

# 酶促重组酶扩增-侧流层析快速检测沙门菌的方法研究

聂艳妮<sup>1,2</sup>, 闫梅英<sup>3</sup>, 宋衍燕<sup>2</sup>

1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040; 2. 北京市朝阳区疾病预防控制中心微生物检验科, 北京 100020;  
3. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

**摘要:** **目的** 建立一种酶促重组酶扩增(ERA)和侧流层析技术(LF)相结合的沙门菌快速检测方法, 为沙门菌现场检测提供技术支持。**方法** 根据沙门菌属高度保守的鞭毛基因*fimY*设计特异性ERA引物, 采用毛细管电泳筛选合适的引物, 再设计探针, 对扩增温度和时间进行优化, 建立ERA-LF检测体系对菌株DNA进行扩增, 采用侧向流纸条检测产物。采用鼠伤寒沙门菌标准菌株检验方法的灵敏度, 采用10种其他肠道感染标准菌株检验特异度, 采用实际分离到的沙门菌验证对实际样本检测能力。**结果** 经过毛细管电泳筛选获得沙门菌特异性引物, 在扩增温度为37℃、反应时间为20 min的条件下, 最低检测浓度为5 copies/ $\mu$ L。本方法对沙门菌核酸扩增结果为阳性, 10株其他肠道感染菌核酸扩增结果均为阴性, 特异度较好。对100株(包含10种血清型)沙门菌进行检测, 结果均显示阳性。**结论** 本研究建立的ERA-LF方法可用于沙门菌的现场即时检测。

**关键词:** 酶促重组酶扩增; 侧流层析; 沙门菌; 即时检测

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087(2023)12-1102-03

## Rapid detection of *Salmonella* by enzymatic recombinase amplification combined with lateral flow chromatography

NIE Yanni<sup>1,2</sup>, YAN Meiyang<sup>3</sup>, SONG Yanyan<sup>2</sup>

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014040, China;  
2. Department of Microbiological Testing, Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100020, China;  
3. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid detection method for *Salmonella* based on the combination of enzymatic recombinase amplification (ERA) and lateral flow chromatography (LF), so as to provide technical support for the on-site detection of *Salmonella*. **Methods** Specific ERA primers and probes were designed based on the highly conserved flagella gene *fimY* in *Salmonella*. The primers were screened using capillary electrophoresis, and the probes were designed according to the amplification range of the screened primers. The amplification temperature and time were optimized to establish the amplification method, and the product was detected using LF strips. A standard strain of *Salmonella* was used to verify the sensitivity, 10 other gut bacteria were used to verify the specificity and sensitivity, and the nucleic acid of the actual *Salmonella* strains was amplified to verify the detectability. **Results** After screening for *Salmonella*-specific primers using capillary electrophoresis, the minimum detection concentration was 5 copies/ $\mu$ L under the amplification temperature of 37℃ and reaction time of 20 minutes. This method had a positive amplification result for *Salmonella* nucleic acid, and the amplification results of 10 other gut bacteria were all negative, with good specificity. **Conclusion** This method provides a possibility for on-site point of care testing of *Salmonella* infection.

**Keywords:** enzymatic recombinase amplification; lateral flow; *Salmonella*; point of care testing

传统的沙门菌鉴定方法为细菌培养法, 需要在培养后对菌落进行血清凝集和生化鉴定等, 耗时较长;

目前使用较多的PCR技术虽然灵敏度和特异度高, 但仪器昂贵, 且需要在专门的分子生物实验室检测, 限制了在现场或者基层单位的使用<sup>[1]</sup>。酶促重组酶扩增技术(enzymatic recombinase amplification, ERA)是新型的恒温核酸扩增技术, 利用引物和重组酶形成聚合体与目标序列结合, 在单链DNA结合蛋白的作用

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.12.020

作者简介: 聂艳妮, 硕士, 技士, 主要从事食品安全与环境卫生研究工作

通信作者: 宋衍燕, E-mail: songyanyancdc@163.com

下打开模板 DNA 双链, 在等温聚合酶的作用下延伸和扩增。侧流层析技术 (lateral flow, LF) 是一项基于抗原抗体特异性结合或核酸探针和靶向核酸杂交反应, 使待测物中各组分通过毛细管作用力的移动速度差异在反应基质上实现分离的技术。两者具有灵敏度高、特异性好、反应迅速、操作简单和环境要求低等特点, 不需要昂贵的仪器设备和专业的技术人员, 适用于现场检测<sup>[2-3]</sup>。本研究拟建立一种基于荧光探针的 ERA 与 LF 技术相结合的方法快速检测沙门菌, 为沙门菌相关疫情现场检测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

1 株鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028; 3 株临床分离沙门菌株, 包括鼠伤寒沙门菌 2 株, 肠炎沙门菌 1 株; 10 株其他肠道感染菌标准菌株, 包括金黄色葡萄球菌 ATCC25923、单增李斯特菌 ATCC19115、阪崎肠杆菌 ATCC29545、产气荚膜梭菌 ATCC13124、大肠埃希菌 ATCC25922、蜡样芽孢杆菌 CMCC63303、副溶血性弧菌 ATCC17802、小肠结肠炎耶尔森菌 CMCC52204、奇异变形杆菌 CMCC49005 和福氏志贺菌 CMCC51572。以上菌株均来自于北京市朝阳区疾病预防控制中心。100 株临床分离沙门菌株, 包括 10 种血清型, 分别为德尔卑沙门菌、肯塔基沙门菌、肠炎沙门菌、印第安纳沙门菌、鼠伤寒沙门菌、鼠伤寒单相沙门菌、斯坦利沙门菌、科瓦利斯沙门菌、阿贡纳沙门菌和里森沙门菌, 每型各 10 株, 来源于中国疾病预防控制中心传染病所腹泻病室。以上所有菌株均通过传统生物学方法和 VITEK 2 全自动细菌鉴定仪器进行验证。

### 1.2 设备与扩增试剂

全自动 DNA/RNA 分析系统 (QIAxcel); 低温高速离心机 (Eppendorf 5430R); 精密水浴箱 (Thermo Fisher 2877); 小涡旋混匀仪 (Stuart SA8); 掌氏离心机 (北京大龙 D1008)。基础型核酸扩增试剂盒 (ERA 法)、试纸型核酸扩增试剂盒 (ERA 法) 和侧流层析检测试纸条购自苏州先达基因科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 引物探针设计和筛选

建立 ERA-LF 方法所使用的引物和探针根据沙门菌属高度保守的鞭毛基因 *fimY* 设计<sup>[4]</sup>, 分别由北京擎科生物科技有限公司和昆山普诺普和生物科技有限公司合成, 序列见表 1。采用基础型核酸扩增试剂盒, 以 1 株鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028 和 3

株临床分离沙门菌作为阳性对照, 灭菌去离子水作为空白对照, 金属浴或 37 °C 水浴 20 min, 分别对 3 对引物进行扩增。扩增产物经毛细管电泳筛选到合适的引物后, 再设计相应的探针。

表 1 沙门菌 ERA-LF 引物及探针序列

Table 1 Sequences of *Salmonella* primers and probes for ERA-LF

名称	序列 (5' -3')
f1-F	CCGAAAACGTACCGCAGCATTCCGCTCATTAGATGAC
f1-R	CCAACCTGAGCGCGCTAGCTGGTTAAGCGCCTC
f2-F	ACCTGTCTCTGTATTGAGGCGCTTAACCAGCTACGC
f2-R	CGCCAGCCATACGGATAAACTGTGTTATAGCGG
f3-F	CCTGTGCGGACGACAAAATCTGGCCTCAGTACGCGA
f3-R	TGACGTGCTATTTCTTTTAAAGAGGCGCCTTGCGCT
f2-P	TCAGCCTCCAAACCTCGCTTATCGGAAAGCTTTAGCCG TACTGACTGGTT

注: F代表上游引物, R代表下游引物, P代表探针。

#### 1.3.2 DNA 制备

沙门菌在哥伦比亚血平板上培养过夜, 挑取菌落置于装有 1 mL 无菌生理盐水的 1.5 EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min (离心半径为 10.1 cm), 弃上清液; 向菌体中再加入 1 mL 无菌生理盐水, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液; 加 100 μL 灭菌去离子水, 重悬菌体, 100 °C 水浴 10 min, 冷却至常温, 12 000 r/min 离心 2 min, 留取上清液。从上清液中取 1 μL 沙门菌核酸, 使用 Nanodrop 仪器测定浓度, 并将所使用的模板全部稀释至 10<sup>4</sup> copies/μL 备用。

#### 1.3.3 沙门菌 ERA-LF 检测方法的建立及优化

引物和探针筛选使用的检测体系: 溶解剂 20 μL, 浓度为 10 μmol/L 的上下游引物各 2.1 μL, 浓度为 10 μmol/L 的探针 0.6 μL, 模板 DNA 2 μL, 激活剂 2 μL, 无菌蒸馏水 21.2 μL, 总体积 50 μL。首先将除模板和激活剂以外的试剂 (46 μL) 提前预混, 并充分振荡混匀, 再分别加入 2 μL 模板和 2 μL 激活剂。ERA-LF 方法初步建立后分别对扩增温度 (25 ~ 45 °C) 和反应时间 (10、15、20、25 min) 进行梯度优化。以 1 株鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028 和 3 株临床分离沙门菌株的 DNA 作为阳性对照, 灭菌去离子水作为空白对照, 金属浴或水浴 37 °C 20 min。ERA 反应结束后, 通过侧向流试纸条检测产物中的 DNA。

#### 1.3.4 方法的灵敏度、特异度和实际菌株检测

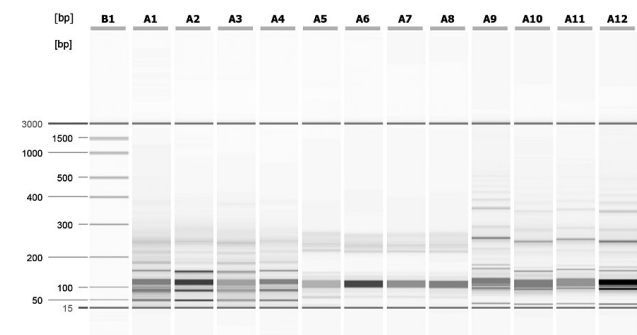
将鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028 的 DNA

按 2 倍、5 倍、10 倍进行稀释, 分别为  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $10$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $5$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1$  copy/ $\mu\text{L}$  及空白对照, 按照 1.3.3 检测方法的灵敏度。通过鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028 和 10 株其他肠道感染菌标准菌株检测方法的特异度。对 100 株临床分离沙门菌核酸进行检测, 以评价方法对实际样本检测能力。

## 2 结果

### 2.1 引物筛选结果

设计 3 对引物中, 引物 f2-F 和 f2-R 的扩增片段最清晰, 非特异条带最少, 故选择 f2 引物对用于后续实验。



注: B1 为 marker; A1 ~ A4 为 f1 引物对; A5 ~ A8 为 f2 引物对; A9 ~ A12 为 f3 引物对。

图 1 沙门菌 ERA-LF 引物筛选结果

Figure 1 Screening results of *Salmonella* ERA-LF primers and probes

### 2.2 扩增温度和反应时间优化结果

采用 ERA-LF 方法在  $25 \sim 45$  °C 范围内均可得到良好的扩增效果, 由于  $37$  °C 最接近于人的体温, 选择  $37$  °C 为扩增温度进行后续检测。反应时间为  $10$  min 时即可出现清晰的检测带,  $20$  min 时效果最佳, 继续延长时间, 效果没有明显改善。

### 2.3 灵敏度、特异度和实际菌株验证结果

在扩增温度  $37$  °C、反应时间  $20$  min 的条件下, 对鼠伤寒沙门菌标准菌株 ATCC14028 的检测下限为  $5$  copies/ $\mu\text{L}$ 。本方法对鼠伤寒沙门菌 ATCC14028 核酸扩增结果为阳性,  $10$  株其他肠道感染菌核酸扩增结果均为阴性。本方法对  $100$  株不同型别的沙门菌核酸扩增均为阳性。

## 3 讨论

本研究建立了一种 ERA 和 LF 相结合的沙门菌快速检测方法, 以沙门菌 *fimY* 特异基因为靶点设计 ERA 检测的引物及探针, 筛选出最优组合, 并对扩增条件进行了优化。ERA-LF 方法的扩增条件温和, 反应适应温度范围广, 反应速度快, 在  $25 \sim 45$  °C,  $10 \sim 25$  min 均可实现扩增, 根据本研究结果,  $37$  °C 和  $20$  min 作为最佳反应条件。菌株核酸检测下限为  $5$  copies/ $\mu\text{L}$ , 与已有文献报道的灵敏度<sup>[3]</sup>相当, 对比重组酶聚合酶扩增-LF 技术在空肠弯曲菌<sup>[5]</sup>、金黄色葡萄球菌<sup>[6]</sup>的文献报道, 本研究灵敏度更好。对  $10$  种常见的其他食源性致病菌均无扩增, 表现出很好的特异度。对  $100$  株沙门菌核酸进行检测, 均获得良好的扩增结果。

理想的分子即时检测 (point-of-care testing, POCT) 技术不仅是在分子扩增阶段及检测结果展示方面有突破, 还需要考虑样本前处理阶段、产品使用的便携性和生物安全性。ERA 的扩增温度更接近于人体温度, 对反应设备要求更低, 更适用于现场 POCT 检测<sup>[7]</sup>。本研究建立的 ERA-LF 沙门菌快速检测方法无需昂贵的温控设备和专业人员, 不受环境条件限制, 可用于基层医院、海关检验检疫等现场工作。该方法还需进一步验证大量样本检测的可行性, 检测信号的稳定性、可重复性尚有优化空间。

## 参考文献

- [1] 孔庆岩, 胥小荣, 庞婕, 等. 基于荧光 PCR 检验方法对食品中沙门菌检验的分析研究 [J]. 食品安全导刊, 2021, 319 (26): 69-70.
- [2] 沈幸盈. 基于 Cas9 切割酶的多重试纸条用于食源性致病菌检测 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2021.
- [3] 李滨. 可视化等温扩增快速检测沙门菌和金黄色葡萄球菌应用研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022.
- [4] 程辉, 梁奕, 俞圣韬, 等. 双重 RT-RPA 法快速检测沙门菌及其 1 类整合酶基因 [J]. 浙江农业学报, 2019, 31 (4): 661-668.
- [5] 刘小青, 王远洋, 陈佳平, 等. 空肠弯曲菌的侧向流层析 RPA 快速检测方法研究 [J]. 广东化工, 2019, 46 (14): 247-248, 253.
- [6] 王亚磊. 基于免疫磁分离的金黄色葡萄球菌 RPA-LF 快速检测方法的建立 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [7] YIN D, ZHU Y N, WANG K F, et al. Development and evaluation of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of human enterovirus 71 [J]. Arch Virol, 2018, 163 (9): 2459-2463.

收稿日期: 2023-06-09 修回日期: 2023-10-12 本文编辑: 徐文璐