

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)05-0083-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.05.019



# 中成药中沙门氏菌环介导等温扩增快速检测方法的建立及应用\*

冯润东<sup>1,2</sup>, 贾首前<sup>1,2</sup>, 王莉芳<sup>1,2</sup>, 杨晓莉<sup>1,2</sup>, 徐长根<sup>1,2,Δ</sup>, 张鸿豪<sup>3</sup>

(1. 陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065; 3. 陕西省药品监督管理局, 陕西 西安 710065)

**摘要:**目的 建立以 *invA* 特异性基因设计合成为引物的沙门氏菌环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法。方法 选择沙门氏菌的毒力因子 *invA* 基因作为检测模板, 采用 Primer Explorer V5 软件设计 3 组 LAMP 引物[正向外引物(F3)、反向外引物(B3), 正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP), 正向环引物(LF)、反向环引物(LB)], 以 4 种沙门氏菌(甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌)和 3 种非沙门氏菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产志贺氏毒素大肠埃希氏菌)的细菌 DNA 为模板, 进行 LAMP 快速检测。结果 在反应温度为 65 °C、反应时间为 60 min 条件下, 即可快速检测 4 个亚种沙门氏菌, 其检测灵敏度可达 10 cfu / mL, 且试验结果易于观察, 筛选的引物特异性良好。结论 所建立的方法灵敏度高、特异性好、检测快速, 可应用于中成药中沙门氏菌的快速检测。

**关键词:** 沙门氏菌; *invA* 基因; 引物; 环介导等温扩增; 快速检测

## Establishment and Application of a Rapid Detection Method of Loop - Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* in Chinese Patent Medicine

FENG Rundong<sup>1,2</sup>, JIA Shouqian<sup>1,2</sup>, WANG Lijiang<sup>1,2</sup>, YANG Xiaoli<sup>1,2</sup>, XU Changgen<sup>1,2</sup>, ZHANG Honghao<sup>3</sup>

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. National Medical Products Administration Key Laboratory of Drug Microbiological Testing Technology, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 3. Shaanxi Medical Products Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

**Abstract: Objective** To establish a rapid detection method of loop - mediated isothermal amplification (LAMP) for *Salmonella* using *invA* specific gene to design and synthesize primers. **Methods** The virulence factor *invA* gene of *Salmonella* was used as the detection template. Three groups of LAMP primers [forward outer primer (F3) and backward outer primer (B3), forward inner primer (FIP) and backward inner primer (BIP), forward loop primer (LF) and backward loop primer (LB)] were designed by the Primer Explorer V5 software. The DNA of four *Salmonella* species (*Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B, *Salmonella paratyphi* C and *Salmonella typhimurium*) and three non - *Salmonella* species [*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and Shiga toxin - producing *Escherichia coli* (STEC)] were used as the templates for the LAMP rapid detection. **Results** Four *Salmonella* subspecies could be rapidly detected under the conditions of reaction temperature of 65 °C and reaction time of 60 min. The sensitivity of detection could reach 10 cfu / mL, the results of detection were easy to observe, and the screening primers were specific. **Conclusion** The established method is sensitive, specific and rapid, which can be used for the rapid detection of *Salmonella* in Chinese patent medicine.

**Key words:** *Salmonella*; *invA* gene; primer; loop - mediated isothermal amplification; rapid detection

沙门氏菌 *Salmonella* 为常见人畜共感染的革兰阴性杆菌<sup>[1]</sup>。据统计,全世界每年因沙门氏菌感染而发病的人口达 9 000 万,死亡 15.5 万<sup>[2]</sup>。沙门氏菌在自然界分布广泛,且可在动植物体内定植,而中成药大多由动

\* 基金项目:陕西省重点研发计划项目[2019SF-011]。

第一作者:冯润东,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药理毒理及安全性评价,(电子信箱)43474735@qq.com。

Δ通信作者:徐长根,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品食品分析、药理毒理及安全性评价,(电子信箱)345154532@qq.com。

[9] 姚尚辰,马步芳,张培培,等. 抗生素 HPLC 含量测定能力验证研究[J]. 中国抗生素杂志,2020,45(10):1034-1039.  
[10] 谢兰桂,赵霞,孙会敏. 塑料薄膜氧气透过量测定能力验证研究[J]. 中国药事,2019,33(4):422-428.  
[11] CNAS-GL003:2018,能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].  
[12] CNAS-CL03:2010,能力验证提供者认可准则[S].  
[13] CNAS-CL01:2018,检验和校准实验室能力认可准则[S].  
[14] YBB00202003-2015,平均线热膨胀系数测定法[S].  
[15] CNAS-GL002:2018,能力验证结果的统计处理和评价指南[S].  
[16] GB/T 28043-2019/ISO 13528:2015,利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S].  
[17] CNAS-CL06:2014,测量结果的溯源性要求[S].  
[18] ISO/IEC 17043:2010,合格评定能力验证的一般要求[S].  
(收稿日期:2022-05-23;修回日期:2022-08-25)

植物加工炮制而成,且在大量丸散膏丹的方剂中常以原粉入药,故中成药中沙门氏菌的监测是药品质量评价的重要指标。沙门氏菌的检验方法主要包括生理生化法、免疫学方法及分子生物学方法<sup>[3]</sup>。2020年版《中国药典》中,沙门氏菌的检测仍采用传统培养分离法<sup>[4]</sup>,操作简单、成本低,但操作过程及检测周期长,在快速、特异检测方面具有一定局限性<sup>[5-6]</sup>。其他各种检测方法灵敏、迅速,但需昂贵、庞大的仪器设备和复杂烦琐的电泳过程等,在药品检测中的应用较少。环介导等温扩增(LAMP)为一种新型恒温核酸扩增技术<sup>[7]</sup>,其特点是针对靶基因的6个区域设计4条特异性引物,利用具有链置换活性的DNA聚合酶,在等温条件下连续扩增,试验过程快速、简便,检测结果特异性强、灵敏度高,已被广泛应用于致病微生物的检测,有关沙门氏菌的检测方法也有研究。欧新华等<sup>[8]</sup>建立了基于LAMP技术的沙门氏菌属检测方法,并经电泳法评价其效果。刘卫德等<sup>[9]</sup>建立了检测中成药中沙门氏菌的实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法。虽然采用的检测方法多样,但检测效果不一,尤其是涉及中成药中沙门氏菌LAMP检测的实际应用报道较少。为探索分子生物学方法在中成药沙门氏菌检测中应用的可行性,本研究中基于LAMP技术原理,以沙门氏菌4个亚种毒理因子*invA*基因作为检测模板,并设计特异性引物,建立简便、高效的中成药沙门氏菌的特异性检测方法,为快速检测药品中的沙门氏菌提供参考。现报道如下。

## 1 仪器、试药与菌株

### 1.1 仪器

ZHTY-50ES型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);202-2A型恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);Eppendorf Mini Spain型离心机(德国艾本德股份公司);StepOne Plus型实时荧光定量PCR仪(赛默飞世尔仪器有限公司);MBE200A型蓝光切胶仪(苏州宇恒生物科技有限公司)。

### 1.2 试药

Bst DNA聚合酶(批号为B110061),脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, 10 mmol/L,批号为B500056),均购自生物工程<上海>股份有限公司;MgSO<sub>4</sub>(100 mmol/L),50×LAMP荧光染料,亚硒酸盐煌绿增菌液,生化试剂,均购于西安晶博生物科技有限公司;9批次待检药品均为市售,药品信息见表1。

### 1.3 菌株

沙门氏菌属:甲型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* A,乙型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* B,丙型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* C,鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*,金黄色葡萄球菌 *Staphylo-*

表1 待检药品信息

编号	药品名称	生产厂家
1	排毒养颜胶囊	云南盘龙云海药业有限公司
2	川贝枇杷露	广州白云山药业股份有限公司
3	川贝枇杷膏	京都念慈庵总厂有限公司
4	强力枇杷露	杭州胡庆余堂药业有限公司
5	桑菊感冒片	北京同仁堂科技发展股份有限公司
6	桑菊感冒片	洛阳伊龙药业有限公司
7	桑菊感冒片	云南腾药制药股份有限公司
8	桑菊感冒片	吉林万通药业集团梅河药业股份有限公司
9	黄连上清丸	太极集团四川绵阳制药有限公司

*coccus aureus*,大肠杆菌 *Escherichia coli*,产志贺氏毒素大肠埃希氏菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC),均购自北纳生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 LAMP引物设计及合成

选择沙门氏菌*invA*基因,根据GenBank数据库中提供的沙门氏菌特异基因组序列进行序列比对,寻找一段高度保守区作为扩增对象,通过Primer Exploer V5软件设计3组LAMP引物,分别为正向外引物(F3)、反向外引物(B3),正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP),正向环引物(LF)、反向环引物(LB)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表2。

表2 沙门氏菌*invA*基因的LAMP检测用引物序列

引物	序列(5'-3')
组1	F3:GTAAAAGCAACATTTTTCATGCA B3:GCTCTTAGCCCTAGTGC FIP:GCGCCGATATAATGTCCTCTTTTATTACAAAATGCAAGTTATC BIP:ACAAAGATGGACAATTTGTTCCAGAGTACTAAGTTAGGATTTGCT LF:CCGCTCGCTTTACATT LB:CCGCTATATGGAACATATGGGAAATG
组2	F3:GAACGTGTGCGCAAGTC B3:CGGCAATAGCGTCACCTT FIP:GCGCGGCATCCGCATCAATATTTTTCTGGATGCTATGCCCGG BIP:GAACGGCGAAGCGTACTGGATTTTCATCGCACCGTCAAAGGAA LF:CTTCAAATCGGCATCAATACTCATC LB:AAGGAAAAGCCAGCTTTACG
组3	F3:CAAATGTATCCCGAGCCA B3:TTGTTGGTGCATCATTGG FIP:GAACCCCTTTCTTTTTTGTGCCACAACCTTATACACCATATCCT BIP:ACTCTTTAAAAACACGATCCAACCTGGTCTTCCATTGTCCG LF:TCATGCAAATGGTTCCGCC LB:GTCCTAAGCCGCTCCATGA

## 2.2 细菌 DNA 模板制备

取细菌培养物 1 mL, 置 1.5 mL EP 管中, 以 12 000 r/min 的转速离心 5 min, 收集菌液, 弃上清液。加入 100  $\mu$ L DNA 提取液, 混匀, 金属浴 100  $^{\circ}$ C 加热保温 10 min, 以 12 000 r/min 的转速离心 5 min, 将上清液转移至另一 EP 管中, 作为 DNA 模板, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

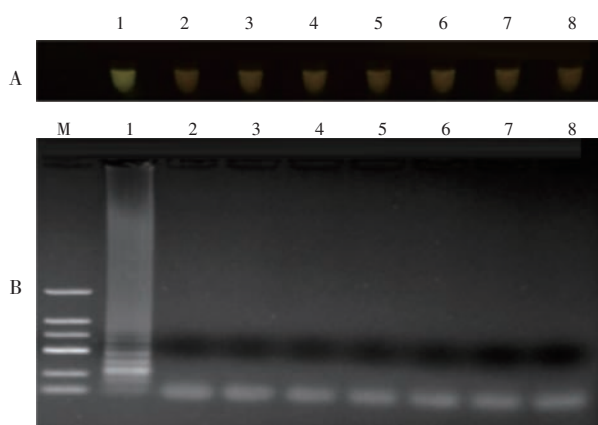
## 2.3 引物筛选

将上述合成的 LAMP 引物按浓度比例 F3 - B3 - LF - LB - FIP - BIP (1:1:2:2:4:4) 进行配制。以沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 采用以下 LAMP 反应体系及检测条件进行扩增, 筛选最佳引物组。

LAMP 反应体系<sup>[10]</sup> (10  $\mu$ L): 取 ddH<sub>2</sub>O 2.8  $\mu$ L, LAMP 缓冲液 1  $\mu$ L, dNTPs (1.6 mmol/L) 1.4  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> (8 mmol/L) 0.6  $\mu$ L, 甜菜碱 (1 mol/L) 2  $\mu$ L, Bst DNA 酶 (8 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, 染料 (1.6 mmol/L) 0.4  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, 制备预混合溶液。每个反应管加入 9  $\mu$ L 预混合溶液, 再加入 1  $\mu$ L 供试品溶液及对照品溶液, 并设空白对照。后续试验溶液的配制同此。

LAMP 检测条件: 反应混合物在实时荧光定量 PCR 仪检测系统进行 LAMP 反应, 反应温度为 65  $^{\circ}$ C, 反应时间为 60 min。试验结果以扩增曲线、产物电泳或在蓝光切胶仪下以阳性和阴性对照为基准目测进行判定。

最优引物筛选: 分别用 3 组引物进行 LAMP 扩增, 反应产物在蓝光切胶仪下以阳性和阴性对照为基准进行目测 (图 1 A), 结果阳性反应液为黄色, 阴性反应液为橙色, 该反应结果基于扩增反应的微量 pH 变化进行检测<sup>[10]</sup>。由反应产物电泳图 (图 1 B) 可见, 阳性对照泳



M. Marker 1. 阳性对照 2 - 8. 阴性对照

A. 蓝光灯下结果 B. 琼脂糖凝胶电泳结果

图 1 *invA* 基因引物组 LAMP 扩增特异性评价

M. Marker 1. Positive control 2 - 8. Negative control

A. Results visualized with blue lamp B. Results of agarose gel electrophoresis

Fig. 1 Evaluation of LAMP amplification specificity of *invA* gene primer groups

道中出现特异性扩增产物, 而阴性对照泳道中无条带, 表明 *invA* 基因引物组 2 为最优引物。

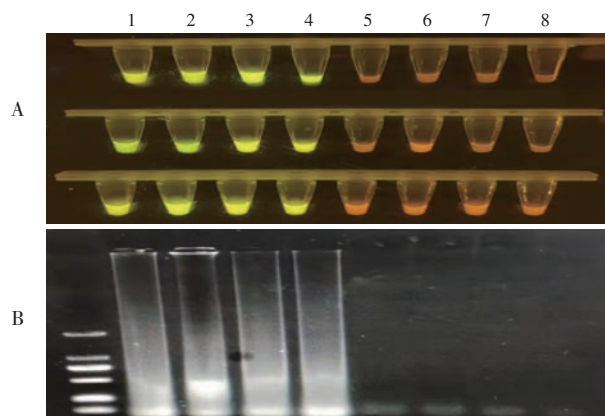
## 2.4 方法学考察

特异性试验: 为了验证引物对沙门氏菌检测的特异性, 于 37  $^{\circ}$ C 条件下培养后, 用 2.3 项下反应体系及检测条件, 以 4 株阳性对照沙门氏菌、3 株非沙门氏菌细菌培养物获得的 DNA 为模板进行 LAMP 扩增检测, 以不含 DNA 模板的阴性质控品作为阴性对照, 验证引物特异性, 重复试验 3 次。采用建立的沙门氏菌 LAMP 检测方法对 7 株细菌进行检测, 菌株来源见表 3, 特异性检测结果见图 2。反应产物在蓝光切胶仪下以阳性和阴性对照为基准进行目测, 结果见图 2 A。可见, 沙门氏菌属的检测结果中, 阳性反应液为黄色 (4 株沙门氏菌亚种均

表 3 试验菌株来源

Tab. 3 Sources of test strains

菌株	来源	LAMP 检测结果
甲型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> A	BNCC336664	+
乙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> B	BNCC103169	+
丙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> C	BNCC186366	+
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	BNCC108207	+
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	BNCC336902	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	BNCC186335	-
产志贺氏毒素大肠埃希氏菌 Shiga toxin - producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)	BNCC186737	-



1. 甲型副伤寒沙门氏菌 2. 乙型副伤寒沙门氏菌 3. 丙型副伤寒沙门氏菌 4. 鼠伤寒沙门氏菌 5. 大肠杆菌 6. 金黄色葡萄球菌 7. 产志贺氏毒素大肠埃希氏菌 8. 无菌水 (空白对照)

A. 蓝光灯下结果 B. 琼脂糖凝胶电泳结果

图 2 沙门氏菌 LAMP 特异性试验检测结果

1. *Salmonella paratyphi* A 2. *Salmonella paratyphi* B 3. *Salmonella paratyphi* C 4. *Salmonella typhimurium* 5. *Escherichia coli* 6. *Staphylococcus aureus* 7. Shiga toxin - producing *Escherichia coli* (STEC)

8. Sterile water (blank control)

A. Results visualized with blue lamp B. Results of agarose gel electrophoresis

Fig. 2 Results of LAMP specificity test of *Salmonella*

为阳性),阴性及空白对照反应液为橙色。由图2 B可见,1,2,3,4泳道中均出现特异性扩增产物,而5,6,7及无菌水(空白对照)泳道中均无扩增条带,表明 *invA* 基因引物特异性较好。

**灵敏度试验:**取营养琼脂平板上新鲜生长的沙门氏菌 BNCC336664 单菌落接种于 LB 肉汤中,以 180 r/min 的转速离心 5 min, 37 °C 培养 24 h 后,吸取 1 mL 菌悬液置 9 mL 无菌生理盐水中,依次稀释,分别得浓度为  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  cfu/mL 的 7 份纯菌稀释液样品。分别取上述 7 份样品制备对应的 DNA 模板 1  $\mu$ L, 采用 2.3 项下方法进行 LAMP 反应,每份样品 DNA 模板设 3 个平行试验。沙门氏菌原菌液浓度为  $10^8$  cfu/mL, 10 倍稀释后,模板量分别为  $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^0$  cfu/mL, 阴性对照为超纯水,对系列稀释菌液进行 LAMP 检测。结果见图 3。可见,沙门氏菌以 *invA* 基因引物进行 LAMP 扩增的检测灵敏度可达  $3 \times 10^1$  cfu/mL。

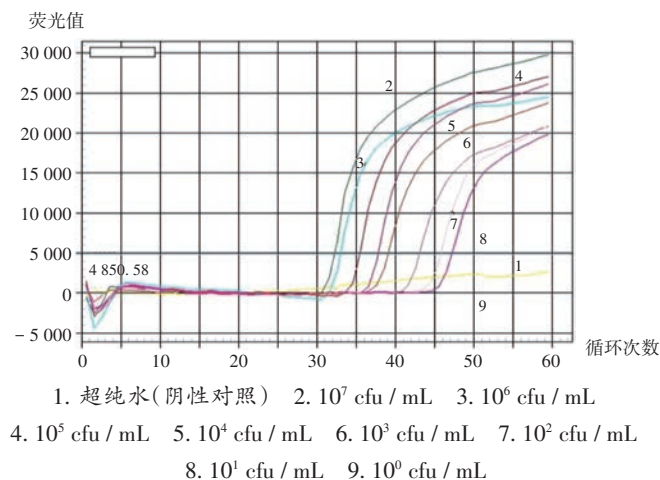


图3 沙门氏菌 LAMP 灵敏度试验结果

1. Ultra-pure water (negative control) 2.  $10^7$  cfu/mL 3.  $10^6$  cfu/mL  
4.  $10^5$  cfu/mL 5.  $10^4$  cfu/mL 6.  $10^3$  cfu/mL 7.  $10^2$  cfu/mL  
8.  $10^1$  cfu/mL 9.  $10^0$  cfu/mL

Fig. 3 Results of LAMP sensitivity test of *Salmonella*

**基质检测限确定:**取亚硝酸盐煌绿增菌液 10 mL, 置 25 mL EP 管中, 分别按  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  cfu/mL 的浓度加入沙门氏菌液, 混匀, 以不含菌液的阴性增菌液作为阴性对照, 分别取 1 mL 菌液提取 DNA, 进行 LAMP 扩增检测。本研究中所建立的 LAMP 检测限为 100 cfu/mL, 检测微量污染沙门氏菌的样品需通过增菌达到更高的灵敏度。对细菌浓度为  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$  cfu/mL 的模拟增菌液样本进行 LAMP 检测, 检测结果见图 4。可见, 在细菌浓度为  $3 \times 10^2$  cfu/mL 时仍可扩增出特异性产物。

## 2.5 样品检测

取 1.2 项下待测药品各 10 g 或 10 mL, 置无菌锥形

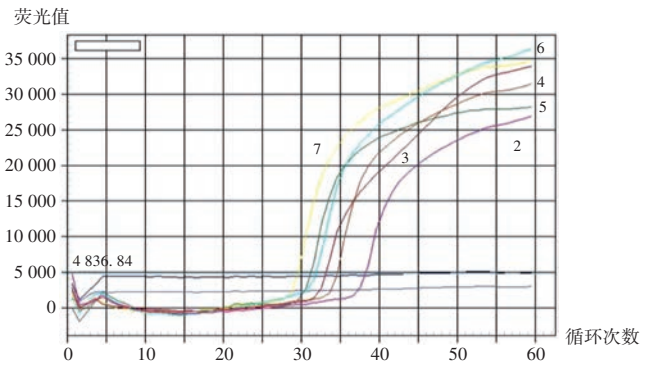
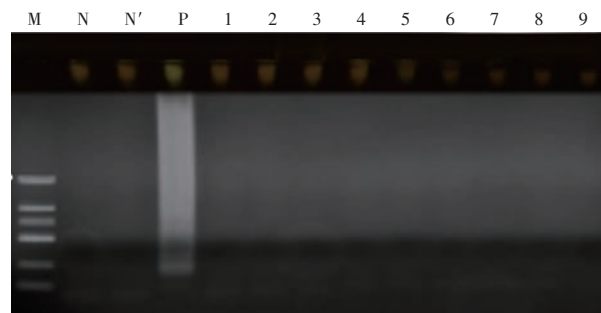


图4 基质中沙门氏菌 LAMP 检测限测定结果  
2-7. 模板量为  $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^2$  cfu/mL  
2-7. Templates:  $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^2$  cfu/mL

Fig. 4 Results of limit of detection determination of LAMP of *Salmonella* in matrix

瓶中, 加亚硝酸盐煌绿增菌液至 200 mL, 作为供试品溶液; 另加入 1 mL 低于  $10^3$  cfu/mL 的沙门氏菌液, 同法制备供试液, 作为阳性对照溶液; 于无菌锥形瓶中加入亚硝酸盐煌绿增菌液至 200 mL, 作为阴性对照溶液。上述溶液分别置 37 °C、180 r/min 恒温培养箱中过夜培养 12 h 后, 按 2.2 项下方法提取基因组 DNA, 采用建立的 LAMP 方法进行检测, 反应产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 5。可见, 阳性对照溶液泳道有特异性扩增, 所有供试品溶液和阴性对照溶液泳道均无特异性扩增, 说明 9 批次样品均未污染沙门氏菌。



M. Marker DL 2000 N, N'. 阴性对照溶液 P. 阳性对照溶液  
1. 排毒养颜胶囊 2. 川贝枇杷露 3. 川贝枇杷膏 4. 强力枇杷露  
5-8. 桑菊感冒片 9. 黄连上清丸

图5 9 批次中成药沙门氏菌 LAMP 检测结果

M. Marker DL 2000 N, N'. Negative control P. Positive control  
1. Paidu Yangyan Capsules 2. Chuanbei Pipa Syrup 3. Chuanbei Pipa Concentrated Decoction 4. Qiangli Pipa Syrup 5-8. Sangju Cold Tablets 9. Huanglian Shangqing Pills

Fig. 5 Results of *Salmonella* detection by LAMP in nine batches of Chinese patent medicine

## 3 讨论

基因的筛选是沙门氏菌检测的关键步骤, *invA* 基因具有属特异性, 是沙门氏菌属检测的常用靶基因<sup>[11-12]</sup>。经生物信息学分析与综合测试评估, *invA* 在沙门氏菌中的特异性能为 97.6%~97.8%<sup>[13-14]</sup>, 达到

理想靶标检测要求,故本研究中选用 *invA* 基因进行特异性引物设计。

LAMP 检测对于引物设计的要求较高,反应所需 Bst DNA 聚合酶可在特定条件下将寡核苷酸随机掺入有缺口的 DNA 模板进行跨片段扩增<sup>[15]</sup>。另外,环引物的加入可加速 LAMP 试验<sup>[16]</sup>,但同时也增加了引物二聚体形成非特异性扩增的可能性,故引物设计不合理易出现假阳性现象。本研究中设计了3组沙门氏菌 *invA* 特异性基因,每组筛选6条引物,引物特异性良好,试验过程中未出现假阳性现象。

本研究中以甲型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* A、乙型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* B、丙型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi* C、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 的 *invA* 基因为检测目标,经过引物设计、引物筛选、引物特异性试验、灵敏度检测、基质中检测限测试及前增菌培养,成功构建了中成药中4个亚种沙门氏菌的 LAMP 快速检测方法,其最佳反应温度为 65 °C,反应时间为 60 min,方法灵敏度可达 10<sup>1</sup> cfu / mL。采用新建立的 LAMP 方法测定了模拟样本亚硝酸盐煌绿增菌液中的沙门氏菌,其灵敏度与细菌直接提取 DNA 进行 LAMP 测定结果相同,且干扰较小。本试验根据扩增曲线、产物电泳及荧光检测判定 LAMP 检测结果,证明 LAMP 快速检测方法检测沙门氏菌的特异性和灵敏度较好,4株沙门氏菌扩增结果显示均为阳性,其余3种对照细菌扩增结果显示均为阴性。本方法从 DNA 提取开始,约 1.5 h 即可完成试验,大大减少了检测周期。其扩增反应在 65 °C 恒温条件下即可完成,不需使用特殊的仪器设备,操作简便,LAMP 技术在普通实验室条件下即可实现<sup>[17]</sup>。采用 LAMP 方法快速初检后,初筛呈阳性的样本再用常规培养法进行验证,可缩短检测周期,减少了工作量,有效降低了检测成本。

本研究中建立的 LAMP 快速检测方法能在 24 h 内完成中成药中沙门氏菌的检测,具有检测时效短、特异性强、灵敏度高、不易交叉污染等优势,成为《中国药典》方法的有效补充。此外,本研究中建立的方法经适当调整后还可应用于中药材、中药饮片、保健食品等原料中沙门氏菌污染的监测工作,有较好的推广应用前景。

#### 参考文献

[1] World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases in the WHO regions[M]. Geneva: World Health Organization, 2015: 84 - 86.

[2] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food - borne outbreaks in 2016[J]. EFSA J, 2017, 15(12): e05077.

[3] 金晶. 肠炎沙门菌不同检测方法比较[J]. 中国校医, 2018, 32(2): 139 - 140.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 165 - 170.

[5] 孙玉岭, 吴斌, 秦成, 等. 食品中沙门菌培养条件的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2006, 18(1): 48 - 52.

[6] 陈惠娟, 张纯萍, 李金贵, 等. 不同增菌液和培养基对沙门菌分离效果的比较研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(24): 20 - 23.

[7] 郭澍强, 贺生芳, 郝俊虎, 等. 沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 23 - 29.

[8] 欧新华, 张如胜, 宋克云, 等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测沙门菌属方法的建立[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6): 1945 - 1947.

[9] 刘卫德, 刘绪平, 章瑛, 等. 中成药中沙门氏菌实时荧光 PCR 检测方法的建立及优化[J]. 中国医药生物技术, 2022, 17(2): 59 - 63.

[10] ZHAO, X, WANG, L, CHU, J, et al. Development and application of a rapid and simple loop - mediated isothermal amplification method for food - borne Salmonella detection[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(6): 1655 - 1659.

[11] 章小洪, 张维波, 姜川, 等. 荧光定量环介导等温扩增法快速检测食品中沙门氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8056 - 8061.

[12] 高志强, 汪琳, 张灿, 等. 沙门氏菌 LAMP 可视化检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(2): 68 - 72.

[13] TURKI Y, OUZARI H, MEHRI I, et al. Biofilm formation, virulence gene and multi - drug resistance in Salmonella Kentucky isolated in Tunisia[J]. Food Res Int, 2012, 45(2): 940 - 946.

[14] MALORNY B, HOORFAR J, BUNGE C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: Towards an international standard[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 290 - 296.

[15] ZYRINA NV, ZHELEZNAYA LA, DVORETSKY EV, et al. N. BspD6I DNA nickase strongly stimulates template - independent synthesis of non - palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase[J]. Biol Chem, 2007, 388(4): 367 - 372.

[16] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop - mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223 - 229.

[17] 田楨干, 阎俊, 陆晔, 等. LAMP 技术快速检测沙门氏菌方法的建立及其应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(5): 296 - 299.

(收稿日期: 2022 - 05 - 23; 修回日期: 2022 - 09 - 26)