



生物实验室

重组酶介导等温核酸扩增方法快速检测土壤沙门氏菌

郭雨¹ 刘常宏¹ 卜元卿^{2,3} 薛雅蓉^{*1}

1 南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210023

2 生态环境部南京环境科学研究所国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室
江苏 南京 210044

3 南京信息工程大学江苏省大气环境与装备技术协同创新中心 江苏 南京 210044

摘要:【背景】沙门氏菌(*Salmonella*)是一种可以引起人畜患病的致病菌,也是最主要的食源性细菌之一。土壤中的沙门氏菌可通过蔬菜等植物进入人体,引发食物中毒。但由于土壤性质及其他微生物的干扰,如何快速甄别土壤是否受到沙门氏菌的污染仍是一个难题。【目的】建立一种快速、灵敏检测土壤沙门氏菌的实时重组酶介导等温核酸扩增(Real-Time Recombinase Aided Amplification, RT-RAA)方法。【方法】针对沙门氏菌 *invA* 基因序列设计特异性引物和探针,构建含有 *invA* 基因待检片段的重组质粒,评价 RT-RAA 方法的灵敏度;分别以肠炎沙门氏菌、大肠杆菌、福氏志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 为模板,评价 RT-RAA 方法的特异性;RT-RAA 方法用于番茄、生姜土壤中沙门氏菌的检测,同时用平板培养法进行验证。【结果】RT-RAA 方法可用于重组质粒中 *invA* 基因片段的检测,在 39 °C 条件下,20 min 内即可获得检测结果,最低检测质粒拷贝数为 10 拷贝/反应,而且与大肠杆菌、福氏志贺氏菌和金黄色葡萄球菌无交叉反应。土壤样品 DNA 的 RT-RAA 检测结果显示,供试番茄土已被沙门氏菌污染,而生姜土则没有,与平板培养结果一致。【结论】RT-RAA 方法具有灵敏度高和特异性强的特点,可用于土壤沙门氏菌污染的快速检测。

关键词: 重组酶介导等温核酸扩增, 沙门氏菌, 分子检测, 土壤微生物

Rapid detection of *Salmonella* in soil by recombinase aided amplification methodGUO Yu¹ LIU Changhong¹ BU Yuanqing^{2,3} XUE Yarong^{*1}

1 State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China

2 Key Laboratory of Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing, Jiangsu 210044, China

3 Jiangsu Collaborative Innovation Center of Atmospheric Environment and Equipment Technology, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing, Jiangsu 210044, China

Abstract: [Background] *Salmonella* is a pathogenic bacterium that can cause human and animal diseases,

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0800705); National Natural Science Foundation of China (31471810, 91951121, 41773083)

***Corresponding author:** Tel: 86-25-89685469; E-mail: xueyr@nju.edu.cn

Received: 24-04-2020; **Accepted:** 30-05-2020; **Published online:** 30-07-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0800705); 国家自然科学基金(31471810, 91951121, 41773083)

***通信作者:** Tel: 025-89685469; E-mail: xueyr@nju.edu.cn

收稿日期: 2020-04-24; **接受日期:** 2020-05-30; **网络首发日期:** 2020-07-30

and is also one of the most important foodborne bacteria. *Salmonella* in soil causes food poisoning in humans through plants such as vegetables. However, due to the nature of the soil and interference from other microorganisms, how to quickly identify whether the soil is contaminated with *Salmonella* remains a challenge. **[Objective]** To develop a real-time recombinase aided amplification (RT-RAA) method for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in soil. **[Methods]** A pair of specific primers and a probe were designed targeting the sequence of *invA* gene in *Salmonella*, and a recombinant plasmid containing *invA* gene fragment was constructed to evaluate the sensitivity of RT-RAA method. The specificity of RT-RAA method was performed by amplification of template DNA from standard strains including *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* and *Staphylococcus aureus*. RT-RAA method was used to detect *Salmonella* in soil of tomato and ginger, and plate culture method were used to verify the results. **[Results]** RT-RAA method can be used to detect *invA* gene fragment in the recombinant plasmid at a minimum copy number of 10 per reaction within 20 min at 39 °C, without cross-reaction with *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* and *Staphylococcus aureus*. RT-RAA detection of the DNA in the tested soil samples showed that the tomato soil was contaminated with *Salmonella*, while the ginger soil was not, which was consistent with the results of plate culture. **[Conclusion]** RT-RAA method has the characteristics of high sensitivity and specificity, and can be used for rapid detection of soil *Salmonella* contamination.

Keywords: recombinase aided amplification, *Salmonella*, molecular detection, soil microorganism

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种广泛分布且引起人畜肠道细菌性感染和细菌性食物中毒的重要病原菌^[1]。每年超过 3 000 万人感染沙门氏菌,死亡 20 多万人^[2]。因此,我国《食品安全国家标准-食品中致病菌限量》(GB 29921-2013)^[3]和《饲料卫生标准》(GB 13078-2001)^[4]中明确规定,肉制品、水产制品、粮食制品等食品产品以及饲料中不得检出沙门氏菌。

土壤是沙门氏菌的重要源泉,主要来源于未经无害化处理的畜禽粪便、污染的水及农产品。有报道显示沙门氏菌在土壤中可存活 160–200 d^[5-6],能通过食物链进入人体,引发食源性疾疾病^[7-8]。因此,有必要检测了解土壤中沙门氏菌的污染情况,并在必要时加以治理修复。

截至目前,已有多种方法用于食品等环境沙门氏菌的检测,包括传统的培养法、PCR 检测技术、基因芯片技术、免疫分析技术、电阻抗测定法和生物发光法等^[9]。虽然这些方法均可以用于沙门氏菌的检测,但耗时费力且需要特殊的设备、场地和熟练的技术人员^[10-11]。因此,开发快速且可靠的环境沙门氏菌检测方法仍面临一定的挑战。

重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification, RAA)以及实时荧光 RAA

(Real-Time Fluorescence RAA, RT-RAA)是近年来发展的一种基于重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的 DNA 扩增新方法^[12]。该方法成功克服了 PCR 需要热循环而耗时较长的不足,在一个恒定的温度下即可完成全部扩增过程^[2]。鉴于 RAA,尤其是 RT-RAA 具有快速(15–30 min)、灵敏(20 fg 的 DNA 或 10.5 CFU 的纯培养细菌)、特异、操作简单的特性和优势^[13],已用于多种人体、食品及环境病原菌的检测,如肺炎支原体(*Mycoplasma pneumonia*)^[14]、乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus)^[15]、柯萨奇病毒(Coxsackie Virus)^[16]、呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)^[17]、沙门氏菌(*Salmonella*)^[11,18]、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)^[19]、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)^[20]、伊氏锥虫(*Trypanosoma evansi*)^[21]。然而,由于土壤性质及其他微生物的干扰,迄今未见将 RAA 技术用于土壤污染病原菌的检测。本研究报道一种用于检测土壤沙门氏菌污染的 RT-RAA 新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与培养方法

供试菌株肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)

ATCC15611)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC25922)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri* ATCC12022) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538) 由杭州萧山机场海关提供。除大肠杆菌的生物安全等级为 1 外, 其他菌株的生物安全等级均为 2。

培养方法: 接种各菌株于含 LB 液体培养基的三角瓶中, 37 °C、120 r/min 培养过夜。

1.1.2 土壤样本

分别于 2019 年 4 月采自山东安丘番茄土壤和潍坊的生姜土壤。其中, 番茄土壤面积 0.13 hm², 生姜土壤面积 0.67 hm²。采取五点取样的方法, 样品为 5–10 cm 的土层。每块土壤的 5 个样品混合均匀, 形成一个混合样, 分装 2 袋并放入干冰盒中, 当天分别转移至 4 °C 和–80 °C 中保存备用。

1.1.3 主要试剂、仪器和培养基

质粒提取试剂盒, 上海吉至生化科技有限公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒以及引物和探针合成, 生工生物工程(上海)股份有限公司; RAA 荧光基础扩增试剂盒和恒温核酸扩增检测仪, 江苏奇天基因生物科技有限公司; 土壤 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 沙门氏菌显色培养基, 青岛海博生物技术有限公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

质粒 DNA、细菌基因组 DNA 和土壤基因组 DNA 的提取均按照试剂盒说明书操作。

1.2.2 引物和探针设计

利用 DNAMAN 8.0 软件, 通过比对 NCBI 数据

库中多条沙门氏菌 *invA* 基因序列, 找出该基因的保守区域, 设计特异性引物(*invA*-F/*invA*-R)和探针(*invA*-P) (表 1)。

1.2.3 质粒构建

将合成的 *invA* 基因序列片段(150 bp)克隆到 pUC57 质粒, 构建质粒 pUC57-*invA* (2 710 bp)。*invA* 基因片段序列为: 5'-CAATTCGTTATTGGCGATAG CCTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATTGT CACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGG TTCAGAACGTGTGCGCGGAAGTCGCGGCCCGAT TTTCTCTGGATGGTATGCCCCGTAAACAGAT-3', 生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 RT-RAA 反应

按 RAA 荧光基础扩增试剂盒使用说明书操作。RT-RAA 反应体系(50 μL): 缓冲液 25 μL, 双蒸水 16.7 μL, 引物 *invA*-F 和 *invA*-R (10 μmol/L)各 2.1 μL, 探针 *invA*-P (10 μmol/L) 0.6 μL, DNA 模板 1.0 μL, 醋酸镁溶液(280 mmol/L) 2.5 μL。于 RT-RAA 反应管中混匀后室温下 300 r/min 离心 15 s, 放入到恒温核酸扩增检测仪中进行扩增。RT-RAA 扩增条件: 39 °C 20 min。

1.2.5 灵敏度检测

将 1.2.3 的质粒进行系列 10 倍比稀释 (10¹–10⁵ 拷贝/μL), 采用 1.2.4 的反应体系, 检测 RT-RAA 方法的灵敏度。

1.2.6 特异性实验

采用 1.2.4 的 RT-RAA 反应体系和扩增条件, 以肠炎沙门氏菌、大肠杆菌、福氏志贺氏菌、葡萄球菌标准菌株的基因组 DNA 为模板, 利用沙门氏菌特异引物 *invA*-F 和 *invA*-R 对其进行扩增, 评价 RT-RAA 方法的特异性。

表 1 RT-RAA 引物和探针序列

Table 1 The primer and probe of RT-RAA

引物名称	引物序列	大小
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>invA</i> -F	TGTTGTCTTCTCTATTGTCACCGTGGTCCAG	107
<i>invA</i> -R	TACCGGGCATACCATCCAGAGAAAATCGTGCCGC	
<i>invA</i> -P	CTCKATTGTCACKGTGGTYCAGTTTATCG(FAM-dT)T(THF) (BHQdT)ACCAAAGGTTCA	

注: FAM: 6-羧基荧光素; THF: 四氢呋喃; BHQ: 黑洞淬灭探针; 3'磷酸化修饰阻断延伸

Note: FAM: 6-carboxyfluorescein; THF: Tetrahydrofuran; BHQ: Black hole quencher; 3' phosphate to block elongation

1.2.7 土壤中沙门氏菌的培养

利用海博沙门氏菌显色培养基(第2代),采用系列稀释涂布平板法^[22],培养番茄和生姜土壤中的沙门氏菌。1 g 土样用无菌水稀释 10 倍,于摇床中 150 r/min 振荡 30 min,再稀释 100 倍和 1 000 倍,然后分别吸取 100 μ L 稀释液涂布平板,每个浓度涂布 3 个平板,置 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h,观察紫色菌落并计数。

2 结果与分析

2.1 引物和探针设计结果

通过比对 NCBI 数据库多条沙门氏菌 *invA* 基因序列,设计了 9 对检测沙门氏菌的 RT-RAA 引物;经过灵敏度检测,最终获得一对能够扩增出 10 拷贝/反应质粒的特异性引物 *invA-F/invA-R* 和探针 *invA-P*(表 1)。扩增片段大小为 107 bp。

2.2 引物灵敏度检测结果

RT-RAA 扩增不同拷贝 pUC57-*invA* 的结果显示,荧光信号的出现时间随 pUC57-*invA* 拷贝数的增加而提前,当拷贝数为 10^5 拷贝/ μ L 时,2 min 后即可观察到扩增荧光信号,即便在 10^1 拷贝/ μ L 时,8 min 后仍可观察到扩增荧光信号(图 1)。因此,利用本实验所设计的引物和扩增条件,在 39 $^{\circ}$ C 下扩增 20 min,可以检测到最低 10 拷贝/反应的质粒 DNA。

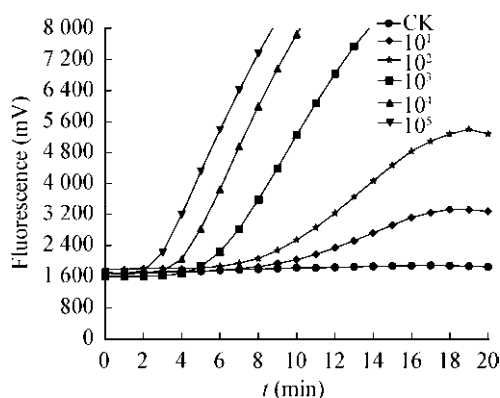


图 1 RT-RAA 灵敏度检测结果
Figure 1 Sensitivity of RT-RAA assay

2.3 特异性

分别以肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 为模板,以 *invA-F/invA-R* 为引物、*invA-P* 为探针进行 RT-RAA 检测。结果表明(图 2),只有肠炎沙门氏菌的基因组 DNA 呈现阳性结果,其他菌株基因组 DNA 的检测结果均呈阴性,无交叉反应。

2.4 土壤 DNA 的 RT-RAA 扩增

分别以番茄和生姜土壤样品 DNA 为模板,在相同反应条件下,研究了用 RT-RAA 方法检测土壤沙门氏菌的有效性。结果显示,番茄土壤基因组 DNA 的 RT-RAA 检测结果呈阳性,而生姜土壤的基因组 DNA 检测结果呈阴性(图 3)。提示供试的山东安丘的番茄土壤已受到沙门氏菌的污染,而潍坊的生姜土壤未受到沙门氏菌污染。

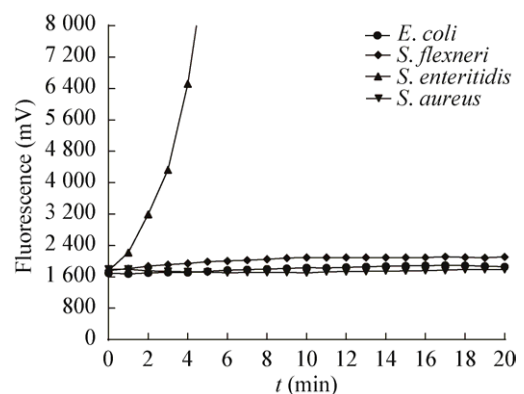


图 2 RT-RAA 特异性检测结果
Figure 2 Specificity of RT-RAA assay

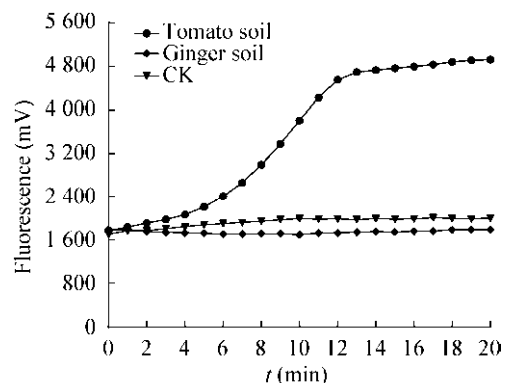


图 3 RT-RAA 检测土壤样本 DNA 结果
Figure 3 Detection of *Salmonella* in soil sample DNA using RT-RAA assay

为了验证 RT-RAA 检测结果的可信性, 利用沙门氏菌显色培养基, 对 2 个土壤样品进行了培养实验。结果发现, 只有番茄土壤样品培养出紫色菌落的沙门氏菌, 数量约 4×10^4 CFU/g 土样, 而生姜土壤样品中未检测到沙门氏菌。这一结果与 RT-RAA 检测结果一致, 表明 RT-RAA 可用于土壤沙门氏菌的快速检测。

3 讨论与结论

RAA 是一种利用重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶在等温条件下进行核酸扩增的技术。与传统 PCR 扩增技术相比, RAA 具有反应时间短、操作简单等优点。RAA 与近几年应用较多的重组酶聚合酶扩增方法(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)类似, 其区别在于 2 种方法所用重组酶的来源不同, RAA 使用的重组酶来源于细菌或真菌, 而 RPA 所用的重组酶为 T4 噬菌体 UvsX 重组酶^[12]。结合荧光探针的应用, 二者均可实现对特定病原微生物的实时检测。在沙门氏菌检测方面, RAA、RPA 和 PCR 均有应用报道^[11-12,23-27], 但截至目前未见 RAA 和 RPA 用于检测土壤沙门氏菌的报道。

土壤中沙门氏菌数量较少, 其基因拷贝数很低, 需要应用高灵敏度的方法检测。本研究通过对引物和探针的筛选优化, 获得一组高灵敏度的引物和探针组合(invA-F、invA-R 和 invA-P)(表 1)。利用这组引物和探针, 可以使检测灵敏度达到 10 拷贝/反应, 高于 Zhang 等^[11]报道的 RT-RAA 检测沙门氏菌的灵敏度(10^3 拷贝/反应的质粒 DNA)。造成这一差异的原因可能与用于 RAA 的引物序列不同有关。例如, 周冬根等(2018)利用 RT-RAA 检测中东呼吸综合征冠状病毒时发现, 不同引物序列的灵敏度可以相差 100 倍^[28]。此外, 本研究建立的 RT-RAA 与 RT-PCR 的检测灵敏度(数十拷贝)^[23]相当。然而, 与 RT-PCR 相比, RT-RAA 还有反应条件及时间等方面的优势。利用该方法对山东安丘的番茄和生姜土壤 DNA 样品的检测结果显示, 番茄土壤被沙门氏菌污染, 而生姜土壤则没有被沙门氏

菌污染, 该结果与基于培养技术的检测结果相符, 说明 RT-RAA 可用于土壤沙门氏菌污染的检测。

利用显色培养基选择性培养鉴定沙门氏菌是国标(GB 4789.4-2010, GB 4789.4-2016)中推荐的一种方法^[22]。海博沙门氏菌显色培养基(第 2 代)是目前市场上常见的用于检测沙门氏菌的显示培养基^[29]。因此, 本研究用这种培养基对所建立的 RT-RAA 检测结果进行了验证。结果显示, 在对生姜土和番茄土中沙门氏菌的检测中, RT-RAA 和选择性培养法表现出一致的结果, 证明了本研究所建立的 RT-RAA 在检测土壤沙门氏菌中应用的可靠性。

靶标基因的选择及其引物的设计是确保基于 DNR/RNA 扩增技术检测环境微生物结果是否正确的关键因子。目前已报道的用于沙门氏菌检测的基因主要有 *fimY*^[18,24]和 *invA*^[11,25-26]。*fimY* 基因参与沙门氏菌 I 型菌毛基因表达的调控^[30], 而 *invA* 基因与沙门氏菌的侵染有关^[31]。本研究以 *invA* 基因为靶标, 设计了特异性扩增引物和荧光探针, 可特异性扩增沙门氏菌, 而不能扩增福氏志贺氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 反映了其高度的扩增专化性, 可用于环境沙门氏菌的检测。根据 RT-RAA 方法的灵敏度实验结果(图 1), 检测时间随着模板浓度的降低而延长, 两者之间可能存在一定的线性关系, 可以通过引物筛选或反应条件的优化寻找这种线性关系, 从而对样本浓度进行定量或者半定量, 这是下一步研究的方向。

本研究成功构建了一种高效检测沙门氏菌的 RT-RAA 方法, 可用于土壤等环境沙门氏菌的检测。

REFERENCES

- [1] Song DX, Yin R, Lin XG, Wang YM, Zhang HY, Wang JJ. Screening of an antagonistic bacterial strain against *Salmonella* and its application in in-site bioremediation of *Salmonella*-contaminated soils[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 30-36 (in Chinese)
宋德显, 尹睿, 林先贵, 王一明, 张华勇, 王纪杰. 一株沙门氏菌拮抗菌的筛选及其在污染土壤原位修复中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 30-36
- [2] Zhang XP, Zheng LY, Wei Y, Guo LC, Ying QJ, Lv QF, Wu

- ZH, Zheng W. Establishment of a recombinase aided amplification assay for *Salmonella* detection[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2017, 40(5): 317-319 (in Chinese)
- 张小平, 郑乐怡, 魏莹, 郭利川, 应清界, 吕沁风, 吴忠华, 郑伟. 重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2017, 40(5): 317-319
- [3] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 29921-2013 National food safety standard-limit of pathogenic bacteria in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2013 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013
- [4] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 13078-2001 Hygienical standard for feeds[S]. Beijing: China Standard Press, 2001 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 13078-2001 饲料卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001
- [5] Holley RA, Arrus KM, Ominski KH, Tenuta M, Blank G. *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure[J]. Journal of Environmental Quality, 2006, 35(4): 1170-1180
- [6] Hoorfar J, Ahrens P, Rådström P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(9): 3429-3435
- [7] Zhang TX, Wu YY, Tian ZY, Yang WH. Effects of manure on survival of *Salmonella* in different soil types[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 297-300 (in Chinese)
- 张桃香, 吴艺妍, 田梓莹, 杨文浩. 粪肥对不同类型土壤中沙门氏菌存活动态的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 297-300
- [8] Jacobsen CS, Bech TB. Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 557-566
- [9] Li HJ. Analysis of current status of detection of *Salmonella* in food[J]. Modern Food, 2019, 5(9): 24-25 (in Chinese)
- 李惠静. 食品中沙门氏菌检测现状分析[J]. 现代食品, 2019, 5(9): 24-25
- [10] Guo YD, Han XJ, Zhang YH, Yue TL. Research progress of *Salmonella* detection[J]. Farm Products Processing, 2019(5): 75-78 (in Chinese)
- 郭耀东, 韩晓江, 张英华, 岳田利. 沙门氏菌检测的研究进展[J]. 农产品加工, 2019(5): 75-78
- [11] Zhang XP, Guo LC, Ma RR, Cong LJ, Wu ZH, Wei Y, Xue SJ, Zheng W, Tang SJ. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139: 202-204
- [12] Lv B, Cheng HR, Yan QF, Huang ZJ, Shen GF, Zhang ZF, Li YN, Deng ZX, Lin M, Cheng Q. Recombinase-aid amplification: a novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification[J]. Scientia Sinica Vitae, 2010, 40(10): 983-988 (in Chinese)
- 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 黄震巨, 沈桂芳, 张志芳, 李轶女, 邓子新, 林敏, 程奇. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学 C 辑, 2010, 40(10): 983-988
- [13] Liu HB, Zang YX, Du XJ, Li P, Wang S. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025
- [14] Xue GH, Li SL, Zhao HQ, Yan C, Feng YL, Cui JH, Jiang TT, Yuan J. Use of a rapid recombinase-aided amplification assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 79
- [15] Shen XX, Qiu FZ, Shen LP, Yan TF, Zhao MC, Qi JJ, Chen C, Zhao L, Wang L, Feng ZS, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 229
- [16] Yan TF, Li XN, Wang L, Chen C, Duan SX, Qi JJ, Li LX, Ma XJ. Development of a reverse transcription recombinase-aided amplification assay for the detection of coxsackievirus A10 and coxsackievirus A6 RNA[J]. Archives of Virology, 2018, 163(6): 1455-1461
- [17] Wang RH, Zhang H, Zhang Y, Li XN, Shen XX, Qi JJ, Fan GH, Xiang XY, Zhan ZF, Chen ZW, et al. Development and evaluation of recombinase-aided amplification assays incorporating competitive internal controls for detection of human adenovirus serotypes 3 and 7[J]. Virology Journal, 2019, 16(1): 86
- [18] Li JL, Ma B, Fang JH, Zhi AT, Chen EJ, Xu Y, Yu XP, Sun CX, Zhang MZ. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food[J]. Foods, 2020, 9(1): 27
- [19] Gao WF, Huang HL, Zhang Y, Zhu P, Yan XJ, Fan JZ, Chen XF. Recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food samples[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1972-1981
- [20] Zhang RQ, Li GX, Li XN, Shen XX, Gao Y, Wang L, Fan T, Duan QX, Wang YK, Wang J, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay incorporating competitive internal control to detect *Bordetella pertussis* using the DNA obtained by boiling[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2019, 86: 108-113
- [21] Li Z, Pinto Torres JE, Goossens J, Stijlemans B, Sterckx YGJ, Magez S. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow assay for the detection of active *Trypanosoma evansi* infections[J]. PLoS Neglected Tropical

- Diseases, 2020, 14(2): e0008044
- [22] Yi TC, Huo SN, Meng J, Zheng SC, Sun XH, Ren YJ. The quality and performance comparison of *Salmonella* chromogenic medium[J]. China Food Safety Magazine, 2017(6): 98-100 (in Chinese)
伊廷存, 霍胜楠, 孟静, 郑世超, 孙潇慧, 任易婕. 沙门氏菌显色培养基的质量与性能比较[J]. 食品安全导刊, 2017(6): 98-100
- [23] Anderson A, Pietsch K, Zucker R, Mayr A, Müller-Hohe E, Messelhäusser U, Sing A, Busch U, Huber I. Validation of a duplex real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products[J]. Food Analytical Methods, 2011, 4(3): 259-267
- [24] Yeh KS, Chen TH, Liao CW, Chang CS, Lo HC. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(3): 227-234
- [25] González-Escalona N, Hammack TS, Russell M, Jacobson AP, De Jesús AJ, Brown EW, Lampel KA. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3714-3720
- [26] Pusterla N, Byrne BA, Hodzic E, Mapes S, Jang SS, Gary Magdesian K. Use of quantitative real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in fecal samples from horses at a veterinary teaching hospital[J]. The Veterinary Journal, 2010, 186(2): 252-255
- [27] Hong HL, Sun CZ, Wei S, Sun X, Mutukumira A, Wu XY. Development of a real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Salmonella* in powdered infant formula[J]. International Dairy Journal, 2020, 102: 104579
- [28] Zhou DG, Luo J, Chen JH, Yu XJ. Development and application of a RT-RAA assay to detect middle east respiratory syndrome coronavirus[J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(1): 45-51 (in Chinese)
周冬根, 罗洁, 陈健骅, 俞雪钧. 中东呼吸综合征冠状病毒 RT-RAA 快速检测方法的建立及应用[J]. 病毒学报, 2018, 34(1): 45-51
- [29] Zhai JJ. Comparison of the application effect of two *Salmonella* chromogenic media[J]. China Health Care & Nutrition, 2013, 23(8): 4721-4722 (in Chinese)
翟俊洁. 两种沙门氏菌显色培养基实际应用效果比较[J]. 中国保健营养, 2013, 23(8): 4721-4722
- [30] Tinker JK, Clegg S. Characterization of *FimY* as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3305-3313
- [31] Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. *InvA* gene specific PCR for detection of *Salmonella* from boilers[J]. Veterinary World, 2011, 4(12): 562-564