

基于反转录-环介导等温扩增技术检测沙门氏菌

梁玉林 刘秀* 周振森 周鹏飞 尹建军

(中国食品发酵工业研究院有限公司 北京 100015)

摘要:【背景】沙门氏菌是最常见的食源性致病菌之一,全球每年沙门氏菌中毒事件居细菌性中毒事件首位。【目的】建立反转录-环介导等温扩增(Rreverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)技术特异性检测沙门氏菌。【方法】针对沙门氏菌特异保守 *invA* 基因设计多组引物,通过对引物筛选和反应条件优化,建立了检测沙门氏菌的实时荧光 RT-LAMP 方法。利用沙门氏菌及其人工污染脱脂乳样品,研究了方法的特异性和灵敏性,并与 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain)方法的灵敏度进行比较。【结果】等温 65 °C 条件下 30 min 内可完成 RT-LAMP 反应。利用该方法检测 5 株沙门氏菌均为阳性,其余 21 种检测菌株为阴性。在人工污染脱脂乳样品的检测中,灵敏度达到 60 CFU/g,比 RT-PCR 方法高 100 倍。【结论】建立的实时荧光 RT-LAMP 方法将为沙门氏菌现场快速检测提供有力手段。

关键词: 反转录-环介导,等温扩增,沙门氏菌,检测,脱脂乳

Detection of *Salmonella* by reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification

LIANG Yu-Lin LIU Xiu* ZHOU Zhen-Sen ZHOU Peng-Fei YIN Jian-Jun

(China National Research Institute Food & Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing 100015, China)

Abstract: [Background] *Salmonella* is currently one of most common food-borne pathogens worldwide. Every year, food poisoning caused by *Salmonella* ranks the first among all bacterial poisoning incidents. [Objective] A reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method was developed to detect *Salmonella*. [Methods] A series of primers were designed according to the specific conservative *invA* gene of *Salmonella*, Real-time fluorescent RT-LAMP method was established to detect *Salmonella* by optimizing primer selection and reaction conditions. The specificity and sensitivity of the method were studied by using *Salmonella* and its artificial contaminated skim milk samples, and compared with the sensitivity of reverse transcription polymerase chain (RT-PCR) method. [Results] The RT-LAMP assay successfully detected *invA* gene of *Salmonella* within 30 minutes at 65 °C. Five strains of *Salmonella* were positive and the other 21 tested strains were negative. In the extracting nucleotide from artificial contaminated skim milk samples, the sensitivity was 60 CFU/g, which was 100-fold higher than that of RT-PCR. [Conclusion] The established real-time fluorescent RT-LAMP method can rapidly detect *Salmonella* on site.

*Corresponding author: Tel: 86-10-53218288; E-mail: xiuli1979@163.com

Received: October 23, 2017; Accepted: June 15, 2018; Published online (www.cnki.net): June 21, 2018

*通信作者: Tel: 86-10-53218288; E-mail: xiuli1979@163.com

收稿日期: 2017-10-23; 接受日期: 2018-06-15; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-21

Keywords: Reverse transcriptase loop-mediated, Isothermal amplification, *Salmonella*, Detection, Skim milk

沙门氏菌是一种重要的革兰氏阴性致病菌,有些专对人致病,有些专对动物致病,有些对人和动物同时致病^[1]。按其抗原成分可以分为甲、乙、丙、丁、戊等基本菌组,其中与人体疾病有关的主要为丁组的伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌。在发展中国家每年大约有 2 200 万人感染伤寒沙门氏菌,导致 2.16 万人死亡^[2],在发达国家肠炎沙门氏菌是最主要的人类肠道传染病^[3]。易感染沙门氏菌的食品有肉类、蛋类、乳品和蔬菜类,人们食用了该类食品后会导致肠道疾病,伴随呕吐、发烧和腹泻等症状^[4-6]。

目前我国规定的沙门氏菌检测方法为国标法^[7],它主要分为前增菌、增菌、分离、生化试验和血清学鉴定等步骤,其检验程序费时费力、繁琐复杂,需要 4-7 d 才能得到检验结果。作为免疫学检测方法,酶联免疫技术具有高灵敏度、反应时间短等优势,因此在食品微生物研究与检测中应用广泛。Krysinski 等最早阐述了鼠伤寒沙门氏菌的酶联免疫检测法,但实验可能出现假阳性现象^[8]。近些年来分子生物学检测方法层出不穷,以聚合酶链式反应(PCR)为代表的变温核酸扩增技术虽然具有高特异性、高灵敏度等优势,但是往往需要专业操作人员和昂贵的实验设备,不利于现场快速检测^[9]。因此,有必要开发一种高效检测方法,为沙门氏菌现场快速检测提供有力手段。

环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是一种新型核酸扩增技术,该技术在 60-65 °C 恒温条件 1 h 内把特异性靶序列扩增到 10⁹ 水平,并且具有高特异性、高敏感性、简单、便捷及成本低的特点^[10-11]。LAMP 技术和 PCR 扩增技术相比,其灵敏度、检测范围、特异性均能达到检测要求,甚至 LAMP 技术优于 PCR 技术^[12];并且,这种新的扩增方法不需要任何实验室专用仪器,只要设计适合的引物,就可以在现场

实现高通量快速检测。由于 DNA 在死菌中不易降解,传统的以 DNA 为模板的 LAMP 反应无法区分死活菌,容易导致假阳性的后果。以半衰期短的 RNA 为模板进行 RT-LAMP 反应,可以达到鉴别死活菌的目的^[13]。RT-LAMP 技术在国内已经广泛应用于病毒检测中^[14-15],在细菌检测方面应用较少。本研究以沙门氏菌特异性保守片段设计 LAMP 引物,构建基于 RNA 为检测模板的 RT-LAMP 技术体系。

1 材料与方法

1.1 菌种

各种标准菌株:大肠杆菌 O157 (*E. coli* O157) CMCC44828, 大肠杆菌 O157 (*E. coli* O157) CICC21530, 肠侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive E. coli*, EIEC) CICC24188, 肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic E. coli*, EPEC) CICC24189, 伤寒沙门氏菌(*S. typhi*) ATCC14028, 甲型副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphoid A*) CMCC50001, 霍乱沙门氏菌(*S. cholera*) CMCC50019, 肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*) CMCC50041, 伤寒沙门氏菌(*S. typhi*) CMCC50115, 宋内志贺氏菌(*S. sonnei*) CMCC51592, 痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*) CMCC51252, 福氏志贺氏菌(*S. flexneri*) CMCC51572, 福氏志贺氏菌(*S. flexneri*) ATCC12022, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC13565, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC29213, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC2592, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC14458, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) CMCC26002, 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) ATCC27519, 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) CMCC60101, 单增李斯特菌(*L. monocytogenes*) ATCC19111, 单增李斯特菌(*L. monocytogenes*) CMCC54001, 小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*) CICC21669, 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) ATCC27853, 阪崎肠杆菌(*E. sakazakii*) ATCC51007,

酿脓链球菌(*S. pyogenes*) CICC10373。

1.2 主要试剂和仪器

RNeasy Mini Kit, 凯杰企业管理(上海)有限公司; PrimeScript™ RT-PCR Kit、Marker DL2000, 宝生物工程(大连)有限公司; Isothermal Master Mix (IMM)、Genie III, OptiGene Limited 公司; Trans DNA Marker II、北京全式金生物技术有限公司。微量移液器、离心机, Eppendorf 公司; 高压灭菌锅, Tomy Digital Biology 公司; 超微量核酸蛋白分析仪, 柏点公司; PCR 仪, Biometra 公司; 电泳仪, 北京君意仪器公司; 凝胶成像仪, Vilber Lourmat 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计

根据 GenBank 中 *invA* 基因(GenBank Accession EU348365)的序列, 利用 LAMP Primer Explorer 4 在线软件(<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)设计 6 组引物, 每组引物分别包括外引物 F3、B3, 内引物 FIP、BIP 和环引物 LoopF、LoopR, 设计完成后委托北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3.2 纯培养细菌 RNA 提取与质量测定

在平板上取肠炎沙门氏菌(CMCC50041)单菌落接入 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 到对数期。取 1 mL OD_{600} 为 0.15 的菌悬液, 5 000×g 离心 10 min, 轻轻倒掉液体。向沉淀加入 10 μL 蛋白酶 K, 100 μL TE (含终浓度 15 mg/mL 溶菌酶), 充分混匀沉淀, 在室温下反应 30 min, 严格按照 RNeasy Mini Kit 操作步骤提取 RNA。

RNA 的质量浓度和纯度检测: 取 RNA 溶液 1 μL, 用超微量核酸蛋白分析仪测定提取的 RNA 在波长 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值, 通过 OD_{260}/OD_{280} 和浓度值判断 RNA 的纯度和浓度, 重复测定 3 次。

RNA 的完整性检测: 分别取 RNA 样品 6 μL, 在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测其完整性, 150 V 恒定电压电泳 20 min。紫外灯下观察 RNA 条带, 并照相记录结果。

1.3.3 RT-PCR 和 RT-LAMP 反应体系

RT-PCR 扩增引物序列如表 1 所示, 扩增产物为 116 bp。按照 PrimeScript™ RT-PCR Kit 操作步骤进行反转录和 PCR 扩增反应。

经优化后在 12.5 μL RT-LAMP 体系中, 包括 7.5 μL IMM、3.5 μL 混合引物(外引物、内引物和环引物含量分别为 2.5、10.0 和 5.0 pmol)、1.5 μL 模板。RT-LAMP 反应温度 65 °C, 反应时间 30–60 min。

1.3.4 RT-LAMP 的特异性和灵敏度检测

提取 5 株沙门氏菌和 21 株非沙门氏菌 RNA, 以此为模板进行 RT-LAMP 反应验证方法的特异性。

将提取的肠炎沙门氏菌(CMCC50041)原菌液总 RNA 测定浓度后, 对总 RNA 进行 10 倍梯度稀释后选取 1.7 fg、17 fg、170 fg、1.7 pg、17 pg、170 pg、1.7 ng/μL 共 7 个浓度梯度, 从各浓度梯度各取 1.5 μL 作为模板进行 RT-LAMP 反应检测纯培养沙门氏菌灵敏度。

1.3.5 RT-PCR 和 RT-LAMP 反应在人工污染脱脂乳中的灵敏度检测

为保证检测结果的准确性, 经国标 GB/T4789.4-2016 方法验证试验所用脱脂乳中不含沙门氏菌, 取 25 g 脱脂乳置于 225 mL 灭菌生理盐水中作为对照样品。取新鲜培养的 12 h 的肠炎沙门氏菌(CMCC50041), 用生理盐水充分洗涤培养基, 10 倍梯度系列稀释, 取各稀释度菌液 1 mL 加入人工脱脂乳样品中, 使人工污染脱脂乳中菌液浓度达到 10^{-1} – 10^{-5} CFU/mL, 充分混合, 作为人工污染脱脂乳样品。

取各菌液浓度的人工污染脱脂乳样品 1 mL, 提取人工污染脱脂乳样品中的 RNA, 同时取不加沙门氏菌的脱脂乳样品 1 mL 作为阴性对照平行进行 RNA 提取。分别进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 反应, 比较两种方法的检测灵敏度。

1.3.6 活菌状态和死菌状态下 RT-LAMP 检测

探究死菌中 RNA 降解情况, 避免死菌中 DNA 对 RT-LAMP 检测结果的干扰。选取 10^5 、 10^4 、 10^3 、

10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/mL 六个菌液浓度。0.1 MPa 灭菌 30 min, 放置一段时间, 模拟死菌状态, 对死菌进行平板培养, 验证是否灭菌完全。分别对灭菌前后各浓度梯度的沙门氏菌菌液进行 RNA 提取, 并进行 RT-LAMP 反应。

2 结果与分析

2.1 纯培养沙门氏菌 RNA 提取质量测定

当 RNA OD_{260}/OD_{280} 大于 2 时表明提取的 RNA 纯度较高, 经 Qiagen 试剂盒提取的沙门氏菌 RNA 浓度为 $78.30 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$, 纯度为 2.29 ± 0.24 。由图 1 可知, 经 Qiagen 试剂盒提取的沙门氏菌 RNA 只有 16S 和 23S 两个条带, 无严重的拖尾状况, 表明提取的 RNA 完整性较高。

2.2 引物筛选

图 2 和图 3 分别是在不含检测模板和含检测模板前提下进行 RT-LAMP 引物的阴性和阳性扩增反应。在不含检测模板的情况下, 1 号和 6 号引物仍然出现扩增曲线, 在排除气溶胶污染等因素后, 该反应可能为引物间碱基互补配对引起的非特异性扩增。在含检测模板的情况下, 3 号引物具有较短的扩增时间和较高的扩增荧光值。综合图 2 和图 3, 3 号引物在扩增稳定性、扩增时间和荧光值等方面均优于其他组引物, 可作为 RT-LAMP 下一步试验的反应引物。3 号引物序列见表 1。

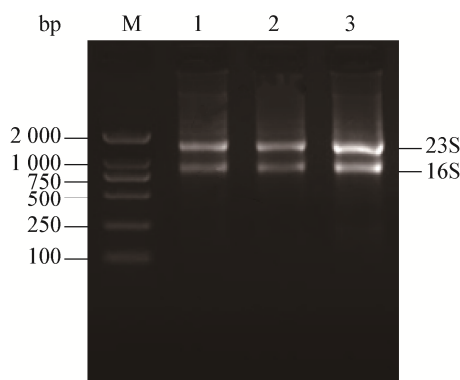


图 1 沙门氏菌 RNA 电泳

Figure 1 *Salmonella* RNA electrophoresis

注: M: Marker DL2000; 1、2 和 3: 肠炎沙门氏菌。

Note: M: Marker DL2000; 1, 2 and 3: *S. enteritidis*.

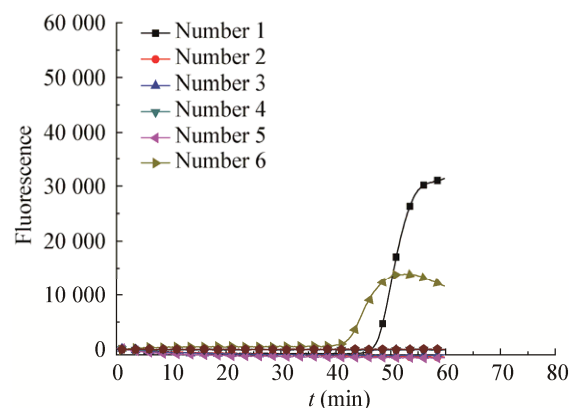


图 2 引物阴性扩增

Figure 2 Primer negative amplification

2.3 RT-LAMP 的特异性和灵敏度检测

试验对包括 5 株沙门氏菌在内的 26 株常见细菌进行 RT-LAMP 特异性检测。结果如表 2 所示, 只有 2 株鼠伤寒沙门氏菌、1 株甲型副伤寒沙门氏菌、1 株霍乱沙门氏菌和 1 株肠炎沙门氏菌产生荧光扩增曲线, 其他菌株均未产生荧光扩增曲线。结果表明建立的 RT-LAMP 方法具有较高的菌株特异性。

提取纯培养沙门氏菌总 RNA 作为阳性模板, 对模板进行 10 倍梯度稀释, 检测 RT-LAMP 反应的灵敏度。由图 4 可知, RT-LAMP 检测 *invA* 靶基因的灵敏度为 $17 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 并且在 30 min 内完成扩增反应。

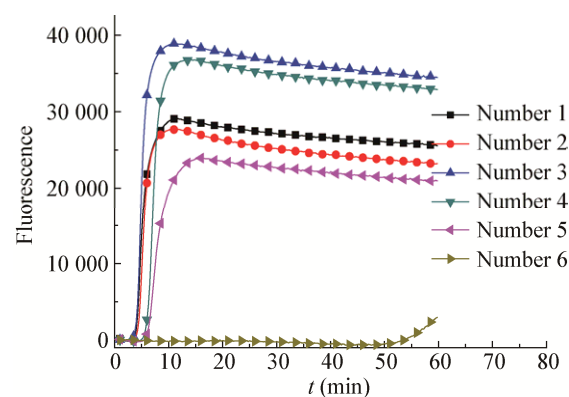


图 3 引物阳性扩增

Figure 3 Primer positive amplification

表 1 所需引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers for RT-LAMP and RT-PCR

靶基因	检测方法	引物	引物序列	长度
Target gene	Detection method	Primer	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
invA	RT-LAMP	F3	GCGAAGCGTACTGGAAAGG	19
		B3	TCAACAATGCGGGGATCTG	19
		FIP	ATGATGCCGGCAATAGCGTCACAAAGCCAGC	42
		TTTACGGTTCC		
		BIP	GTGGGGAATACTCGCCATGGACCATCACCAAT	39
		GGTCAGC		
		LooF	AAACTTCATCGCACCGTCAAA	21
		LooB	CCTCCGCCCTGTCTACTTATACCA	24
	RT-PCR	F	CAACGTTCTCTGCGGTACTGT	21
		R	CCCGAACGTGGCGATAATT	19

表 2 特异性检测结果

Table 2 Results of specificity

菌株名称	菌株编号	检测结果
Strain name	Strain No.	Detection result
<i>E. coli</i> O157	CMCC44828	-
<i>E. coli</i> O157	CICC21530	-
EIEC	CICC24188	-
EPEC	CICC24189	-
<i>S. typhi</i>	ATCC14028	+
<i>S. paratyphoid</i> A	CMCC50001	+
<i>S. cholera</i>	CMCC50019	+
<i>S. enteritidis</i>	CMCC50041	+
<i>S. typhi</i>	CMCC50115	+
<i>S. sonnei</i>	CMCC51592	-
<i>S. dysenteriae</i>	CMCC51252	-
<i>S. flexneri</i>	CMCC51572	-
<i>S. flexneri</i>	ATCC12022	-
<i>S. aureus</i>	ATCC13565	-
<i>S. aureus</i>	ATCC29213	-
<i>S. aureus</i>	ATCC25923	-
<i>S. aureus</i>	ATCC14458	-
<i>S. aureus</i>	CMCC26002	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC27519	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	CMCC60101	-
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19111	-
<i>L. monocytogenes</i>	CMCC54001	-
<i>Y. enterocolitica</i>	CICC21669	-
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	-
<i>E. sakazakii</i>	ATCC51007	-
<i>S. pyogenes</i>	CICC10373	-

注：+：有荧光扩增曲线，阳性；-：无荧光扩增曲线，阴性。
Note: +: Fluorescence amplification curve; -: No fluorescence amplification curve.

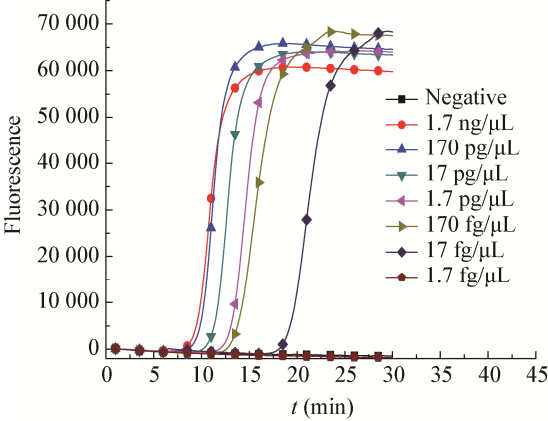


图 4 RT-LAMP 反应灵敏度

Figure 4 RT-LAMP reaction sensitivity

2.4 RT-PCR 和 RT-LAMP 在人工污染脱脂乳中的灵敏度检测

把脱脂乳与不同浓度的沙门氏菌混匀，室温放置 30 min 后进行病原微生物 RNA 的提取，然后进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 灵敏度检测(图 5 和图 6)。由图 5 可知 RT-PCR 反应灵敏度达到 6×10^2 CFU/mL，换算成固体脱脂乳样品检测灵敏度为 6×10^3 CFU/g。由图 6 可知 RT-LAMP 反应灵敏度达到 6 CFU/mL，换算成固体脱脂乳样品检测灵敏度为 60 CFU/g。建立的 RT-LAMP 方法灵敏度较高，是 RT-PCR 反应灵敏度的 100 倍以上。

2.5 活菌状态和死菌状态下 RT-LAMP 检测

灭菌前后各浓度梯度的沙门氏菌菌液进行 RNA 提取并进行 RT-LAMP 反应。图 7 为灭菌前沙

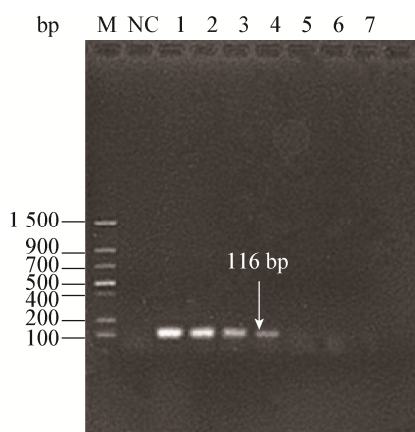


图5 人工污染脱脂乳 RT-PCR 产物电泳

Figure 5 Artificial contamination skim milk RT-PCR product electrophoresis

注: M: Trans DNA marker II; NC: 阴性对照; 1: 6×10^5 CFU/mL; 2: 6×10^4 CFU/mL; 3: 6×10^3 CFU/mL; 4: 6×10^2 CFU/mL; 5: 6×10^1 CFU/mL; 6: 6 CFU/mL; 7: 0 CFU/mL.

Note: M: Trans DNA marker II; NC: Negative control; 1: 6×10^5 CFU/mL; 2: 6×10^4 CFU/mL; 3: 6×10^3 CFU/mL; 4: 6×10^2 CFU/mL; 5: 6×10^1 CFU/mL; 6: 6 CFU/mL; 7: 0 CFU/mL.

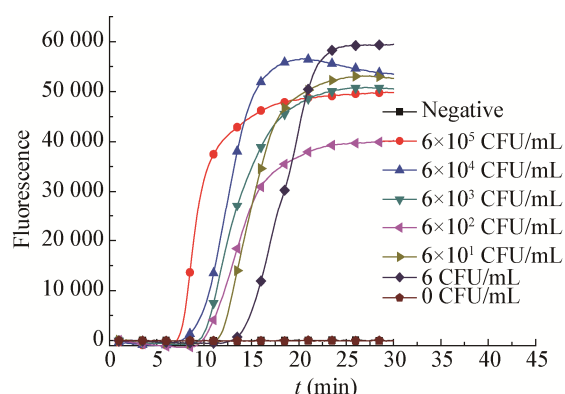


图6 人工污染脱脂乳 RT-LAMP 反应灵敏度

Figure 6 Artificial contamination skim milk RT-LAMP reaction sensitivity

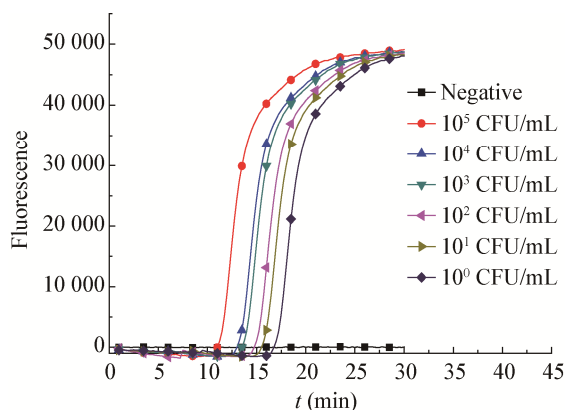


图7 活菌 RNA 检测

Figure 7 RNA detection of viable bacteria

门氏菌 RT-LAMP 反应, 10^0 – 10^5 CFU/mL 菌液浓度均有荧光扩增反应, 表明各反应体系中均含有沙门氏菌 RNA。图 8 为灭菌后沙门氏菌 RT-LAMP 反应, 即使最高浓度的菌液也没有出现荧光扩增反应。灭菌处理的沙门氏菌, 经平板培养观察未发现形成菌落, 表明灭菌后的沙门氏菌均为死菌状态。综合图 7 和图 8 结果, 沙门氏菌死菌 RNA 降解完全, 所建立的 RT-LAMP 方法不能检出沙门氏菌死菌, 可对活的沙门氏菌有效检出。

3 讨论与结论

针对沙门氏菌特异性保守基因片段共设计了 6 组 LAMP 引物, 对设计的引物进行初步筛选, 避免出现引物二聚体等非特异性扩增。相比凝胶电泳和浊度法检测, 本实验扩增产物能够在仪器上显示荧光曲线, 整个检测过程无需开盖检测, 因此大大降低了污染率和人为观测误差。

由于 DNA 稳定, 在死菌中不易降解, 可以长时间存在。传统以 DNA 为检测模板进行的 LAMP 反应可能会由于 DNA 的存在而导致假阳性的后果, 而 RNA 具有的单链结构不稳定, 导致 RNA 在死菌细胞内会很快被降解。基于此, 以 RNA 为模板进行 RT-LAMP 反应能够有效区分细菌的死活, 避免假阳性结果的发生; 扩增结果能表明检测的沙门氏菌是否处于活的增殖状态, 更能体现样品的潜在感染性, 有助于食品安全风险监测。

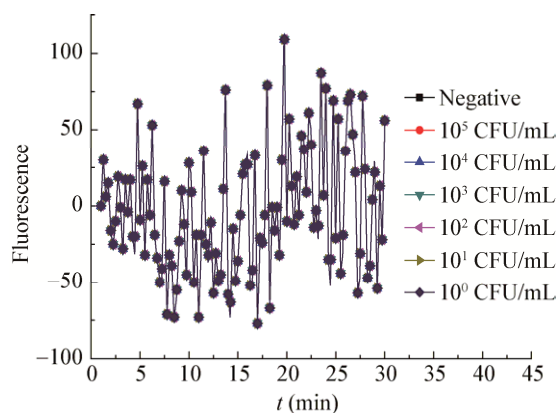


图8 死菌 RNA 检测

Figure 8 RNA detection of dead bacteria

常作为检测沙门氏菌的靶基因有 *invA*、*fimY*、*phoP* 和 *HisJ* 等^[16-21], 其中 *invA* 基因编码的蛋白在沙门氏菌致病过程中起着重要的作用, 是沙门氏菌的主要毒力因子, 已发表的文献大多是以沙门氏菌侵袭蛋白 *invA* 基因作为检测的靶基因^[22]。本实验根据沙门氏菌特异性 *invA* 基因设计 LAMP 引物, 建立了实时荧光 RT-LAMP 检测方法。RT-LAMP 检测方法灵敏度高, 对固体人工污染脱脂乳检测灵敏度达到 60 CFU/g, 高于 RT-PCR 检测方法。同时该方法反应迅速, 依靠 OptiGene 仪器平台使得核酸扩增和反转录过程可以同时进行, 从核酸提取到扩增反应结束仅需 2 h 左右, 与其他检测方法相比较大大缩短了反应时间, 有望实现对沙门氏菌的现场实时监控。

建立的实时荧光 RT-LAMP 方法只能检测到沙门氏菌属, 不能区分伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌等。樊粉霞等^[23]和 Chen 等^[24]分别以伤寒沙门氏菌的 STY3671 和 STM4496 基因为靶基因, 能够把伤寒沙门氏菌与沙门氏菌属中其他常见的沙门菌血清型分开。Yang 等^[25]和袁发许等^[26]则以 *lygD* 基因作为检测肠炎沙门氏菌的靶基因, 仅能特异性检出肠炎沙门氏菌。后期可根据不同血清型的沙门氏菌特异性靶基因设计引物, 将不同种的沙门氏菌分别检出。

因食品种类繁多, 不同的食物基质可能会对核酸提取效果产生干扰。因此需要扩大沙门氏菌污染样品的种类, 探究复杂条件下对沙门氏菌 RNA 提取与 RT-LAMP 方法检测的情况。综上所述, 建立了简便快捷、灵敏度高、特异性强的适用于脱脂乳检测的实时荧光 RT-LAMP 方法, 将通过对实际样品检测以进一步完善该方法。

REFERENCES

- [1] Chen J, Park B. Recent advancements in nanobioassays and nanobiosensors for foodborne pathogenic bacteria detection[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(6): 1055-1069
- [2] Yang HZ, Mou Y, Luo W. Research progress of food-borne *Salmonella*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(4): 69-71,75 (in Chinese)
- [3] Ravan H, Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 733: 64-70
- [4] Kennedy J, Bolton DJ, Cowan C. Food safety and bacterial pathogens: why you should eat in restaurants[A]//Proceedings of an International Conference Hosted by the 32nd Annual Food science and Technology Research Conference[C]. Ireland Cork: National University of Ireland Cork, 2002
- [5] Ding B. Investigation and analysis of pathogenic microorganisms in cold dishes of Shandong Province[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2013 (in Chinese)
- [6] 丁勃. 山东省凉菜类餐饮食品中致病微生物的调查分析[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2013
- [7] Ravan H, Amandadi M, Sanadgol N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 91: 161-165
- [8] Gao H, He J, Yan L. Capability verification of three detection methods of *Salmonella*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(2): 510-515 (in Chinese)
- [9] 高晗, 何娟, 严礼. 3 种沙门氏菌检测方法能力验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 510-515
- [10] Kryszinski EP, Heimsch RC. Use of enzyme-labeled antibodies to detect salmonella in foods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33(4): 947-954
- [11] Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 253(1): 155-161
- [12] Wang Y, Wang ZQ, Zhang W. Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Salmonella* in meat and meat products[J]. Food Science, 2010, 31(16): 270-273 (in Chinese)
- [13] 王羽, 王贞强, 张伟. 环介导等温扩增技术检测肉及肉制品中的沙门氏菌[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 270-273
- [14] Notomi T, Okayamah H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63
- [15] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. Nature Protocols, 2008, 3(5): 877-882
- [16] Techathuvanan C, D'Souza DH. Reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification as a rapid screening/monitoring tool for *Salmonella enterica* detection in liquid whole eggs[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(4): M200-M205
- [17] Fan FX, Wang SJ, Lou J, et al. Establishment of RT-LAMP assay to detect *Salmonella* Typhi in blood[J]. Disease Surveillance, 2012, 27(4): 325-329 (in Chinese)
- [18] 樊粉霞, 王淑京, 娄静, 等. 全血中伤寒沙门菌 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 疾病监测, 2012, 27(4): 325-329

- [15] Yu Y, Ma XY, Zhang W. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk using real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification[J]. Advance Journal of Food Science and Technology, 2015, 8(9): 678-684
- [16] Lu YX, Yang WQ, Shi L, et al. Specific detection of viable *Salmonella* cells by an ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification (EMA-LAMP) method[J]. Journal of Health Science, 2009, 55(5): 820-824
- [17] Chen SY, Wang F, Beaulieu JC, et al. Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(12): 4008-4016
- [18] Ye YX, Wang B, Huang F, et al. Application of *in situ* loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods[J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 438-444
- [19] Zhang YQ, Shan XX, Shi L, et al. Development of a *fimY*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 1011-1015
- [20] Li XF, Zhang S, Zhang HW, et al. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133(3): 252-258
- [21] Zhang L, Pan ZM, Geng SZ, et al. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *HisJ* gene for the detection of food borne *Salmonella*[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(6): 1055-1062
- [22] Mashooq M, Kumar D, Niranjana AK, et al. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: A new tool for DNA quantification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 126: 24-29
- [23] Fan FX, Kan B, Yan MY. Detection of *Salmonella* typhi by RT-LAMP[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 29(7): 682-689 (in Chinese)
樊粉霞, 阚飙, 闫梅英. 利用 RT-LAMP 技术鉴别伤寒沙门菌[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(7): 682-689
- [24] Chen ZQ, Zhang K, Yin H, et al. Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method[J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4(2): 75-79
- [25] Yang JL, Ma GP, Yang R, et al. Simple and rapid detection of *Salmonella* serovar enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(5): 1715-1723
- [26] Yuan FH, Yin H, Li Q, et al. Detection of *Salmonella enteritidis* by loop-mediated isothermal amplification[J]. China Brewing, 2013, 32(4): 146-149 (in Chinese)
袁发许, 尹欢, 李琦, 等. 肠炎沙门氏菌的 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国酿造, 2013, 32(4): 146-149

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

