

# 树鼩粪便中沙门氏菌 LAMP 检测方法建立及应用

王璇,袁园,张志成,刘城秀,宋庆凯,孙晓梅\*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队,云南省眼科疾病防治研究重点实验室,昆明 650118)

**【摘要】 目的** 建立树鼩粪便沙门氏菌的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)检测方法,并对此方法进行初步应用。**方法** 根据沙门氏菌种属特异性基因 invA(侵袭蛋白基因 A)的保守序列,设计合成特异性 LAMP 引物。分别设定十个反应温度即 57℃~66℃和十个反应时间即 24~42 min 进行优化,并测定本方法的特异性和灵敏度;同时进行普通 PCR 实验,作为本方法的验证和比较。用建立的 LAMP 法对 91 份野生来源的树鼩稀便样品进行检测。结果优化反应条件选出反应温度为 62℃,反应时间 34 min;该方法对沙门氏菌的灵敏度可达  $3.36 \times 10^1$  CFU/mL,比普通 PCR 方法高 10~100 倍;对 10 种树鼩来源的肠道细菌进行 LAMP 检测,只有沙门氏菌属的肠炎沙门氏菌和乙型副伤寒沙门氏菌检测为阳性,其余为阴性;对 91 份野生树鼩粪便样品进行 LAMP 检测,阳性检出率为 20.88%;LAMP 法的所有反应可在 40 min 内完成。**结果** 可通过肉眼观察颜色变化直接判定。**结论** 所建立的 LAMP 方法具有便捷、快速、灵敏、特异等特点,可用于树鼩粪便中沙门氏菌的大规模快速检测。

**【关键词】** 沙门氏菌;环介导等温扩增;粪便样品;树鼩  
**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0090-08  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.02.016

## Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Salmonella* in feces of tree shrews

WANG Xuan, YUAN Yuan, ZHANG Zhicheng, LIU Chengxiu, SONG Qingkai, SUN Xiaomei\*  
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS)& Peking Union Medical College (PUMC) Institute of Medical Biology Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medicine Sciences Experimental Tree Shrew Standardization and Application Research Provincial Innovation Team, The Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control, Kunming 650118, China)

**【Abstract】 Objective** To Establish a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Salmonella* in fecal samples of tree shrews, and report the result of preliminary application of this method. **Methods** LAMP primers were designed and synthesized according to the conserved sequence of *Salmonella* specific gene invA (invasive protein gene A). To optimize the reaction time and temperature by setting 10 reaction times (24 to 42 min) and temperature (57℃ to 66℃) and tested its specificity and sensitivity. At the same time, a conventional PCR test was performed to verify and compare with the LAMP assay. 91 fecal samples of wild-derived tree shrews were detected by the

**【基金项目】** 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);重点实验室运行补助专项(2017DG008);云南省重大科技专项(2017ZF007)。  
**【作者简介】** 王璇(1993—),男,硕士生,研究方向:病原生物学。E-mail: 764065560@qq.com  
**【通信作者】** 孙晓梅(1963—),女,主任技师。E-mail: sxm@imbcams.com.cn

LAMP assay. **Results** The experimental condition was confirmed as 62℃ and 34 min. The sensitivity of *Salmonella* was  $3.36 \times 10^1$  CFU/mL, which was 10 to 100 times higher than that of conventional PCR assay. In 10 kinds of intestinal bacteria for LAMP amplification, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella paratyphi* B were positive, the others were negative. Among the 91 samples of tree shrew fecal samples detected by the LAMP assay, the positive detection rate was 20.88%. The LAMP assay can be completed within 40 min, the result can be observed and judged visually by color changes. **Conclusions** The LAMP assay established in this study is convenient, rapid, sensitive and specific. It can be used as a rapid measure for large-scale detection of *Salmonella* in feces of tree shrews.

**【Key words】** *Salmonella*; loop-mediated isothermal amplification; LAMP; feces; tree shrews

沙门氏菌 (*Salmonella*) 属于 γ-变形菌纲、肠杆菌科、沙门氏菌属,为革兰氏阴性菌。是重要的人兽共患病原菌之一,引起人兽感染后可能表现为无症状带菌状态,也会出现有症状的致死疾病,能加重病态或死亡率,或者降低动物的繁殖生产力<sup>[1]</sup>,对实验动物的影响较严重;是所有实验动物微生物质量控制中必须排除的病原菌。肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 和伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 是全世界流行的主要沙门氏菌<sup>[2]</sup>,感染后通常引起呕吐、腹泻、肠炎等症状。

环介导等温扩增技术是由 Notomi 等<sup>[3]</sup>在 2000 年最早发明的一种新型的核酸扩增方法。其原理是针对靶基因保守序列的 6~8 区域设计 4~6 条引物,包括外引物、内引物、环引物各一对,其中内引物和环引物是反应必需的,加入环引物可通过与茎环 DNA 杂交,并促进链置换和扩增<sup>[4-5]</sup>,以加速 LAMP 反应,在具链置换活性的 DNA 聚合酶(如 Bst)作用下,即可在 60℃~66℃ 的恒温条件下短时间内实现大量扩增,反应结果可通过直接观察是否产生焦磷酸镁白色沉淀来判断<sup>[6-7]</sup>,也可在反应前后加入显色剂(如钙黄绿素,SYBR Green I 等)根据颜色变化来判断,还可在紫外光下通过观察荧光情况判断<sup>[8-9]</sup>;对扩增产物进行凝胶电泳为梯状条带。

LAMP 法检测具有特异、灵敏、快速、便携等特点,在恒温条件下 40 min 内即可完成高效扩增反应,可肉眼观察反应结果,被广泛应用病原菌和寄生虫的检测中<sup>[10]</sup>。

树鼩作为一种实验动物,其在进化上接近于灵长类动物,在生理、生化及解剖学等生物学特性方面与人类有着相似之处,被广泛引用于人类病毒性疾病<sup>[11]</sup>、眼科疾病<sup>[12]</sup>、生殖生物学及免疫学<sup>[13]</sup>等疾病研究中。利用树鼩进行实验前需要检测沙门氏菌以排除其对实验的干扰,因此,建立快速、简便、特异的方法对于树鼩沙门氏菌检测具有重要意义。本研究旨在建立一种具有上述特点的可大规模检测树鼩粪便沙门氏菌的 LAMP 方法。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

本研究使用的两个阳性菌株即肠炎沙门氏菌 (CMCC50041 株,冻干粉) 和乙型副伤寒沙门氏菌 (CMCC50094 株,冻干粉) 来自于中国食品药品鉴定研究院;其它菌株即普通变形杆菌、粪肠球菌等 8 株均为前期从野生来源树鼩肠道中分离、鉴定、保存的菌株<sup>[14]</sup>,见表 1 中 3~10 号样品,由中国医学科学院医学生物学研究所的李建芳老师惠赠。

表 1 实验菌株及来源  
Tab.1 The experimental bacterial strains and sources

| 样品编号<br>Sample Number | 菌株<br>Bacterial strains                    | 来源<br>Sources                                             |
|-----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1                     | 肠炎沙门氏菌 ( <i>Salmonella enteritidis</i> )   | 中国食品药品鉴定研究院 National Institutes for Food and Drug Control |
| 2                     | 乙型副伤寒沙门氏菌 ( <i>Salmonella paratyphi</i> B) | 中国食品药品鉴定研究院 National Institutes for Food and Drug Control |
| 3                     | 普通变形杆菌 ( <i>Proteus vulgaris</i> )         | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 4                     | 粪肠球菌 ( <i>Enterococcus faecalis</i> )      | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 5                     | 屎肠球菌 ( <i>Enterococcus faecium</i> )       | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 6                     | 费格森埃希菌 ( <i>Escherichia fergusonii</i> )   | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 7                     | 弗氏志贺氏菌 ( <i>Shigella flexneri</i> )        | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 8                     | 索氏志贺氏菌 ( <i>Shigella sonnei</i> )          | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 9                     | 大肠埃希菌 ( <i>Escherichia coli</i> )          | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |
| 10                    | 金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )   | 树鼩粪便分离 Isolate from feces of tree shrew                   |

1.2 树鼩粪便样本

利用肛拭子采集野生来源、腹泻树鼩的稀便，于 1.5 mL 离心管中，4℃ 保存。

1.3 主要仪器与试剂

高速离心机 (HIMAC) ; nanophotometer N50 微量分光光度仪 (Implen) ; PCR 扩增仪 (Bio-Rad) ; 凝胶成像仪 (Bio-Rad) ; 电泳仪和电泳槽 (Bio-Rad) ; 细菌全基因组提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0) ; 金牌 Mix (擎科生物) ; WarmStart® LAMP 试剂盒 (New England Biolabs Inc) ; GelRed 凝胶核酸染料 (Biotium) 。

1.4 实验方法

1.4.1 菌种培养

首先将试验菌株接种于 LB 液体培养基内，恒温振荡器内 37℃ 250 r/min 过夜培养，以活化和增殖细菌。然后将肠炎沙门氏菌和乙型副伤寒沙门氏菌分别接种于 SS 培养基上，其余菌种接种于营养琼脂，37℃ 恒温培养箱倒置培养 24 h。

1.4.2 菌液浓度测定

将纯培养的肠炎沙门氏菌用无菌水 10 倍梯度稀释后接种，按平板菌落计数法计数。

1.4.3 细菌 DNA 提取

纯培养的实验菌株参照细菌全基因组提取试剂盒说明书提取 DNA；粪便样品中细菌 DNA 提取参考 LaMontagne<sup>[15]</sup>、蹇宇<sup>[16]</sup> 的细菌基因组提取方法并略微改变。

1.4.4 引物设计

利用沙门氏菌的 invA 基因，参考 Rahn 等<sup>[17]</sup> 的文献合成普通 PCR 引物 (invA-F、invA-R)；参考

Yang 等<sup>[18]</sup> 的研究合成 LAMP 引物 (F3、B3、FIP、BIP、Loop-F、Loop-B)，引物由擎科生物合成，引物序列见表 2。

1.4.5 LAMP 检测方法建立和条件优化

利用经普通 PCR 检测为阳性的上述样本进行 LAMP 方法建立及优化。按照 WarmStart® LAMP 试剂盒说明书，采用 25 μL 的反应体系，包括 WarmStart LAMP 2X Master Mix 12.5 μL，40 pmol FIP/BIP 各 1 μL，10 pmol F3/B3 各 1 μL，20 pmol LB/LF 各 1 μL，LAMP Fluorescent Dye (50X) 0.5 μL，模板 DNA 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足 25 L。对反应温度和反应时间进行优化，其中设置温度梯度 57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃；设置时间梯度 24、26、28、30、32、34、36、38、40、42 min，以筛选最佳反应温度和反应时间。

1.4.6 LAMP 产物检测

直接肉眼观察判断，管中出现白色浑浊为阳性，无明显浑浊为阴性。另外，反应前在体系中加入钙黄绿素，反应结束后阳性为绿色，阴性为橙色，紫外光照射下阳性发出绿色荧光，阴性不发荧光。取 LAMP 产物 3 μL 用 2% 的琼脂糖进行凝胶电泳，在凝胶成像系统中成像，阳性为梯状条带；阴性无明显条带。

1.4.7 灵敏度测试

用上述建立的 LAMP 方法对 2 株沙门氏菌标准株和 8 株非沙门氏菌进行检测，同时进行普通 PCR 扩增 (其中 PCR 反应条件为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 40 s，60℃ 退火 40 s，72℃ 延伸 50 s，35 个循环；72℃ 延伸 5 min；保存于 4℃)。取扩增产物 3 μL 于 2% 的琼脂糖进行凝胶电泳。

表 2 引物序列

Tab.2 The primer sequences

| 引物名称<br>Primer names | 序列(5' - 3')<br>Sequences (5' - 3')                   | 位置<br>Position                    | 产物<br>Products | 参考<br>Reference      |
|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------------|
| invA-F<br>inav-R     | GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGCAA<br>TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | 287 - 312<br>571 - 550            |                |                      |
| F3<br>B3             | CGGCCCGATTTTCTCTGG<br>CGGCAATAGCGTCACCTT             | 503 - 520<br>665 - 682            |                | Rahn <sup>[11]</sup> |
| FIP                  | GCGCGGCATCCGCATCAATA-<br>TGCCCGGTAAACAGATGACT        | 573 - 592 (F1c)<br>527 - 546 (F2) | 284 bp         |                      |
| BIP                  | GCGAACGGCGAAGCGTACTG-<br>TCGCACCGTCAAAGGAAC          | 573 - 592 (F1c)<br>527 - 546 (F2) |                | Yang <sup>[12]</sup> |
| Loop-F<br>Loop-B     | GGCCTTCAAATCGGCATCAAT<br>GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG      | 547 - 567<br>613 - 634            |                |                      |

1.4.8 灵敏度测试

用无菌水 10 倍梯度稀释纯培养的沙门氏菌,每个稀释梯度取 5 mL 菌液提取 DNA。分别进行 PCR 和 LAMP 法扩增、电泳,比较两种方法的灵敏度。

1.4.9 LAMP 法在快速检测树鼩粪便中沙门氏菌的应用

对 91 份野生树鼩新鲜稀便提取的 DNA 样品用建立的 LAMP 法进行检测,同时用普通 PCR 法进行对比,比较两种方法的检出率。

2 结果

2.1 沙门氏菌标准株检测

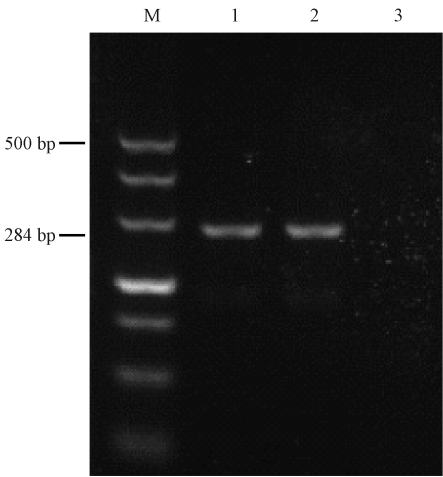
纯培养的沙门氏菌初始浓度为  $3.36 \times 10^8$  CFU/mL。PCR 扩增后凝胶电泳结果显示在 284 bp 处有目的条带(见图 1),表明为沙门氏菌阳性。LAMP 试验结束后反应管内液体为绿色,无模板对照为橙色,凝胶电泳结果显示为梯状条带,是 LAMP 扩增的典型特征(见图 2)。

2.2 LAMP 反应条件优化结果

条件优化结果显示在所有温度梯度下均出现条带,且条带亮度差异较小,选取 62℃ 作为后续实验的反应温度;反应时间在 34 min 以前条带亮度逐渐增强,34 min 以后条带无明显差异,因此确定最佳反应时间 34 min。

2.3 LAMP 特异性试验结果

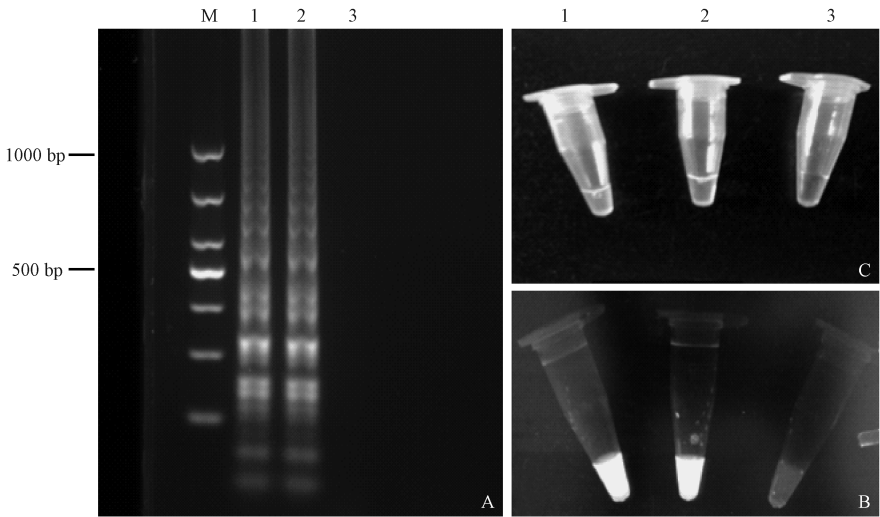
利用优化好的 LAMP 法检测特异性,结果显示只在两个沙门氏菌标准株中出现了绿色,且在紫外光下有绿色荧光,凝胶电泳结果呈梯状扩增条带,



注:(M) DL500 DNA marker;(1)肠炎沙门氏菌标准株;(2)乙型副伤寒沙门氏菌标准株;(3)无模板对照。

图 1 沙门氏菌标准株 PCR 检测结果电泳图  
Note:(M) DL500 DNA marker. (1) *Salmonella enteritidis* standard strain. (2) *Salmonella paratyphi* B standard strain. (3) No template control.

Fig. 1 The electrophoresis chart of *Salmonella* standard strain PCR test



注:(A) 凝胶电泳(阳性为梯状条带);(B) 凝胶成像系统拍照;(C) 肉眼观察(阳性为绿色);(M) DL1000 DNA marker;(1) 肠炎沙门氏菌标准株;(2) 乙型副伤寒沙门氏菌标准株;(3) 无模板对照。

图 2 沙门氏菌标准株 LAMP 检测结果

Note. (A) Gel electrophoresis (Positive samples show ladder strips). (B) Pictures taken by the gel imaging system. (C) Visual observation (positive samples are green). (M) DL1000 DNA marker; (1) *Salmonella enteritidis* standard strain. (2) *Salmonella paratyphi* B standard strain; (3) No template control.

Fig. 2 The results of *Salmonella* standard strain LAMP test



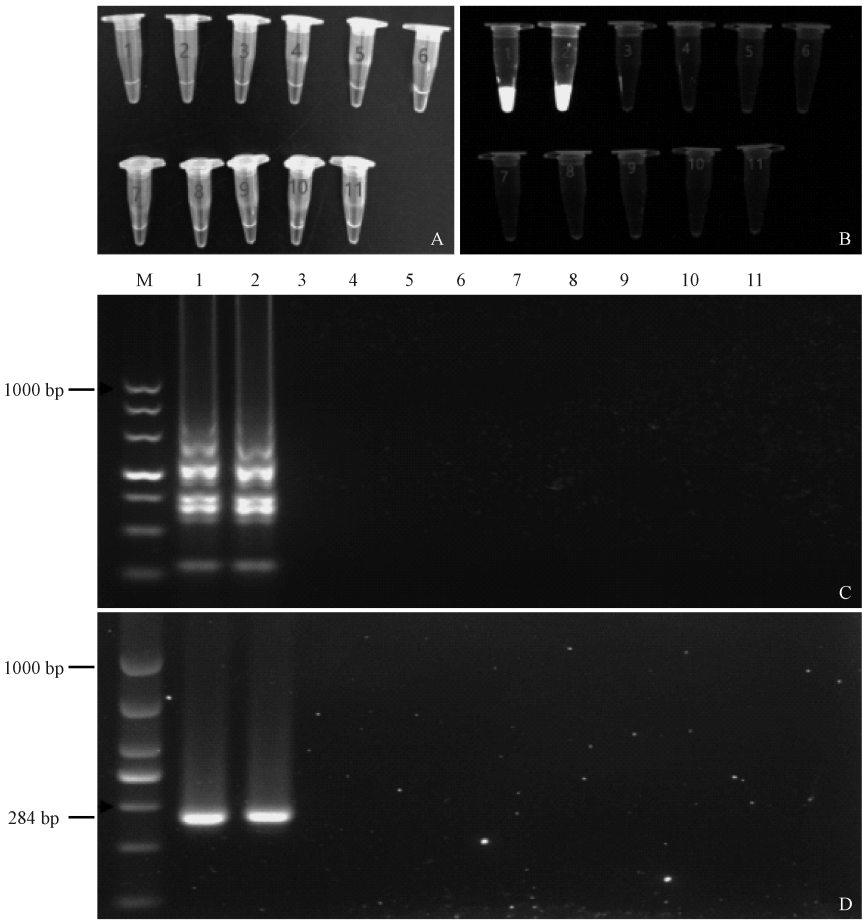
而在其他 8 株非沙门氏菌内无明显条带。与 PCR 结果一致,说明建立的 LAMP 法对沙门氏菌具有特异性。(见图 3)

2.4 LAMP 检测沙门氏菌的灵敏度及 PCR 比较结果

对纯培养的肠炎沙门氏菌进行梯度稀释,浓度依次为: $3.36 \times 10^8 \sim 3.36 \times 10^0$  CFU/mL。然后进行 LAMP 和 PCR 检测,凝胶电泳结果显示 LAMP 产物在  $3.36 \times 10^8 \sim 3.36 \times 10^1$  CFU/mL 有明显梯状条带;PCR 产物在  $3.36 \times 10^8 \sim 3.36 \times 10^3$  CFU/mL 有明显条带(见图 4)。因此,LAMP 法的检测限在  $3.36 \times 10^1 \sim 3.36 \times 10^0$  CFU/mL 之间,PCR 的检测限在  $1 \times 10^3 \sim 3.36 \times 10^2$  CFU/mL 之间,LAMP 检测

沙门氏菌的灵敏度是 PCR 检测的 10 ~ 100 倍。  
2.5 LAMP 法在快速检测树鼩粪便中沙门氏菌的应用

对采集的 91 份新鲜树鼩粪便样品提取 DNA 进行 LAMP 检测,同时进行普通 PCR 验证,LAMP 结果显示阳性样本数为 19 份,阳性检出率为 20.88%;PCR 结果显示阳性样本数为 18 份,阳性检出率为 19.78%,且 PCR 和 LAMP 检出的阳性样品完全吻合。LAMP 及 PCR 产物凝胶电泳部分结果(见图 5)。对 PCR 检测阳性的样品随机抽取三份进行测序,测序结果与目的序列的吻合度均达到 99% 以上,因此可以确定 LAMP 结果的可靠性。

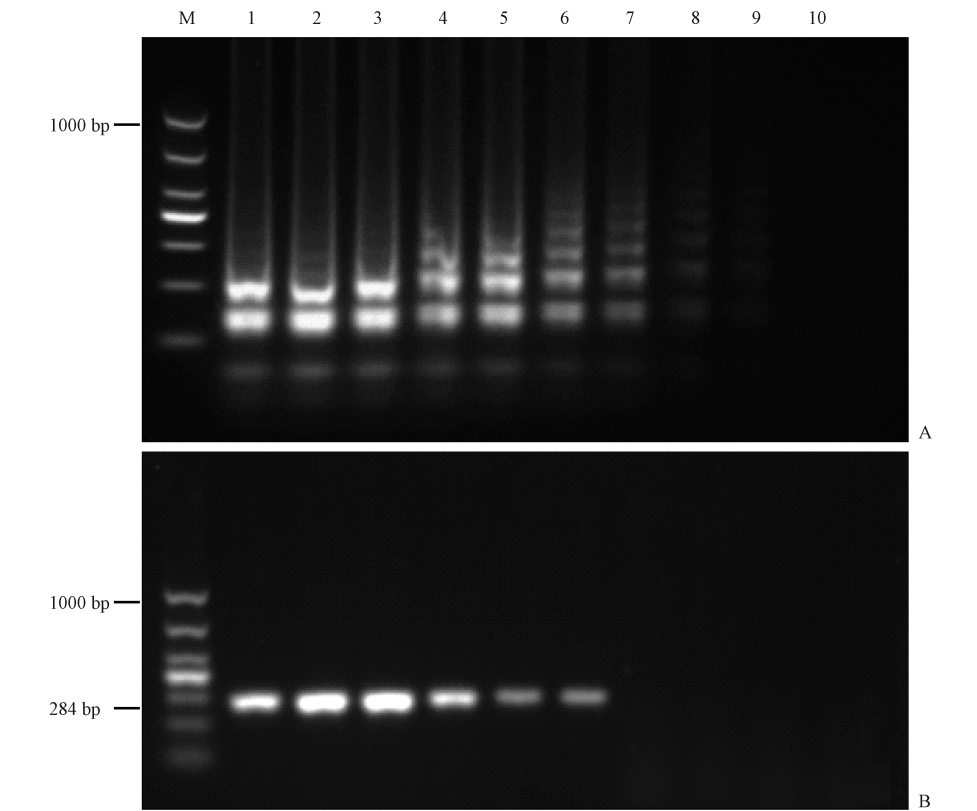


注:(A) 肉眼观察;(B) 凝胶成像系统拍照;(C) LAMP 检测特异性;(D) PCR 检测特异性;(M) DL1000 DNA marker;(1) 肠炎沙门氏菌;(2) 乙型副伤寒沙门氏菌;(3) 普通变形杆菌;(4) 粪肠球菌;(5) 屎肠球菌;(6) 费格森埃希菌;(7) 弗氏志贺菌;(8) 索氏志贺氏菌;(9) 大肠埃希菌;(10) 金黄色葡萄球菌;(11) 无模板对照。

图3 LAMP 和 PCR 检测特异性

Note. (A) Visual observation. (B) Pictures taken by the gel imaging system. (C) The specificity test results of LAMP. (D) The specificity test results of PCR. (M) DL1000 DNA marker. (1) *Salmonella enteritidis*. (2) *Salmonella paratyphi* B. (3) *Proteus vulgaris*. (4) *Enterococcus faecalis*. (5) *Enterococcus faecium*. (6) *Escherichia fergusonii*. (7) *Shigella flexneri*. (8) *Shigella sonnei*. (9) *Escherichia coli*. (10) *Staphylococcus aureus*. (11) No template control.

Fig.3 The specificity of LAMP and PCR detection



注:(A) LAMP 检测灵敏度;(B) PCR 检测灵敏度;(M) DL1000 DNA marker;(1~9 号)  $3.36 \times 10^8 \sim 3.36 \times 10^0$  CFU/mL;(10) 无模板对照。

图 4 LAMP 和 PCR 检测灵敏度

Note. (A) LAMP assay. (B) PCR assay. (M) DL1000 DNA marker. (No. 1-No. 9)  $3.36 \times 10^8$  to  $3.36 \times 10^0$  CFU/mL; (10) No template control.

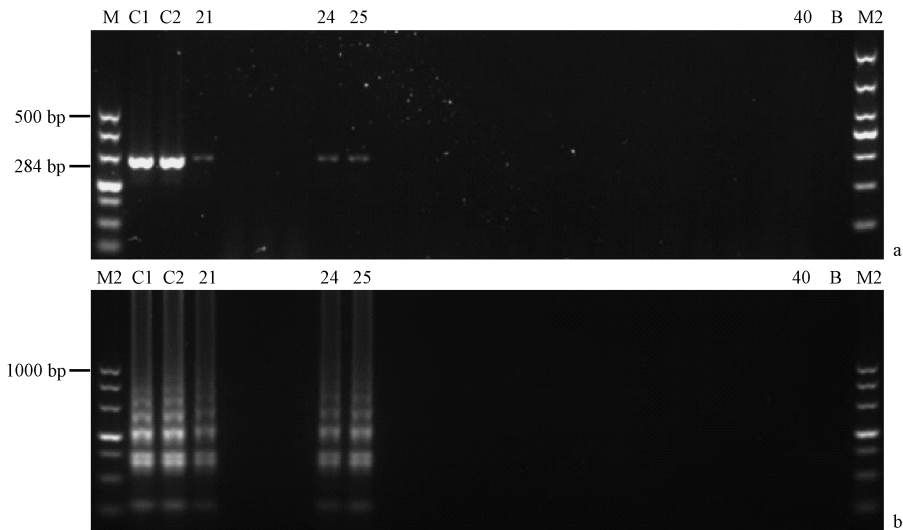
Fig. 4 Sensitivity of the LAMP and PCR assays

3 讨论

实验动物致病菌的筛查和检测方法通常需要具备简便、快速、特异、灵敏等特性。沙门氏菌作为一种致病性强、流行范围广的病原,目前常用的检测方法主要有传统的培养鉴定、免疫学(如 ELISA 试验)及分子生物学(PCR, qPCR 等)方法。虽然传统的培养鉴定法仍然是沙门氏菌检测的金标准,但通常需要耗费较长的时间(3 d 以上),不利于快速检测诊断<sup>[19]</sup>;免疫学方法使用方便、检测快速,但其较低的特异性限制了应用<sup>[20]</sup>,并且针对于树鼯这一新的实验动物品种,目前还没有可使用的市售免疫试剂盒;基于分子生物学基础的 PCR 和 qPCR 方法被广泛用于沙门氏菌检测,具有较高特异性和灵敏度,但是需要复杂的仪器设备,且结果必须通过凝胶电泳才能观察,耗时较长,不适用于大规模快速检测。LAMP 方法针对目的基因的 6~8 个区域设计 4~6 条引物,只有同时存在

所有引物才能启动扩增,这保证了 LAMP 法的特异性;LAMP 法对仪器要求较低,不需要昂贵的 PCR 仪,在恒温水浴锅中就可以完成全部反应,避免了升降温循环的时间消耗,而且实验结果直接肉眼可视。因此,相比于传统的细菌培养、免疫学方法、PCR 方法, LAMP 法具有操作简便、耗时短、不需要特殊设备、结果可视等优点,更适用于现场快速检测和基层样品初筛<sup>[21-22]</sup>。

沙门氏菌 *invA* 基因编码侵袭蛋白 A,与细菌吸附侵入有关<sup>[23]</sup>,侵袭蛋白决定沙门氏菌对肠黏膜细胞的侵袭力,与其致病性密切相关<sup>[24]</sup>, *invA* 基因高度保守且具有种属特异性,常被用作沙门氏菌检测的靶基因。另外,虽然 *FimY*, *bcdD*<sup>[25]</sup> 等基因也常被用于沙门氏菌检测的靶基因,但是 *FimY* 基因作为 LAMP 法的靶基因时不能检测邦戈沙门菌 (*Salmonella bongori*),所以 *FimY* 基因不适用于沙门氏菌属的所有种的检测<sup>[26]</sup>。本方法选取了 *invA* 基因作为 LAMP 法检测的目的基因,在其保守区设计



注:(a) PCR 产物凝胶电泳;(b) LAMP 产物凝胶电泳;(M) DNA marker;(M2) DL1000 DNA marker;(C1) 肠炎沙门氏菌;(C2) 乙型副伤寒沙门氏菌;(21~40 号) 树鼩粪便样品 21~40 号;(B) 无模板对照。

图 5 树鼩粪便样品部分 LAMP 检测结果

Note. (a) The gel electrophoresis results of PCR products. (b) The gel electrophoresis results of LAMP products. (M) DL500 DNA marker. (M2) DL1000 DNA marker. (C1) *Salmonella enteritidis*. (C2) *Salmonella paratyphi* B. (No. 21~40) Tree shrew fecal samples No. 21-No. 40. (B) No template control.

Fig. 5 The results of LAMP test of a part of the tree shrew stool samples

引物,结果显示在 2 株沙门氏菌菌株表现出阳性,非沙门氏菌的 8 种细菌检测为阴性,扩增产物经测序验证,与预期一致,说明具有较好的特异性。

在本研究中建立的沙门氏菌 LAMP 法的检测限为  $3.36 \times 10^1$  CFU/mL,是普通 PCR 法的 10~100 倍,反应时间为 34 min。吴家林等<sup>[27]</sup>利用 *invA* 基因建立的沙门氏菌 LAMP 法检测限为  $4.8 \times 10^1$  CFU/mL,反应时间 60 min;邱索平等<sup>[28]</sup>利用 *FimY* 基因建立的实验猴沙门氏菌检测方法的检测限  $1.35 \times 10^1$  CFU/mL,反应时间 60 min;Zhuang 等<sup>[25]</sup>利用 *bcfD* 基因建立的 LAMP 的检测限  $5 \times 10^0$ ,反应时间 25 min;马晨等<sup>[29]</sup>比较了传统的细菌分离培养鉴定方法,其检测限是  $0.5 \times 10^5$  CFU/mL,低于这一剂量的样品都将无法被检测,并且检出时间需要 1 d 以上,抗杂菌干扰能力较分子生物学方法低,样品中微生物污染背景较高且沙门氏菌剂量较低时,检测结果易被干扰。本研究建立的树鼩粪便中沙门氏菌的 LAMP 检测方法的灵敏度与其他的研究报告的 LAMP 方法相近,而高于传统的培养鉴定方法;反应时间明显低于传统培养鉴定方法和不含 LF/LB 引物的 LAMP 方法,说明加入 LF/LB 引物能通过促进链置换和扩增从而大大加速 LAMP 反应<sup>[4-5]</sup>。

由于 LAMP 法较高的灵敏度和扩增效率,极易

因污染而出现假阳性<sup>[26]</sup>,因此在加样过程中应该尽量避免交叉污染和产生气溶胶污染,阳性模板和其他样品模板加样区域应分离。在本试验中使用的显色剂是钙黄绿素,在反应前加入到反应体系,反应过程中不需开盖,避免了反应后开盖加入显色剂时引起的气溶胶污染,保证了实验的特异性。

利用建立的 LAMP 法对 91 份野生来源树鼩新鲜稀便样品检测,结果显示 LAMP 法检测的阳性率为 20.88%,PCR 检测的阳性率为 19.78%,阳性样品完全一致,表明所建立 LAMP 方法可用于树鼩粪便样品的检测。邢进等<sup>[30]</sup>曾对树鼩肠道内容物进行细菌分离培养,并进行生化、药敏和 16SrRNA 测序鉴定,最终得出树鼩沙门氏菌携带率为 3.3%;高家红等<sup>[31]</sup>的树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究结果显示沙门氏菌携带率 8.41%。本研究的沙门氏菌阳性检出率高于上述研究结果,原因之一是样品来源不同,本次实验检测的粪便样品均来自于野生、待检疫的腹泻树鼩,并且采样时间为夏季,湿热的环境易于沙门氏菌滋生。原因之二是分子生物学检测方法的灵敏性。本实验研究为实验树鼩沙门氏菌病原的检测提供了又一种简单、快捷、有效的方法。

# 参考文献:

- [1] 彭丽萍, 陈博文, 徐建超, 等. 食品沙门氏菌检测方法进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 16(5): 89-91.
- [2] 徐桂云, 樊世杰. 家禽沙门氏菌感染现状及不同国家的防治策略[J]. 中国家禽, 2012, 34(9): 7-12.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [4] Nagamine K, Hase T, Notomi T, et al. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [5] Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, et al. Development of immuno-capture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum[J]. J Virol Methods, 2004, 121(1): 49-55.
- [6] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 150-154.
- [7] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. Nat Protoc, 2008, 3(5): 877-882.
- [8] Gao H, Lei Z, Jia J, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of Yersinia enterocolitica in pork meat[J]. J Microbiol Methods, 2009, 77(2): 198-201.
- [9] Lu CC, Dai TT, Zhang HF, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay to detect Fusarium oxysporum[J]. J Phytopathol, 2015, 163(1): 63-66.
- [10] 戴婷婷, 陆辰晨, 郑小波, 等. 环介导等温扩增技术在病原物检测上的应用研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(5): 695-703.
- [11] 殷安国, 匡德宣, 李晓飞, 等. 树鼩模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 86-89.
- [12] 周广龙, 朱勤, 李振宇, 等. 树鼩在眼科学的基础研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 652-655.
- [13] 徐新平, 陈红波, 贲昆龙. 树鼩在医学生物学中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 187-190.
- [14] 刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定[J]. 中国比较医学杂志. 2015, 25(210): 64-68.
- [15] LaMontagne MG, Michel FC Jr, Holden PA, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. J Microbiol Methods, 2002, 49(3): 255-264.
- [16] 蹇宇, 赵欣. 大鼠粪便中细菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 166-169.
- [17] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, et al. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella[J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(4): 271-279.
- [18] Yang Q, Domesle KJ, Wang F, et al. Rapid detection of Salmonella in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 112.
- [19] GB4789.4-2010, 食品微生物学检验沙门氏菌检验[S].
- [20] Eriksson E, Aspan A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for Salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry[J]. BMC Vet Res, 2007, 3: 21.
- [21] 张凤玉, 胡丹, 吕恒, 等. 2 型猪链球菌 89K 毒力岛 IV 型分泌系统 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(2): 113-116, 121.
- [22] 熊春蓉, 殷旭仁, 宋丽君, 等. 环介导同温 DNA 扩增法 (LAMP) 与解剖-显微镜检法检测血吸虫感染性钉螺效果的比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(12): 1084-1087.
- [23] Ashida H, Toyotome T, Nagai T, et al. Shigella chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors[J]. Mol Microbiol, 2007, 63(3): 680-693.
- [24] Galán JE, Curtiss R. Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars; invA mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells[J]. Infect Immun, 1991, 59(9): 2901-2908.
- [25] Zhuang L, Gong J, Li Q, et al. Detection of Salmonella spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting bcfD gene[J]. Lett Appl Microbiol. 2014, 59(6): 658-664.
- [26] Boyd EF, Hartl DL. Analysis of the type 1 Pilin gene cluster fim in Salmonella: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions[J]. J Bacteriol, 1999, 181(4): 1301-1308.
- [27] 吴家林, 沙丹, 马广源, 等. 沙门氏菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(7): 611-614.
- [28] 邱索平, 林志雄, 游勇来, 等. 实验猴粪便样品中沙门氏菌 LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(1): 51-56.
- [29] 马晨, 陈雪华, 李建国. 国标法与快速法检测沙门氏菌的结果比较[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 276-282.
- [30] 邢进, 冯育芳, 付瑞, 等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查[J]实验动物科学, 2012, 29(3): 34-38.
- [31] 高家红, 江勤芳, 罗志武, 等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 24-26, 34.

[收稿日期]2017-09-20