



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：牛奶中沙门氏菌可视化 LAMP 快速检测技术
作者：于珊珊，王楠，陈宏伟，韩殿鹏，梁俊
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20250073
收稿日期：2025-04-10
网络首发日期：2025-07-28
引用格式：于珊珊，王楠，陈宏伟，韩殿鹏，梁俊. 牛奶中沙门氏菌可视化 LAMP 快速检测技术[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250073>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250073

牛奶中沙门氏菌可视化 LAMP 快速检测技术

于珊珊^{1,2}, 王楠², 陈宏玮², 韩殿鹏², 梁俊¹

(1. 天津科技大学轻工科学与工程学院, 天津 300457;

2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

摘要: 为了预防牛奶中沙门氏菌引起的食源性疾病, 建立早期快速诊断技术具有重要意义。基于环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 构建可用于牛奶中沙门氏菌快速检测的可视化检测体系。首先, 针对沙门氏菌的管家基因 *invE* 设计并筛选特异性引物, 验证其在不同食源性致病菌中的特异性。建立并优化基于可视化 LAMP 的快速检测体系, 经实际样品检测其在 1 h 内即可完成对牛奶中沙门氏菌的快速检测, 其对沙门氏菌的最低检测限可达 1 CFU/mL, 对其基因组 DNA 的最低检测限能够达到 10^{-7} ng/mL。相较于传统检测方法, 本研究检测方法可显著提高牛奶中沙门氏菌的检测效率, 并且无需复杂仪器, 仅通过肉眼即可完成对检测结果的判读。

关键词: 环介导等温扩增(LAMP); 可视化; 沙门氏菌; 食品安全; 快速检测

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Visualized LAMP Rapid Detection Technique for *Salmonella* in Milk

YU Shanshan^{1,2}, WANG Nan², CHEN Hongwei², HAN Dianpeng², LIANG Jun¹

(1. College of Light Industry Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Environmental Medicine and Operational Medicine, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: The importance of establishing early and rapid diagnostic techniques for the prevention of foodborne illnesses caused by *Salmonella* in milk. Construction of a visual detection system for rapid detection of *Salmonella* in milk based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). First, specific primers were designed and screened for *invE*, the house-keeping gene of *Salmonella*, to verify its specificity in different foodborne pathogens. On this basis, a rapid detection system based on visual LAMP was established and optimised, and the rapid detection of *Salmonella* in milk could be completed within 1 hour after actual sample testing, with a minimum detection limit of 1 CFU/mL for *Salmonella*, and a minimum detection limit of 10^{-7} ng/mL for its genomic DNA. Compared with the traditional detection method, the assay developed in this study can significantly improve the detection efficiency of *Salmonella* in milk, in addition, it does not require complex instruments to complete the interpretation of the test results by the naked eye.

Key words: loop-mediated isothermal amplification(LAMP); visualization; *Salmonella*; food safety; rapid testing

随着居民生活水平的提高, 牛奶因富含钙、磷、维生素 D 等必需微量元素^[1-2], 已成为日常膳食的重

收稿日期: 2025-04-10; 修回日期: 2025-05-28

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301101)

作者简介: 于珊珊(1999—), 女, 黑龙江人, 硕士研究生; 通信作者: 梁俊, 教授, Jliang1118@yeah.net

要组成部分^[3]。然而,因牛奶水分高且 pH 接近中性,同时蛋白质、乳糖及矿物质等含量丰富,为微生物的生长繁殖提供了理想环境,其微生物安全一直是乳制品行业及公共卫生领域广泛关注的焦点^[4]。其中,沙门氏菌作为食品污染中常见的革兰氏阴性食源性致病菌,主要通过动物性食品传播,可引起腹泻、发热、腹痛等多种症状,严重时可危及生命。在与乳制品相关的食源性疾病中,沙门氏菌属污染占比高达 28.6%^[5],导致每年约 1.8 亿例腹泻病例^[6]。更为严峻的是,多重耐药沙门氏菌的出现导致其抗生素耐药性增强,使临床治疗成功率大幅下降,严重威胁着消费者的身体健康和生命安全^[7]。因此,开发灵敏、快速的沙门氏菌检测技术对于保障乳制品乃至动物性食品安全至关重要^[8-9]。当前针对动物性食品中沙门氏菌的检测主要以培养鉴定和核酸检测为主。培养法是通过分离培养的方式对样品中的沙门氏菌进行计数与检测,具有成本低、准确度高的优点,但在鉴定过程中需涉及多个步骤,如预富集和生化鉴定等,延长了检测周期,限制了其应用场景。在众多新兴核酸检测技术中,环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术因其操作简便、无需升降温循环,恒定温度下可实现对靶标片段的快速扩增而广受关注^[10]。LAMP 反应原理如图 1 所示。

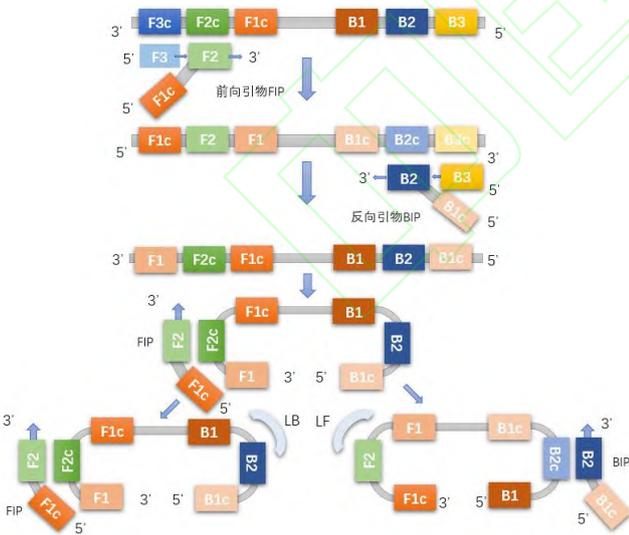


图 1 LAMP 反应原理

Fig. 1 Schematic of the LAMP reaction

初始阶段,具有高链置换活性的 Bst DNA 聚合酶与特异性引物通过链置换反应形成哑铃状结构,作为后续反应模板。第二阶段循环扩增仅需 2 个内引物,基于哑铃结构,引物结合模板,在 Bst DNA 聚

合酶作用下不断延伸、置换,实现 DNA 扩增。最终产物为含多个重复靶序列的茎环 DNA 混合物。目前基于 LAMP 技术已发展出多种与之相结合的可视化快速检测技术,不开盖条件下即可对检测结果进行直接判定,有效避免气溶胶污染导致的假阳性结果的产生^[10],其在牛奶乃至动物性食品安全检测中具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

沙门氏菌 (*Salmonella*) CVCC541, 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所微生物实验室; 牛奶, 天津市大润发超市; Bst 2.0 DNA 聚合酶 (M0537L)、dNTP 混合液 (N0447L)、等温扩增缓冲液套装 (B0537S)、MgSO₄ 溶液 (B1003S9)、WarmStart 变色 LAMP 2X 预混液 (M1804S)、LAMP Fluorescent Dye (B1700S), 纽英伦生物技术(北京)有限公司; GelRed 核酸凝胶染料 (41003), 上海开放生物科技有限公司; 常规基因组 DNA 提取试剂盒 (含 RNase A, EE101-01), 北京全式金生物技术股份有限公司; Whatman 定性滤纸, GE 公司; 荧光染料 SYBR Green 1, 上海麦克林生化科技股份有限公司; *invE* PCR 引物、*invE* LAMP 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 电泳仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪, 美国 GE 公司; 金属浴, 杭州佑宁仪器有限公司; 485 nm 激发光源, 深圳市橙紫照明光电有限公司; 生物安全柜、NanoDrop One 型超微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 沙门氏菌 *invE* 基因特异性验证

取 50 μL 冻存甘油菌, 以 1 : 100 的比例接种于 TSB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12 h。取 1 mL 细菌培养液在 12000g 离心 1 min。按照说明书 (EE101-11) 进行基因组 DNA 的提取。针对沙门氏菌的管家基因 *invE* (GenBank: CP009102.1) 进行常见食源性致病菌的特异性验证, 按照反向互补原则设计 *invE* 基因 PCR 引物 F : TAAGACAGCTTTTCAATAGTACG , R : GCAATTAAATGATTCCTGGCTCAA。PCR 反应体系: 1 μL 5'端引物 (10 μmol/L), 1 μL 3'端引物 (10 μmol/L), 25 μL 2×Mix Taq 酶, 21 μL ddH₂O, 2 μL

模板; 总反应体系为 50 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 循环 34 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增结束后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 检测目的基因扩增情况。

1.2.2 LAMP 反应体系的建立

利用 NEB LAMP Primer Design Tool 在线工具设计沙门氏菌管家基因 *invE* 的 LAMP 引物。*invE* LAMP 引物序列见表 1。LAMP 反应体系: 10 \times *invE* 引物 (1.6 $\mu\text{mol/L}$ FIP 和 BIP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ F3 和 B3, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ LoopF) 2.5 μL , 10 mmol/L dNTP Mix 3.5 μL , 10 \times Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL , 200 mmol/L MgSO_4 3.5 μL , 8000 U/mL Bst 2.0 DNA 聚合酶 1 μL , 目的基因 2 μL , ddH $_2\text{O}$ 10 μL ; 共计 25 μL 。将体系混匀, 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中反应 25 min, 琼脂糖凝胶电泳分析 LAMP 扩增结果。

表 1 *invE* LAMP 引物
Tab. 1 *invE* LAMP primers

引物名称	序列 (5'-3')
F3	GCGACCCAGCATACTGATG
B3	CCTTCGGTAAAGCCTCATCC
FIP	GACATTTTCGTCCGTCGACTGG AGGAAATACAACAGGCCGCA
BIP	GCGCTGGCGCAATTTTCGTA AAGCACGCGTTCAAACTGT
Loop F	TACTTCCGCCCTGGAGAC

1.2.3 LAMP 反应体系的优化

采用单因素变量法, 分别围绕反应体系中 dNTP 浓度 (终浓度 1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2 mmol/L)、最适反应温度 (61、62、63、64、65、66、67、68、69 $^{\circ}\text{C}$) 和最佳时间 (5、10、15、20、25、30、35、40、45 min) 优化 LAMP 反应体系, 所有实验重复 3 次, 保证结果的可靠性。反应结束后通过琼脂糖凝胶电泳分析 LAMP 扩增的结果。

1.2.4 可视化 LAMP 反应体系的建立

在前述 LAMP 反应体系优化的基础上, 加入 0.5 μL NEB LAMP Fluorescent Dye 构建沙门氏菌检测的荧光 LAMP 反应体系, 反应结束后通过 485 nm 激发光源下荧光信号的强弱判断扩增结果。利用 WarmStart LAMP 2 \times 预混液构建沙门氏菌检测比色 LAMP 反应体系, 其中预混液 12.5 μL , 10 \times 引物 Mix 2.5 μL , 模板 2 μL , 用无菌超纯水将体积补齐至 25 μL , 64 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后直接观察颜色的变化, 通过琼脂糖凝胶电泳对可视化 LAMP 结果进行验证。

1.2.5 可视化 LAMP 反应体系检测性能分析

将提取的基因组 DNA 用 TE 缓冲液进行连续 10 倍的倍比稀释, 并以其作为模板分别进行荧光和比色 LAMP 反应, 根据荧光信号的实时变化, 判定所构建检测方法的灵敏度, 反应结束后通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

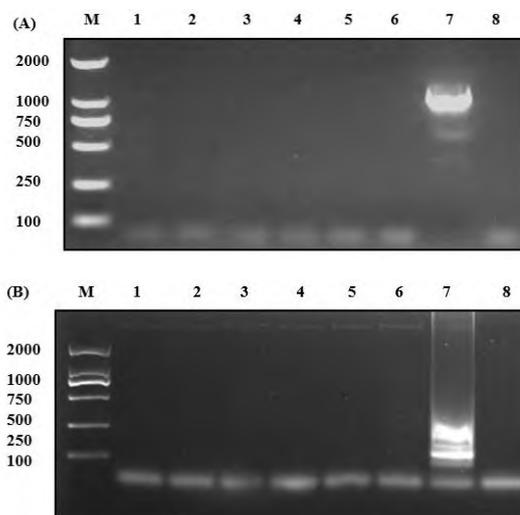
1.2.6 基于可视化 LAMP 方法的实际样品检测

选取牛奶作为检测样品, 按照 GB 4789.18—2024 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品采样和检样处理》^[11] 中规定的方法制备牛奶样品。首先吸取 5 mL 某市售牛奶, 用 45 mL 无菌 1 \times PBS 稀释并混匀, 将 100 μL 不同浓度细菌悬液与 900 μL 牛奶样品混合均匀, 混合前后通过平板培养法验证稀释牛奶样品的菌落数, 混合样品的 DNA 提取参考 Nguyen 等^[12] 的方法, 通过类芬顿反应裂解细菌释放 DNA, 用 Whatman 滤纸捕获, 用 TE 缓冲液洗脱, 以此为模板进行荧光和比色 LAMP 检测, 反应结束后通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应体系建立

以提取的不同食源性致病菌基因组 DNA 作为模板, 利用沙门氏菌 *invE* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 结果如图 2 (A) 所示。有且仅有第 7 泳道 (沙门氏菌) 在约 1000 bp 处呈现清晰条带, 扩增条带与 *invE* 基因大小相符, 其余 6 个非目标菌株样本和阴性对照组均未见条带, 表明 *invE* 基因在常见食源性致病菌中具有较好的特异性。



M. Marker; 1. 单增李斯特氏菌; 2. 铜绿假单胞杆菌; 3. 金黄色葡萄球菌;

4. 志贺杆菌; 5. 大肠杆菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 沙门氏菌; 8. H₂O

(A) *invE* 基因特异性 (B) LAMP 特异性检测沙门氏菌

图 2 *invE* 基因特异性和 LAMP 特异性检测沙门氏菌

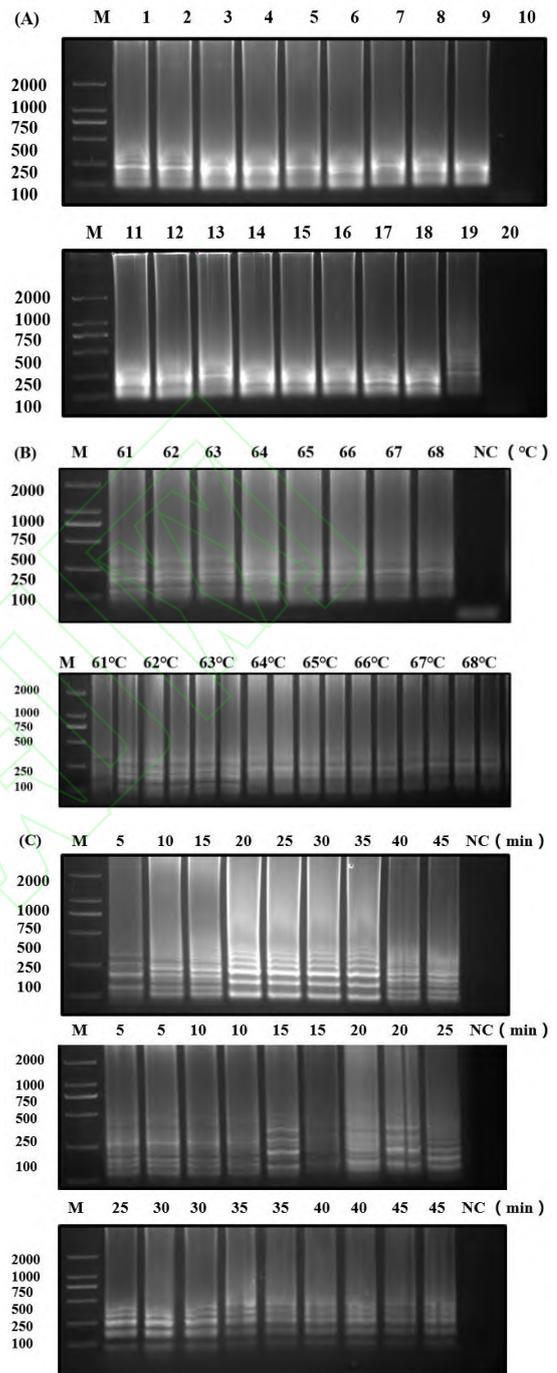
Fig. 2 *invE* gene specificity and LAMP specific detection of *Salmonella*

选取 *invE* 基因上 839~1049 bp 处的片段设计 LAMP 引物, 建立靶向沙门氏菌管家基因的 LAMP 检测体系, 并通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 结果如图 2 (B) 所示。只有第 7 泳道 (以沙门氏菌基因组 DNA 为模板的扩增结果) 具有典型的“梯形条带”, 而其它非靶标菌株对应组和以 H₂O 为模板的阴性对照组均没有扩增条带出现, 表明该基因可作为沙门氏菌的特异性基因构建特异性 LAMP 反应体系。

2.2 LAMP 反应体系的优化

dNTP 作为反应底物, 其可为 LAMP 扩增提供含氮碱基, 并脱下 1 个焦磷酸分子, 而过量的焦磷酸分子会螯合镁离子, 导致反应体系中镁离子的有效浓度下降, 进而抑制反应。LAMP 反应体系的优化结果如图 3 所示。

通过优化不同浓度的 dNTP, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 (A) 所示, 当 dNTP 浓度为 1.6 mmol/L 时, 条带亮度最高, 因此选取 1.6 mmol/L 为最适反应条件。酶活力受温度调控, LAMP 反应体系的温度决定 Bst 聚合酶的反应速度, 高温可能使酶变性失去活力, 而温度过低则会影响整个体系的反应速率^[13]。进一步优化 LAMP 反应体系的温度, 结果如图 3 (B) 所示, 当温度为 64 °C、65 °C 和 66 °C 时, 电泳条带亮度最高, 综合考虑经济成本等因素选择 64 °C 作为 LAMP 反应的最适温度。作为一种核酸快速扩增的新兴技术, 反应时间直接决定现场对靶标污染物的检出效率。进一步优化 LAMP 反应体系的反应时间, 结果如图 3 (C) 所示, 其中 20 min 和 25 min 电泳条带最高, 考虑到现场实际应用中的快速检测需求, 以 20 min 作为最佳反应时间。



(A) 不同浓度 dNTP LAMP 电泳结果。M. marker; 1—3. 1.7 mmol/L; 4—6. 1.6 mmol/L; 7—9. 1.5 mmol/L; 11—13. 1.4 mmol/L; 14—16. 1.3 mmol/L; 17—19. 1.2 mmol/L; 10 和 20. 阴性对照。(B) LAMP 反应温度优化。(C) LAMP 反应时间优化。

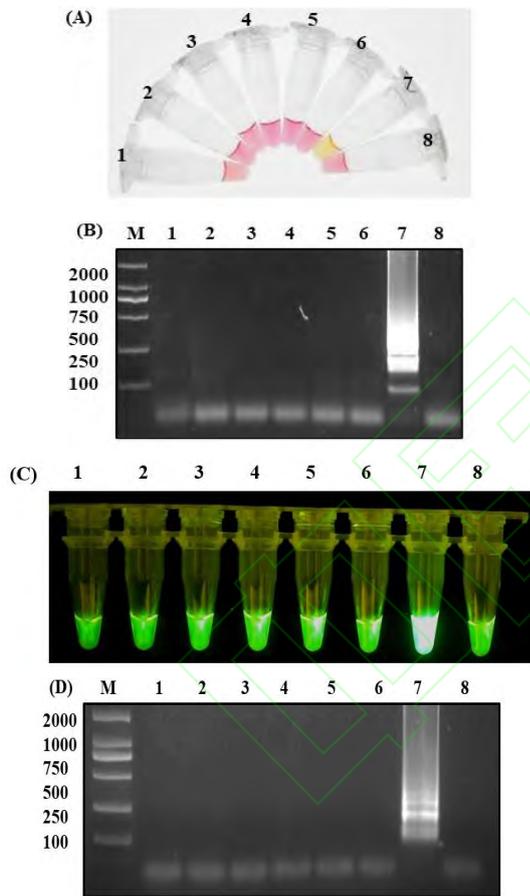
图 3 LAMP 反应体系的优化

Fig. 3 Optimization of LAMP Reaction System

2.3 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的可行性验证

LAMP 扩增结果的判定往往依赖于琼脂糖凝胶电泳进行观察, 这在资源有限条件下极大限制了其现

场应用,而可视化 LAMP 检测不需借助其他实验设备,反应结束即可对扩增结果进行现场判读^[14]。分别构建比色 LAMP 和荧光 LAMP 两种可视化检测方法,前者通过目视即可直观判读检测结果,后者借助激发光源产生的荧光亮度进行结果判读^[15]。进一步验证所构建可视化检测方法的可行性,对其进行琼脂糖凝胶电泳分析。可视化 LAMP 检测沙门氏菌的可行性验证结果如图 4 所示。两种可视化检测的结果均只有第 7 泳道出现明亮的“梯形条带”。由此可见,无论是比色 LAMP 还是荧光 LAMP,都能明显区分靶标与非靶标之间的阳性和阴性结果,表明其可用于沙门氏菌的可视化 LAMP 检测。



(A)比色 LAMP 检测沙门氏菌, (B)比色 LAMP 检测沙门氏菌电泳结果, (C) 荧光 LAMP 检测沙门氏菌, (D)荧光 LAMP 检测沙门氏菌电泳结果

M. marker; 1. 单增李斯特氏菌; 2. 铜绿假单胞杆菌; 3. 金黄色葡萄球菌; 4. 志贺杆菌; 5. 大肠杆菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 沙门氏菌; 8. H₂O

图 4 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的可行性验证

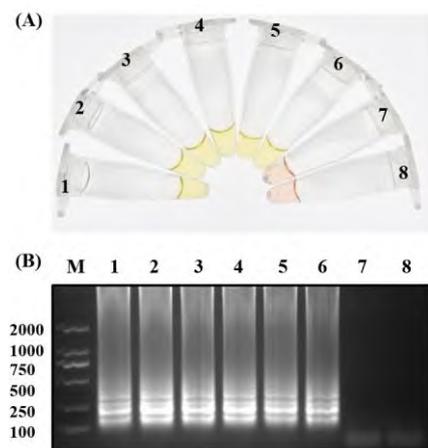
Fig. 4 Feasibility verification of visual LAMP detection of *Salmonella*

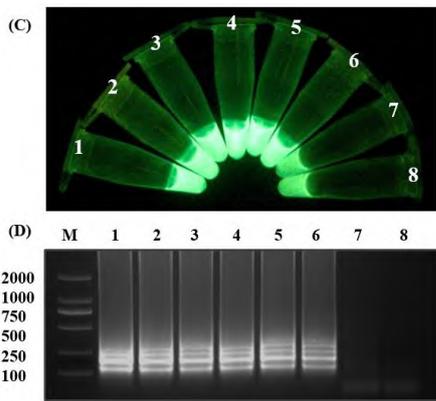
2.4 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的性能

对两种可视化 LAMP 检测方法的最低检测限进

行比较,利用倍比稀释的沙门氏菌基因组 DNA 为模板,比色 LAMP 的结果如图 5 (A) 所示,可以直观看到第 7、8 管与其余管中颜色差异明显,可据此判断阳性和阴性结果。荧光 LAMP 的结果如图 5 (C) 所示,通过对不同管中荧光亮度的比较,可以得出相同的结论。可视化 LAMP 的检测限为 10^{-6} ng/ μ L,用琼脂糖凝胶电泳进行验证,结果如图 5 (B) 和图 5 (D) 所示,第 1—6 泳道均产生明显的“梯形条带”,该结果与可视化 LAMP 结果一致。

为了验证可视化 LAMP 的检测性能,用实验室针对沙门氏菌检测的金标准方法 qPCR 验证,结果如图 6 所示。随着靶标浓度的下降,循环阈值 (CT 值) 越来越大,当质量浓度为 10^{-5} ng/ μ L 时,没有荧光信号产生,琼脂糖凝胶电泳的结果进一步验证了实时荧光定量曲线的结果,表明可视化 LAMP 相较于实验室金标准方法展现出良好的灵敏度。一方面, LAMP 技术针对靶基因多个区域设计引物,在 DNA 聚合酶作用下, $60\sim 65$ °C 等温环境中即可实现高效快速的靶基因扩增。这种多区域引物设计大幅提升了反应特异性,降低非特异性扩增干扰,同时密集的引物结合位点让微量靶基因也能被充分捕捉并大量复制,为高灵敏度检测奠定物质基础^[16]。另一方面,与金标准 qPCR 需经历高温变性、低温退火和适温延伸等复杂温度循环不同, LAMP 恒定的等温反应条件避免了因频繁温度变化引发的核酸降解与酶活性损耗的问题^[17]。核酸完整性得以保留, DNA 聚合酶始终维持在稳定的活性状态,确保扩增过程顺利推进,进一步提升了扩增效率与检测灵敏度,使可视化 LAMP 能够精准识别低浓度靶基因,展现出优异的检测性能。



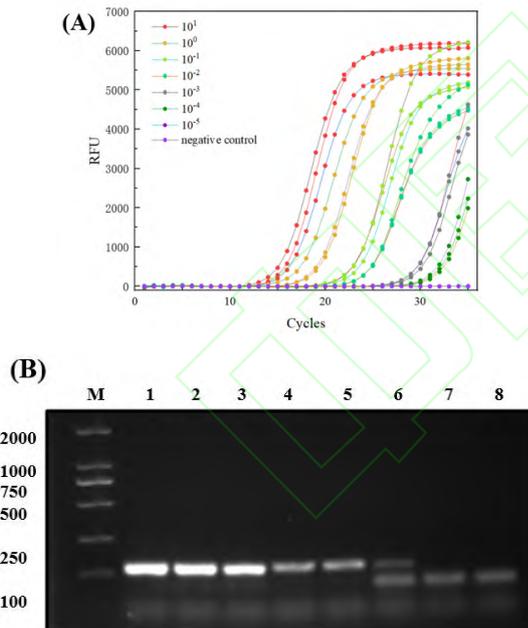


(A)不同基因浓度比色可视化 LAMP, (B)不同基因浓度比色可视化 LAMP 电泳, (C)不同基因组浓度荧光可视化 LAMP, (D) 不同基因组浓度荧光可视化 LAMP 电泳

M. marker; 1. 10^{-1} ng/ μ L; 2. 10^{-2} ng/ μ L; 3. 10^{-3} ng/ μ L; 4. 10^{-4} ng/ μ L; 5. 10^{-5} ng/ μ L; 6. 10^{-6} ng/ μ L; 7. 10^{-7} ng/ μ L; 8. H₂O

图 5 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的性能

Fig. 5 Performance of Visual LAMP Detection for *Salmonella*



(A)不同基因组 DNA 浓度 qPCR 曲线, (B)不同基因组 DNA 浓度 qPCR 曲线电泳

M. marker; 1. 10 ng/ μ L; 2. 1 ng/ μ L; 3. 10^{-1} ng/ μ L; 4. 10^{-2} ng/ μ L; 5. 10^{-3} ng/ μ L; 6. 10^{-4} ng/ μ L; 7. 10^{-5} ng/ μ L; 8. H₂O

图 6 qPCR 验证

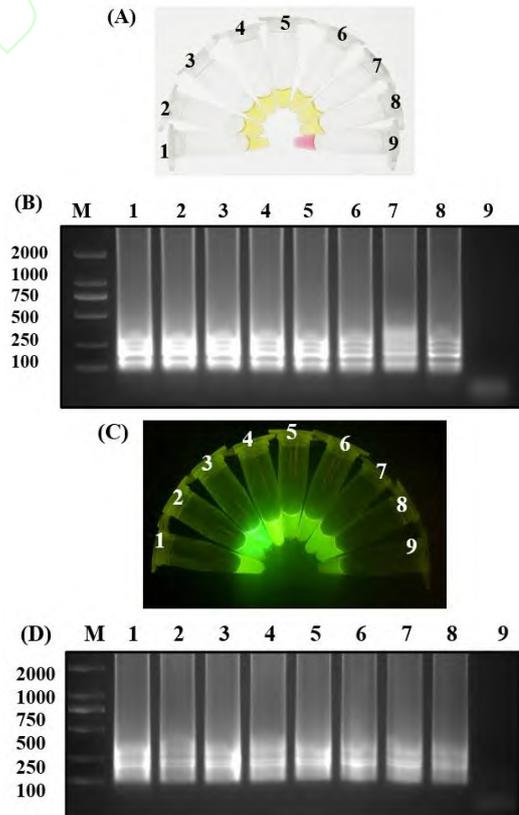
Fig. 6 qPCR validation

2.5 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的实际样品检测

为验证所构建的可视化 LAMP 方法在实际样品检测中的实用性,选取牛奶作为实际样品进行不同浓

度沙门氏菌的加标实验。因牛奶富含碳水化合物、蛋白质和脂质,这些成分会阻碍 DNA 聚合酶活性,导致核酸无法有效扩增。大幅降低分子检测的灵敏度,使低浓度目标核酸难以检出,造成假阴性结果,影响结果准确性,可能导致食品致病菌漏检等后果^[18]。通过类芬顿反应提取样品混合溶液中基因组 DNA,降低牛奶基质对扩增反应的影响,以此作为模板利用可视化 LAMP 方法对实际样品中的沙门氏菌进行检测,结果如图 7 所示。比色 LAMP 中除了第 9 管,其余管均从红色变为黄色,荧光 LAMP 的结果与比色 LAMP 结果一致,在激发光源照射下,阴性对照组的荧光亮度远暗于其他试管。琼脂糖凝胶电泳结果与可视化 LAMP 结果一致,除阴性对照外,其余泳道均有明亮条带出现,该结果表明可视化 LAMP 可用于实际样品中的沙门氏菌检测,检测限低至 1 CFU/mL。

qPCR 检测牛奶样品结果如图 8 所示。当细菌浓度的降低至 10 CFU/mL 时,没有荧光信号产生,琼脂糖凝胶电泳的结果进一步验证了实时荧光定量结果,表明可视化 LAMP 检测可用于实际样品中沙门氏菌的快速检测,同时其相较于 qPCR 具有较好的灵敏度。

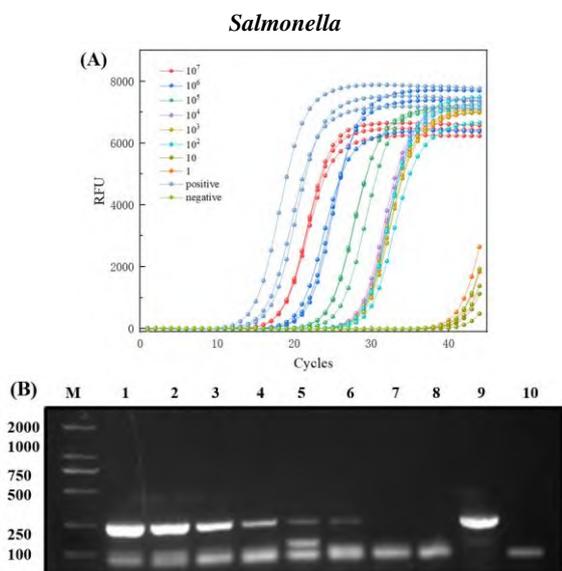


(A)比色 LAMP 检测牛奶样品中不同浓度沙门氏菌, (B)比色检测牛奶样品中不同浓度沙门氏菌电泳图, (C) 荧光 LAMP 检测牛奶样品中不同浓度沙

门氏菌, (D) 荧光 LAMP 检测牛奶样品中不同浓度沙门氏菌电泳图
M. marker; 1. 10^7 CFU/mL; 2. 10^6 CFU/mL; 3. 10^5 CFU/mL; 4. 10^4 CFU/mL;
5. 10^3 CFU/mL; 6. 10^2 CFU/mL; 7. 10 CFU/mL; 8. 1 CFU/mL; 9. H₂O

图 7 可视化 LAMP 检测沙门氏菌的实际样品检测

Fig. 7 Actual sample testing of visual LAMP detection of



(A) qPCR 检测牛奶样品中不同沙门氏菌浓度, (B) qPCR 检测牛奶样品中不同沙门氏菌浓度电泳图

M. marker; 1. 10^7 CFU/mL; 2. 10^6 CFU/mL; 3. 10^5 CFU/mL; 4. 10^4 CFU/mL;
5. 10^3 CFU/mL; 6. 10^2 CFU/mL; 7. 10 CFU/mL; 8. 1 CFU/mL; 9. 阳性对
照; 10. H₂O

图 8 qPCR 检测牛奶样品

Fig. 8 qPCR detection of milk samples

3 讨论

准确、及时检测食品污染中的食源性致病菌对于保障消费者身体健康和维护食品安全具有重要意义^[19]。然而,传统培养法存在检测周期长、步骤繁琐等局限性。随着分子诊断技术的发展,该技术被广泛应用于食源性致病菌检测领域。Yue 等^[20]将生物素-链霉亲和素系统和膜过滤技术相结合,在最佳实验参数下可以在 2 h 内检测到牛奶中的沙门氏菌,检测限为 1.8×10^4 CFU/mL。Chen 等^[21]通过结合适配体的识别开发了一种适配体催化的夹夹组装信号放大方法,应用于牛奶中沙门氏菌的现场比色检测,检测限为 2.4×10^2 CFU/mL。Han 等^[22]提出具有双模式检测通道(比色荧光)与聚合链反应(PCR)相结合的多功能平台,可以检测到食品中 21.8 CFU/mL 的沙门氏菌。为了进一步提高灵敏度,考虑到环介导等温扩增

技术具有不依赖升降温循环、短时间内指数扩增等优点^[23-25],本研究基于比色和荧光方法构建了可视化 LAMP 检测技术,在不开盖的条件下,可直接实现对结果的准确判读。通过对实际样品中沙门氏菌的定量检测,推断出可视化 LAMP 对沙门氏菌的检测限低至 1 CFU/mL,相较于金标准方法及以上检测方法更加快速、灵敏。

本研究基于可视化 LAMP 方法构建了一种可用于食品安全中典型食源性致病菌现场的快速检测技术。未来可以通过识别靶标的替换,拓展至其他食源性致病菌的快速检测中,将该技术与微流控芯片相结合^[26-27],可以开发便携式、多通道现场检测设备,在临床诊断中面对感染性疾病爆发,该设备可以快速鉴别病原体,辅助医生及时制定治疗方案^[28];在环境监测方面可用于水体、土壤中致病微生物的检测;在食品安全检测^[29]领域,从食品原料、加工运输直至餐桌的全链条^[30],都能利用该设备进行实时监测,保障食品质量安全,有效降低食源性疾病的发生风险,对守护公众健康、维护社会稳定具有重要意义。

参考文献:

- [1] BORAD S G, KUMAR A, SINGH A K. Effect of processing on nutritive values of milk protein[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2017, 57(17): 3690-3702.
- [2] HU Y, SUN Y, GU J, et al. Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk[J]. Food chemistry, 2021, 353: 129481.
- [3] KHALESI M, FITZGERALD R J. Impact of variation in calcium level on the technofunctional properties of milk protein concentrate[J]. Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects, 2022, 643: 128741.
- [4] XU Q, XIE G, SHI Q, et al. The dual nucleic acid amplification with dynamic light scattering strategy for ultrasensitive detection of *Salmonella* in milk[J]. Microchemical journal, 2023, 184: 108143.
- [5] LIANG T, ZHOU P, ZHOU B, et al. Simultaneous quantitative detection of viable *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter* spp., and *Salmonella* spp. Using sodium deoxycholate-propidium monoazide with multiplex real-time PCR[J]. Journal of dairy science, 2019, 102(4): 2954-2965.
- [6] BESSER J M. *Salmonella* epidemiology: a whirlwind of change[J]. Food microbiology, 2018, 71: 55-59.

- [7] LI Z, MA W, LI W, et al. A broad-spectrum phage controls multidrug-resistant *Salmonella* in liquid eggs[J]. Food research international, 2020, 132: 109011.
- [8] FLYNN K, VILLARREAL B P, BARRANCO A, et al. An introduction to current food safety needs[J]. Trends in food science & technology, 2019, 84: 1-3.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验:GB 4789.4—2024[S]. 北京:中国标准出版社, 2024.
- [10] XIAO B, WANG M, ZHANG J, et al. Rapid DNA extraction and microfluidic LAMP system in portable equipment for GM crops detection[J]. Sensors and actuators B: chemical, 2024, 411: 135716.
- [11] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品采样和检样处理: GB 4789.18—2024[S]. 北京:中国标准出版社, 2024.
- [12] NGUYEN H A, LEE N Y. Copper: DNA extraction and solid phase detection agent for all-in-one molecular diagnostic device coupled with isothermal amplification[J]. Biosensors and bioelectronics, 2023, 229: 115222.
- [13] ZENG M, WANG X, TAN Z, et al. A novel rapid detection method for *Mycobacterium tuberculosis* based on scattering-light turbidity using loop-mediated isothermal amplification[J]. Biosensors, 2025, 15(3): 162-175.
- [14] WU C, ZENG Y, YANG H. Rapid visualization and detection of *Staphylococcus aureus* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2021, 309: 209-218.
- [15] NOVI V T, MEHER A K, ABBAS A. Visualization methods for loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays[J]. The analyst, 2025, 150(4): 588-599.
- [16] PUIGMULÉ M, COLL M, PÉREZ-SERRA A, et al. High-quality RNA improves sensitivity of SARS-Cov-2 detection by colorimetric RT-LAMP[J]. Experimental biology and medicine, 2022, 247(3): 276-281.
- [17] PENG Y, HU R, XUE S, et al. Rapid and highly sensitive colorimetric lamp assay and integrated device for visual detection of monkeypox virus[J]. Analytica chimica acta, 2024, 1311: 342720.
- [18] LI Q, ZHANG J, CHEN X, et al. Real-time and visual detection of viable *Salmonella* in milk from remote pasture via IMS-LAMP-NALFS[J]. Microchemical journal, 2024, 197: 109732.
- [19] SELVA SHARMA A, LEE N Y. Advancements in visualizing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reactions: a comprehensive review of colorimetric and fluorometric detection strategies for precise diagnosis of infectious diseases[J]. Coordination chemistry reviews, 2024, 509: 215769.
- [20] YUE X, SUN J, ZHAO R, et al. A novel NMR immunosensor based on O-CMCS-targeted Gd probe for rapid detection of *Salmonella anatum* in milk[J]. International dairy journal, 2022, 131: 105372.
- [21] CHEN S, ZONG X, ZHENG J, et al. A colorimetric strategy based on aptamer-catalyzed hairpin assembly for the on-site detection of *Salmonella typhimurium* in Milk[J]. Foods, 2021, 10(11): 2539.
- [22] HAN L, CHEN M, SONG Y, et al. Development of a dual mode UCNPS-MB biosensor in combination with PCR for sensitive detection of *Salmonella*[J]. Biosensors, 2023, 13(4): 475-497.
- [23] LI Y, KOU J, HAN X, et al. Argonaute-triggered visual and rebuilding-free foodborne pathogenic bacteria detection[J]. Journal of hazardous materials, 2023, 454: 131485.
- [24] MARTIN A, GRANT K B, STRESSMANN F, et al. Ultimate single-copy DNA detection using real-time electrochemical LAMP[J]. ACS Sensors, 2016, 1(7): 904-912.
- [25] HEYMANS R, VILA A, VAN HEERWAARDEN C A M, et al. Rapid detection and differentiation of *Salmonella species*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* by multiplex quantitative PCR[J]. PLOS ONE, 2018, 13(10): e0206316.
- [26] WAN J, ZHENG L, KONG L, et al. Development of a rapid detection method for real-time fluorescent quantitative PCR of *Salmonella* spp. and *Salmonella enteritidis* in ready-to-eat fruits and vegetables[J]. LWT-Food science and technology, 2021, 149: 111837.
- [27] SRIDHAR A, KAPOOR A, KUMAR P S, et al. Lab-on-a-chip technologies for food safety, processing, and packaging applications: a review[J]. Environmental chemistry letters, 2022, 20(1): 901-927.
- [28] YU W, CHEN Y, WANG Z, et al. Multiple authentications of high-value milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP[J]. Food chemistry, 2021, 351:

[29] JING W, ZHANG T, MIN X, et al. CHAMP: a centrifugal microfluidics-based CRISPR/Cas12b-combined real-time LAMP one-pot method for *Mycoplasma pneumoniae* infection diagnosis[J]. ACS Omega, 2024, 9(37): 38989-38997.

[30] ZHANG H, XU Y, FOHLEROVA Z, et al. LAMP-on-a-chip: revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification[J]. Trends in analytical chemistry, 2019, 113: 44-53.

