

沙门氏菌 ERA 可视化快速检测方法的建立

杨艳歌¹, 王帅^{1,2}, 李红娜¹, 李涛¹, 吴占文^{1,2}, 孙冬梅^{2*}, 袁飞^{1*}

(¹中国检验检疫科学研究院 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全) 北京 100176

²黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江大庆 163000)

摘要 为实现食品中沙门氏菌的快速检测,选用文献报道的沙门氏菌 RPA 引物和探针,建立酶促等温扩增(ERA)荧光法和显色法两种沙门氏菌可视化快速检测方法,并分析两种方法的特异性、灵敏度、检出限等指标。同时,为满足实验室外现场检测环境的要求,分别采用自热包和热贴作为现场 DNA 提取和 ERA 反应的热源,建立不依赖实验室设备的方法。优化后两种 ERA 方法检测时间分别为 11 min 和 4 min,灵敏度均可达 10^{-2} ng/ μ L,人工污染样品增菌培养 4 h 后检出限为 1 CFU/mL。本研究创新性地将沙门氏菌 RPA 引物探针应用到 ERA 检测体系,建立了荧光法和显色法两种可视化快速检测方法,并集成现场 DNA 提取和 ERA 反应检测套组,提高了扩增效率,摆脱了对传统实验室设备的依赖,对于推进食源性致病菌现场可视化快速检测具有重要意义。

关键词 沙门氏菌; 可视化; 酶促等温扩增技术(ERA); 现场快速检测; 食源性致病菌

文章编号 1009-7848(2023)10-0261-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.10.026

沙门氏菌(*Salmonella*)是环境中广泛存在的一类食源性致病菌,能够引起人畜食物中毒^[1],引起肠道内疾病,表现为急性发热、腹痛、呕吐等症状^[2],也可导致败血症、脑膜炎的发生^[3]。据报道,全球每年约有 9 000 多万例的沙门氏菌感染事件^[4]。我国现行的国标 GB 29921-2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》^[5]中明确规定,肉制品、水产制品、即食蛋制品等食品中不得检出沙门氏菌。目前沙门氏菌的检测方法主要有培养法^[6]、免疫分析法^[7]、PCR 检测法^[8]、芯片检测法^[9]、质谱分析法^[10]、光谱测定法等^[11]。其中传统培养法耗时费力,PCR 法、芯片法、质谱光谱法等均需依赖精准控温的仪器、设备和专业的操作,不适合室外环境快速检测。

酶促等温扩增技术(Enzymatic recombinase amplification, ERA)是我国自主研发的一种新型等温扩增技术,诞生时间较晚,其反应原理与 RPA 技术类似^[12-13],都是在 37~42 °C 的常温环境下,重组酶与引物 DNA 紧密结合的聚合物在模板 DNA

上搜索到完全匹配的互补序列,然后在单链 DNA 结合蛋白的帮助下打开 DNA 双链结构,最后在 DNA 聚合酶的作用下完成扩增产物的指数级扩增。目前关于 ERA 技术的研究主要集中在病毒和临床疾病检测等方面。如曾宇晨等^[14]建立了非洲猪瘟病毒 B646L、EP402R、MGF505/360 基因 ERA 检测方法,并应用到临床样品的检测。Zhang 等^[15]建立了一种检测猪圆环病毒 3 型的 ERA-CRISPR/Cas12a 方法。Yang 等^[16]建立了一种鉴别猪流行性腹泻病毒 PEDV 野生型的 ERA-CRISPR/Cas12a 方法。Liu 等^[17]使用 ERA 试剂盒结合 CRISPR 技术建立一种快速检测癌症细胞耐药基因 *FLT3-F691L* 的方法,40 min 即可获得检测结果。Meng 等^[18]基于 ERA 试剂盒结合 CRISPR 技术建立便捷、即时的检测啤酒腐败菌的方法。然而,目前未见该技术在食源性致病菌快速检测中的报道。

本研究将文献报道的沙门氏菌 RPA 引物探针应用到 ERA 快速检测体系,拟建立荧光法和显色法两种沙门氏菌 ERA 可视化高效快速检测方法,旨在为沙门氏菌可视化快速检测提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡胸肉,购于北京某超市。热贴和自热包,购

收稿日期: 2022-10-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF0607900, 2018YFC1603606)

第一作者: 杨艳歌,女,硕士,副研究员

通信作者: 孙冬梅 E-mail: sdmlzw@126.com

袁飞 E-mail: feiyuan@163.com

于某电商平台。试验用菌,分别购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)、中国医学细菌菌种保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC)和中国检验检疫微生物菌种保藏管理中心(Inspection and Quarantine Culture Collections, IQCC),详见表1。

脑心浸液肉汤培养基(Brain heart infusion, BHI)、脑心浸液琼脂培养基(Brain heart infusion

agar, BHIA), 英国 Oxoid 公司; PrepMan™ Ultra 样品制备试剂, 美国 Thermo Fisher 公司; 基础型核酸扩增试剂盒(ERA 法)、荧光型核酸扩增试剂盒(ERA 法), 苏州先达基因科技有限公司; 酚: 氯仿: 异戊醇(体积比为 25:24:1)、10000×SYBR Green I, 北京索莱宝科技有限公司; 中性红、苯酚红、钙黄绿素, 天津福晨化学试剂厂; 羟基萘酚蓝, 山东酷尔化学有限公司。

表 1 试验用菌株信息

Table 1 Information about the strains used in this study

编号	菌种名称	拉丁名称	菌种号
1	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028
2	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC50013
3	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC53885
4	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enterica</i>	ATCC10708
5	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMCC50018
6	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CMCC44104
7	大肠埃希氏菌 O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	IQCC10193
8	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	IQCC10138
9	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC29930
10	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC27729
11	单增李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	IQCC22291
12	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC26003
13	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876
14	枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC11774
15	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC27562
16	乙型溶血性链球菌	<i>Streptococcus hemolytic-β</i>	CMCC32210

1.2 设备与仪器

Pico 17 离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; 掌上离心机, 美国 SCIOLOGEX 公司; 涡旋混合器, 德国 IKA 公司; 拍击式均质器, 法国 Inter-science 公司; 高压灭菌锅, 以色列 Tuttnauer 公司; DH-420 电热恒温培养箱, 美国 Memmert 公司; 水浴锅, 金坛市白塔新宝仪器厂; BioSpec-nano 核酸蛋白分析仪, 日本岛津公司; 便携式迷你 qPCR 仪, 上海翊辉生物科技有限公司; 电泳仪、全自动凝胶成像系统 PharosFX, 美国伯乐(BIO-RAD)公司。

1.3 方法

1.3.1 引物来源 按参考文献[19]~[22]合成引物及探针序列, 所有引物和探针均由英潍捷基(上

海)贸易有限公司合成, 序列见表2。

1.3.2 沙门氏菌培养及基因组 DNA 提取 将冻干菌粉接种到 5 mL BHI 培养基中, 置恒温培养箱 37 °C 培养 20 h。取菌液, 平板划线接种至 BHIA 培养基中, 于 37 °C 恒温培养箱培养 20 h, 挑取单菌落加入 5 mL BHI 培养基中培养 12 h。取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中 16 000×g 离心 2 min, 去上清, 加入 100 μL PrepMan™ Ultra 样品制备试剂提取液, 涡旋振荡混匀, 然后 100 °C 水浴 10 min, 16 000×g 离心 2 min, 取上清液 50 μL, 即提取的 DNA, 采用核酸蛋白分析仪测其浓度后 -20 °C 保存^[23]。

1.3.3 反应体系与检测程序 ERA 荧光法反应体系参照荧光型核酸扩增试剂盒(ERA 法)使用说明

表 2 引物探针序列信息

Table 2 The information of primers and probes

编号	名称	序列 (5'-3')	来源
1#	1F	ATATTACCAGATATATATTAGAGCAATGGAAAA	[19]
	1R	ATAGCCGAGGTAGTTATCAGTTGTAATTATTG	
	1P	TTTAAGAAATGCCAAAAGACTGCGCCTGCCG (FAM-dT)T (dSpacer) (BHQ1-dT)CACTCTC-CAACGCCG(c3-spacer)	
2#	2F	TATCAGATAAAAACCTCCGCTATAACACAGT	[20]
	2R	CTTTCCGATAAGCGAGGTTTGGAGGCTGAT	
	2P	GATAAAAACCTCCGCTATAACACAGTTTA (FAM-dT)C (THF)G (BHQ1-dT)ATGGCTGGGCGTT (c3-spacer)	
3#	3F	GTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTTCC	[21]
	3R	GCATCGGCTTCAATCAAGATAAGACGACTGGT	
4#	4F	TATCAGATAAAAACCTCCGCTATAACACAGT	[22]
	4R	CTTTCCGATAAGCGAGGTTTGGAGGCTGAT	
	4P	GATAAAAACCTCCGCTATAACACAGTTTA (FAM-dT)C (THF)G (BHQ1-dT)ATGGCTGGGCGTT (c3-spacer)	

书制备预混液,基础型 ERA 体系(显色法)参照基础型核酸扩增试剂盒(ERA)说明书制备预混液,模板量均为 1 μL 。预混液混匀后取 48 μL 转移至 ERA 酶粉反应管,向管盖滴加 2 μL 激活剂,盖紧后涡旋瞬时离心,ERA 荧光反应体系放入便携式迷你 qPCR 仪。设置反应程序为:39 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 s;39 $^{\circ}\text{C}$ 反应 14 s,40 个循环。在第二反应阶段收集 FAM 荧光信号,检测阈值设为自动。ERA 显色法反应程序设置为:39 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 15 min。反应结束,取 25 μL 扩增产物加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),振荡混匀后充分离心,上清用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。其余扩增产物用于后续显色法试验。

1.3.4 引物探针筛选 以表 1 中 5 株沙门氏菌为模板,采用表 2 中编号 1、2、4 的 3 套引物探针进行 ERA 荧光法检测,采用表 2 中的 4 组引物(编号 1、2、3、4)进行基础型 ERA 检测,比较扩增效果。对扩增效率较好的引物和探针进行特异性分析。以肠炎沙门氏菌为检测对象,以表 1 中编号 6~17 的 12 种菌为特异性分析的阴性对照菌株。通过上述试验,筛选扩增效率高、特异性好的引物探针组合进行后续试验。所有 DNA 样品质量浓度统一为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$,以无菌 ddH₂O 为阴性对照,做 3 次重复试验。

1.3.5 显色法的建立 为满足基础型 ERA 快速的需求,需建立一种现场可视化分析方法以取代电泳法。分别配制 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的中性红、羟基萘酚蓝、苯酚红、钙黄绿素,以及 1000 \times SYBR Green I 溶液。ERA 反应后,分别向管中添加 1, 1.5, 2.5, 2.5 μL 和 3.5 μL 上述显色液,选择能明显区分阳性和阴性结果的显色剂和剂量。所有 DNA 样品质量浓度统一为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$,以无菌 ddH₂O 为阴性对照,做 3 次重复试验。

1.3.6 ERA 检测方法反应程序优化 为建立可视化 ERA 快速检测方法,对 ERA 检测程序进行优化。

1) ERA 荧光法反应程序优化 将 1.3.3 节 ERA 荧光法反应程序中的循环数分别缩短为 35, 30, 25 和 20,以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的 DNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)为模板,采用 1.3.4 节筛选的最佳引物探针组合进行 ERA 反应,比较扩增结果并确定荧光型 ERA 快速反应程序。试验过程中以无菌 ddH₂O 为空白对照。每个反应设置 2 个平行,做重复试验 2 次($n=4$)。

2) ERA 显色法反应程序优化 将 1.3.3 节基础型 ERA 反应程序的扩增时间分别缩短到 12, 10, 8, 6 min 和 4 min,以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的 DNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)为模板,以 1.3.4 节

筛选的最佳引物组合进行 ERA 反应,比较扩增结果并确定 ERA 显色法快速反应程序。以无菌 ddH₂O 为空白对照,做 3 次重复试验。

1.3.7 不依赖仪器的 ERA 显色法的建立 为满足现场检测的需求,对 DNA 提取和 ERA 检测中需要依赖传统实验室设备的步骤进行改良。以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 为研究对象,采用自热盒加热的方法代替传统水浴锅进行 DNA 提取,同时用温度计监测沸腾时的温度和维持时间。采用核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度和纯度。使用热帖加热的方式代替 PCR 仪或等温扩增仪进行 ERA 检测,同时用温度计监测热帖达到 ERA 反应最适温度的时间,采用显色法进行结果分析,电泳法验证检测效果。以上试验均重复 3 次。

1.3.8 ERA 可视化快速检测方法灵敏度分析 为分析建立的 ERA 可视化快速检测方法的灵敏度,将肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的 DNA 稀释至 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² ng/μL, 采用 1.3.6 节确定的快速反应程序进行荧光法和显色法 ERA 反应,分析两种 ERA 快速可视化方法的检测灵敏度。以无菌 ddH₂O 为空白对照,做 3 次重复试验。

1.3.9 ERA 可视化快速检测法对人工污染样品的检出限分析 以鸡肉为基质,按 GB 4789.4-2016^[24] 方法制备人工污染沙门氏菌的样品。向均质液中添加 1 mL 浓度为 10³, 10², 10¹, 10⁰ CFU/mL 的肠炎沙门氏菌 ATCC10708 培养液,37 °C 增菌培养 0, 2, 4 h 后,按 1.3.7 节步骤提取 DNA。分析人工污染样品的检出限。以无菌 ddH₂O 为空白对照,做 3

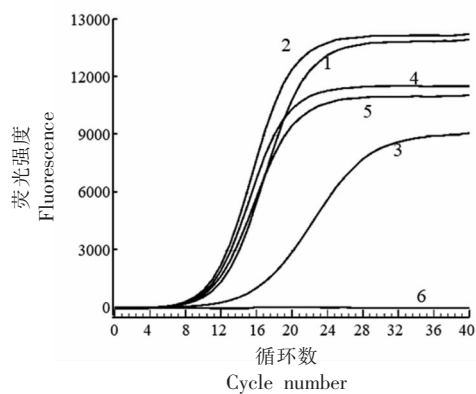
次重复试验。

2 结果

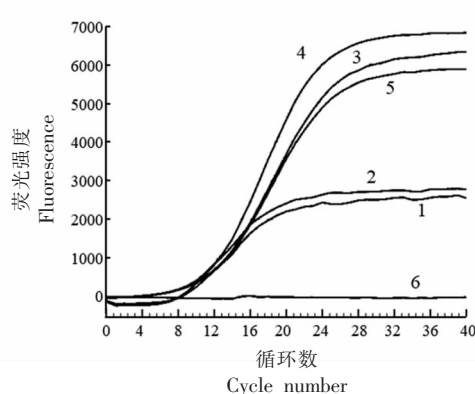
2.1 ERA 荧光法的建立

2.1.1 ERA 荧光法检测引物探针的筛选结果 采用表 2 中 3 组引物探针(编号 1[#]、2[#]和 4[#])进行 ERA 扩增效果分析,发现 1[#]引物探针不仅能同时扩增 5 种沙门氏菌,而且扩增效率比 2[#]和 4[#]的效果好(图 1a~1c)。为进一步分析该引物探针组合在 ERA 荧光法反应体系中的特异性,以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 为检测对象,对食品中常见的食源性致病菌,如枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等 12 种阴性对照菌,使用 1[#]引物探针进行 ERA 特异性分析。结果显示,1[#]引物探针仅能特异性扩增肠炎沙门氏菌 ATCC10708,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等 12 种非沙门氏菌的食源性致病菌均未扩增(图 1d),表明该引物探针在 ERA 反应体系中对沙门氏菌特异,可用于 ERA 荧光法快速检测体系的建立。

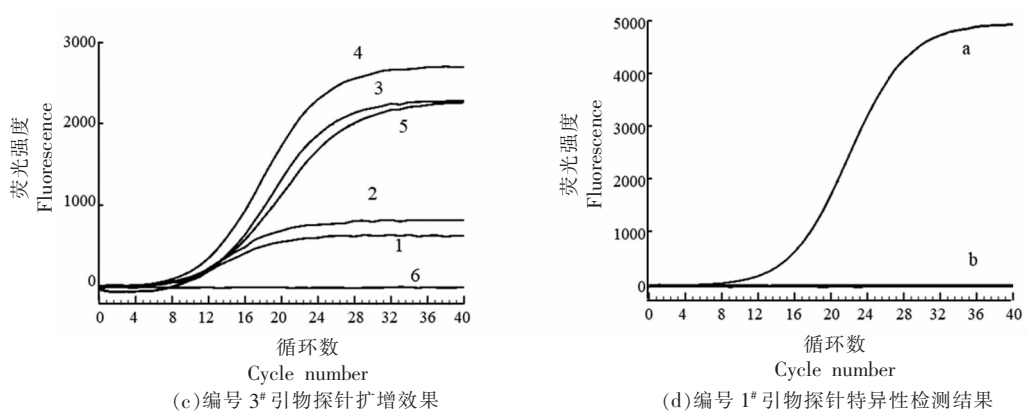
2.1.2 ERA 荧光法快速反应程序的建立 为缩短检测时间,以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 为模板,依托便携式迷你 qPCR 仪,对 ERA 荧光法的检测程序进行优化。扩增结果显示,当扩增循环数设为 40 时,ERA 结果的重复性最好,扩增效率最高,此时检测时间为 17 min(图 2a)。随着反应时间的缩短,ERA 结果重复性虽有所降低,但起峰时间和荧光值变化不大,扩增效率仍较好(图 2b~2d)。当扩增循环数降到 20 时,反应时间虽仅需 9



(a) 编号 1[#] 引物探针扩增效果



(b) 编号 2[#] 引物探针扩增效果



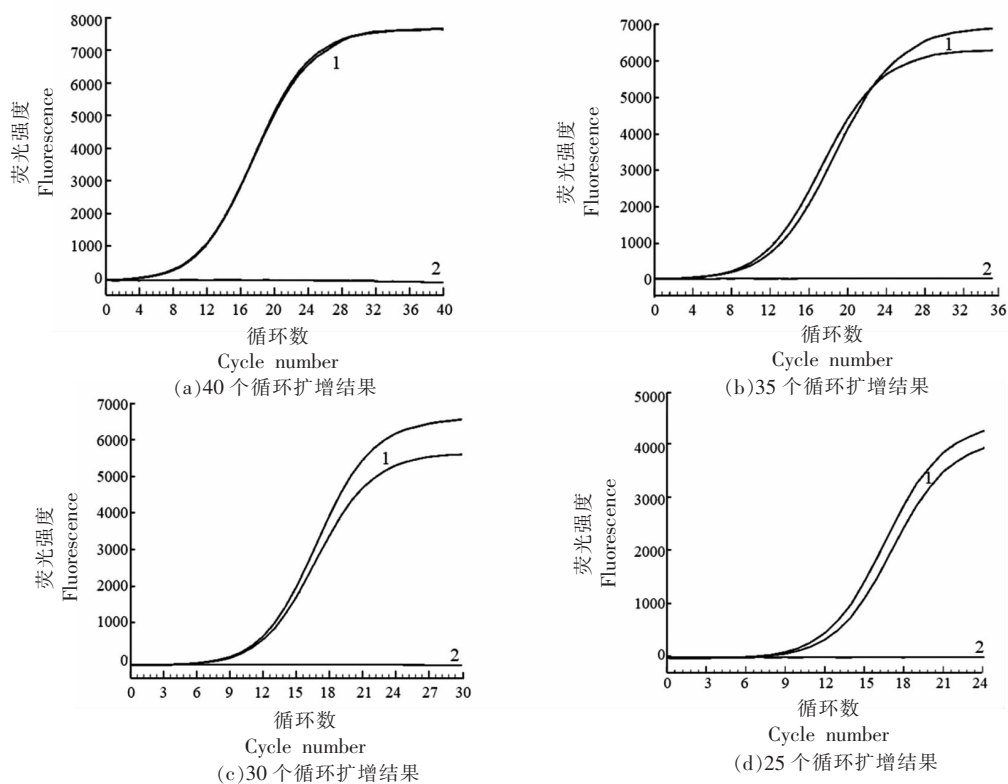
注：1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028;2. 鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50013;3. 肠炎沙门氏菌 ATCC53885;4. 肠炎沙门氏菌 ATCC10708;5.猪霍乱沙门氏菌 CMCC50018;6.空白对照。a.肠炎沙门氏菌 ATCC10708;b.其它菌种(大肠埃希氏菌 CM-CC44104、大肠埃希氏菌 O157:H7、大肠埃希氏菌 IQCC10138、宋内氏志贺氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、创伤弧菌、乙型溶血性链球菌)及空白对照。

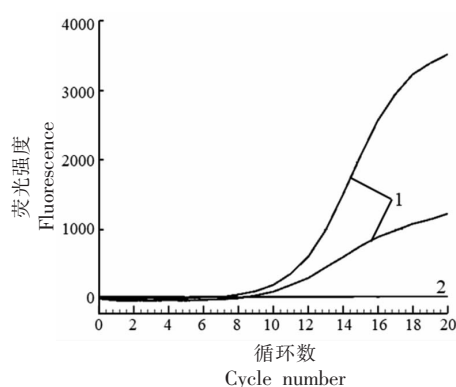
图 1 沙门氏菌引物探针筛选结果

Fig.1 Results of *Salmonella* primer probe screening

min,但扩增曲线的重复性较差,荧光值也降低较多(图 2e),说明该程序对扩增效果有影响。从节约时间的角度考虑,在保证检测效率的情况下,

ERA 荧光法快速反应程序设定为:39 °C 反应 1 s;39 °C 反应 14 s,25 个循环。此时,检测时间仅需 11 min。





(e)20个循环扩增结果

注:1.肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的 2 个平行重复;2.空白对照。

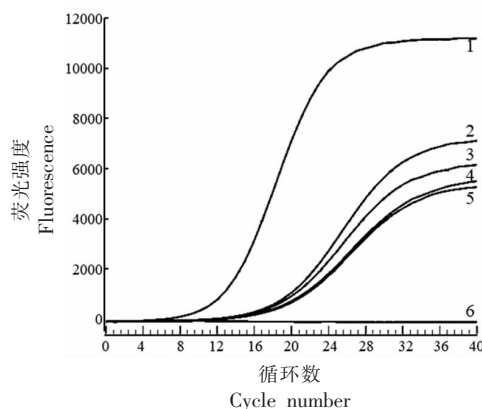
图2 ERA 荧光法快速反应程序优化

Fig.2 Optimization of rapid reaction procedure for ERA fluorescence method

2.1.3 ERA 荧光法检测的灵敏度分析 分析建立的 ERA 荧光法对沙门氏菌的检测灵敏度,分别以 DNA 质量浓度为 $10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$ ng/ μ L 的肠炎沙门氏菌 ATCC10708 为模板,检测结果见图 3。当 DNA 质量浓度为 10^{-2} ng/ μ L 时仍被检出,扩增效果良好。最终确定本研究建立的 ERA 荧光法检测沙门氏菌的最低灵敏度为 10^{-2} ng/ μ L。

2.2 ERA 显色法的建立

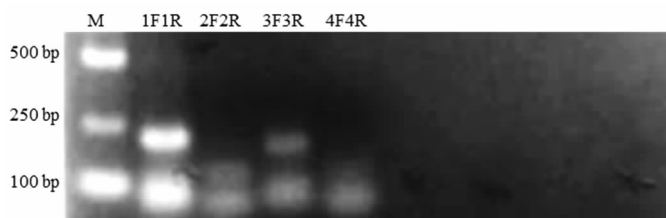
2.2.1 基础型 ERA 引物筛选 采用表 2 中 4 组沙门氏菌 PRA 引物进行 ERA 反应,扩增效果如图 4a 所示。1F1R 和 3F3R 的扩增效果较好。对这两组引物的特异性以及对 5 种沙门氏菌的覆盖性进行分析,结果显示:1F1R 对 5 种鼠伤寒沙门氏菌的扩增效果较好,且其它 12 种非沙门氏菌的食源性致病菌均无扩增。引物 3F3R 虽也对沙门氏菌特异,但对鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 的扩增效果较差(图 4b)。后续试验以 1F1R 为沙门氏菌



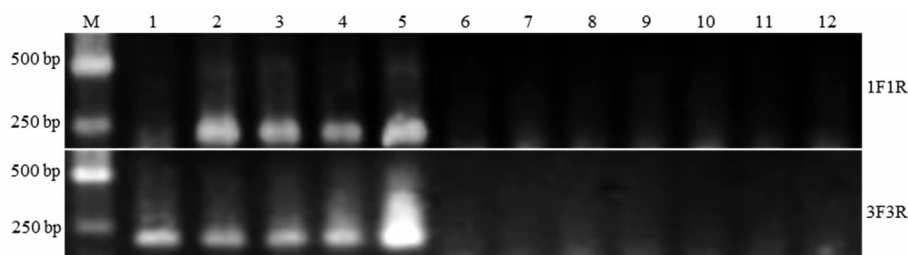
注:1~5. 肠炎沙门氏菌 ATCC10708 DNA 质量浓度分别为 $10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$ ng/ μ L;6. 空白对照。

图3 建立的 ERA 荧光法的灵敏度分析结果
Fig.3 Sensitivity analysis results of fluorescent ERA reaction

基础型 ERA 检测的引物。



(a)4 种引物组合对肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的扩增效果比较



(b)引物组合 1F1R 和 3F3R 对沙门氏菌检测的特异性和覆盖度

注: M. 分子量 Marker DL 2 000 bp, 片段大小分别为 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp; 1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028; 2. 鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50013; 3. 肠炎沙门氏菌 ATCC53885; 4. 肠炎沙门氏菌 ATCC10708; 5. 猪霍乱沙门氏菌 CMCC50018; 6~12. 其它菌种(大肠埃希氏菌 CMCC44104、大肠埃希氏菌 O157: H7、大肠埃希氏菌 IQCC10138、宋内氏志贺氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、创伤弧菌、乙型溶血性链球菌)。

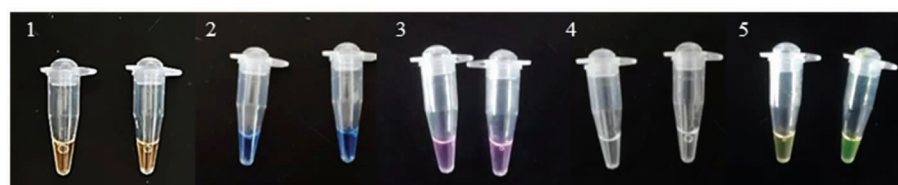
图 4 沙门氏菌基础型 ERA 引物筛选

Fig.4 Primers screening of basic ERA method for *Salmonella*

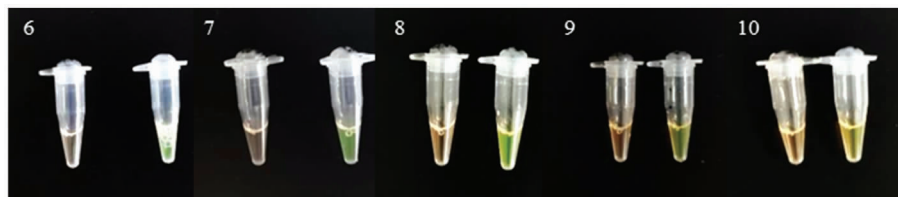
2.2.2 显色剂的筛选 对基础型 ERA 检测结果的传统分析需采用电泳检测和凝胶呈像。为满足现场检测的要求, 本研究欲建立一种现场显色法以取代电泳法。常见的显色剂包括: 中性红、羟基萘酚蓝、苯酚红、钙黄绿素和 1000×SYBR Green I 等。本试验比较基础型 ERA 反应后采用上述显色剂的检测效果, 结果如图 5a 所示。添加中性红、苯酚红酸碱指示剂, 以及羟基萘酚蓝、钙黄绿素离子检测剂时无法区分阳性样品和空白对照。若加入核酸染料 SYBR Green I, 则阳性样品呈绿色, 空白对照显橙色, 两者形成明显对照, 并可通过肉眼观察结果。后续选择 1000×SYBR Green I 作为基

础型 ERA 反应的显色剂。

为分析显色剂添加量对检测结果的区分效果, 对 1000×SYBR Green I 的添加量进行分析。分别向 ERA 反应后的产物中添加 1, 1.5, 2.5, 2.5, 3.5 μL 的 1000×SYBR Green I, 颠倒混匀后观察颜色变化, 结果如图 5b 所示。可以看出, 当添加量为 1~2.5 μL 时, 均能区分阳性结果与空白对照, 其中添加量为 2 μL 时, 区分效果最明显。而当添加量增到 3 μL 时, 阳性样品与空白的颜色差距不大, 基本呈现 1000×SYBR Green I 染料的颜色, 无法区分二者。最终确定后续 ERA 显色法试验 1000×SYBR Green I 的添加量为 2 $\mu\text{L}/25 \text{ mL}$ 反应



(a)ERA 反应产物加入 5 种显色剂的显色结果



(b)添加不同量 1000×SYBR Green I 的显色情况

注: 1. 中性红; 2. 羟基萘酚蓝; 3. 苯酚红; 4. 钙黄绿素; 5. 1000×SYBR Green I; 6. 加入 1 μL 1000×SYBR Green I; 7. 加入 1.5 μL 1000×SYBR Green I; 8. 加入 2 μL 1000×SYBR Green I; 9. 加入 2.5 μL 1000×SYBR Green I; 10. 加入 3 μL 1000×SYBR Green I。

图 5 基础型 ERA 法显色剂的选择

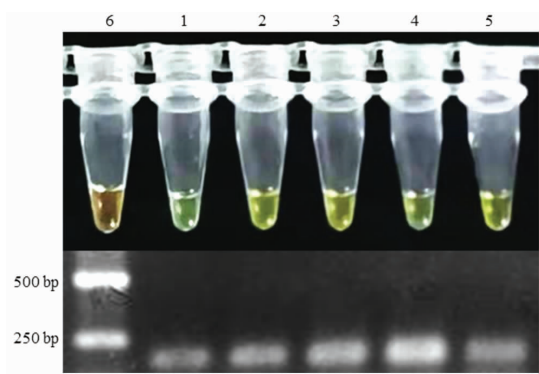
Fig.5 Chromogenic agents screening of basic ERA method

产物。

2.2.3 ERA 显色法快速检测反应程序优化 为缩短 ERA 显色法检测的时间,以肠炎沙门氏菌 ATCC10708 为模板,对基础型 ERA 的扩增程序进行优化,分别用电泳法和显色法观察结果。如图 6 所示,扩增时间从原始扩增程序的 15 min 降到 4 min 的过程中均可明显区分阳性结果与空白对照,即 ERA 显色法只需 4 min 即可进行结果分析。从节约时间的角度,在满足检测要求的情况下,后续基础型快速检测的反应程序设定为:39 °C 等温扩增 4 min。

2.2.4 不依赖仪器的 ERA 显色法的建立 无论是采用煮沸法提取致病菌的 DNA,还是 ERA 检测都需要加热设备,如水浴锅、PCR 仪或等温扩增仪等。为摆脱现场检测对传统实验室设备的依赖,以

自热盒取代水浴锅,提供 DNA 提取所需温度环境。结果显示:自热盒 1 min 30 s 开始出现气泡(84 °C,图 7a 左),20 min 内保持 80~84 °C。提取的 DNA 质量浓度 (285.44 ± 2.13)ng/ μ L 与传统煮沸法 (315.65 ± 10.99)ng/ μ L 差异不大,纯度平均值几乎相同,可满足后续 ERA 反应的要求。然后,使用热帖代替 PCR 仪或等温扩增仪,以提供现场 ERA 反应所需温度。撕开热帖包装 5 min 后温度可达 37 °C(图 7a 右),即 ERA 反应要求的温度下限;20 min 后可达 42 °C,即 ERA 反应的上限温度。采用此法进行 ERA 快速检测,显色结果如图 7b 所示,阳性样品呈现明显的绿色,而空白为橙色,区分效果良好。电泳结果也显示良好的扩增条带,证实建立的不依赖仪器的 ERA 显色法可行。

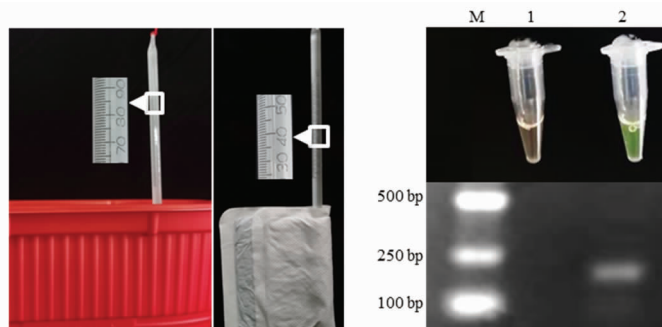


注:1~5. 反应时间 4,6,8,10,12 min;6. 空白对照。

图 6 ERA 显色法反应时间优化结果
Fig.6 Reaction time optimization results
of ERA chromogenic method

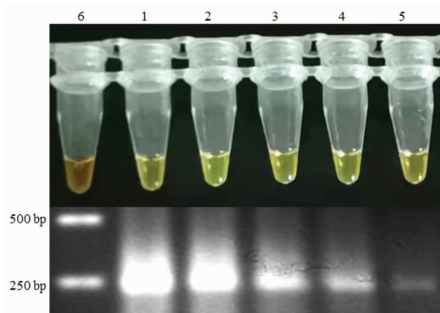
2.2.5 不依赖仪器的 ERA 显色法灵敏度分析

为分析上述建立的不依赖仪器的 ERA 显色法的检测灵敏度,分别以模板质量浓度为 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ng/ μ L 的肠炎沙门氏菌 ATCC10708 进行检测,结果见图 8。当模板质量浓度低至 10^{-2} ng/ μ L 时显色仍为绿色,与空白对照区分明显,对应的电泳结果有清晰的目的条带。最终确定建立的不依赖仪器的 ERA 显色法对沙门氏菌的检测灵敏度低至 10^{-2} ng/ μ L。



(a)不依赖仪器的 DNA 提取和 ERA 反应装置及温度监测情况
(b)不依赖仪器的 ERA 反应检测结果
注: M.分子量 Marker DL 2 000 bp,片段大小分别为 100,250,500,750,1 000,2 000 bp;1.空白对照;2.阳性样本。

图 7 不依赖仪器的 ERA 显色法检测结果
Fig.7 Results of ERA chromogenic method
without instruments

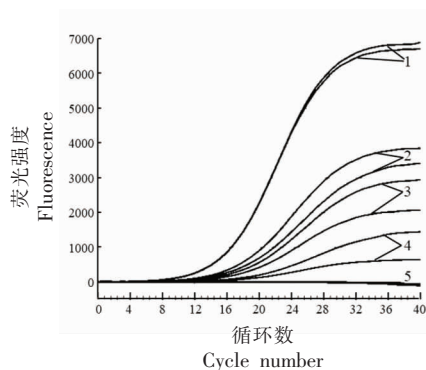


注:1~5. 模板质量浓度分别为 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ng/ μ L; 6. 空白对照。

图 8 ERA 显色法灵敏度检测结果
Fig.8 Sensitivity for *Salmonella* of ERA
chromogenic method

2.3 人工污染试验

对人工污染肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的污染量分别为 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 的样品增菌 0~4 h, 并提取 DNA, 分析建立的 2 种 ERA 可视化快速检测方法的实际检出限。结果显示:前增菌 2 h, 两种方法最低可检出浓度为 100 CFU/mL 的沙门氏菌, 前增菌 4 h 最低可检出 1 CFU/mL 的沙门氏菌(表 3)。图 9 显示增菌 4 h 的检测结果。随着污染量的降低, 荧光法的扩增效率逐渐降低(图 9a)。显色法结果显示试验组均有绿色荧光, 与空白对照差别明显, 对应的电泳条带亮度逐渐下降。最终确定本研究建立的两种 ERA 可视化快速检测方法前增菌 4 h 的检出限均为 1 CFU/mL。



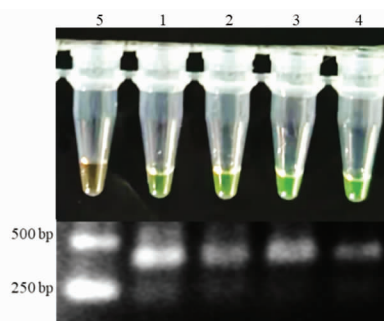
(a) 增菌 4 h ERA 荧光法检测结果

表 3 人工污染样品检测结果

Table 3 Test results of artificially contaminated samples

检测方法	增菌 时间/h	菌浓度/CFU·mL ⁻¹			
		10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
ERA 荧光法	0	-	-	-	-
	2	+	+	-	-
	4	+	+	+	+
ERA 显色法	0	-	-	-	-
	2	+	+	-	-
	4	+	+	+	+

注:“+”代表检测结果阳性;“-”代表检测结果阴性。



(b) 增菌 4 h ERA 显色法和电泳法检测结果

注: 1~4. 人工污染肠炎沙门氏菌 ATCC10708 的污染量为 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 CFU/mL; 5. 空白对照。

图 9 建立的 ERA 可视化快速检测方法对人工污染样品的检测结果

Fig.9 Detection results of artificially contaminated samples by ERA visual detection method

3 讨论

在我国, 每年都有因食源性致病菌导致的中毒事件发生。目前, 食源性致病菌的检测主要采用 GB 4789 规定的培养法, 检测周期 4~6 d, 时间长、流程复杂且需经验丰富的检测人员。面对当今生鲜农产品快速流通的现状, 这种耗时较长的检测手段无法满足市场快速筛查的需求。近年, 已报道许多食源性致病菌快速检测方法。例如, 魏莹等^[25]根据 *CepA* 基因设计了针对 A 族乙型溶血性链球菌的 RPA 引物和探针, 在 39 °C 恒温下, 20 min 内可检出 10 copies/ μ L 的目的基因。Yang 等^[26]综述 LAMP 在沙门氏菌检测方面的研究进展, 并分析其在食品等领域的应用前景。陈佳平等^[27]

通过 *rfbE* 基因设计 RPA 引物及探针, 能够快速、准确区分大肠杆菌 O157 血清型与非 O157 血清型的菌株。Jiang 等^[28]针对副溶血弧菌设计 RPA 引物探针, 将其应用到生蚝中副溶血弧菌的检测, 针对实际样品的检测灵敏度达 2 CFU/g。刘立兵等^[29]基于 RPA 技术建立了一种产气荚膜梭菌的快速检测方法, 仅需 3~13 min 即可检出人工污染样品中的阳性样品, 检出限为 1×10^2 CFU/mL。王妙妹等^[30]建立了一种通过可视化单引物等温扩增技术检测发酵乳制品中沙门氏菌的方法, 对纯培养物的检出限为 3.2×10^1 CFU/mL。

ERA 技术诞生时间较晚, 目前研究主要集中在病毒和临床疾病检测等方面, 在食源性致病菌

快速检测方面缺乏报道。本研究创新性地将文献报道的RPA引物探针应用至ERA检测体系,首次建立沙门氏菌ERA可视化快速检测方法,为食源性病原菌的快速检测提供了新思路和新方法。研究过程中,首先依托国产便携式迷你qPCR仪建立ERA荧光法,检测时间仅需11 min。该仪器仅A4纸大小,可携带至现场检测,且具有无运动光学部件,移动运输无需校准维护。目前已集成一个从DNA提取到ERA可视化快速检测为一体的便携式快速检测箱,可为口岸、野外等应用场景的现场快速检测提供良好的技术装备。其次,筛选基础型ERA检测的显色剂,建立ERA显色法,并且创新性地使用自热包和热帖进行DNA提取和ERA反应,集成了不依赖仪器的现场可视化快速检测装备,从而摆脱了对传统设备如水浴锅、PCR仪、等温扩增仪等的依赖,不仅降低了检测成本,而且自热包的升温速度更快,能够显著缩短DNA提取所需时间,从DNA提取到可视化检测整个流程仅需10 min左右。本研究建立的沙门氏菌ERA可视化快速检测方法特异性好、灵敏度高、操作简单、成本低廉、不依赖设备,十分适合在现场和基层检测中应用推广,可为我国食品安全监管和口岸食品查验提供技术支持。采用的ERA检测试剂和集成的便携式现场快速检测装备均为我国自主研发,对打破国外试剂装备垄断,突破国外“卡脖子”技术具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 彭亚博, 李晓婷, 方婷, 等. 鸡肉中沙门氏菌和背景菌群生长动力学模型[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 7-15.
PENG Y B, LI X T, FANG T, et al. Modelling growth kinetics of *Salmonella* and background microorganisms in chicken[J]. Food Science, 2019, 40(9): 7-15.
- [2] 侯悦, 刘洁. 肠炎沙门氏菌中侵袭相关毒力基因研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3867-3873.
HOU Y, LIU J. Research progress of invasion-related virulence genes in *Salmonella enteritidis* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(10): 3867-3873.
- [3] KI A, KSAB C, AI A, et al. Invasive *Salmonella enteritidis* infection complicated by bacterial meningitis and vertebral osteomyelitis shortly after influenza a infection in an immunocompetent young adult [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(2): 269-273.
- [4] 诸宏伟, 臧欢欢, 刘培培, 等. 肺炎克雷伯菌外排泵基因研究与耐药性的关系[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(15): 2133-2134, 2139.
ZHU H W, ZANG H H, LIU P P, et al. Relationship between gene expression and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* effervescent pump[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2020, 17(15): 2133-2134, 2139.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量: GB 29921-2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 1-6.
National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard limit of pathogenic bacteria in prepackaged food: GB 29921-2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021: 1-6.
- [6] KUIJPERS L M F, POST A S, JACOBS J. Chromogenic media for the detection of *Salmonella enterica* serovar paratyphi A in human stool samples: Evaluation in a reference setting[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018, 37(11): 2181-2190.
- [7] 王晓海. 沙门菌 H:g 单抗竞争 ELISA 方法的建立与应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
WANG X H. Development and preliminary application of competitive ELISA for detection of *Salmonella enteritidis* based on monoclonal antibody against H: g antigen[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020.
- [8] BRUNDABAN S, SHIVA D S, KUMAR B B, et al. Rapid detection of *Salmonella* contamination in seafoods using multiplex PCR[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2019, 50(3): 807-816.
- [9] SARENGAOWA, HU W Z, FENG K, et al. An in situ-synthesized gene chip for the detection of food-borne pathogens on fresh-cut cantaloupe and lettuce

- [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 5(10): 3089.
- [10] YANG S M, KIM E, KIM D, et al. Rapid detection of *Salmonella enteritidis*, *Typhimurium* and *Thompson* by specific peak analysis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Foods*, 2021, 10(5): 933.
- [11] 李惠静. 食品中沙门氏菌检测现状分析[J]. *现代食品*, 2019(9): 24–25.
- LI H J. Status analysis of *Salmonella* detection in food[J]. *Modern Food*, 2019, (9): 24–25.
- [12] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6): 47–53.
- JING Z G, DONG H, DI D D, et al. Research progress of recombinant enzyme polymerase amplification technology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(6): 47–53.
- [13] 刘迪, 许鑫燕, 郑亚婷, 等. 猫疱疹病毒 ERA-LFD 检测技术的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(1): 11–18.
- LIU D, XU X Y, ZHENG Y T, et al. Establishment and application of ERA-LFD detection technology of feline herpesvirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(1): 11–18.
- [14] 曾宇晨, 龚浪, 王京煜, 等. 基于 *B646L*、*EP402R*、*MGF360/505* 基因的非洲猪瘟病毒 ERA 检测方法的建立[J]. *华南农业大学学报*, 2021, 42(5): 33–40.
- ZENG Y C, GONG L, WANG J Y, et al. Development of ERA detection method for African swine fever virus based on *B646L*, *EP402R* and *MGF360/505* genes[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2021, 42(5): 33–40.
- [15] ZHANG W Y, XU L, LIU Q, et al. Enzymatic recombinase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for ultrasensitive, rapid, and specific porcine circovirus 3 detection[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 59: 101763.
- [16] YANG K, LIANG Y, LI Y, et al. Reverse transcription-enzymatic recombinase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for rapid detection and differentiation of PEDV wild-type strains and attenuated vaccine strains[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(30): 7521–7529.
- [17] LIU Y, CHEN Y L, HUANG S S, et al. Rapid and sensitive diagnosis of drug-resistant FLT3-F691L mutation by CRISPR detection[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 25(8): 753276.
- [18] MENG Q Z, YANG H M, ZHANG G Q, et al. CRISPR/Cas12a-assisted rapid identification of key beer spoilage bacteria[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 74: 102854.
- [19] 李轲, 郭华麟, 禹建鹰, 等. 3 种病原菌多重 IMS-荧光 RPA 检测体系的建立及初步应用[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(3): 106–112.
- LI K, GUO H L, YU J Y, et al. Establishment and preliminary application of multiple IMS real-time-rpa detection system for three pathogen bacteria[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(3): 106–112.
- [20] 智安桐. 沙门氏菌和噬肺军团菌的 RPA 检测方法研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2017.
- ZHI A T. Study on the RPA assay for detection of *Salmonella* and *Legionella pneumophila*[D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2017.
- [21] 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.
- LIU L B, GENG Y Y, JIANG Y F, et al. Development and application of recombinase polymerase amplification assay for detection of *Salmonella*[J]. *Food Science*, 2019, 40(2): 298–303.
- [22] 程辉, 梁奕, 俞圣韬, 等. 双重 RT-RPA 法快速检测沙门氏菌及其 1 类整合酶基因[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(4): 661–668.
- CHENG H, LIANG Y, YU S T, et al. Development of a duplex real-time recombinase polymerase amplification (RT-RPA) assay for efficient detection of *Salmonella* and drug-resistant related class 1 integron[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(4): 661–668.
- [23] 王丹丹, 李莉, 杨艳歌, 等. 克罗诺杆菌属快速检测体系的建立[J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 286–292.
- WANG D D, LI L, YANG Y G, et al. Establishment of a rapid detection system for *Cronobacter* spp.[J]. *Food Science*, 2021, 42(16): 286–292.
- [24] 国家药品监督管理局. 食品安全国家标准 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: 1–16.
- National Medical Products Administration. National standard for food safety food microbiological test *Salmonella* test: GB 4789.4–2016[S]. Beijing: Stan-

- dards Press of China, 2016: 1-16.
- [25] 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, 323.
- WEI Y, GUO L C, ZHANG X P, et al. Establishment of recombinase aided amplification assay for group a *Streptococcus pyogenes* detection[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2018, 41(5): 314-316, 323.
- [26] YANG Q R, DOMESLE K J, GE B L. Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: Current applications and future directions[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(6): 309-331.
- [27] 陈佳平, 兰全学. 荧光型重组酶聚合酶扩增技术检测食品中大肠埃希氏菌 O157[J]. 食品科技, 2020, 45(3): 326-332.
- CHEN J P, LAN Q X. Detection of food-borne *Escherichia coli* O157 based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(3): 326-332.
- [28] JIANG W, REN Y L, HAN X G, et al. Recombi-
- nase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(12): 2903-2914.
- [29] 刘立兵, 李睿文, 陈志敏, 等. 产气荚膜梭菌实时荧光 PCR 和实时荧光 RPA 检测方法的建立和比较[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 268-272.
- LIU L B, LI R W, CHEN Z M, et al. Development and comparison of real-time polymerase chain reaction and real-time recombinase polymerase amplification assays for detection of *Clostridium perfringens* in food[J]. Food Science, 2020, 41(4): 268-272.
- [30] 王妙妹, 范春刚, 郑玮丽, 等. 可视化单引物等温扩增技术检测发酵乳制品中沙门氏菌的研究[J]. 农产品加工, 2021(17): 53-56.
- WANG M S, FAN C G, ZHENG W L, et al. Study on detection of *Salmonella* in fermented dairy products by visual single primer isothermal amplification method[J]. Farm Products Processing, 2021(17): 53-56.

Establishment of ERA Visual Rapid Detection Methods for *Salmonella*

Yang Yang¹, Wang Shuai^{1,2}, Li Hongna¹, Li Tao¹, Wu Zhanwen^{1,2}, Sun Dongmei^{2*}, Yuan Fe^{1*}
 (¹Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176

²College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, Heilongjiang)

Abstract In order to realize the rapid detection of *Salmonella* in food, in this study, the *Salmonella* RPA primers and probes reported in the literature were used to establish the enzymatic recombinase amplification (ERA) fluorescence method and chromogenic method for visualization of *Salmonella*. Then, the specificity, sensitivity and detection limit of the two methods were analyzed. Furthermore, considering the requirements of the on-site detection environment outside the laboratory, the self-heating box and heat stickers were used as heat sources for DNA extraction and ERA reaction on-site, respectively. The optimized detection time was only 11 min and 4 min respectively, and the sensitivity was up to 10^{-2} ng/ μ L. The detection limit of artificially contaminated samples was 1 CFU/mL after culture for 4 h. This study innovatively applied RPA primers and probe applied to ERA detection system, established two visual rapid detection methods: fluorescence method and chromogenic method, and integrated on-site DNA extraction and ERA reaction devices. In this study, the *Salmonella* RPA primer probe was innovatively applied to the ERA detection system, two visual and rapid detection methods, fluorescence method and chromogenic method were established, and the on-site DNA extraction and ERA reaction detection kit were integrated to improve the amplification efficiency. And get rid of the dependence on traditional laboratory equipment, it is of great significance to promote the rapid detection of food-borne pathogens on-site visualization.

Keywords *Salmonella*; visualization; enzymatic recombinase amplification (ERA); rapid detection on-site; foodborne pathogens