

噬菌体特异性侵染耦合荧光 RPA 的沙门菌活菌快速检测

刘道峰¹ 翟玉杰^{2,3} 谭侯宸^{2,3} 山珊⁴ 芦军¹ 钟子清⁵

(1. 江西省疾病预防控制中心重大疫情防控江西省重点实验室, 江西 南昌 330029; 2. 南昌大学公共卫生学院, 江西 南昌 330019; 3. 营养膳食与健康江西省卫生健康重点实验室, 江西 南昌 330019; 4. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 5. 福建林业职业技术学院, 福建 南平 353000)

摘要: [目的] 针对传统分子生物学检测方法难以便捷区分食源性致病菌死活的技术痛点, 建立一种基于噬菌体特异侵染与重组酶聚合酶扩增(RPA)的沙门菌活菌快速检测方法。[方法] 依托 O-1 噬菌体仅在活菌中增殖的特性, 将其接种于增菌后的待检样本中, 温育培养后提取总 DNA; 通过荧光 RPA 检测噬菌体 DNA 增殖情况, 以判断原样本中是否存在沙门菌活菌。[结果] 经优化, 确定最佳检测条件为: 加入 100 μL 、 3×10^5 PFU/mL 的 O-1 噬菌体, 侵染增殖时间 3 h。该方法噬菌体核酸检出限为 0.07 fg/ μL , 沙门菌活菌检出限为 1.58×10^2 CFU/mL; 对 37 株不同血清型沙门菌检测的属内包容性为 100%, 对 17 株非沙门菌检测的属间特异性为 100%。[结论] 该方法利用噬菌体只在活菌宿主内快速增殖的特性, 无需 PCR 热循环仪, 可在 4 h 内实现沙门菌活菌高灵敏、高特异性检测, 适用于食品生产、流通等环节中沙门菌活菌的现场快速筛查与鉴定, 为食品中沙门菌活菌即时检测提供了新技术方案。

关键词: 沙门菌; 快速检测; 活菌; 噬菌体; 核酸扩增技术

Rapid detection of viable *Salmonella* based on specific phage infection combined with fluorescent RPA

Liu Daofeng¹ Zhai Yujie^{2,3} Tan Yucheng^{2,3} Shan Shan⁴ Lu Jun¹ Zhong Ziqing⁵

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Major Epidemics Prevention and Control, Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 2. School of Public Health, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330019, China; 3. Jiangxi Key Laboratory of Preventive Medicine, Nanchang, Jiangxi 330019, China; 4. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 5. Fujian Forestry Vocational Technical College, Nanping, Fujian 353000, China)

Abstract: [Objective] To establish a rapid detection method for viable *Salmonella* based on specific phage infection and recombinase polymerase amplification (RPA) in response to the key challenge that traditional molecular biological detection methods have difficulty in conveniently distinguishing between viable and non-viable foodborne pathogens. [Methods] Taking advantage of the characteristic that O-1 phage only proliferates in viable bacteria, the phage is added to the enriched sample. After further incubation, total DNA is extracted. Fluorescent RPA is used to determine whether the phage has significantly proliferated, so as to judge the presence of viable *Salmonella* in the original sample. [Results] After optimization, the optimal detection conditions are as follows: 100 μL of O-1 phage with a concentration of 3×10^5 PFU/mL is added, and the infection and proliferation time is 3 hours. The detection limit of the method for phage DNA is

基金项目: 江西省重点研发计划(编号:20243BBH81007); 江西省自然科学基金重点项目—南昌(编号:20253BAC280055); 江西省自然科学基金青年基金项目(编号:20232BAB21605, 20232BAB216106)

通信作者: 钟子清(1988—), 女, 福建林业职业技术学院讲师, 博士。E-mail: crystal1439@163.com

收稿日期: 2025-07-03 **改回日期:** 2026-05-01

引用格式: 刘道峰, 翟玉杰, 谭侯宸, 等. 噬菌体特异性侵染耦合荧光 RPA 的沙门菌活菌快速检测[J]. 食品与机械, 2026, 42(7): 42-51.

Citation: Liu Daofeng, Zhai Yujie, Tan Yucheng, et al. Rapid detection of viable *Salmonella* based on specific phage infection combined with fluorescent RPA[J]. Food & Machinery, 2026, 42(7): 42-51.

0.07 fg/ μ L, and that for viable *Salmonella* is 1.58×10^2 CFU/mL. The intra-generic inclusivity of the method is 100% when testing 37 *Salmonella* strains of different serotypes, and the inter-generic specificity is 100% when testing 17 non-*Salmonella* strains. [Conclusion] The method utilizes the characteristic that phages only rapidly proliferate in viable host bacteria, enabling highly sensitive and specific detection of viable *Salmonella* within 4 hours without a PCR thermal cycler. The method is suitable for on-site rapid screening and identification of viable *Salmonella* in food production and circulation processes, providing a new approach for the on-site detection of viable *Salmonella* in food.

Keywords: *Salmonella*; rapid detection; live bacteria; phages; nucleic acid amplification technology

食源性病原微生物引起的食源性疾病已成为中国食品安全面临的最主要的问题^[1],其中沙门菌(*Salmonella*)引起的食物中毒常列榜首^[2]。沙门菌的致病性高度依赖细菌的活力,活菌可通过侵入宿主肠道上皮细胞引发感染,而死菌因失去代谢活性而无法致病^[3-4]。

迄今为止,已开发出许多检测沙门菌的方法,传统培养法作为活菌检测的“金标准”,其耗时较长(通常为4~7 d),难以满足食品供应链快速筛查及食源性疾病快速处置的时效性要求^[5-6]。基于核酸扩增的分子生物检测技术及免疫学分析法虽显著提升了检测速度和灵敏度,但这些传统的快速检测方法均无法规避死菌核酸及菌体抗原带来的干扰^[7-9]。经热处理的食物或环境中,残留的死菌DNA或死菌的抗原仍可被检出,被误判为活菌污染,进而引发不必要的产品召回、资源浪费及公众信任危机^[10],显著削弱了传统快速检测方法检测结果的指导价值及监管决策的可靠性^[11]。有研究者^[12-15]尝试通过分子生物学检测方法来实现致病菌死活的区分(如叠氮氯化丙啶PMA预处理、mRNA靶标检测等),但依然面临操作复杂(多重步骤)、目标分子稳定性差(如mRNA易降解)以及灵敏度不足等挑战,限制了这些新方案的广泛应用。因此,开发具备活菌识别能力的沙门菌快速检测技术具有迫切的现实需求。

近年来,基于噬菌体的食源性致病菌检测方法受到广泛关注。噬菌体是一类能特异性感染细菌并裂解宿主细胞的病毒^[16],噬菌体可特异性识别并吸附细菌表面,将其遗传物质注入细菌细胞,并合成噬菌体相关蛋白以产生子代噬菌体。宿主细胞经一段培养后,噬菌体得以扩增,最终细胞裂解产生子代噬菌体。由于子代噬菌体的释放是在噬菌体感染宿主细菌后发生的,且在此过程中只能检测到存活的细菌;因此,可以通过检测裂解性噬菌体特异性吸附并感染宿主细胞后释放的子代噬菌体间接检测目标细菌^[17]。基于培养的双层琼脂平板法通常用于检测释放的子代噬菌体,但操作繁琐且培养时间长。为缩短检测时间,人们探索了许多其他子代噬菌体的分析方法,如生物传感器法、生物发光、qPCR^[18-20]等。

研究拟建立一种沙门菌活菌快速检测新方法,基于噬菌体对宿主菌的特异性侵染与裂解,通过噬菌体沙门菌活菌中增殖裂解后的噬菌体DNA显著高于死菌中的

噬菌体DNA的特性,以噬菌体DNA作为检测靶标替代沙门菌核酸,规避传统分子检测中因沙门菌死菌核酸残留导致的假阳性干扰。为缩短检测时间、简化操作,采用重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)替代传统的基于培养的子代噬菌体检测方法,RPA不需要专业恒温设备,在37℃左右孵育时30 min内即可实现核酸体外大量扩增,全封闭反应体系可有效避免气溶胶污染^[21],提升食品加工与流通环节中沙门菌活菌的监控效率和准确性,为保障食品安全、降低食源性疾病风险提供更可靠的技术支撑。针对O-1噬菌体的保守基因序列,设计高特异性引物与探针,构建噬菌体靶向识别与RPA检测子代噬菌体的快速检测方法。

1 材料与试剂

1.1 菌株信息

试验菌株(见表1):保存于江西省疾病预防控制中心。

1.2 试剂

Felix O-1噬菌体(O-1噬菌体):江西省疾病预防控制中心;

营养肉汤(NB)、营养琼脂(NA):青岛海博生物技术有限公司;

磷酸盐缓冲液(PBS):吉象生物(上海)有限公司;

核酸提取试剂盒:北京卓诚惠生生物科技股份有限公司;

DNA恒温快速扩增试剂盒(荧光型):江苏常州安普未来生物科技有限公司。

1.3 主要仪器设备

超纯水系统:Merck Millipore Synergy型,德国Merck Millipore公司;

混匀仪:BTE-CM8型,珠海宝泰仪生物科技有限公司;

旋转混合仪:BE-1200型,江苏其林贝尔仪器制造有限公司;

恒温金属浴:TU-10型,上海一恒科学仪器有限公司;

生物安全柜:AC2-6S1型,新加坡ESCO公司;

生化培养箱:LTI-1200W型,日本东京理化公司;

恒温振荡培养箱:ZWYR-4912型,上海智城分析仪器制造有限公司;

冷冻离心机:1-16K型,德国Sartorius AG公司;

自动核酸提取仪:KingFisher-Flex型,美国Thermo

表 1 菌株信息

Table 1 Information of strains

菌株	菌株编号	菌株	菌株编号	菌株	菌株编号
伦敦沙门菌	SM-WY-2024-41F	鼠伤寒沙门菌	SM-LA-2024-66D	印第安纳沙门菌	SM-PX-2024-45F
伦敦沙门菌	SM-YD-2024-245D	圣保罗沙门菌	SM-FZ-2024-166D	乙型副伤寒沙门菌	SM-FC-2023-66D
伦敦沙门菌	SM-FZ-2024-239D	圣保罗沙门菌	SM-DHQ-2024-33D	铜绿假单胞菌	ATCC 9027
伦敦沙门菌	SM-FY-2024-152D	里森沙门菌	SM-SR-2024-287D	白色念珠菌	ATCC 10231
肠炎沙门菌	SM-JDZ-2024-19D	里森沙门菌	SM-SR-2024-284D	产志贺氏毒素大肠埃希氏菌	FC 7856
肠炎沙门菌	SM-FC-2024-1D	波茨坦沙门菌	SM-FZ-2024-163D	产志贺氏毒素大肠埃希氏菌	BNCC 186739
汤普森沙门菌	SM-SR-2024-186D	俄亥俄沙门菌	SM-YC-2024-285D	大肠杆菌	CMCC 44484
汤普森沙门菌	SM-GA-2024-74D	俄亥俄沙门菌	SM-GZ-2024-144D	大肠杆菌	ATCC 25922
汤普森沙门菌	SM-JDZ-2024-17D	纽波特沙门菌	SM-GZ-2024-62F	金黄色葡萄球菌	ATCC 2393
斯坦利沙门菌	SM-YC-2024-300D	纽波特沙门菌	SM-FC-2024-279D	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 51777
斯坦利沙门菌	SM-NKQ-2024-145D	明斯特沙门菌	SM-GZ-2024-59F	蜡样芽孢杆菌	ATCC 21366
斯坦利沙门菌	SM-GZ-2024-115D	慕尼黑沙门菌	SM-SR-2024-286D	阪崎肠杆菌	ATCC 29004
斯坦利沙门菌	SM-GZ-2024-50D	姆班达卡沙门菌	SM-LA-2024-42F	表皮葡萄球菌	ATCC 19654
婴儿沙门菌	SM-FX-2024-40F	利文斯顿沙门菌	SM-FX-2024-39F	苏云金芽孢杆菌	ATCC 39152
婴儿沙门菌	SM-FC-2024-20F	利文斯顿沙门菌	SM-JDZ-2024-15D	木糖葡萄球菌	ATCC 35663
鼠伤寒沙门菌	SM-FY-2024-37F	肯塔基沙门菌	SM-SR-2024-289D	志贺氏菌	ATCC 19623
鼠伤寒沙门菌	SM-YC-2024-297D	肯塔基沙门菌	SM-DHQ-2024-246D	英诺克李斯特菌	ATCC 33090
鼠伤寒沙门菌	SM-JDZ-2024-234D	印第安纳沙门菌	SM-FC-2024-54F	小肠结肠炎耶尔森菌	ATCC 23715

Fisher Scientific 公司；

荧光定量 PCR 仪：QuantStudio 12K Flex 型，美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株培养 取 100 μL 保存于甘油管中的菌种（沙门菌和非沙门菌）接入 10 mL NB 中，放入 37℃摇床中，180 r/min 振荡培养 14 h。

1.4.2 O-1 噬菌体侵染沙门菌及增殖 将 O-1 噬菌体（100 μL）分别与 900 μL 活的、灭活的沙门菌和等体积 NB 在 37℃下静置孵育 10 min。然后置于 37℃恒温摇床中（180 r/min）培养一段时间，得到富含噬菌体的混悬液。O-1 噬菌体侵染存活状态沙门菌为阳性组，O-1 噬菌体侵染灭活状态沙门菌为阴性组，O-1 噬菌体侵染 NB 为空白对照。

1.4.3 噬菌体 DNA 提取 噬菌体 DNA 采用磁珠法核酸提取试剂盒经自动核酸提取仪提取。操作时，首先取 200 μL 待测液加入预分装试剂的裂解液中，经磁珠吸附、样本裂解、杂质洗涤、漂洗和核酸洗脱，最后收集洗脱液即为提取的基因组 DNA，于 -20℃保存，避免反复冻融。

1.4.4 RPA 引物及探针的设计 噬菌体的基因序列来源于 NCBI GenBank 数据库（GenBank 登录号：NP944921.1），并通过 RPA 引物及探针设计软件（Primer and Probe Design Tool for RPA/RAA，<https://ezassay.com/primer>）比较确定基因的保守区，根据保守区域的基因序

列设计噬菌体的 RPA 引物，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。正向引物序列为 5'-CAGCAAGAGCAGTAAATAACTTGTTACAAGGC-3'，反向引物序列为 5'-GTGCTCTTCCTCTTGAACTAACTCCCAAGT-3'，EXO 探针序列为 5'-TATCCAGTAGGTACTATCCATCTCTCTATGAA [FAM-dT] [THF] C [BHQ-dT] GCAAACCCCTTCTAC-C3-Spacer-3'。

1.4.5 荧光 RPA 方法的建立 采用 exo 探针荧光 RPA 法检测提取的噬菌体 DNA，按照 DNA 恒温快速扩增试剂盒（荧光型）使用说明书进行组分体系配制并稍加优化。RPA 反应体系（50 μL）：A buffer（主要为稳定蛋白/酶性能的缓冲体系）29.4 μL，10 μmol/L 的上游引物和下游引物各 0.5~8.0 μL，0.6 μL 探针（1~100 μmol/L），DNA 模板 2 μL，B buffer（主要为镁离子等激活体系）1~3 μL，用双蒸水补齐至 50 μL。将反应管混匀放入 QuantStudio 12K 荧光扩增平台中进行恒温扩增并读光。扩增程序：37℃反应 25 min，每 30 s 采集一次荧光信号并自动绘制荧光曲线。阈值设定方法：通过前期 12 次独立无模板对照试验，建立阴性对照数据集，获取荧光强度（relative fluorescence units, RFU）数据；计算其 RFU 均值 $\bar{x}$ =130 000，标准差 s =27 000，RFU 阈值（Threshold）= $\bar{x}$ +10 s =400 000（该设定覆盖 99.99% 置信区间，确保假阳性率<0.01%）；若终点 RFU>400 000 的结果判读为阳性，反之则为阴性。

1.4.6 O-1 噬菌体投入量及侵染时间优化 分别取 3×10^3 , 3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 PFU/mL 的 O-1 噬菌体溶液 100 μ L 侵染 900 μ L 存活状态、灭活状态的沙门菌和等体积 NB, 在 37 $^{\circ}$ C 下静置孵育 10 min 后, 分别在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温培养箱中振荡培养(0, 1, 2, 3, 4 h), 磁分离后取上清, 按照 1.4.3 所述方法提取子代噬菌体 DNA。将所提取的 DNA 按 1.4.5 中的方法加入 RPA 反应体系, 以 NB 的 RPA 荧光曲线为对照, 观察不同投入量的 O-1 噬菌体在不同侵染时间下, 侵染不同状态的沙门菌株(存活和灭活)的 RPA 荧光曲线荧光信号强度, 终点荧光信号强度越高, 起峰时间越早, 扩增速度越快, 相同条件下样本中的目标 DNA 含量越多。分析噬菌体的投入量及侵染时间对 RPA 荧光信号特征的影响。

1.4.7 方法检出限

(1) 噬菌体核酸检测限: 取 3×10^7 PFU/mL O-1 噬菌体原液(250 μ L), 按 1.4.3 中的方法提取 DNA; 核酸定量分析确认浓度后, 制备 10 倍系列梯度稀释液; 各稀释度核酸取 2 μ L 作为模板, 依据 1.4.5 中的方法进行实时荧光 RPA 检测。通过分析扩增曲线特征, 确定噬菌体核酸的最低检测限(limit of detection, LOD)。

(2) 活沙门菌检测限: 将系列浓度梯度的活沙门菌菌液(900 μ L)分别与 O-1 噬菌体(100μ L, 3×10^5 PFU/mL)混合, 作为活菌组。阴性对照组采用等体积热灭活沙门菌菌液(95 $^{\circ}$ C, 30 min)替代活菌菌液, 空白对照组以等体积 NB 替代活菌菌液。所有混合液于 37 $^{\circ}$ C 静置孵育 10 min, 随后转移至 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床(180 r/min)中继续培养 180 min。培养结束后, 取上清液按 1.4.3 中的方法(磁珠法核酸提取试剂盒)提取 DNA, 并依据 1.4.5 中的方法进行实时荧光 RPA 检测。通过分析不同活菌浓度样本的荧光扩增曲线, 结合阴性/空白对照背景信号, 确定该方法对活沙门菌的 LOD 值。

1.4.8 方法的属内包容性和属间特异性

(1) 属内包容性: 选取 37 株沙门菌株(10^6 CFU/mL)探究方法的属内包容性。37 株沙门菌分属于 17 种血清型, 即伦敦沙门菌(SM-WY-2024-41F、SM-YD-2024-245D、SM-FZ-2024-239D、SM-FY-2024-152D)、肠炎沙门菌(SM-JDZ-2024-19D、SM-FC-2024-1D)、汤普森沙门菌(SM-SR-2024-186D、SM-GA-2024-74D、SM-JDZ-2024-17D)、里森沙门菌(SM-SR-2024-287D、SM-SR-2024-284D)、斯坦利沙门菌(SM-YC-2024-300D、SM-NKQ-2024-145D、SM-GZ-2024-115D、SM-GZ-2024-50D)、圣保罗沙门菌(SM-FZ-2024-166D、SM-DHQ-2024-33D)、鼠伤寒沙门菌(SM-FY-2024-37F、SM-YC-2024-297D、SM-JDZ-2024-234D、SM-LA-2024-66D)、波茨坦沙门菌(SM-FZ-2024-163D)、俄亥俄沙门菌(SM-YC-2024-285D、SM-GZ-2024-144D)、纽波特沙门菌(SM-GZ-2024-62F、SM-

FC-2024-279D)、明斯特沙门菌(SM-GZ-2024-59F)、慕尼黑沙门菌(SM-SR-2024-286D)、肯塔基沙门菌(SM-SR-2024-289D、SM-DHQ-2024-246D)、姆班达卡沙门菌(SM-LA-2024-42F)、利文斯顿沙门菌(SM-FX-2024-39F、SM-JDZ-2024-15D)、婴儿沙门菌(SM-FX-2024-40F、SM-FC-2024-20F)、印第安纳沙门菌(SM-FC-2024-54F、SM-PX-2024-45F)。以传统平板检测法作为对照。取 1 mL 不同血清型的沙门菌菌液, 均匀涂布于 NA 平板, 待菌液干燥后, 在平板上滴加噬菌体菌液, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 14 h, 通过观察噬菌斑的有无来判定结果。属内包容性以检测出的阳性菌株数与总阳性菌株数的百分比表示。

(2) 属间特异性: 选取 17 株非沙门菌株(10^6 CFU/mL)探究方法的属间特异性, 包括金黄色葡萄球菌(ATCC 2393)、单核细胞增生李斯特菌(ATCC 51777)、蜡样芽孢杆菌(ATCC 21366)、表皮葡萄球菌(ATCC 19654)、白色念珠菌(ATCC 10231)、铜绿假单胞菌(ATCC 9027)、苏云金芽孢杆菌(ATCC 39152)、木糖葡萄球菌(ATCC 35663)、产志贺氏毒素大肠埃希氏菌(STEC, BNCC 186739)、产志贺氏毒素大肠埃希氏菌(STEC, FC 7856)、大肠杆菌(ATCC 25922)、大肠杆菌(CMCC 44484)、阪崎肠杆菌(ATCC 29004)、志贺氏菌(ATCC 19623)、英诺克李斯特菌(ATCC 33090)和小肠结肠炎耶尔森菌(ATCC 23715), 以沙门菌活菌作为阳性对照。属间特异性以检出的非阳性菌株数与总非阳性菌株数的百分比表示。

1.5 数据处理

所有样本及对照均设 3 个平行进行 RPA 检测, 数据处理使用 Excel 2019 和 SPSS 24.0 软件。

2 结果与分析

2.1 荧光 RPA 法反应体系的优化

在 RPA 扩增过程中, 探针会识别出与目标 DNA 互补的 DNA 单链, 同时激活核酸外切酶活性, 识别并切割四氢呋喃(THF)位点, 分离探针上的荧光基团和淬灭基团, 从而释放出荧光信号。检测体系中噬菌体 DNA 浓度越高, RPA 扩增速度越快, RPA 荧光曲线起峰时间越早, 终点荧光信号值越大。

如图 1 所示, *exo* 探针体积为 0.6 μ L 时, 随着探针添加浓度升高, 阳性组荧光信号逐渐增大。然而, 过高的探针浓度会带来更高的背景信号。当探针浓度为 10 μ mol/L 时, 阳性组起峰明显, 且阴性及对照组背景信号较低。故选择 10 μ mol/L 作为探针的添加浓度。图 2 显示, 当上、下游引物添加量为 4.0 μ L 时, 阳性组起峰时间较快, 阴性及对照组背景信号较低且未起峰。随着引物添加量增加, 阳性组荧光信号出现先降低后上升的非线性变化, 与万佳欣等^[22]的研究结果相似。当引物添加量为 6.0 μ L 时, 荧光信号出现降低, 可能是因为过量的引物与单链结合蛋

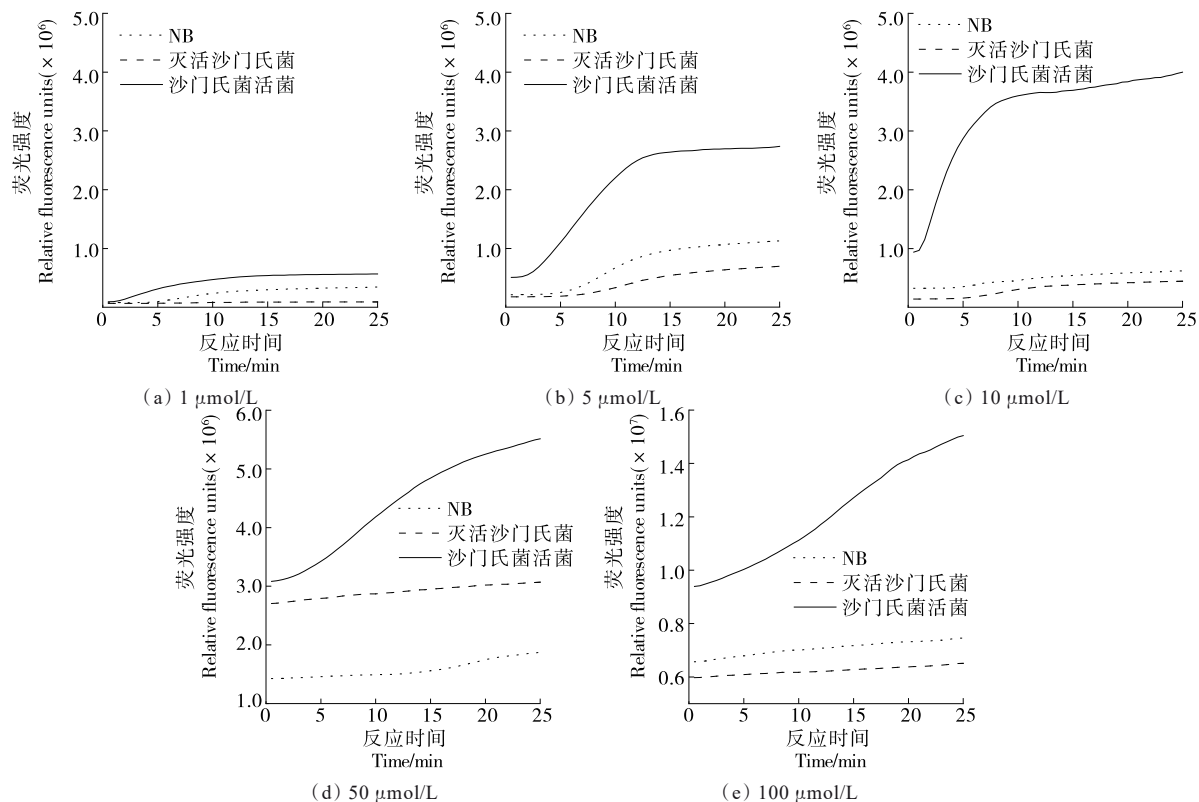


图1 exo探针浓度对RPA检测体系的影响

Figure 1 Effect of exo probe concentration on RPA detection system

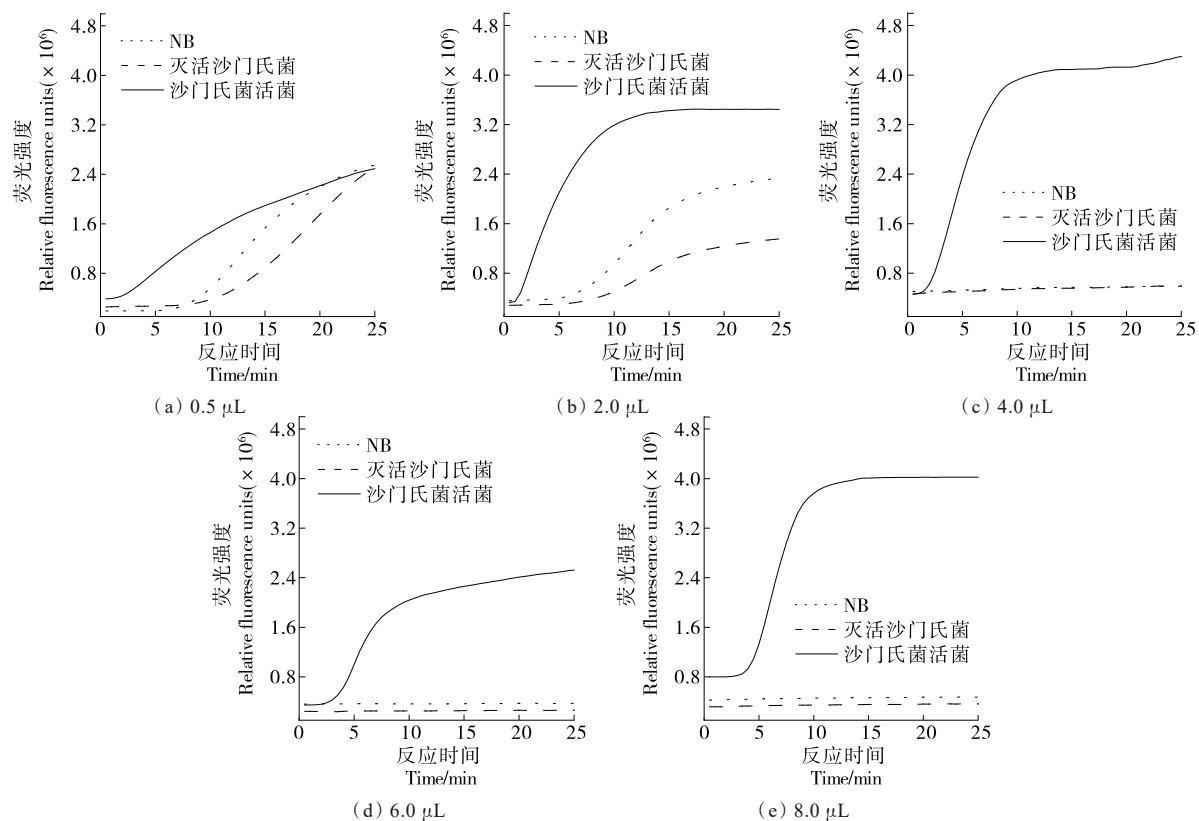


图2 引物添加量对RPA检测体系的影响

Figure 2 Effect of primer addition amount on RPA detection system

白结合,致其不足,从而抑制了有效扩增复合物的形成,导致整体扩增效率下降。当引物添加量增至 $8.0\ \mu\text{L}$ 时,虽然反应初期的效率可能仍然受到抑制,但大量引物提高了聚合酶与模板-引物复合物碰撞的概率,可在反应后期缓慢累积扩增产物,最终荧光信号强度回升但起峰时间出现了延迟。因此,确定上、下游引物的最佳添加量为 $4.0\ \mu\text{L}$ 。

2.2 O-1 噬菌体投入量及侵染时间的优化

试验选用的 O-1 噬菌体是一种烈性噬菌体,属于肌病毒科 A1 组^[23],对沙门菌裂解谱极为广泛^[24],能在有活力的沙门菌中增殖产生子代噬菌体,但不能在灭活的沙门菌或 NB 培养基中增殖产生子代噬菌体,可用于区分沙门菌的死活。

O-1 噬菌体投入量是影响检测方法灵敏度的关键参数,如图 3 所示,随着噬菌体投入量的增加,阳性样本(含活沙门菌)的起峰时间逐渐前移,终点荧光值相应升高。噬菌体投入量过低会延长其在阳性样本中的增殖时间,导致 RPA 荧光曲线起峰延迟;反之,噬菌体投入量过高

($\geq 3 \times 10^5$ PFU)时,待检液中残留的母代噬菌体过多,致使阴性对照(灭活沙门菌)产生非特异性荧光信号(假阳性),难以区分活菌与死菌。当 O-1 噬菌体投入量为 3×10^4 PFU 时,可在较短的侵染时间内有效检出活沙门菌,同时避免阴性对照出现假阳性。

如图 4 所示,随着侵染时间的增加,O-1 噬菌体侵染阳性组的起峰时间逐渐前移,终点荧光值相应升高,侵染增殖 3 h 时阳性组和阴性组起峰时间有明显差异,且 3 h 后荧光信号值不再明显增加。因此,侵染时间确定为 3 h。

2.3 方法检测限

2.3.1 噬菌体核酸检测限 噬菌体核酸梯度为 $7.3 \times 10^5 \sim 7.3 \times 10^{-2}$ fg/mL,反应结果如图 5 所示,当核酸质量浓度 ≥ 73 fg/mL 时,RPA 荧光检测均产生扩增曲线且终点荧光强度 $> 4.0 \times 10^5$,因此,该方法检出限为 $0.07\ \text{fg}/\mu\text{L}$ 。

2.3.2 噬菌体核酸检测限 经过活菌梯度检测($1.58 \times 10^5 \sim 1.58 \times 10^1$ CFU/mL),结果表明,该方法在 1.58×10^2 CFU/mL 活菌数下呈显著阳性扩增(终点荧光值 $>$

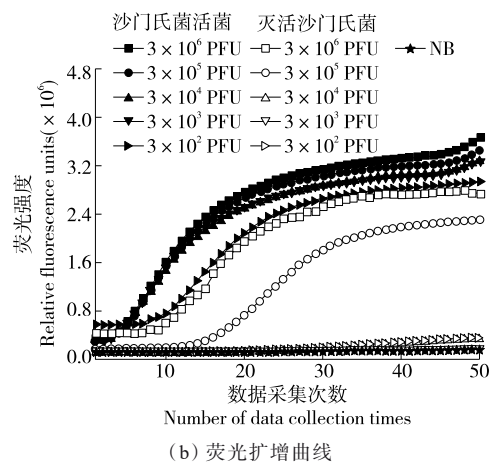
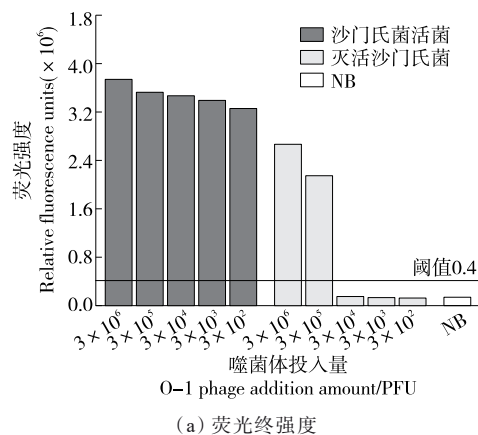


图 3 O-1 噬菌体投入量对检测的影响

Figure 3 Influence of O-1 phage addition amount on detection

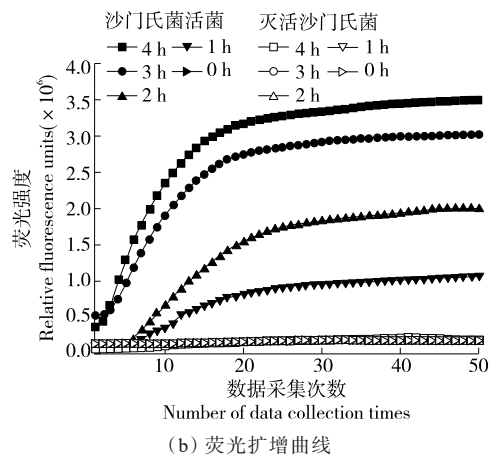
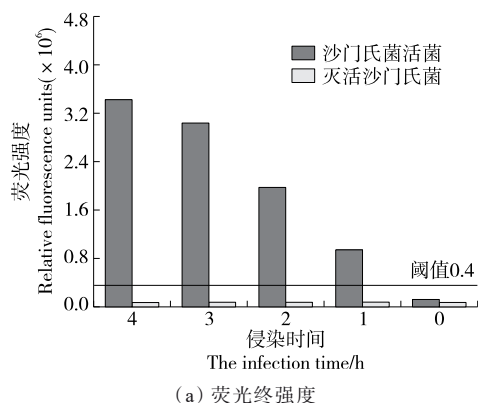


图 4 O-1 噬菌体侵染时间对检测的影响

Figure 4 Influence of O-1 phage infection time on detection

4.0×10^5), 而灭活菌组及 NB 组均无扩增信号(图 6)。据此判定该方法对活沙门菌的 LOD 为 1.58×10^2 CFU/mL (检出率 100%, $n=3$)。

噬菌体特异性侵染耦合荧光 RPA 的沙门菌活菌快速检测方法对活沙门菌的检测限为 1.58×10^2 CFU/mL, 不需要额外增殖步骤, 这得益于噬菌体在活菌内的快速增殖, 产生大量子代噬菌体, 放大了检测信号^[25]。基于传统的噬菌斑计数的子代噬菌体检测需要 6~7 h, 而采用荧光 RPA 技术可在 0.5 h 内检测出子代噬菌体, 因此, 使用荧光 RPA 检测子代噬菌体耗时更短, 灵敏度和特异性更高。相比传统分子生物学检测方法, 如 qPCR、LAMP 等, 引入噬菌体后规避了死菌 DNA 的干扰, 具有更高的灵敏度和特异性。RPA 可在噬菌体侵染 3 h 后的 15~30 min 实现等温条件下核酸的快速扩增, 省去了携带精密温度循环设备(如 PCR 仪), 仅需荧光信号检测装置即可完成检测, 操作更便捷^[26], 非常适合于食品生产现场、流通环节的快速筛查, 疫情应急响应以及资源有限地区的沙门菌污染监控。

2.4 方法的属内包容性和属间特异性

2.4.1 属内包容性 如图 7(a)所示, 37 株沙门菌的 RPA 结果均为阳性, 研究建立的方法的属内包容性高达 100%。试验过程中发现, SM-2024-33D、SM-2024-62F、SM-2024-64D、SM-2024-235D 和 SM-2024-289D 在传统噬菌斑试验的平板上并未出现可见的噬菌斑[见图 7(b)], 而 RPA 结果却呈阳性, 表明与传统噬菌斑试验相比, 研究建立的方法灵敏度更高, 更能有效避免因噬菌斑不显著或形成缓慢导致的漏检。

2.4.2 属间特异性 如图 8 所示, 除沙门菌外, 其余菌株 RPA 结果和噬菌斑结果均为阴性, 表明该检测方法的属间特异性高达 100%。噬菌体对宿主细胞具有高度特异性, 噬菌体增殖具有很好的特异性, 且能够区分活细菌和死细菌, 因为噬菌体只会识别并吸附活的宿主细菌并产生子代噬菌体^[16]。研究设计的 RPA 引物探针为 O-1 噬菌体保守基因, 具有高特异性, 确保了扩增荧光信号仅来源于在沙门菌活菌中增殖的子代噬菌体, 能有效排除非沙

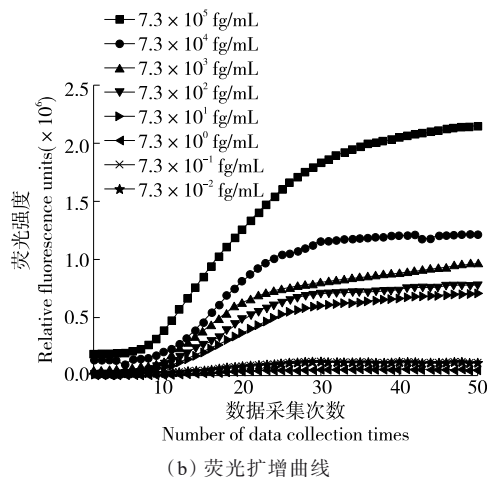
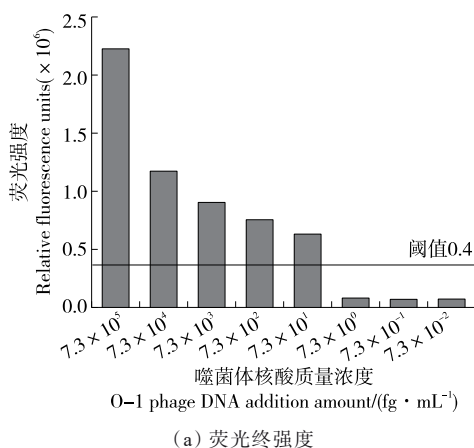


图 5 噬菌体核酸检测限

Figure 5 Detection limit for phage DNA

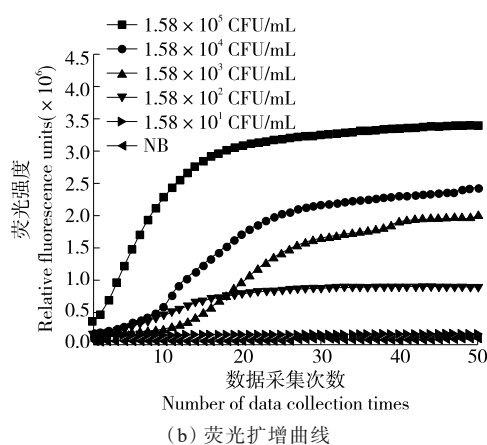
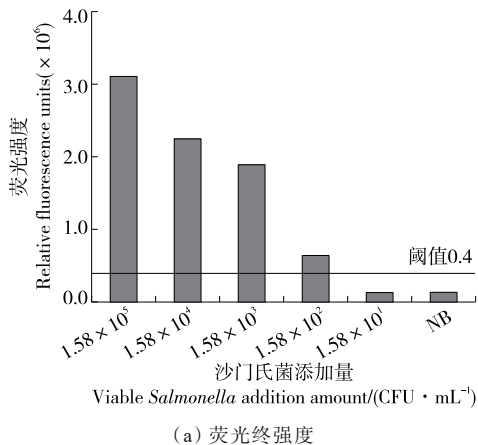
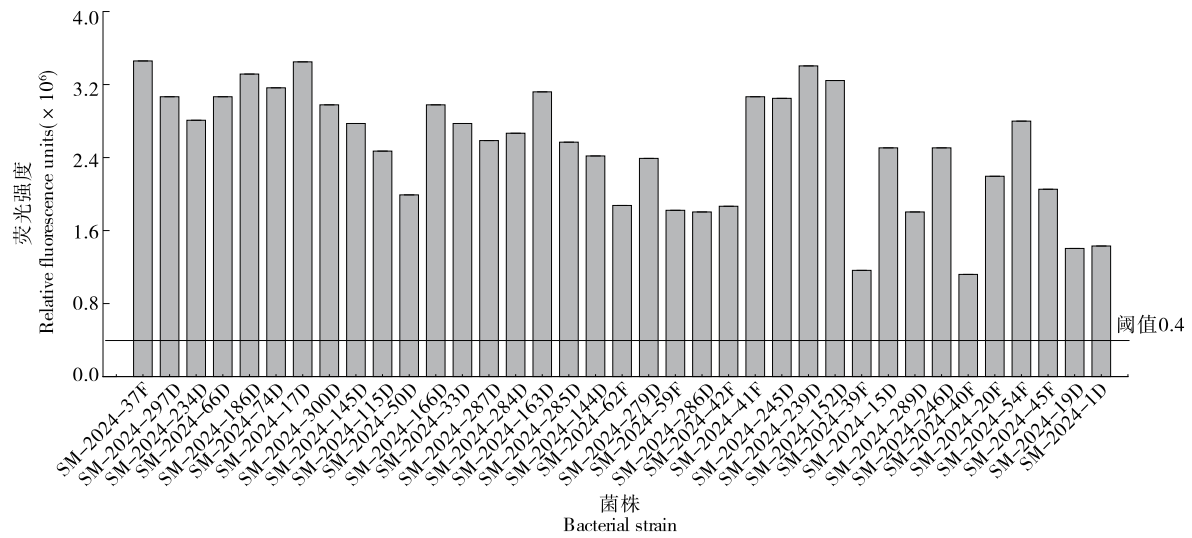
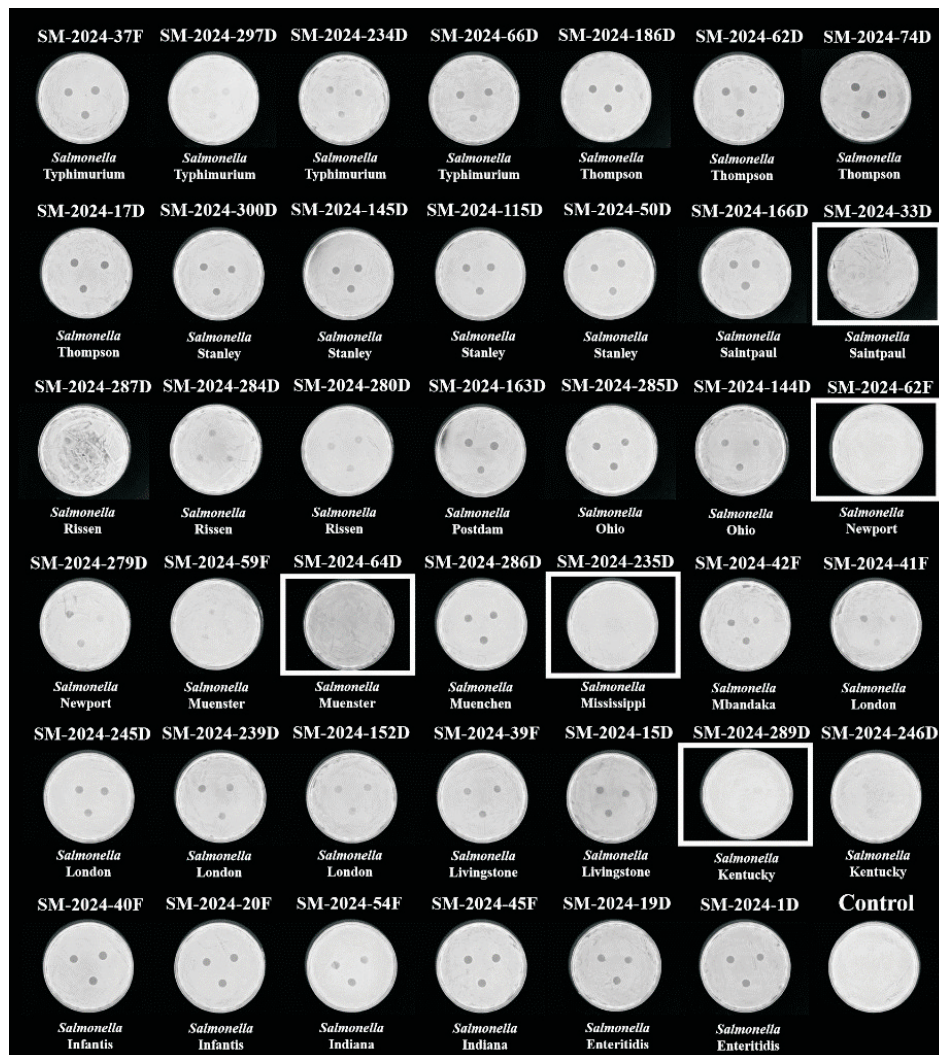


图 6 活沙门菌检测限

Figure 6 Detection limit for viable *Salmonella*



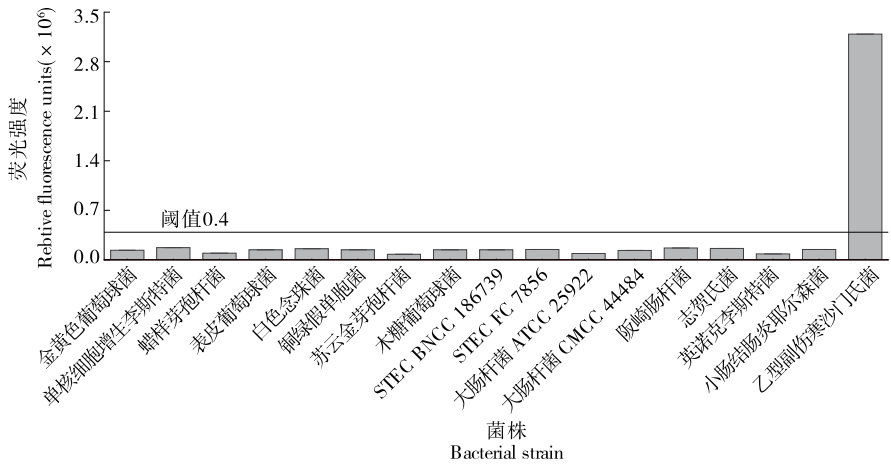
(a) 噬菌体特异性侵染耦合荧光 RPA 方法



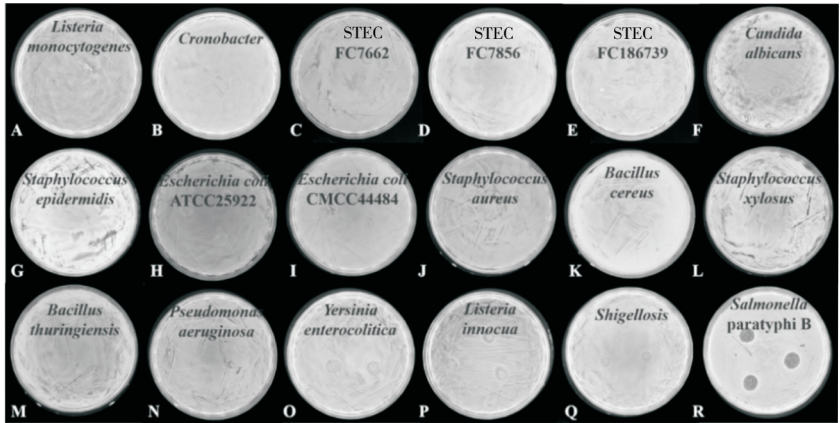
(b) 传统噬菌斑试验

图7 方法属内包容性

Figure 7 Intra-generic inclusivity



(a) 噬菌体特异性侵染耦合荧光 RPA 方法



(b) 传统噬菌斑试验

图 8 方法属间包容性

Figure 8 Inter-generic inclusivity

门菌及母代噬菌体背景信号的干扰。

3 结论

研究基于 Felix O-1 噬菌体特异性侵染活菌并增殖的特性,耦合重组酶聚合酶扩增(RPA)技术,建立了沙门菌活菌的重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法。该方法可在 4 h 内对沙门菌活菌进行快速检测,具有检测速度快、特异性强、灵敏度和准确性高等技术优势;灵敏度可达 10² CFU/mL,对 37 株不同血清型沙门菌检测的属内包容性为 100%,与 17 株非沙门菌无交叉反应。该方法适用于食品生产现场、流通环节中沙门菌活菌的现场快速筛查与鉴定,为食品加工沙门菌污染的安全监管提供技术支持。

参考文献

[1] 范鹏辉,李红秋,褚遵华,等. 2023 年中国大陆食源性疾病暴发监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(10): 1 199-1 208.
Fan P H, Li H Q, Chu X H, et al. Analysis of foodborne diseases outbreak surveillance in China's Mainland, 2023[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(10): 1 199-1 208.

[2] 段星星,曾晓琮,周露. 沙门氏菌检验及鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 5 364-5 370.
Duan X X, Zeng X C, Zhou L. Research progress on the detection and identification methods of *Salmonella*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(16): 5 364-5 370.
[3] 刘理慧,储锦华,隋雨欣,等. 沙门氏菌中主要毒力因子的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 72-83.
Liu L H, Chu J H, Sui Y X, et al. Research progress of main virulence factors in *Salmonella*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 72-83.
[4] 王紫璇,孙洁芳,邵兵. 食物中典型致病菌的快速检测研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 382-389.
Wang Z X, Sun J F, Shao B. Research progress in rapid detection of typical pathogenic bacteria in food stuff[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 382-389.
[5] 王芳妹,钟文涛,李政,等. 基于量子点纳米粒子对乳制品中致病菌进行定性分析[J]. 食品与机械, 2025, 41(3): 39-44.
Wang F M, Zhong W T, Li Z, et al. Qualitative analysis of pathogenic bacteria in dairy products based on quantum dot nanoparticles[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 39-44.

- [6] Yang Q, Zu J Q, Zhang S H, et al. An overview of rapid detection methods for *Salmonella*[J]. Food Control, 2025, 167: 110771.
- [7] 刘紫洋, 胡高爽, 郝建雄, 等. 纳米酶标记免疫分析技术在食品安全检测应用中的研究进展[J]. 食品与机械, 2025, 41(1): 234-242.
Liu Z Y, Hu G S, Hao J X, et al. Research progress on immunoassay technology based on nanoenzyme labeling in detection of food safety [J]. Food & Machinery, 2025, 41(1): 234-242.
- [8] 林哲. 基于噬菌体生物传感器的沙门氏菌检测方法研究: 以生鲜肉类中沙门氏菌活菌检测为例[J]. 食品安全导刊, 2025 (14): 144-147.
Lin Z. Research on *Salmonella* detection method based on phage biosensors: a case study of live *Salmonella* detection in fresh meat[J]. China Food Safety Magazine, 2025(14): 144-147.
- [9] 刘婷宇, 董庆利, 李嘉铭, 等. 食品中食源性致病菌活菌检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2025, 46(13): 395-403.
Liu T Y, Dong Q L, Li J M, et al. Research progress of detection technology of viable foodborne pathogens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(13): 395-403.
- [10] 王纯, 张若鸿, 王晓芳, 等. 食源性致病菌活菌检测方法的应用现状及展望[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(23): 183-189.
Wang C, Zhang R H, Wang X F, et al. Application status and prospects of detection methods for viable foodborne pathogens [J]. Food Research and Development, 2021, 42(23): 183-189.
- [11] 周冬根, 牟丹, 许恒毅. 重组酶介导的扩增技术及活菌检测方法的应用研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2023, 46 (3): 295-301.
Zhou D G, Mu D, Xu H Y. Application and research progress of recombinase-aid amplification technology and live bacteria detection methods[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2023, 46(3): 295-301.
- [12] 卫博, 王杰, 陈亦新, 等. 基于 PMA-CELL-qPCR 的葡萄酒发酵中酿酒酵母活菌计数方法的开发与应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17): 79-86.
Wei B, Wang J, Chen Y X, et al. Development and application of *Saccharomyces cerevisiae* viable cell quantitative method in wine fermentation based on PMA-CELL-qPCR[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(17): 79-86.
- [13] 沈静怡, 徐佳瑶, 陈赵圆, 等. 基于 RNA 检测畜禽病原菌活菌方法研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2024(6): 81-85.
Shen J Y, Xu J Y, Chen Z Y, et al. Research progress of RNA-based detection of viable pathogens in livestock and poultry[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2024(6): 81-85.
- [14] 黎财慧, 游淑珠, 王小玉, 等. 食品中沙门氏菌活菌的 *Taq Man* 实时荧光 PCR 检测方法研究[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(4): 76-83.
Li C H, You S Z, Wang X Y, et al. Study on detection of live *Salmonella* in food by *TaqMan* Real-time PCR[J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(4): 76-83.
- [15] 王梓晨, 牛洪梅, 刘阳泰, 等. 产志贺毒素大肠埃希氏菌活菌检测方法的应用现状及展望[J]. 工业微生物, 2024, 54(2): 92-100.
- Wang Z C, Niu H M, Liu Y T, et al. Application status and prospects of detection methods for living shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. Industrial Microbiology, 2024, 54(2): 92-100.
- [16] Dion M B, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(3): 125-138.
- [17] Monika B, Iva S. Phage amplification assay for detection of mycobacterial infection: a review[J]. Microorganisms, 2021, 9 (2): 237.
- [18] 郭歌. 基于纳米酶的噬菌体生物传感器特异检测金黄色葡萄球菌[D]. 扬州: 扬州大学, 2024: 63-96.
Guo G. Specific detection of *Staphylococcus aureus* by bacteriophage biosensor based on nanozymes[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024: 63-96.
- [19] Šuster K, Podgornik A, Cör A. Quick bacteriophage-mediated bioluminescence assay for detecting *Staphylococcus* spp. in sonicate fluid of orthopaedic artificial joints[J]. The New Microbiologica, 2017, 40(3): 190-196.
- [20] Ding Y F, Huang C X, Chen M X, et al. Rapid and simultaneous detection of viable *S. aureus* and its penicillin susceptibility by phage amplification techniques in different food matrices[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 176: 114526.
- [21] 张雪花. 基于重组酶聚合酶扩增(RPA)技术快速检测假结核耶尔森氏菌[D]. 武汉: 华中科技大学, 2024: 7-11.
Zhang X H. Rapid detection of *Yersinia pseudotuberculosis* based on recombinase polymerase amplification[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2024: 7-11.
- [22] 万佳欣, 朱寅初, 徐杏, 等. 基于实时荧光 RPA 的鸭瘟病毒株感染快速检测方法的建立[J/OL]. 生物工程学报. (2025-09-05) [2025-10-03]. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.250357>.
Wan J X, Zhu Y C, Xu X, et al. Development of a rapid detection method for a virulent strain of duck enteritis virus based on real-time fluorescence recombinase polymerase amplification[J/OL]. Chinese Journal of Biotechnology. (2025-09-05) [2025-10-03]. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.250357>.
- [23] Whichard J M, Weigt L A, Borris D J, et al. Complete genomic sequence of bacteriophage felix O1[J]. Viruses, 2010, 2(3): 710-730.
- [24] Welkos S, Schreiber M, Baer H. Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage[J]. Applied Microbiology, 1974, 28 (4): 618-622.
- [25] Bárdy P, Pantůček R, Benešik M, et al. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 618-633.
- [26] 周洁, 黄夏宁, 卢玲敏, 等. 基于恒温扩增技术的病原体快速检测研究进展[J]. 中国口岸科学技术, 2024, 6(S2): 19-27.
Zhou J, Huang X N, Lu L M, et al. Advances in isothermal amplification technologies for rapid detection of pathogens[J]. China Port Science and Technology, 2024, 6(S2): 19-27.