

## 跨越式滚环等温扩增双染料比色法检测食品中的沙门氏菌

孙艳玉<sup>1</sup>, 李子坤<sup>2</sup>, 张蕴哲<sup>1</sup>, 徐慧<sup>3</sup>, 卢鑫<sup>3</sup>, 张伟<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

<sup>2</sup>河北农业大学 河北保定 071000

<sup>3</sup>河北农业大学理工系 河北沧州 061100

<sup>4</sup>河北农业大学生命科学院 河北保定 071000

<sup>5</sup>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** 沙门氏菌是导致腹泻病的四大原因之一,对人类健康危害极大。本研究基于甲酚红(CR)和羟基萘酚蓝(HNB)的不同作用模式和显色原理,建立一种跨越式滚环等温扩增(SRCA)双染料比色法,用于沙门氏菌的可视化检测。首先针对沙门氏菌设计 SRCA 引物组,然后优化双染料添加量,建立 SRCA 双染料比色检测方法。通过特异性、灵敏度和检出限试验,对该方法进行评估。通过检测 60 份实际样品,评价该方法的实际应用性能。结果表明:HNB/CR 最佳浓度比为 0.6,即 HNB 浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$ ,CR 浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$ 。用该方法检出 8 株沙门氏菌为阳性,其余 15 株非沙门氏菌菌株均为阴性。该方法灵敏度为 6.8 CFU/mL,是 PCR 方法( $6.8 \times 10^2$  CFU/mL)的 100 倍。检出限为 9.5 CFU/mL,比 PCR 方法( $9.5 \times 10^2$  CFU/mL)低 100 倍。检测实际样品,计算其敏感性、特异性和符合率分别为 100%,98.2%,98.3%。本研究建立的 SRCA 双染料比色方法能够特异、准确、灵敏地检测沙门氏菌。与使用单一染料相比,双染料混合使用使阴性(紫色)与阳性(绿色)样品间具有更高的色相对比度和更广的颜色变化范围。此外,比色染料可预先加入反应体系之中,能有效避免二次污染。

**关键词** 跨越式滚环等温扩增; 双染料; 比色检测; 沙门氏菌

**文章编号** 1009-7848(2025)01-0400-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.038

沙门氏菌是一种具有鞭毛结构,且不形成芽孢的高度多样化兼性厌氧型革兰氏阴性细菌,其包含 2 600 多种血清型<sup>[1-3]</sup>。沙门氏菌常存在于肉(鸡肉、牛肉、猪肉等)、蛋、奶以及新鲜水果和蔬菜中<sup>[4-5]</sup>。人类感染沙门氏菌后会引发(副)伤寒和非伤寒肠胃炎<sup>[6-7]</sup>,有时还会引起脑膜炎和败血症等并发症,甚至会致人死亡<sup>[8-9]</sup>。快速、灵敏地检测食品和环境中的沙门氏菌,对于保障食品供应以及确保公共健康非常重要。

目前传统的沙门氏菌检测方法基于多步骤的细菌培养和生化血清型鉴定试验,通常需要耗时 3 d 以上才能完成<sup>[10]</sup>。近年来,出现酶联免疫吸附试验(ELISA)这类免疫学分析方法,虽可以缩短检测时间,但菌体表面蛋白不稳定,使该方法极易出现假阴性或假阳性的结果<sup>[11]</sup>。相比于蛋白质,DNA 具有更高的稳定性和抗基质干扰能力,因此基于 DNA 的方法能够更加准确地检测沙门氏菌<sup>[12]</sup>。聚合酶链反应(PCR)作为最传统的核酸扩增技术,其检测时间虽较短,但依赖变温程序,无法满足现场检测需要<sup>[13]</sup>。本实验室开发的跨越式滚环等温扩增(Saltatory rolling circle amplification,SRCA)技术依靠 *Bst* DNA 聚合酶的链置换和催化能力,仅需 1 组引物就能开启扩增反应<sup>[14]</sup>。与环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术相比,SRCA 引物设计相对简单,而且可以对扩增产物进行回收、验证<sup>[15]</sup>。与滚环扩增(Rolling circle amplification,RCA)技术相比,SRCA 无需进行模板环化操作,大大缩短了检测时间,同时也降低了成本<sup>[16]</sup>。

**收稿日期:** 2024-01-19

**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, 226Z5503G,236Z5502G);河北省外专百人计划项目(360-0803-JSN-3YGS);河北省博士后科研项目(B2021005007);河北省重点研究开发计划项目(18275501D);河北省教育厅科研项目(QN2022073);河北省自然科学基金项目(C2019204284)

**第一作者:** 孙艳玉,女,硕士生

**通信作者:** 张伟 E-mail: zhangwei631126@163.com

目前,已建立多种基于 SRCA 技术的沙门氏菌检测方法,例如电化学法<sup>[17]</sup>、荧光法<sup>[18]</sup>和比色法<sup>[19]</sup>等。其中比色法最不依赖仪器、设备,更能满足现场快速检测的需要<sup>[20]</sup>。比色法主要基于比色染料的颜色变化,对于 SYBR Green I 这类核酸嵌入荧光染料,需反应后二次加入,可能会产生气溶胶污染<sup>[21]</sup>。若将比色染料预先加入反应体系中,就能有效避免二次污染。

甲酚红 (Cresol red, CR) 是一种 pH 敏感染料,当 pH<7.2 时呈黄色,当 pH>8.8 时呈洋红色<sup>[22]</sup>。羟基萘酚蓝 (Hydroxynaphthol blue, HNB) 是常见的金属敏感染料,主要响应于体系中  $Mg^{2+}$  浓度的变化<sup>[23]</sup>。在核酸扩增期间,合成 dsDNA 的同时,会释放副产物焦磷酸根离子 ( $P_2O_7^{4-}$ ) 和氢离子 ( $H^+$ )<sup>[24-25]</sup>。 $H^+$  累积使体系 pH 值下降,CR 由洋红色变为黄

色<sup>[26]</sup>;而  $P_2O_7^{4-}$  与  $Mg^{2+}$  结合产生不溶性白色沉淀  $Mg_2P_2O_7$ , 使溶液中  $Mg^{2+}$  减少, HNB 由紫色变为天蓝色<sup>[27-28]</sup>。CR 和 HNB 均不会对扩增产生抑制,因此可在反应前加入体系之中<sup>[29-30]</sup>。将这两种染料单独进行比色时,存在颜色变化范围太小,色相对比度不高的问题,比色结果不易区分,特别是对于一些患有色觉障碍的人群<sup>[31-32]</sup>。

本研究将 CR 和 HNB 组合应用,利用二者不同作用模式和显色原理,建立一种 SRCA 双染料比色方法检测食品中的沙门氏菌,以期优化食品中沙门氏菌的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

本研究所用菌株见表 1。

表 1 菌株信息

Table 1 The information of bacteria strains

序号	菌株名称	拉丁学名	菌株编号及来源
1	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-A</i>	CICC 21501
2	乙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-B</i>	CICC 21495
3	丙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-C</i>	CICC 21512
4	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115
5	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	CMCC 50041
6	山夫登堡沙门氏菌	<i>Salmonella senftenberg</i>	ATCC 8400
7	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	CICC 21493
8	火鸡沙门氏菌	<i>Salmonella oranienburg</i>	CICC 21511
9	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 13706
10	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CICC 10032
11	肠道出血性大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CICC 21530
12	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CICC 21633
13	斯氏李斯特氏菌	<i>Listeria seeligeri</i>	CICC 21671
14	无害李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	CICC 10297
15	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26073
16	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC 21600
17	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21617
18	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
19	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51571
20	痢疾志贺氏菌	<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC 51135
21	阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter sakasaki</i>	ATCC 29544
22	莫氏克罗诺杆菌	<i>Cronobacter muytjensii</i>	CICC 23943
23	蜡样芽胞杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 63302

### 1.2 材料与试剂

本试验培养基由苏州春曼医药有限公司提供;DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、ddH<sub>2</sub>O、dNTP

MIX, 北京博迈德生物技术公司;Bst DNA Polymerase、ThermoPol Buffer (10×)、MgSO<sub>4</sub>, 美国 NEB 公司;HNB、CR, 北京华迈科生物技术有限责任公

司;SRCA引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.3 仪器与设备

PCR扩增仪,德国 Biomedizinische Anaiytik 有限公司;JY300C型电泳仪,北京君意东方公司;Nanodrop 2000分光光度计,美国 Thermo scientific 公司;HWSY-24型恒温水浴锅,深圳市澳德玛电子科技有限公司;超净工作台,菲斯福仪器(河北)有限公司;MGC-500型电热恒温培养箱,郑州生元仪器有限公司。

表2 沙门氏菌 *invA* 基因引物信息

Table 2 The primers information of *Salmonella invA* gene

靶序列	序列编号	引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp	目的序列长度/bp
<i>invA</i>	GenBank M90846.1	FWP	CCTGGACGATAACAGCAT	18	59
		RVP	CCGTGTTGAACAATTACGG	20	

1.4.3 SRCA、PCR反应体系 SRCA反应体系:dNTP MIX (2.5 mmol/L)、MgSO<sub>4</sub> (30 mmol/L)各4 μL, ThermoPol Reaction Buffer (10×)取2 μL, *Bst* DNA Polymerase (8 000 U/mL)、FWP/RVP Primers (10 μmol/L)、模板DNA(阴性对照不加模板)各1 μL,使用ddH<sub>2</sub>O补全20 μL体系。于62℃恒温反应1h,最后升温至80℃,使*Bst* DNA聚合酶失活,反应终止。

PCR反应体系:Taq Master Mix (2×)取11 μL,FWP/RVP Primers (10 μmol/L)、模板DNA(阴性对照不加模板)各1 μL,使用ddH<sub>2</sub>O补全25 μL体系。

1.4.4 SRCA扩增产物测序分析 SRCA反应结束后,利用琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物,若为正确扩增条带,则继续对其进行测序分析。每组试验重复3次。

### 1.5 双染料添加量优化试验设计

1.5.1 CR浓度的优化 选取4组CR浓度,分别为:50,100,200,400 μmol/L。吸取不同浓度的CR各1 μL于体系中,进行SRCA反应。使用智能手机拍照记录比色结果,并用Photoshop软件测量样品的Lab值,然后通过CIEDE2000色差公式<sup>[33]</sup>,计算阴性与阳性样品之间的色差并制作色差热图。选取色差较大的CR浓度,以及其前、后浓度为边界,设置浓度区间,进行CR浓度最终优化,以测

### 1.4 试验方法

1.4.1 基因组DNA提取 使用商业试剂盒提取表1中菌株的基因组DNA,并测定所提取模板的纯度与浓度( $A_{260}/A_{280}$ 值在1.8~2.0),后于-20℃保存备用。

1.4.2 引物设计 本研究选择沙门氏菌*invA*基因,在NCBI中筛选出同源性最好的靶序列,通过DNAMAN软件进行SRCA引物设计,最后由上海生工进行引物合成,引物信息见表2。

定CR最佳比色浓度。每组试验均重复3次。

1.5.2 HNB/CR浓度比的优化 在确定CR最佳浓度的基础上,优化HNB/CR浓度比。共设置5组HNB/CR浓度比值(0,0.4,0.6,0.8,1.0),按照所设置的浓度比,分别吸取CR和HNB各1 μL添加到体系中,进行SRCA反应。按照1.5.1节的操作处理试验结果,以测定HNB/CR最佳浓度比。每组试验重复3次。

### 1.6 SRCA双染料比色方法的建立

按照1.5.2节测定的HNB/CR最佳浓度比,分别向体系中添加两种染料各1 μL,进行SRCA反应。随后记录比色结果,并利用琼脂糖凝胶电泳共同验证。每组试验均重复3次。

### 1.7 特异性试验

为评估该方法的特异性,以表1中菌株的基因组DNA为模板进行SRCA双染料比色反应,并对比色结果进行琼脂糖凝胶电泳验证。每组试验均重复3次。

### 1.8 灵敏度试验

使用无菌生理盐水制备沙门氏菌纯培养物梯度稀释液,经平板计数法测定菌液浓度为 $6.8 \times 10^7 \sim 6.8 \times 10^{-1}$  CFU/mL。提取稀释菌液基因组DNA,以其作为模板进行SRCA双染料比色反应,同时使用PCR方法对上述基因组DNA进行检测。每组试验均重复3次。

### 1.9 检出限试验

制备人工污染牛奶样品梯度稀释液,经平板计数法测定沙门氏菌浓度为  $9.5 \times 10^7 \sim 9.5 \times 10^{-1}$  CFU/mL。提取基因组 DNA,以其为模板进行 SRCA 双染料比色反应和 PCR 反应。每组试验均重复 3 次。

### 1.10 实际样品检测

在超市(河北省保定市)共采集实际样品 60 份,包括 25 种肉类及其制品(鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉)、25 种奶类(纯牛奶、奶粉、发酵乳品)和 10 种即食蛋类。分别使用 SRCA 双染料比色方法和《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》(GB 4789.4-2016)<sup>[34]</sup>方法检测所有样品。记录并分析试验数据,按照公式(1~3)计算敏感性、特异性和符合率。每组试验均重复 3 次。

敏感性 (%) = 真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数) × 100 (1)

特异性 (%) = 真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数) × 100 (2)

符合率 (%) = (真阳性数 + 真阴性数) / 样品总数 × 100 (3)

## 2 结果与分析

### 2.1 检测原理

检测原理如图 1 所示,核酸扩增期间,合成 DNA 分子的同时,会释放扩增副产物焦磷酸根离子 ( $P_2O_7^{4-}$ ) 和氢离子 ( $H^+$ )。反应过程中  $H^+$  累积,体系 pH 值下降,使 CR 由洋红色变为黄色;而  $P_2O_7^{4-}$  与  $Mg^{2+}$  结合产生不溶性白色沉淀  $Mg_2P_2O_7$ ,从而释放 HNB-Mg 复合物中的 HNB,使溶液由紫罗兰色变为天蓝色。基于 CR 和 HNB 的不同作用模式和显色原理,将这两种染料组合应用于 SRCA 比色反应,产生了全新的颜色变化区间(紫色-绿色)。与使用单一染料相比,获得了更加多样的色彩变化,扩大了颜色变化窗口,增强了色相对比效果。

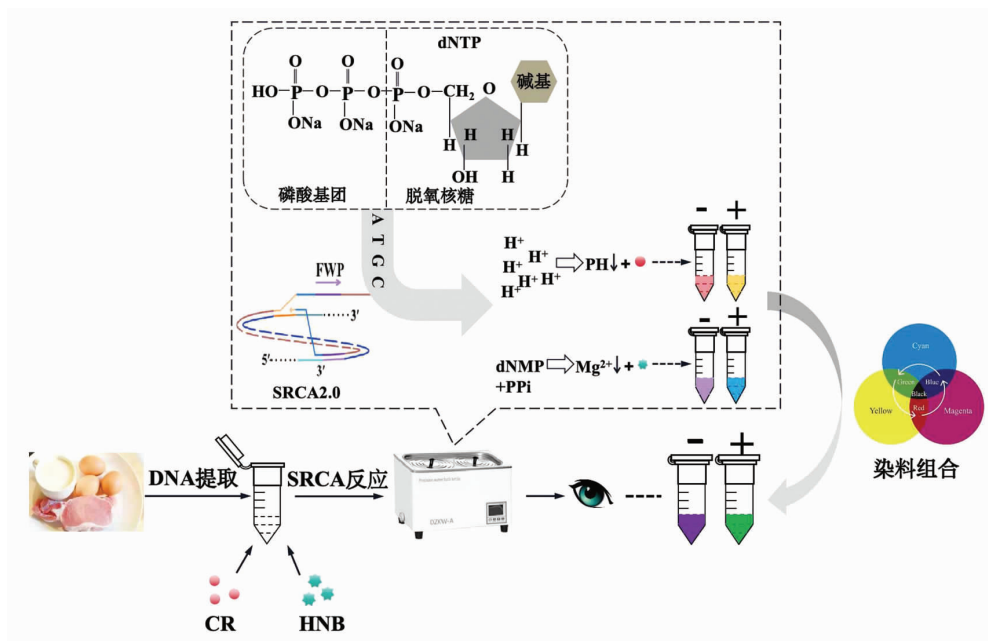


图 1 SRCA 双染料比色检测沙门氏菌示意图<sup>[14]</sup>

Fig.1 Schematic diagram of dual-dye SRCA colorimetric detection of *Salmonella*<sup>[14]</sup>

根据约翰内斯·伊顿的色彩理论<sup>[35]</sup>,当色轮上一个颜色变为与之相反的另一个颜色(色相差为 12)时,色彩差异最为显著。基于这一理论,将 CR 和 HNB 引起的颜色变化于色轮<sup>[36]</sup>中重新审视。如图 2 所示,HNB 的色相变化范围是 4 到 7,只相隔

3 个色调;CR 引起 1 到 18 的色相变化,色调差为 7;将这两种染料混合使用,发生了 3 到 14 的色相变化,色调差为 11,接近对比色,此时色彩差异最为显著,也更适用于肉眼观察。



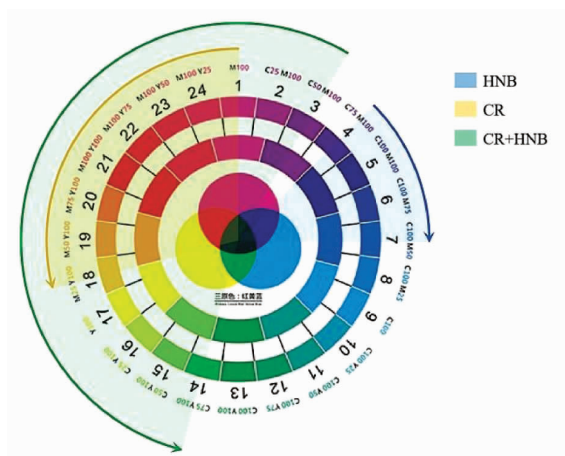


图 2 不同染料色相变化

Fig.2 The color variation range of different dyes

## 2.2 SRCA 扩增产物测序分析

由电泳结果(图 3a)可知,P 泳道为特征梯状条带,N 泳道未见条带。对前 4 条电泳条带切胶测序分析,如图 3b 所示,扩增产物是通过添加序列将目的序列间隔开而,形成的一系列串联重复片段,添加序列为 AAT,符合 SRCA 扩增原理。

## 2.3 双染料添加量的优化结果

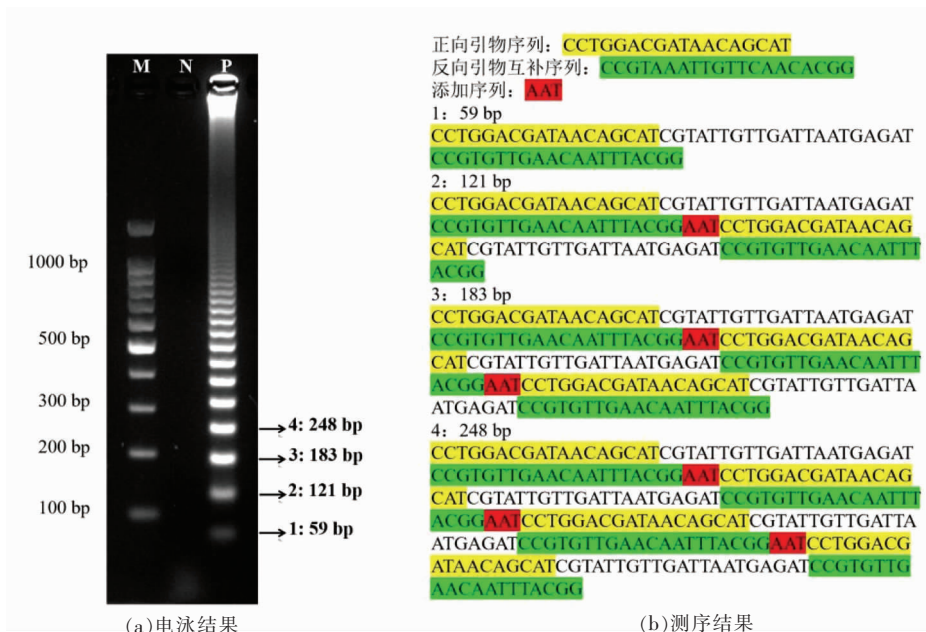
### 2.3.1 CR 的最佳浓度 由 CR 浓度筛选预试验

比色结果(图 4a)和色差热图(图 4b)可知,当 CR 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时,阴性与阳性样品之间的色差最大;当 CR 浓度在 50~200  $\mu\text{mol/L}$  时,阴性与阳性样品之间的色差呈先增加后减小的变化趋势,说明 CR 最佳比色浓度存在于此浓度范围内。

CR 浓度筛选试验在 50~200  $\mu\text{mol/L}$  浓度区间内,设置浓度间隔 25  $\mu\text{mol/L}$ ,设定 5 组浓度(75, 100, 125, 150, 175  $\mu\text{mol/L}$ )进行试验。由比色结果(图 4c)和色差热图(图 4d)可知,当 CR 浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  时,样品之间的色差最大。因此,本研究 CR 的最佳浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.3.2 HNB/CR 的最佳浓度比

在最佳 CR 浓度的基础上,通过调整 HNB/CR 浓度比(0,0.4,0.6, 0.8,1.0),计算出相对应的 HNB 浓度为 0,50,75, 100,125  $\mu\text{mol/L}$ 。比色结果如图 5a 所示,当 HNB 浓度由 0  $\mu\text{mol/L}$  增加到 125  $\mu\text{mol/L}$  时,双染料混合产生了新的颜色区间(紫色-绿色)。由色差热图(图 5b)可知,当 HNB 浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$  时,样品之间的色差最大。因此本研究中 HNB/CR 最佳浓度比为 0.6,即 HNB 浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$ ,CR 浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$ 。



注:图 a 中,M. 100 bp DNA ladder,N. 阴性,P. 阳性。

图 3 SRCA 扩增产物验证结果

Fig.3 Verification results of SRCA amplification products

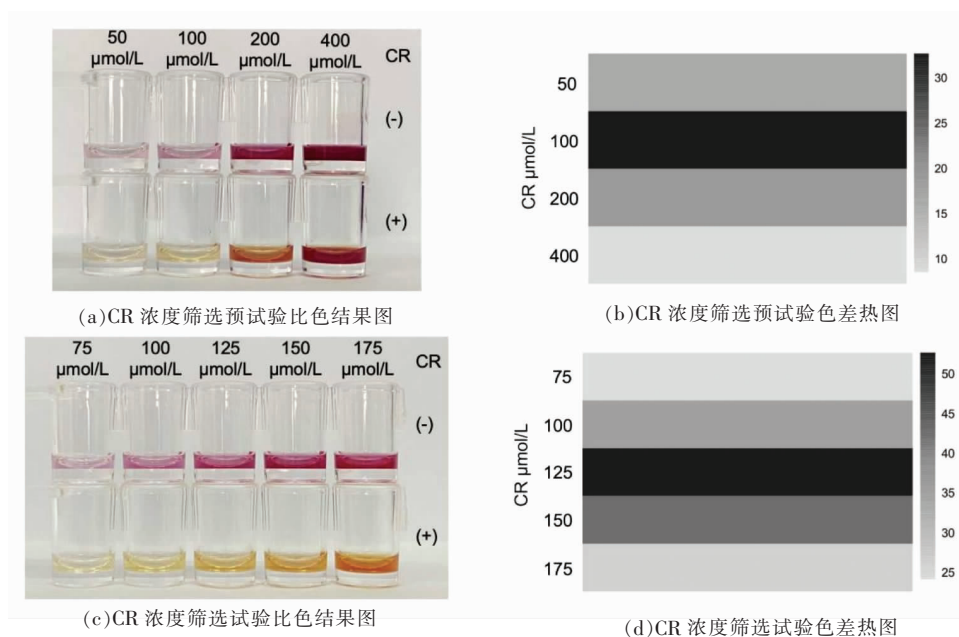


图 4 CR 浓度优化

Fig.4 Optimization of CR concentrations

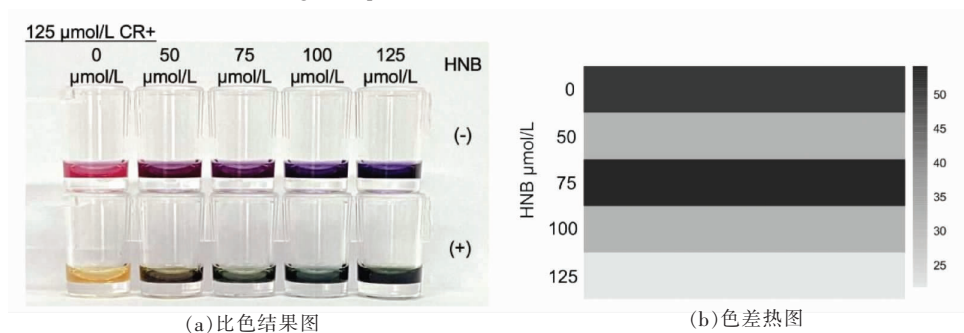


图 5 HNB/CR 浓度比的优化

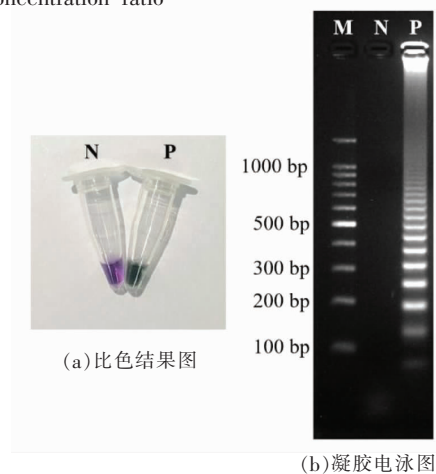
Fig.5 Optimization of HNB/CR concentration ratio

## 2.4 SRCA 双染料比色方法的验证

按照 HNB/CR 最佳浓度比,在反应前将这两种染料各添加 1 μL 于体系中,随后进行 SRCA 反应。由比色结果(图 6a)可知,阴性样品反应管呈紫色,阳性样品反应管呈绿色。图 6b 为电泳结果,阴性没有出现扩增条带,阳性出现梯型条带。因此,本研究成功建立了基于 CR 和 HNB 的 SRCA 双染料比色检测方法。

## 2.5 特异性分析

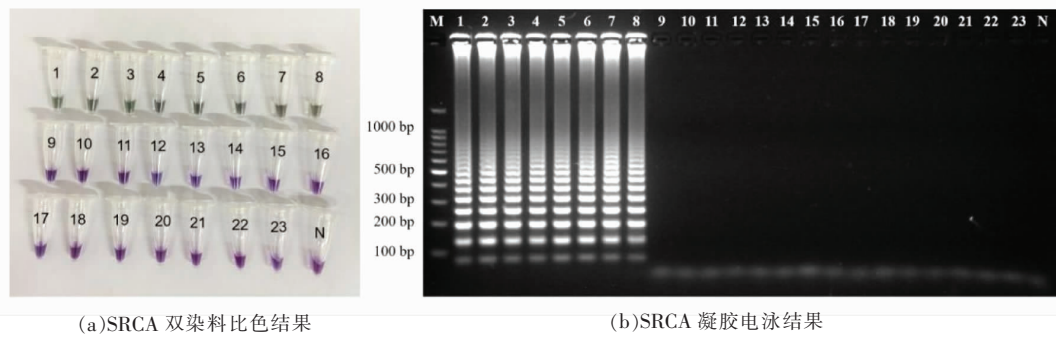
由比色结果(图 7a)和琼脂糖凝胶电泳结果(图 7b)可知,含有沙门氏菌的 1~8 号反应管为阳性,其它含有非沙门氏菌菌株的反应管全部为阴性。因此,本研究建立的 SRCA 双染料比色方法能够特异性区分沙门氏菌和其它菌株。



注:N. 阴性,P. 阳性。

图 6 SRCA 双染料比色方法验证

Fig.6 The verified results of dual-dye SRCA colorimetric method



注:1~23 的菌株信息见表 1,N. 阴性对照。

图 7 特异性试验

Fig.7 Specific test

### 2.6 灵敏度分析

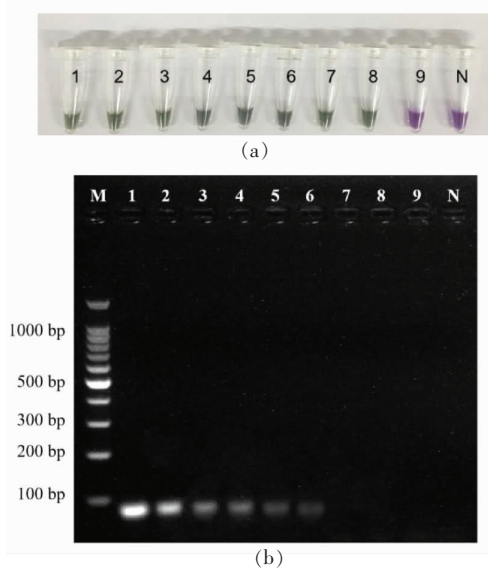
如图 8a 所示,反应管 1~8( $6.8 \times 10^7 \sim 6.8$  CFU/mL)为绿色,反应管 9( $6.8 \times 10^{-1}$  CFU/mL)仍为紫色。因此,通过试验测得 SRCA 双染料比色方法的灵敏度为 6.8 CFU/mL。如图 8b 所示,泳道 1~6( $6.8 \times 10^7 \sim 6.8 \times 10^2$  CFU/mL)出现亮度依次变暗的条带,从泳道 7( $6.8 \times 10^1$  CFU/mL)开始,条带完全消失。由此测得 PCR 方法的灵敏度为  $6.8 \times 10^2$  CFU/mL。因此,SRCA 双染料比色方法具有较高的灵敏度,是 PCR 方法的 100 倍。

### 2.7 检出限分析

对人工污染牛奶样品进行沙门氏菌检出限分析,从图 9a 可以看出,当菌液浓度低于 9.5 CFU/mL 时,反应管颜色变为紫色。因此,SRCA 双染料比色法的检出限为 9.5 CFU/mL;从图 9b 观察到,随着菌液浓度降低到  $9.5 \times 10^2$  CFU/mL 以下时,扩增条带完全消失,故测出 PCR 检出限为  $9.5 \times 10^2$  CFU/mL。因此,SRCA 双染料比色方法具有较低的检出限,比 PCR 方法低 100 倍。

### 2.8 实际样品检测

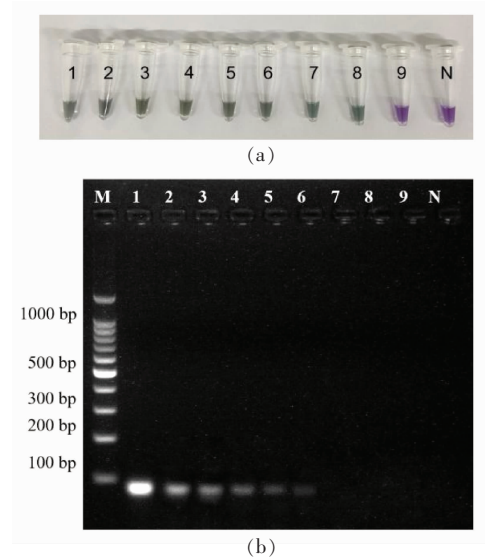
检测结果如表 3 所示。



注:M. 100 bp DNA Ladder,1~9 对应沙门氏菌浓度为  $6.8 \times 10^7 \sim 6.8 \times 10^{-1}$  CFU/mL,N. 阴性对照。

图 8 灵敏度分析

Fig.8 Sensitivity analysis



注:M. 100 bp DNA Ladder,1~9 对应沙门氏菌浓度为  $9.5 \times 10^7 \sim 9.5 \times 10^{-1}$  CFU/mL,N. 阴性对照。

图 9 检出限分析

Fig.9 The detection limit analysis

表 3 实际样品检测结果

Table 3 The results of actual sample test

样品种类	样品个数	GB 4789.4-2016 方法		双染料 SRCA 方法	
		阳性样品数/阴性样品数		阳性样品数/阴性样品数	
肉类	25	4/21		5/20	
奶类	25	0/25		0/25	
即食蛋类	10	0/10		0/10	
	敏感性/%	—		100	
	特异性/%	—		98.2	
	符合率/%	—		98.3	

### 3 讨论

本研究基于 CR 和 HNB 的不同作用模式和显色原理,开发了一种 SRCA 双染料比色方法检测食品中的沙门氏菌。解决了使用单一染料比色时,样品之间色调差太小的问题。该方法不仅能够简单、快速地实现对沙门氏菌的特异性检测,还能有效扩大样品之间的颜色变化范围,提高色彩对比度,更加符合肉眼观察的适用性。而且这两种染料对扩增无抑制作用,仅需在原有 SRCA 反应体系的基础上,按照最佳比例在反应前添加这两种比色染料,无需二次开盖加入,降低了交叉污染的风险。

SRCA 反应期间,合成 dsDNA 的同时,会产生焦磷酸根离子 (PPi) 和氢离子 (H<sup>+</sup>),其中 PPi 与 Mg<sup>2+</sup>结合,使溶液中 Mg<sup>2+</sup>浓度降低。同时,溶液中 Mg<sup>2+</sup>的浓度变化还受到多种因素的影响,例如 dNTP 对 Mg<sup>2+</sup>也具有螯合作用。考虑到 HNB 主要响应于体系中 Mg<sup>2+</sup>浓度,在 SRCA 反应期间由于引物退火而导致的非特异性扩增等也会影响 HNB 的颜色变化。因此,在双染料组合中,HNB 提供蓝色背景,CR 负责响应体系 pH 变化,并完成最终比色信号输出。两种染料组合使用,能够成功扩大样品颜色变化范围,提高色彩对比度。

### 4 结论

总之,本研究成功开发了一种 SRCA 双染料比色方法,实现对沙门氏菌的可视化检测,该方法具有良好的特异性,较高的灵敏度,较低的检出限,并且操作简便、耗时较短。在检测时无需二次开盖加入染料,即可实现“一管式”反应。并且比色染料的组合使用扩大了颜色变化范围,增强了色相对比效果,更加适用于肉眼观察,为沙门氏菌以

及其它病原菌的比色检测提供了新策略。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG H Z, SHU M, YANG W Y, et al. Isolation and characterization of a novel *Salmonella* bacteriophage JNwz02 capable of lysing *Escherichia coli* O157:H7 and its antibacterial application in foods[J]. LWT, 2023, 173: 114251.
- [2] CHAUDHARI R, SINGH K, KODGIRE P. Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella* spp[J]. Research in Microbiology, 2023, 174(1/2): 103985.
- [3] WANG C Y, ZHANG Y T, LIU S S, et al. Allosteric probe-triggered isothermal amplification to activate CRISPR/Cas12a for sensitive electrochemiluminescence detection of *Salmonella*[J]. Food Chemistry, 2023, 425: 136382.
- [4] MARUS J R, MAGEE M J, MANIKONDA K, et al. Outbreaks of *Salmonella enterica* infections linked to animal contact: Demographic and outbreak characteristics and comparison to foodborne outbreaks—United States, 2009–2014[J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(4): 370–376.
- [5] GAL-MOR O, BOYLE E C, GRASSL G A. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 391.
- [6] YUE M N, LI X Y, LIU D, et al. Serotypes, antibiotic resistance, and virulence genes of *Salmonella* in children with diarrhea[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2020, 34(12): e23525.
- [7] ELSLAND D M, DUIJSTER J W, ZHANG J L, et al. Repetitive non-typhoidal *Salmonella* exposure is an environmental risk factor for colon cancer and



- tumor growth[J]. *Cell Reports Medicine*, 2022, 3(12): 100852.
- [8] GU Y F, KUANG X H, SAJID A, et al. Prevalence and mechanism of antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella* isolated from foodborne animal in China[J]. *LWT*, 2023, 184: 114906.
- [9] CHEN K F, GAO Y, LI L L, et al. Increased drug resistance and biofilm formation ability in ST34-type *Salmonella typhimurium* exhibiting multicellular behavior in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 876500.
- [10] MOOIJMAN K A, PIELAAT A, KUIJPERS A F A. Validation of EN ISO 6579-1 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1 detection of *Salmonella* spp.[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 288: 3–12.
- [11] HE Y X, REN Y R, GUO B, et al. Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk[J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125942.
- [12] JAIN S, CHATTOPADHYAY S, JACKERAY R, et al. Highly sensitive detection of *Salmonella typhi* using surface aminated polycarbonate membrane enhanced-ELISA[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 31(1): 37–43.
- [13] FANG Z W, ZHOU X J, WANG X, et al. Development of a 3-plex droplet digital PCR for identification and absolute quantification of *Salmonella* and its two important serovars in various food samples[J]. *Food Control*, 2023, 145: 109465.
- [14] SUN R X, ZHANG Y Z, WANG X C, et al. A new exploration of the amplification mechanism of saltatory rolling circle amplification (SRCA) for food safety detection[J]. *LWT*, 2024, 209: 116757.
- [15] KIM E, YANG S M, KIM H Y. Rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thompson by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and colorimetric LAMP combined without DNA extraction in the field[J]. *LWT*, 2023, 182: 114850.
- [16] ZHU D, YAN Y R, LEI P H, et al. A novel electrochemical sensing strategy for rapid and ultrasensitive detection of *Salmonella* by rolling circle amplification and DNA-AuNPs probe[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 846: 44–50.
- [17] ZHENG S M, YANG Q, YANG H Y, et al. An ultrasensitive and specific ratiometric electrochemical biosensor based on SRCA-CRISPR/Cas12a system for detection of *Salmonella* in food[J]. *Food Control*, 2023, 146: 109528.
- [18] GUO W, YANG Q, LIU J, et al. Multiple fluorescent saltatory rolling circle amplification (SRCA) for simultaneous and sensitive detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in food[J]. *LWT*, 2022, 168: 113875.
- [19] WANG H B, YANG Q, XU H, et al. Saltatory rolling circle amplification assay coupled with photosensitization method for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food[J]. *European Food Research & Technology*, 2023, 249(8): 2067–2075.
- [20] ZHANG Y Z, YANG Q, LI C, et al. Sensitive and visual detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula by saltatory rolling circle amplification method[J]. *LWT*, 2019, 107: 41–48.
- [21] ROUMANI F, BARROS-VELAZQUEZ J, GARRIDO-MAESTU A, et al. Real-time PCR, and recombinase polymerase amplification combined with SYBR green I for naked-eye detection, along with propidium monoazide (PMA) for the detection of viable patulin-producing fungi in apples and by-products[J]. *Food Control*, 2023, 144: 109347.
- [22] TANNER N A, ZHANG Y H, EVANS JR T C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes[J]. *Bio Techniques*, 2015, 58(2): 59–68.
- [23] ZHANG X L, ZHAO Y F, MA C, et al. An optimized visual loop mediated isothermal amplification assay for efficient detection of minute virus of mice with hydroxynaphthol blue dye[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 308: 114575.
- [24] JAROENRAM W, CECERE P, POMPA P P. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 156: 9–14.
- [25] TOUMAZOU C, SHEPHERD L M, REED S C, et al. Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 641–646.
- [26] NIESSEN L, BECHTNER J, FODIL S, et al. LAMP-based group specific detection of aflatoxin

- producers within *Aspergillus* section *Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 241-250.
- [27] ROTHBERG J M, HINZ W, REARICK T M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing[J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 348-352.
- [28] ANDERSON E P, DANIELS J S, YU H, et al. A system for multiplexed direct electrical detection of DNA synthesis[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 129(1): 79-86.
- [29] GOTO M, HONDA E, OGURA A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. *Biotechniques*, 2009, 46(3): 167-172.
- [30] XIONG J, HUANG B, XU J S, et al. A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(1): 201-211.
- [31] WU S S, LIU X Y, YE S L, et al. Colorimetric isothermal nucleic acid detection of SARS-CoV-2 with dye combination[J]. *Heliyon*, 2021, 7(4): e6886.
- [32] ZHANG F, GAO C S, BAI L L, et al. Dual-color blending based visual LAMP for food allergen detection: A strategy with enlarged color variation range and contrast[J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 13: 100201.
- [33] LUO M R, CUI G, RIGG B. The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000[J]. *Color Research and Application*, 2001, 26(5): 340-350.
- [34] 中华人民共和国国际卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 2-7.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. Microbiology inspection of food for *Salmonella* inspection: GB 4789.4-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 2-7.
- [35] 约翰内斯·伊顿. 色彩艺术[M]. 上海: 世界图书出版公司, 1999: 85-111.
- ITTEN J. The art of color[M]. Shanghai: World Book Publishing Limited, 1999: 85-111.
- [36] HARKNESS N. The colour wheels of art, perception, science and physiology[J]. *Optics & Laser Technology*, 2006, 38(4): 219-229.

### Colorimetric Detection of *Salmonella* in Foods by Dual-Dye Saltatory Rolling Circle Amplification

SUN Yanyu<sup>1</sup>, LI Zikun<sup>2</sup>, ZHANG Yunzhe<sup>1</sup>, XU Hui<sup>3</sup>, LU Xin<sup>3</sup>, ZHANG Wei<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>2</sup>Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>3</sup>College of Science and Technology, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

<sup>4</sup>College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>5</sup>Hebei Provincial Key Laboratory of Analysis and Control for Zoonoses Microbial, Baoding 071000, Hebei)

**Abstract** *Salmonella* is among the four leading culprits of diarrhoeal afflictions and poses a considerable risk to human health. Based on the various action modes and colour rendering principles of cresol red (CR) and hydroxynaphthol blue (HNB), a colorimetric detection of *Salmonella* in food by dual-dye SRCA has been created. The first step involved designing the SRCA primers for the *invA* gene of *Salmonella*, followed by optimization of the double-dye addition to establish a dual-dye SRCA colorimetric method. The method underwent evaluation via specificity, sensitivity, and detection limit tests, and its practical application performance was assessed by detecting 60 actual samples. The study identified that the ideal concentration ratio of HNB/CR was 0.6, which equated to 75  $\mu\text{mol/L}$  HNB and 125  $\mu\text{mol/L}$  CR. The test yielded positive results for 8 *Salmonella* strains and negative results for other strains. The sensitivity of the method was 6.8 CFU/mL, which was 100 times higher than that of PCR ( $6.8 \times 10^2$  CFU/mL), and the detection limit was 9.5 CFU/mL,

which was 100 times lower than that of PCR ( $9.5 \times 10^2$  CFU/mL). Importantly, the sensitivity, specificity, accuracy of this method were 100%, 98.2%, and 98.3%. Therefore, the double-dye SRCA colorimetric method can detect *Salmonella* quickly, specifically and accurately. On the one hand, the combination of two dyes produces a higher hue contrast and a wider range of color variation between negative (purple) and positive (green) samples than using a single dye. On the other hand, the colorimetric dyes can be pre-added to the reaction system, which can effectively avoid secondary pollution.

**Keywords** saltatory rolling circle amplification (SRCA); double dyes; colorimetric detection; *Salmonella*