

跨越式滚环扩增(SRCA)结合金纳米粒子可视化检测 食品中的沙门氏菌

董贺楠¹, 张蕴哲¹, 徐慧², 檀建新¹, 张伟^{1,3,4}, 袁耀武^{1*}

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001

²河北农业大学理工系 河北沧州 061100

³河北农业大学生命科学学院 河北保定 071001

⁴河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000

摘要 沙门氏菌是引起全球人类腹泻病的主要病因,严重危害人畜健康。传统检测方法耗时长,步骤繁琐,因此开展快速简便灵敏的可视化检测方法,具有重要意义。本文设计能与靶序列结合的探针,将其与金纳米粒子(AuNPs)结合。经跨越式滚环等温扩增技术(SRCA)扩增的靶序列,高温变性后成为单链,其与金纳米粒子上的探针结合后,释放出金纳米粒子,在MgSO₄的作用下,聚集呈现肉眼可见的蓝色,判定为阳性,阴性为紫色。依此,建立一种简便、快捷、灵敏的可视化检测方法。结果表明:该方法特异性良好,能够区分8株沙门氏菌阳性与8株非沙门氏菌阴性。可视化检测的灵敏度为5.5×10⁹ CFU/mL。将牛奶样品人工污染沙门氏菌,检出限为3.7×10⁹ CFU/mL。在50份实际样品检测中,与GB 4789.4-2016方法进行比较,该方法敏感性为100.00%,特异性为97.87%,符合率达到98.00%。本文建立的SRCA-AuNPs可视化检测方法,具有较高的应用价值,结果肉眼可见,适合于现场可视化检测和基层单位使用。

关键词 沙门氏菌;跨越式滚环等温扩增(SRCA);金纳米粒子;可视化

文章编号 1009-7848(2024)03-0240-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.024

沙门氏菌是引起全球人类腹泻病的主要病因,严重危害人畜健康^[1]。目前沙门氏菌的检测方法主要包括国标法^[2]、免疫学法^[3]、生物传感器法^[4]、分子生物学法^[5-6],其中国标法是检测沙门氏菌的金标准,然而耗时过长,步骤繁琐;免疫学法抗原抗体制作过程复杂;生物传感器法需要昂贵的仪器和专业人员;而分子生物学方法具有灵敏度高,耗时短和对仪器要求低的特点。

AuNPs 具有独特的光学性质,AuNPs 的聚集导致吸收光谱颜色变化,常与免疫学法、分析生物学法结合制作比色检测系统,在分子识别^[7]、细胞内成像^[8]、临床诊断^[9]和环境监测^[10]等方面有着重要的应用,DNA-AuNPs 核酸比色检测系统因经济、快速、简便等优点而成为非常具有竞争力的一

种可视化检测技术^[11]。

DNA-AuNPs 核酸比色检测系统最早由 Mirkin^[12]在1996年提出,利用巯基DNA修饰AuNPs,Au与巯基之间易形成强的Au-S共价键作用力,构建多功能AuNPs探针,比色检测目标DNA、RNA或其它大分子物质^[13-14]。未经修饰的单链DNA可以通过其暴露的碱基与带负电荷的AuNPs结合^[15-16],使AuNPs免受盐诱导,避免发生聚集;而双链DNA不能与AuNPs结合,使得AuNPs在盐诱导后发生聚集。

Suebsing等^[17]利用逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)结合AuNPs探针法比色检测凡纳滨对虾诺达病毒(PvNV)。Kampeera等^[18]利用RT-LAMP结合比色AuNPs探针法检测尼罗河罗非鱼和红罗非鱼杂交鱼中的罗非鱼湖病毒(TiLV),均能够明显区分阴阳性样本,有较低的检出限。较短的检测时间和良好的现场检测能力,具有很好的应用价值。

当前核酸检测技术得到使用。相较传统的核酸检测方法,如:PCR、RT-PCR、SPIA、LAMP等^[19],SRCA作为一种新型的核酸等温扩增技术,近年来

收稿日期: 2023-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172288,31371772);
河北省自然科学基金重点项目(C2019204342);
中央引导地方科技发展资金项目(216Z5501G);
河北省外专百人计划项目(360-0803-JSN-3YGS)

第一作者: 董贺楠,女,硕士生

通信作者: 袁耀武 E-mail: yuanyawu1970@163.com

在沙门氏菌的检验中得到广泛应用^[6,20]。特异性强、灵敏度高、可测序分析验证结果,利用 *Bst* DNA 聚合酶和一对引物实现等温高效扩增,是该扩增方法的主要优点^[21-23]。

基于以上优点,本研究将金纳米粒子通过探针与跨越式滚环等温扩增技术(SRCA)结合,利用金纳米粒子在高盐溶液中会聚集变色的特点,建立一种简便、快速的沙门氏菌检测方法。检测原理如图 1 所示,由柠檬酸钠还原氯金酸得到金纳米粒子,金纳米粒子表面有柠檬酸根负离子,可使 AuNPs 稳定分散,呈现酒红色,ssDNA 探针利用碱基和柠檬酸根离子之间的静电相互作用附着在

AuNPs 表面,ssDNA 探针增强了 AuNPs 之间的排斥力,增加了空间位阻^[24-25],使得溶液仍稳定地保持为酒红色。待测目标存在时,SRCA 扩增产物经高温变性后形成与探针互补的单链 DNA,ssDNA 探针从 AuNPs 表面分离并与单链 DNA 结合形成具有刚性结构的双链 DNA,没有 ssDNA 探针吸附的 AuNPs 在高盐条件下聚集,溶液从酒红色变为蓝色。待测目标不存在时,ssDNA 探针仍吸附在 AuNPs 表面,这是因为体系中少量 Mg^{2+} 加入, AuNPs 发生部分聚集,导致溶液由酒红色变为紫色。试验结果可由肉眼观察,实现可视化检测,以此来定性检测食品中的沙门氏菌。

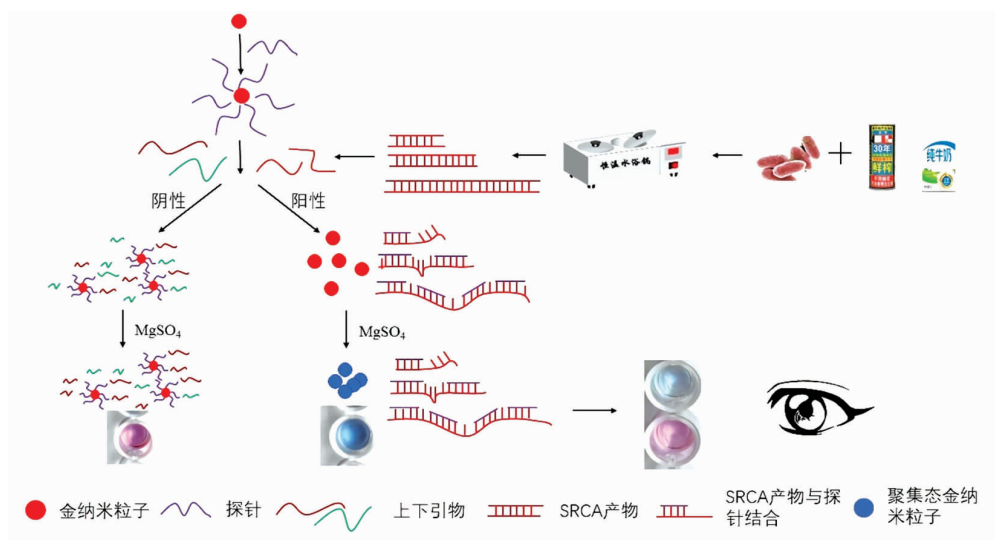


图 1 反应原理图

Fig.1 Reaction principle diagram

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究选取了 8 株沙门氏菌菌株和 8 株非沙门氏菌菌株作为研究对象,具体菌株信息如表 1 所示。

TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),天根生化科技(北京)有限公司;*Bst* DNA 聚合酶,美国 NEB 有限公司;dNTPs,北京博迈德基因技术有限公司;氯金酸,源叶生物;柠檬酸钠,天津市纵横兴工贸有限公司化工试剂分公司;所有溶液均采用无菌超纯水配制。

1.2 仪器与设备

恒温油浴锅,上海壹茗实业有限公司;高速离

心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;紫外分光光度计,BioTek Instruments;DXY-33A 型电泳仪,北京六一仪器厂;JY04S-3E 凝胶成像仪,北京君意电泳设备有限公司;DK-8D 三孔电热恒温水槽,上海一恒科学仪器有限公司;透射电子显微镜 TEM,日本 JEOL JEM-F200。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种的培养及 DNA 的提取 将保存的沙门氏菌使用 LB 肉汤培养基 37 °C 培养 18 h,使用细菌基因组试剂盒提取 DNA。Nanodrop 2000 分光光度计测定 DNA 模板浓度,将 DNA 模板于 -20 °C 保存备用。

1.3.2 引物及探针的设计 根据 SRCA 引物设计原则,选用沙门氏菌特异性基因型 *invA*, 选取

表1 菌株信息

Table 1 Strain information

编号	菌株名称	拉丁属名	菌株来源
1	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	^a CICC 21493
2	火鸡沙门氏菌	<i>Salmonella Oranienburg</i>	CICC 21511
3	山夫登堡沙门氏菌	<i>Salmonella senftenberg</i>	^b ATCC 8400
4	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enterica</i>	^c CMCC 50041
5	鸭沙门氏菌	<i>Salmonella anatum</i>	CICC 21493
6	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115
7	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-A</i>	CICC 21501
8	海德堡沙门氏菌	<i>Salmonella heidelberg</i>	CICC 21487
9	伊氏李斯特菌	<i>Listeria ivanovii</i>	CICC 21671
10	无害李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	CICC 10297
11	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC 54001
12	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CICC 21678
13	宋氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	CICC 21535
14	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26073
15	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CICC 10032
16	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CMCC 44752

注:a:中国工业微生物菌种保藏管理中心(Center of Industrial Culture Collection,CICC);b:America Type Culture Collection,ATCC;c:中国医学细胞保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC)。

GenBank 序列号为 ALFE01000410.1。使用 DNA-MAN 与 Oligo 软件设计 SRCA 正反向引物与相关探针。全部序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物及探针序列见表2。

表2 序列名称及基因序列

Table 2 Sequence name and gene sequence

序列名称	基因序列
上引物	5'-GAAGATCTGGAAAAAGCTCAACTTGC GGA -3'
下引物	5'- CAGCGCACGCCATAATCAATAAA -3'
探针	5'-GAAGCGCTGCACGCGTCTGAACTGGAGAGACTAGAC-3'

1.3.3 金纳米粒子的合成 本试验按照参考文献[26]中方法稍作修改,使用柠檬酸钠还原氯金酸制备 AuNPs。在三颈烧瓶中加入 98 mL 去离子水和 2 mL 体积分数 1% HAuCl₄, 搅拌条件下 130 °C 加热沸腾。之后, 迅速加入 10 mL 38.8 mmol/L 的柠檬酸钠, 在回流加热的条件下, 剧烈搅拌 15 min, 当体系颜色由淡黄色变为深红色, 说明 AuNPs 已经形成。将体系 10 000 r/min 离心 15 min 后, 取沉淀即 AuNPs 溶于超纯水中, 4 °C 下避光储存备用。

1.3.4 金纳米粒子与探针结合 1 mL 金纳米粒子溶液与 50 μL DNA 探针结合, 37 °C 孵育 24 h,

12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 超纯水, 4 °C 下避光储存备用。

1.3.5 SRCA 扩增反应 SRCA 初始反应总体体系为 20.0 μL, 其中无菌超纯水 5.0 μL, Mg²⁺(20.0 mmol/L) 3.0 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5.0 μL, 10 × ThermoPol Reaction Buffer 2.5 μL, 上下引物 (10.0 μmol/L) 各 1.0 μL, 模板 DNA (67.4 ng/μL) 1.5 μL, *Bst* DNA 聚合酶 (8 000 U/mL) 1.0 μL, 63 °C 反应 40 min。反应结果通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3.6 比色反应分析 反应前, 将 SRCA 产物样品在 95 °C 变性 5 min 后立即冷却至室温。将 56

μL 探针修饰的 AuNPs 和 4 μL 目标 DNA 混合,并将混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min。结束后,加入 40 μL MgSO_4 并通过移液器混合,并将混合物保持 4 min 以稳定显色。如果加入 MgSO_4 后反应混合物的颜色变成蓝色,则比色结果为阳性;若为紫色,则比色结果为阴性。

1.3.7 SRCA-AuNPs 方法特异性检测 提取表 1 中细菌 DNA。使用 SRCA-AuNPs 方法进行检测,同时以无菌超纯水作为空白对照,分析本研究所建立方法的特异性。

1.3.8 SRCA-AuNPs 方法灵敏度检测 将沙门氏菌菌液进行 10 倍梯度稀释,并使用试剂盒法提取各梯度菌液 DNA,使用本文方法进行检测,评估其灵敏度。

1.3.9 人工污染牛奶样品中沙门氏菌检测 为了证明该检测分析的可靠性,使用牛奶进行人工污染检测。使用《GB 4789.4-2016》方法进行培养,确定样品中不含沙门氏菌。将牛奶用无菌生理盐水稀释 10 倍,在 9 mL 牛奶样本中加入 1 mL 不同浓度的沙门氏菌菌液,取 1 mL 混合液提取 DNA 后使用 SRCA-AuNPs 比色方法进行检测。

1.3.10 实际样品检测 购买肉蛋奶及其制品共 50 份,样品清单见表 3,采用 GB 4789.4-2016 方法以及 SRCA-AuNPs 方法进行检测,验证 SRCA-AuNPs 方法在实际样品检测中的应用能力。根据公式确定其敏感性、特异性、符合率。

敏感性=(真阳性数)/(真阳性数+假阴性数) \times 100%;

特异性=(真阴性数)/(真阴性数+假阳性数) \times 100%;

符合率=(真阳性数+真阴性数)/(被检总数) \times 100%。

表 3 实际样品清单

样品种类	数量
奶类及奶类制品	14
鸡肉及鸡肉制品	12
猪肉及猪肉制品	10
牛肉及牛肉制品	3
羊肉及羊肉制品	2
蛋类及即食类蛋制品	7
驴肉制品	2
总计	50

2 结果与分析

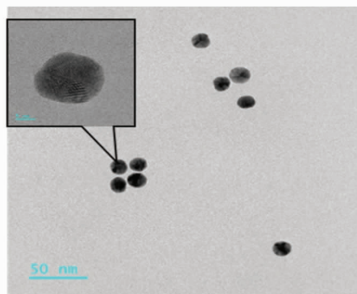
2.1 可行性验证

2.1.1 金纳米粒子表征及可行性验证 如图 2a 所示,扫描电镜结果表示金纳米粒子制备成功,分布均匀。平均直径约为 15 nm,代表金纳米粒子具有较高的表面积和体积比,有利于探针的吸附。

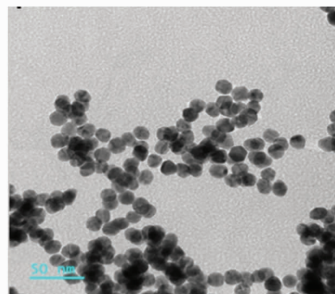
如图 2b,可以明显观察到盐的加入使 AuNPs 形态发生变化,产生不可逆的聚集。

2.1.2 SRCA 反应琼脂糖凝胶验证 如图 2c 所示,目的序列通过 SRCA 反应得到很好的扩增,产生大量扩增产物。

2.1.3 紫外分光光度计法验证 如图 2d 所示,单纯金纳米粒子分散状态下在 520 nm 处产生吸收峰,高盐条件下金纳米粒子成聚集状态,最高吸收峰向右移动,在 650 nm 处产生吸收峰。ssDNA 探针修饰的金纳米粒子在 520 nm 处产生吸收峰,在目标 DNA 存在的条件下,体系颜色变蓝,最高吸收峰右移,在 620 nm 处产生吸收峰,在目标 DNA 不存在的条件下,金纳米粒子部分聚集,显示紫色,在 530 nm 处产生吸收峰。



(a) 分散状态金纳米粒子及其尺寸



(b) 聚集状态金纳米粒子

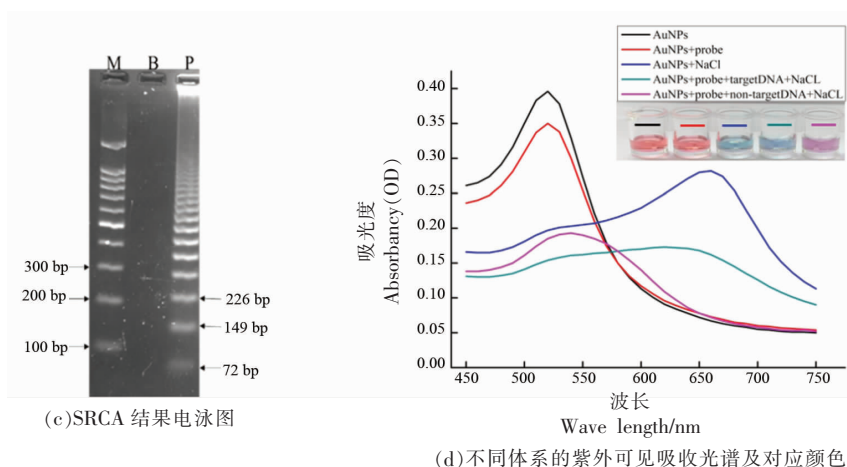


图2 可行性分析

Fig.2 Feasibility analysis

2.2 条件优化

2.2.1 硫酸镁溶液浓度的优化 高浓度的盐溶液能够诱导 AuNPs 聚集,使得反应混合物的颜色发生变化,因此需要找到合适浓度的盐溶液,本研究将 100 mmol/L $MgSO_4$ 按 1:99,1:19,1:14,1:9,1:4,1:1 稀释,稀释结果为 1,5,6.7,10,20,50 mmol/L,将 40 μ L $MgSO_4$ 加入 60 μ L AuNPs 体系中。

如图 3 所示,随着 $MgSO_4$ 浓度的升高,溶液逐渐变为蓝色,当 $MgSO_4$ 的浓度大于 6.7 mmol/L 时,颜色变化趋于稳定,表明浓度为 6.7 mmol/L 的

$MgSO_4$ 能够使 AuNPs 发生明显聚集,保障了之后试验的准确性。

2.2.2 探针浓度的优化 探针浓度是影响本研究准确性的另一个至关重要的因素。本研究在 $MgSO_4$ 浓度为 6.7 mmol/L 情况下,比较了 0.1~15 μ mol/L 探针浓度下体系颜色的变化。

如图 4 所示,随着探针浓度从 0.1~5 μ mol/L 增加,颜色逐渐加深,探针浓度从 5~15 μ mol/L,颜色逐渐变浅。因此本研究选择 5 μ mol/L 为探针使用浓度。

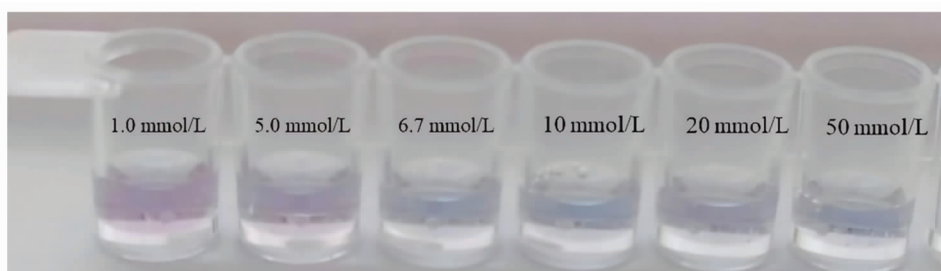


图3 不同硫酸镁溶液浓度颜色变化

Fig.3 Color changes of different magnesium sulfate solution concentration systems

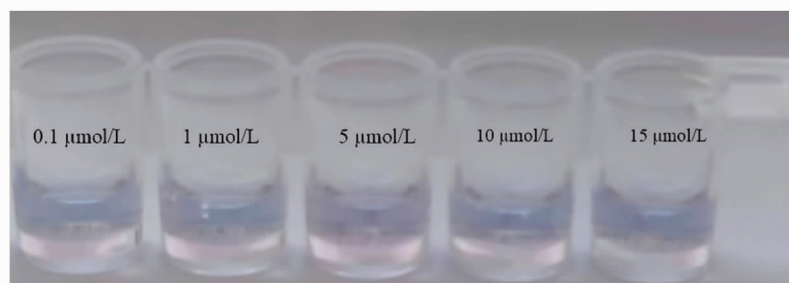


图4 不同探针浓度颜色变化

Fig.4 Color change of different probe concentration

2.3 特异性分析

为了验证 SRCA-AuNPs 检测沙门氏菌的特异性,我们按照了表 1 中的 8 株沙门氏菌和 8 株非沙门氏菌顺序提取 DNA 作为反应模板,进行比色试验。如图 5 所示,目标菌株和非目标菌株在颜

色变化上具有巨大差异,非目标菌株在加入盐后仍呈紫色,目标菌株在加入盐后变为蓝色。18 号空白样品与阴性样品颜色相近,17 号为 8 株沙门氏菌混合样品,也有较为明显颜色变化,这说明该方法具有良好的特异性。

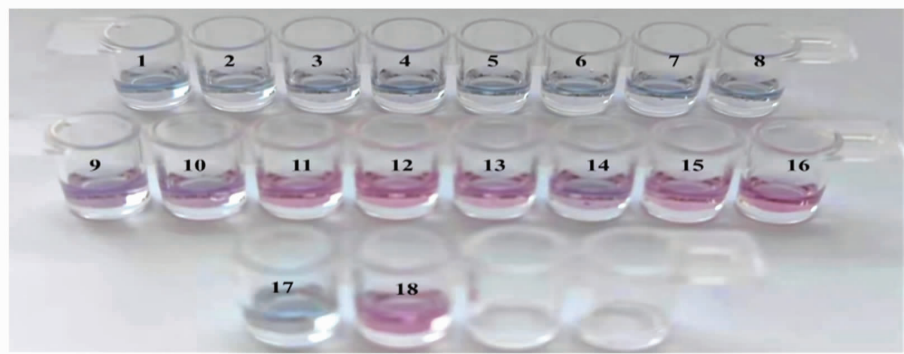


图 5 特异性检测

Fig.5 Specific detection

2.4 灵敏度分析

将浓度为 5.5×10^6 CFU/mL 的沙门氏菌菌液进行 10 倍梯度稀释,稀释范围为 $5.5 \times 10^{-1} \sim 5.5 \times 10^6$ CFU/mL,将不同浓度菌液提取 DNA 后进行检测。

如图 7 所示,采用 SRCA-AuNPs 法,肉眼可视化灵敏度为 5.5×10^0 CFU/mL。并在表 4 与其它比色检测沙门氏菌方法比较,表明该方法具有较高的灵敏度。

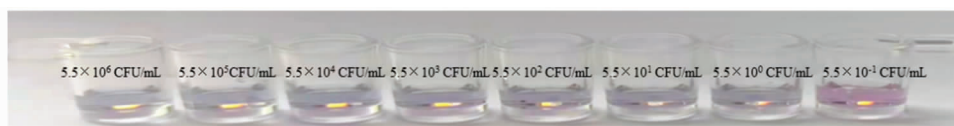


图 6 灵敏度分析

Fig.6 Sensitivity analysis

表 4 沙门氏菌比色检测方法对比

Table 4 Comparison of colorimetric detection methods for *Salmonella*

方法	检测范围/CFU·mL ⁻¹	灵敏度/CFU·mL ⁻¹	检测时间	文献来源
基于金纳米粒子比色适体传感器	$1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$	5.6×10	1 h	[15]
基于 ZnFe ₂ O ₄ /rGO 过氧化物酶活性氧化 TMB 比色适体传感器	$3.75 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^4$	1.1×10	1 h 5 min	[27]
基于 Toehold 介导的链置换反应比色传感器	$1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$	4.2×10	<2 h	[28]
基于脲酶诱导的 AuNR 夹心 ELISA 比色传感器	$1.21 \times 10^1 \sim 1.21 \times 10^8$	1.21×10	< 1 h	[29]
SRCA 结合金纳米粒子探针可视化检测	$5.5 \times 10^{-1} \sim 5.5 \times 10^6$	5.5×10^0	55 min	本研究

2.5 人工污染牛奶样品中沙门氏菌检出限分析

使用 SRCA-AuNPs 方法对添加沙门氏菌的牛奶样本进行了检测,其中牛奶中人工添加沙门氏菌浓度为 $3.7 \times 10^{-1} \sim 3.7 \times 10^8$ CFU/mL,由图 7 可

知,当污染牛奶中的菌浓度为 $3.7 \times 10^0 \sim 3.7 \times 10^8$ CFU/mL 时,蓝色较为明显,检出限为 3.7×10^0 CFU/mL,该方法检出限较低,可用于实际样品检测。

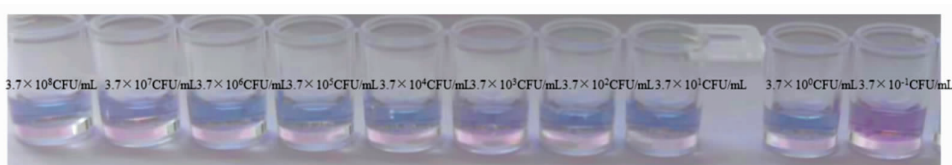


图7 检出限分析

Fig.7 Detection limit analysis

2.6 实际样品检测

使用 GB 4789.4-2016 方法以及 SRCA-AuNPs 对所有实际样品进行检测,SRCA-AuNPs 方法阳性样品检出数为 4 个, 阴性样品检出数为

46 个。通过计算 SRCA-AuNPs 方法的敏感性为 100.00%、特异性为 97.87%、符合率达到 98.00%。因此, 本文的研究方法在实际样品检测中有一定的应用价值。

表5 实际样品检测结果

Table 5 The results of real sample test

方法	样品数	真阳性	真阴性	假阳性	假阴性	敏感度/%	特异性/%	符合率/%
GB 4789.4-2016	50	3	47	0	0	-	-	-
本方法	50	3	46	1	0	100.00	97.87	98.00

3 结论

本研究将 SRCA 扩增技术与 AuNPs 探针结合, 利用金纳米粒子在高盐条件下聚集导致颜色变化的性质, 与高灵敏扩增技术结合, 建立了一种简便快捷高效的沙门氏菌可视化检测方法。该方法特异性好、灵敏度高、检出限低、结果肉眼可见, 并且整个试验可以在 55 min 内完成, 耗时短。该方法具有良好的应用价值, 适合于现场可视化检测和基层单位。

参 考 文 献

- [1] POPPE C. Pathogens in milk: *Salmonella* spp[J]. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2022, 4: 507-514.
- [2] TANG X J, YANG Z, CHEN X B, et al. Verification and large scale clinical evaluation of a national standard protocol for *Salmonella* spp./*Shigella* spp. screening using real-time PCR combined with guided culture[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 145: 14-19.
- [3] REN Y R, WEI J, WANG Y, et al. Development of a streptavidin-bridged enhanced sandwich ELISA based on self-paired nanobodies for monitoring multiplex *Salmonella* serogroups[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1203: 339705.
- [4] JIANG H, JIANG D L, LIU X M, et al. A self-driven PET chip-based imprinted electrochemical sensor for the fast detection of *Salmonella*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 349: 130785.
- [5] SHANG Y T, YE Q H, CAI S Z, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets[J]. LWT, 2021, 142: 110999.
- [6] 庄梦晴, 张先舟, 卢鑫, 等. 食品中沙门氏菌 FTA 膜结合跨越式滚环等温扩增检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 275-283. ZHUANG M Q, ZHANG X Z, LU X, et al. Establishment of *Salmonella* FTA membrane combined with leapfrog rolling ring isothermal amplification detection method in food[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 275-283.
- [7] YANG Y Y, LI Y T, LI X J, et al. Controllable in situ fabrication of portable AuNP/mussel-inspired polydopamine molecularly imprinted SERS substrate for selective enrichment and recognition of phthalate plasticizers[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 402: 125179.
- [8] ZHOU H X, HUANG R G, SU T C, et al. A c-MWCNTs/AuNPs-based electrochemical cytosensor to evaluate the anticancer activity of pinoresinol from *Cinnamomum camphora* against HeLa cells[J]. Bioelectrochemistry, 2022, 146: 108133.
- [9] HEIDARI R, RASHIDIANI J, ABKAR M, et al.

- CdS nanocrystals/graphene oxide-AuNPs based electrochemiluminescence immunosensor in sensitive quantification of a cancer biomarker: p53[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 126: 7-14.
- [10] JAIN P D A K A. Plasmonic sensing of Hg(II), Cr(III), and Pb(II) ions from aqueous solution by biogenic silver and gold nanoparticles[J]. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 2020, 51(9): 1214-1225.
- [11] FENG J L, ZHU Q C, WANG Y. Colorimetric detection of Gadidae species using probe-modified gold nanoparticles[J]. *Food Control*, 2020, 116: 107287.
- [12] MIRKIN C, LETSINGER R, MUCIC R, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. *Nature*, 1996, 382(6592): 607-609.
- [13] HILL H D M C. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 324-336.
- [14] MA W W, WAN S F, LIN C C, et al. Towards online specific recognition and sensitive analysis of bisphenol A by using AuNPs@aptamer hybrid-silica affinity monolithic column with LC-MS[J]. *Talanta*, 2020, 219: 121275.
- [15] MA X Y, SONG L G, ZHOU N X, et al. A novel aptasensor for the colorimetric detection of *S. typhimurium* based on gold nanoparticles[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 245: 1-5.
- [16] 孙博, 陈萍. 基于核酸适配体杂交链式反应比色法检测鼠伤寒沙门氏菌[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(12): 294-300.
- SUN B, CHEN P. Detection of *Salmonella typhimurium* based on nucleic acid aptamer hybridization chain reaction colorimetric method[J]. *Modern Food Technology*, 2021, 37(12): 294-300.
- [17] SUEBSING R, PROMBUN P, KIATPATHOMCHAI W. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle (AuNP) probe assay for visual detection of *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2013, 56(6): 428-435.
- [18] KAMPEERA J, DANGTIP S, SUVANNAKAD R, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle (AuNP) probe assay for visual detection of tilapia lake virus (TiLV) in Nile and red hybrid tilapia [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 44(10): 1595-1607.
- [19] XIA X H, YANG H, CAO J J, et al. Isothermal nucleic acid amplification for food safety analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 153: 116641.
- [20] 张蕴哲, 苑宁, 李靳影, 等. 可视化跨越式滚环等温扩增技术检测食品中沙门氏菌[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 304-311.
- ZHANG Y Z, YUAN N, LI J Y, et al. Detection of *Salmonella* in food by visual leapfrog rolling isothermal amplification technology[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2020, 20(9): 304-311.
- [21] 董换哲, 苑宁, 张蕴哲, 等. 跨越式滚环等温扩增技术结合 CRISPR/Cas12a 定量检测海产品中的副溶血性弧菌[J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 289-295.
- DONG H Z, YUAN N, ZHANG Y Z, et al. Leapfrogging isothermal amplification combined with CRISPR / Cas12 a quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood[J]. *Food Science*, 2022, 43(14): 289-295.
- [22] YUAN N, ZHANG Y Z, XU H, et al. Development of the saltatory rolling circle amplification assay for rapid and visual detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(15): 4538-4545.
- [23] MILTON A A P, MOMIN K M, PRIYA G B, et al. Novel saltatory rolling circle amplification assay for rapid and visual detection of *Campylobacter jejuni* in chicken meat [J]. *LWT*, 2021, 149(4): 111807.
- [24] CAO Z N, WANG S, LIU Z, et al. A rapid, easy, and sensitive method for detecting His-tag-containing chitinase based on ssDNA aptamers and gold nanoparticles[J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127230.
- [25] DEB R, PAL P, CHAUDHARY P, et al. Development of gold nanoparticle-based visual assay for rapid detection of *Escherichia coli* specific DNA in milk of cows affected with mastitis[J]. *LWT*, 2022, 155: 112901.
- [26] 郑聪. 金纳米颗粒的制备及在检测生物分子中的应用

- 用[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- ZHENG C. Preparation and application of gold nanoparticles in detection of biomolecules[D]. Jinan: Shandong University, 2020.
- [27] WU S J, DUAN N, QIU Y T, et al. Colorimetric aptasensor for the detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium using ZnFe₂O₄-reduced graphene oxide nanostructures as an effective peroxidase mimetics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 261: 42-48.
- [28] WANG X Q, LUO Z W, XIE Q Y, et al. Toehold-mediated strand displacement reaction formation of three-way junction DNA structure combined with nicking enzyme signal amplification for highly sensitive colorimetric detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Anal Chim Acta, 2020, 1139: 138-145.
- [29] GAO B, CHEN X R, HUANG X L, et al. Urease-induced metallization of gold nanorods for the sensitive detection of *Salmonella enterica Choleraesuis* through colorimetric ELISA [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(3): 1997-2007.

Visual Detection of *Salmonella* in Food Using Saltatory Rolling Circle Amplification Combined with Gold Nanoparticles

Dong Henan¹, Zhang Yunzhe¹, Xu Hui², Tan Jianxin¹, Zhang Wei^{1,3,4}, Yuan Yaowu^{1*}

¹School of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei

²Department of Science and Engineering, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

³College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei

⁴Key Laboratory of Microbiological Analysis and Control of Human and Livestock Communities in Hebei Province, Baoding 071000, Hebei)

Abstract *Salmonella* is the main cause of human diarrhea worldwide, which seriously endangers human and animal health. Traditional detection methods are time-consuming and cumbersome, so it is of great significance to carry out rapid, simple and sensitive visual detection methods. In this paper, a probe that can bind to the target sequence was designed and combined with gold nanoparticles (AuNPs). The target sequence was amplified by saltatory rolling circle amplification (SRCA). After denaturation at high temperature, it became a single chain. After binding with the probe on gold nanoparticles, gold nanoparticles were released. Under the action of MgSO₄, the aggregation showed blue visible to the naked eye, which was judged to be positive and negative to be purple. Therefore, a simple, fast and sensitive visual detection method was established. The results showed that the method had good specificity and could distinguish 8 *Salmonella* positive and 8 non-*Salmonella* negative. The sensitivity of visual detection was 5.5×10⁹ CFU/mL. The milk samples were artificially contaminated with *Salmonella*, and the detection limit was 3.7×10⁹ CFU/mL. Comparison with GB 4789.4-2016 method for detection of 50 actual samples, the sensitivity of this method was 100.00%, the specificity was 97.87%, and the coincidence rate was 98.00%. The SRCA-AuNPs visual detection method established in this paper has high application value, and the results are visible visually, which is suitable for on-site visual detection and grassroots units.

Keywords *Salmonella*; saltatory rolling circle amplification (SRCA); gold nanoparticles; visualization