 125(12): 108560.
- [3] RUCHITA B, JUSTIN I, JUNG-SEOK L, et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2019, 15(6): 1421-1426.
- [4] 骆业巧, 王进, 司波. 一起由沙门氏菌和金黄色葡萄球菌混合引起的食物中毒病原分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 6947-6951.
LUO Y Q, WANG J, SI B. Pathogen analysis of a food poisoning event caused by *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(19): 6947-6951.
- [5] CHEN Z G, ZHONG H X, LUO H, et al. Recombinase polymerase amplification combined with unmodified gold nanoparticles for *Salmonella* detection in milk[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(1): 190-197.
- [6] HALD T, ASPINALL W, DEVLESSCHAUWER B, et al. World Health Organization estimates of the relative contributions of food to the burden of disease due to selected foodborne hazards: A structured expert elicitation[J]. PLoS One, 2017, 11(1): 0145839.
- [7] PRIYA G B, AGRAWAL R K, MILTON A A P, et al. Rapid and visual detection of *Salmonella* in meat using invasins A (*invA*) gene-based loop-mediated isothermal amplification assay[J]. LWT, 2020, 126(5): 109262.
- [8] 牛瑞江, 赖卫华, 熊齐荣, 等. 鼠伤寒沙门氏菌特异性多克隆抗体的纯化方法[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 151-155.
NIU R J, LAI W H, XIONG Q R, et al. Purification of specific polyclonal antibody against *Salmonella typhimurium*[J]. Food Science, 2011, 32(13): 151-155.
- [9] LIU R, WANG Z, LIU X, et al. Rapid on-site detection of *Salmonella pullorum* based on lateral flow nucleic acid assay combined with recombinase polymerase amplification reaction[J]. Poultry Science, 2020, 99(12): 7225-7232.
- [10] KASTURI K N. A real-time PCR for rapid identification of *Salmonella enterica* Gaminara serovar[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 169(2): 105729.
- [11] 侯巧华. 基于 LCR/PCR 核酸试纸条检测食源性致病细菌方法的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
HOU Q H. The research on detection of food-borne pathogenic bacteria by nucleic acid dipstick assay based on LCR and PCR[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [12] 刘健慧, 张先舟, 张蕴哲, 等. 基于 G-四链体的 PCR-RCA 双重扩增技术检测沙门氏菌[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 325-333.
LIU J H, ZHANG X Z, ZHANG Y Z, et al. Detection of *Salmonella* by G-quadruplex-based PCR-RCA double amplification[J]. Food Science, 2022, 43(12): 325-333.
- [13] ZHANG Y, LI S T, TIAN J J, et al. Universal linker polymerase chain reaction-triggered strand displacement amplification visual biosensor for ultra-sensitive detection of *Salmonella*[J]. Talanta, 2021, 222(15): 121575.
- [14] 孙秀伟. 基于 HCR 技术建立沙门氏菌可视化检测方法的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
SUN X W. The research on visual detection of *Salmonella* based on HCR[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.
- [15] KIL E J, KIM S, LEE Y J, et al. Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of *Tomato chlorosis* virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 213(1): 68-74.

- [16] MULLIS K B. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction[J]. *Methods Enzymol*, 1987, 155(87): 335-350.
- [17] BRASHER C W, DEPAOLA A, JONES D D, et al. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR[J]. *Current Microbiology*, 1998, 37(2): 101-107.
- [18] YANG Q, XU H, ZHANG Y Z, et al. Single primer isothermal amplification coupled with SYBR Green II: Real-time and rapid visual method for detection of *Listeria monocytogenes* in raw chicken[J]. *LWT*, 2020, 128(6): 109453.
- [19] PALIWAL S, SUDAN V, SHANKER D, et al. Rapid diagnosis of *Theileria annulata* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay[J]. *Veterinary Parasitology*, 2020, 285(9): 109224.
- [20] LI R D, YIN B C, YE B C. Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 86(15): 1011-1016.
- [21] ZENG R J, WANG J, WANG Q S, et al. Horseradish peroxidase-encapsulated DNA nanoflowers: An innovative signal-generation tag for colorimetric biosensor[J]. *Talanta*, 2020, 221(1): 121600.
- [22] YANG T, LUO Z W, TIAN Y H, et al. Design strategies of AuNPs-based nucleic acid colorimetric biosensors[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 124(3): 115795.
- [23] CHEN Q M, GAO R, JIA L. Enhancement of the peroxidase-like activity of aptamers modified gold nanoclusters by bacteria for colorimetric detection of *Salmonella typhimurium*[J]. *Talanta*, 2020, 221(1): 121476.
- [24] 孔德明. G-四链体-氯化血红素 DNA 酶在传感器设计中的应用[J]. *化学进展*, 2011, 23(10): 2119-2131.
KONG D M. Applications of G-quadruplex-hemin DNAszymes in sensor design[J]. *Progress in Chemistry*, 2011, 23(10): 2119-2131.
- [25] LI S T, ZHANG Y, TIAN J J, et al. Luminescent DNAszyme and universal blocking linker super polymerase chain reaction visual biosensor for the detection of *Salmonella*[J]. *Food Chemistry*, 2020, 324(15): 126859.
- [26] WANG L L, WEN Y L, LI L Y, et al. Sensitive and label-free electrochemical lead ion biosensor based on a DNAszyme triggered G-quadruplex/hemin conformation[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 115(15): 91-96.
- [27] 刘卓靓, 陶呈安, 王建方. 鸟嘌呤四链体在生化分析中的应用进展[J]. *分析化学*, 2020, 48(2): 153-163.
LIU Z L, TAO C A, WANG J F. Progress on applications of G-quadruplex in biochemical analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 48(2): 153-163.
- [28] GYLLENSTEN U B, ERLICH H A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(20): 7652-7656.
- [29] DENG H, XU Y, LIU Y H, et al. Gold nanoparticles with asymmetric polymerase chain reaction for colorimeter detection of DNA sequence[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(3): 1253-1258.
- [30] 刘健慧, 耿凤珍, 张先舟, 等. G-四联体与聚合酶链式反应联用可视化检测沙门氏菌[J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 331-338.
LIU J H, GENG F Z, ZHANG X Z, et al. Visual detection of *Salmonella* by G-quadruplex-generating polymerase chain reaction[J]. *Food Science*, 2021, 42(22): 331-338.
- [31] DEHGHANI B, RASOOLI I, JALALI-NADOUSHAN M, et al. Immunoprotectivity of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* virulence protein, *InvH*, against *Salmonella typhi*[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2014, 17(8): 84-90.
- [32] 卢宇, 关一夫. 不同的 G-四链体结构对 DNAszyme 活性的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(7): 823-829.
LU Y, GUANG Y F. Effects of different G-quadruplex structures on the DNAszyme activity[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 32(7): 823-829.
- [33] 鹿才余. 基于 G-四联体 DNAszyme 的电化学生物传感器信号放大策略研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
LU C Y. Study on signal amplification strategy of electrochemical biosensors based on G-quadruplex DNAszyme[D]. Qingdao: Qingdao University, 2014.
- [34] 王心一, 刘榜, 谌阳, 等. 基于 G-四联体比色生物

传感器检测肉制品中羊源性成分[J]. 生物技术进展, 2019, 9(6): 641-646.

WANG X Y, LIU B, ZHAN Y, et al. A colorimetric biosensor based on G-quadruplex for detection of sheep-derived components[J]. Current Biotechnology, 2019, 9(6): 641-646.

[35] WON B Y, SHIN S, FU R, et al. A one-step electrochemical method for DNA detection that uti-

lizes a peroxidase-mimicking DNAzyme amplified through PCR of target DNA[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 30(1): 73-77.

[36] LIU Z M, YAO C H, WANG Y M, et al. Visual diagnostic of *Helicobacter pylori* based on a cascade amplification of PCR and G-quadruplex DNAzyme as a color label[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 146(3): 46-50.

Visual Detection of *Salmonella* by Combined Application of G-quadruplex and As-PCR Methods

Liu Jianhui^{1,2}, Zhang Xianzhou¹, Zhang Yunzhe¹, Wang Hongjing¹, Li Xueyao¹, Geng Fengzhen^{3*}, Tan Jianxin^{1*}

¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Hebei Bioinformatic Utilization and Technological Innovation Center for Agricultural Microbes, Baoding 071000, Hebei

²School of Biology and Food Science, Hebei Normal University for Nationalities, Chengde 067000, Hebei

³Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei)

Abstract *Salmonella* (SALM) is a foodborne pathogen that often transmit via food as media, so rapid detection is the key to controlling the pathogen. In this study, *Salmonella* genomic DNA was used as templates, the amplification conditions of asymmetric PCR (As-PCR) were optimized. The results demonstrated that the maximum concentration of single-strand DNA (ssDNA) could be obtained when the final concentration of the excess primer (HF) was 0.4 $\mu\text{mol/L}$, the ratio of the final concentration of HF to GR was 10:1, the annealing temperature was 58 $^{\circ}\text{C}$ and the amplification cycle was 40 cycles. When ssDNA with G-quadruplex sequence interacted with 40 $\mu\text{mol/L}$ hemins for 60 min, the peroxidase activity of G-quadruplex was the highest. On this basis, the visual detection of the *invH* gene of *Salmonella* was realized by combining As-PCR with G-quadruplex technology. The method could detect *Salmonella* genomic DNA in a range of 2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ -258 $\text{ng}/\mu\text{L}$, and the logarithm of its concentration had a good linear relationship with the absorbance value at 421 nm ($y = 0.0691x + 0.3085$, $R^2 = 0.9729$). The detection limit of *Salmonella* for contaminated milk samples was 35 CFU/mL, showing that this method had the advantages of simple operation with a high sensitivity and providing new technical support for the detection of these pathogenic microorganisms.

Keywords asymmetric PCR; visual detection; *Salmonella*; G-quadruplex