



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Food Safety and Health—Article

基于链置换环介导等温扩增的量子点纳米珠标记侧流免疫检测试纸条快速灵敏检测鼠伤寒沙门氏菌

Yuting Shang^{a,b,#}, Shuzhen Cai^{a,#}, Qinghua Ye^a, Qingping Wu^a, Yanna Shao^a, Xiaoying Qu^a, Xinran Xiang^a, Baoqing Zhou^a, Yu Ding^a, Moutong Chen^a, Liang Xue^a, Honghui Zhu^a, Jumei Zhang^{a,*}

^a Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health & State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China & Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China

^b State Key Laboratory of Food Science and Technology & National Engineering Research Center for Functional Foods & Synergetic Innovation Center of Food Safety & Joint International Research Laboratory on Food Safety, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2020

Revised 18 December 2020

Accepted 11 March 2021

Available online 17 July 2021

关键词

鼠伤寒沙门氏菌

量子点纳米珠

侧流免疫检测试纸条

环介导等温扩增

链置换探针

摘要

快速、灵敏、即时检测致病菌对食品安全至关重要。在这项研究中,开发了一种新的量子点纳米珠标记的侧流免疫检测试纸条(QB-labelled LFIA)结合链置换环介导的等温扩增(SD-LAMP)技术,用于定量检测鼠伤寒沙门氏菌(ST)。量子点纳米珠(QB)作为荧光报告材料,具有良好的检测效率。在LAMP中使用了可定制的链置换(SD)探针,以提高方法的特异性并防止副产物捕获。检测基于夹心免疫分析法。荧光条读取器测量测试(T)线和对照(C)线的荧光强度(FI)。条带的线性检测范围为每毫升 $10^2 \sim 10^8$ 个菌落形成单位(CFU)。视觉检出限为 10^3 CFU·mL⁻¹,表明该系统的灵敏度是AuNP标记试纸的10倍。根据聚合酶链反应(PCR)和SD-LAMP的琼脂糖凝胶输出分析ST特异性。在食品中检测到ST,回收率为85%~110%。该方法快速、简便,几乎不需要设备,适用于食品中的细菌检测和临床诊断。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

等温核酸扩增技术,如核酸序列扩增、链置换扩增、解旋酶依赖性扩增、滚环扩增和环介导等温扩增(LAMP)等,是很有前途的现场病原体鉴定方法;因为它们可以有效地扩增靶标,而不需要基于聚合酶链反应(PCR)的方法所需的热循环设备[1–2]。LAMP是一项特别有趣的技术,因为该技术使用一种酶,可以在一小时内扩增多达 10^9 个拷贝,使用不到10个拷贝的输入模

板[3]。尽管有这些优势,但传统的LAMP检测偶尔会遇到挑战,如非特异性扩增、引物-二聚体形成或污染,最终导致假阳性结果,原因是高浓度的引物和 Mg^{2+} [4–5]。常用的LAMP扩增子可视化技术,如浊度测量[6]、琼脂糖凝胶电泳[7]、荧光插层染料染色[8–9]、金属离子指示剂[10]和pH敏感染料[11],无法区分非特异性副产物。虽然已经通过各种方法解决了这一问题,包括尿嘧啶DNA-糖基化酶(UDG)补充LAMP,其中在第一轮扩增时将脱氧尿嘧啶三磷酸(dUTP)纳入扩增子中,

* Corresponding author.

E-mail address: Zhangjm128@126.com (J. Zhang).

These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: Engineering 2022, 19(12): 62–70

引用本文: Yuting Shang, Shuzhen Cai, Qinghua Ye, Qingping Wu, Yanna Shao, Xiaoying Qu, Xinran Xiang, Baoqing Zhou, Yu Ding, Moutong Chen, Liang Xue, Honghui Zhu, Jumei Zhang. Quantum Dot Nanobeads-Labelled Lateral Flow Immunoassay Strip for Rapid and Sensitive Detection of *Salmonella* Typhimurium Based on Strand Displacement Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.024>

然后在下一轮扩增之前被UDG消化以消除携带[12]；以及荧光共振能量转移探针[13]、分子信标[14]，猝灭未纳入的信号扩增探针[15]，通过释放猝灭来检测扩增[16–17]，但这些方法需要相对昂贵的试剂和设备，并且在即时诊断中存在问题。相比之下，侧流免疫检测试纸条(LFIAS)更快、更简单；据报道，该测试条有望增强LAMP扩增产物的可视化和分析[18–21]。不幸的是，LAMP-LFIAS也可能检测到扩增副产物，导致虚假的结果。Phillips等[22]最近通过将链置换(SD)探针集成到LAMP分析中，成功地防止了商业AuNP-LFIAS上的副产物捕获。SD探针是通过将带有羧基荧光素(FAM)标记的环状引物退火到带有淬灭剂标记的较短互补链来制备的。然而，使用荧光团标记的环状引物限制了对不同靶标的适应，因为环状引物设计通常在这方面不太令人满意，而且大多数胶体金试纸条只能进行定性或半定量检测。

为了解决这些问题，需要确保SD-LAMP检测的特异性和可靠性，即SD-LAMP只有在靶标DNA存在的情况下才会给出真正的阳性反应[23]。使用标记的内引物[正向内引物(FIP)或后向内引物(BIP)]取代SD探针中的标记环引物[环正向(LF)或环后向(LB)]；由于后者在LAMP反应中的使用浓度是前者的两倍，因此在扩增过程中被更大程度地结合到扩增产物中。为了更简单和更灵敏地直接读出LAMP扩增，进一步将SD-LAMP与量子点纳米珠(QB)标记的LFIAS结合用于细菌检测。QB是一种新型的荧光纳米材料，由掺杂了大量量子点的聚合物纳米棒组成，具有优异的亮度和很强的抗光漂白稳定性[24]。与使用胶体金纳米颗粒或荧光染料的LFIAS相比，QB标记的LFIAS表现出更高的灵敏度和准确性，以及更低的背景干扰[25]。这种新建立的检测方法的工作原理如图1所示。简单地说，在一个典型的程序中，使用生物素标记的内引物和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的SD探针进行核酸扩增，以标记靶标DNA[图1(a)]。然后，将得到的具有双标记(FITC和生物素)的杂交产物沉积到QB标记的LFIAS上，根据形成的三明治结构来指示靶标的存在或不存在[图1(b)]。研究推测，SD-LAMP与QB标记的LFIAS方法相结合，可以以特定的方式成功地检测目标病原体。鼠伤寒沙门氏菌(ST)是一种通常会导致人和动物严重疾病的病原菌，该病原菌被用于检查拟议平台的性能。该方法具有较高的特异性和灵敏度，检测时间短，操作方便，可作为实验室细菌检测和现场检测的有用工具。

2. 材料和方法

2.1. 材料和试剂

将10个ST菌株和20个非ST菌株保存在25%的甘油中，温度为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。所有菌株在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的Luria-Bertani(LB)肉汤中复苏两次，持续24 h，使用HiPure Bacterial DNA Kit(广州美基生物科技有限公司)提取基因组DNA。在SD-LAMP反应中使用了从美国New England Biolabs公司获得的Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶(M0538L)。所有引物和探针都是从北京擎科生物科技股份有限公司订购的。

本文研究团队在实验室合成了涂有羧基的亲水CdSe/ZnS QB耦合试剂，1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma-Aldrich公司(美国)。Tween-20、聚乙二醇(PEG)、果糖、蔗糖和其他分析级试剂购自Aladdin公司(中国)。抗FITC单克隆抗体(mAb₁)、抗生物素单克隆抗体(mAb₂)和山羊抗小鼠IgG均来自Abcam公司(英国)。所有的LFIAS材料、样品垫(Ahlstrom 8951)、共轭垫(Ahlstrom 8964)、硝酸纤维素(NC)膜(Sartorius CN 140)、吸收垫(H5072)和PVC板(DB-6)均购自上海杰一生物技术有限公司。

2.2. SD探针设计和SD-LAMP反应

SD探针基本上是由杂交的寡核苷酸组成的半双链DNA，其中内部引物(FIP或BIP)在其5'或3'端含有一个荧光团和一个较短的互补支架(称为Fd)。一般来说，设计荧光团标记的引物的目的是避免形成稳定的发夹；SD探针的溶解温度应明显低于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (至少低 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$)，以确保启动趾状物介导的链置换反应。SD-LAMP引物是用PrimerExplorer V5在线软件(Eiken Chemical Co. Ltd., 日本)为ST设计的。本研究通过将 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的5'-FITC标记的BIP与 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Fd在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下退火5 min，然后以 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度缓慢冷却到 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以制备SD探针的储备溶液。SD-LAMP反应与标准LAMP反应的进行方式几乎相同，只是加入了SD探针。反应混合物含有 $1\text{ }\mu\text{L}$ DNA模板、 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 、 $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、 $0.32\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶、 $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ F3和B3引物、 $1.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FIP引物、 $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BIP引物和 $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SD探针，总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的 $1\times$ 等温缓冲液，在Biometra TOne 96G(Jena Analytik, 德国)中进行， $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h，然后加热到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 持续10 min，使聚合酶变性，然后保持在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直到用于分析。标准LAMP和SD-LAMP产品采用2%聚丙烯酰胺凝胶电泳，溴化乙锭染色，并使用Tanon-

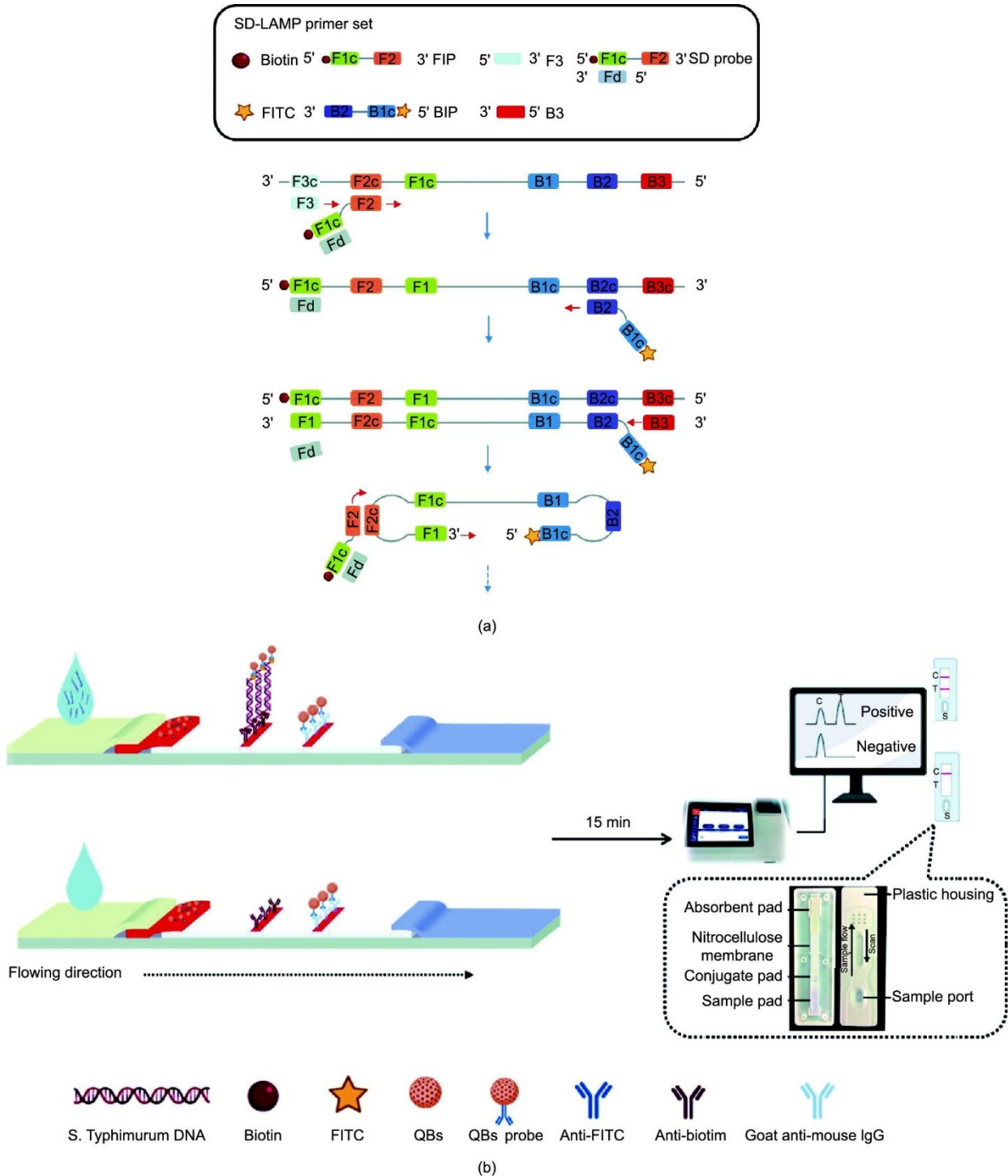


图1. (a) SD-LAMP反应的原理；(b) 用于检测扩增产物的QB标记的LFIA的示意图。FITC：异硫氰酸荧光素。FIP：正向内引物。BIP：后向内引物。SD：链置换。IgG：免疫球蛋白G。

2500 紫外线 (UV) 透射器 (Tanon, 中国) 进行可视化分析。此外, 本研究使用 LightCycler[®] 96 实时荧光检测 (Roche, 瑞士) 进一步确认了 SD-LAMP 的有效性。

2.3. QB-mAb₁ 共轭物的制备和表征

利用 QB 表面的羧基与抗体的胺基发生 EDC 共轭反应,

制备了 QB-mAb₁ 共轭物。具体来说, 5 μ L 的 QB (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在 500 μ L 磷酸盐缓冲液 (PB) (0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 6.0) 中用新制备的 5 μ L EDC (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 预活化。将混合溶液置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的旋转器中 30 min, 然后加入 5 μ g mAb₁ 并搅拌 2 h。为了阻断剩余的活性偶联部位, 加入含 10% 牛血清白蛋白的 50 μ L 的 PB (0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH =

6.0), 孵育 1 h; 对 QB-mAb₁ 10 000 g 离心 20 min, 用纯水洗涤至少两次。最后, 将纯化的共轭物悬浮在 1 mL PB (0.01 mol·L⁻¹, pH = 7.4) 中。PB 含 2% (浓度) 果糖、5% (浓度) 蔗糖、1% (浓度) 牛血清白蛋白、1% (浓度) PEG 20 000 和 0.4% (体积分数) Tween-20, 并在 4 °C 保存以备后用。QB 与 mAb₁ 的最佳配比为 20~300 μg mAb₁ 与 1 mg QB 共轭。用紫外-可见 (vis) 吸收光谱 (Lambda 45 分光光度计, PerkinElmer, 美国) 和荧光发射光谱 (LS 45 光谱荧光仪, PerkinElmer, 美国) 对 QB-mAb₁ 共轭物进行表征。用 Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, 英国) 测量了纳米颗粒的流体学直径。用 H-7650 透射电子显微镜 (Hitachi, 日本) 拍摄 QB 的形态图像。

2.4. QB 标记的等温核酸扩增技术的制作和优化

QB 标记的 LFIAS 由样品垫、共轭垫、NC 膜和吸收垫组成。由玻璃纤维制成的样品垫被浸泡在含有 2% (浓度) PEG 8000 和 1.5% (体积分数) Tween-20 的盐酸三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl) (0.05 mol·L⁻¹, pH = 8.0) 中, 达到完全饱和, 并在 50 °C 下干燥 24 h。共轭垫的制备方式与样品垫相似, 不同的是处理液为硼酸盐缓冲液 (BB) (0.002 mol·L⁻¹, pH = 8.5), 含有 5% (浓度) 海藻糖、0.5% (浓度) 酪蛋白钠盐, 0.1% (浓度) PEG 20 000 和 0.5% (体积分数) Tween-20, 在浸泡之后, 用一定体积的 QB-mAb₁ 喷洒共轭垫, 在 37 °C 下干燥 12 h。然后, 用 XYZ3060 分配器 (BioDot, 美国) 将一定浓度的 mAb₂ 和 1 mg·mL⁻¹ 的山羊抗鼠 IgG 分别加入 NC 膜, 形成测试 (T) 线和对照 (C) 线。点胶速度为 1 μL·cm⁻¹, T 线和 C 线之间的距离约为 4 mm。然后将 NC 膜在真空条件下于 37 °C 培养 12 h。根据相应的阳性样品的 T 线和 C 线的信号强度来确定 T 线上的最佳抗体浓度。吸收垫未经处理就被使用。所有部分被依次粘贴在聚氯乙烯 (PVC) 板上, 重叠 2 mm, 以确保液体能顺利通过整个测试条。最后, 用条形切割器 (HGS201, 杭州峰航科技有限公司) 将组装的测试条切割成 4 mm 大小, 并储存在干燥器中, 用于后续的检测。

2.5. QB 标记的 LFIAS 进行程序检测

整个过程包括 SD-LAMP 反应和 QB 标记的 LFIAS 检测步骤。将 10 μL SD-LAMP 产物与 90 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.01 mol·L⁻¹, pH = 7.4) 混合, 并用吸管将液体输送到样品垫上, 使液体在毛细管力的作用下被吸收并向吸收垫迁移。一旦靶标 DNA 被包含在样品中, FITC 和生物素标记的扩增物就可以通过抗原-抗体相互作用与 QB-mAb₁ 结合物结合, 然后被 T 线上的 mAb₂ 包被捕获, 形成

夹心复合体。多余的 QB-mAb₁ 进一步迁移并与山羊抗鼠抗体在 C 线上发生反应。相反, 如果样品中不存在靶标 DNA, 它将在没有相互作用的情况下流经 T 线, 这导致在 T 线处没有荧光信号, 但在 C 线处保留正信号。如果不存在 C 线, 则认为该测试无效。15 min 后, 将试纸插入 FIC-S1 荧光条阅读机, 记录 T 线和 C 线的荧光强度 (FI) 以定量分析物。为了消除批次变化和样本矩阵的干扰, 使用 HMReader 8.3 软件计算 FI_T/FI_C 比。以无靶标 DNA 的 SD-LAMP 反应为对照。在相同的条件下, 每个样品的测试进行三次。

2.6. 性能分析

利用细菌 DNA 模板对 SD-LAMP QB 标记的 LFIAS 的性能进行评估。共有 10 株 ST 和 20 株非 ST (包括 10 种不同血清型的沙门氏菌和 10 种非沙门氏菌) 具有相同浓度 [10⁷ 个菌落形成单位 (CFU) ·mL⁻¹], 用于评价 LFIAS 的特异性。使用从 10 倍系列稀释的 ST ATCC 14028 培养基中提取的 DNA 进行灵敏度测试, 范围从 10⁷ CFU·mL⁻¹ 到 10⁰ CFU·mL⁻¹。通过绘制 FI_T/FI_C 与样品中 ST 的浓度的关系, 制作校准曲线。检出限 (LOD) 由方程 LOD = 3σ/S 定义, 其中 σ 是空白测量的标准偏差, S 是校准曲线的斜率。作为对照, 分别用新设计的正向引物 5'-CGTGCTT-GAATACCGCCTGT 和反向引物 5'-AGATCGTGTCGC-TATAGGT-3' 与所有 DNA 模板同时进行扩增。

2.7. 在食物样品中的应用

本实验使用不同类型的食物, 如饮用水、橙汁、生菜和鸡肉, 与 ST 混合得到加标样品, 测试了 SD-LAMP QB 标记的 LFIAS 的适用性。简而言之, 本研究使用 PB (0.01 mol·L⁻¹, pH = 7.4) 对液体样品 (包括饮用水和橙汁) 进行 100 倍稀释, 以便进一步使用。至于固体样品 (生菜和鸡肉), 本研究使用 90 mL PB (0.01 mol·L⁻¹, pH = 7.4) 将 10 g 样品均质到无菌袋中, 然后孵化 30 min。将所有的食物样本离心以去除食物残渣, 使用 ST ATCC 14028 人工感染上清液, 以获得 10⁷~10⁰ CFU·mL⁻¹ 的最终浓度。对照组样品没有加注 ST ATCC 14028。最后, 使用 SD-LAMP QB 标记的 LFIAS 方法对加标样品进行单独分析。食物样品购自广州当地的一家超市, 并通过标准的培养方法确认不含 ST。

3. 结果和讨论

3.1. SD-LAMP 的可行性

4 条引物 (F3、B3、FIP 和 BIP) 和 SD 探针被用来扩

增和检测 ST 特异性 DAN 序列（见表 1 和附录 A 中的图 S1）。如附录 A 中的图 S2 所示，本研究在阳性反应中观察到梯状条带和白色沉淀物，但在阴性和空白对照中未观察到，表明该 SD-LAMP 扩增体系是可行的。相反，标准 LAMP 产生了虚假的扩增子（如附录 A 中图 S3 的阴性对照）。实时 SD-LAMP 还揭示了靶标与 SD 探针的结合引发了链置换反应，该反应将导致 FD 从 SD 探针上移位，从而激活 FD 上的荧光团（见附录 A 中的图 S4）。因此，SD 探针在 LAMP 中的应用并不影响扩增反应，并且可以区分假阳性扩增产物和在没有特定靶标 DNA 的情况下产生的引物扩增伪迹。

3.2. QB-mAb1 的表征

本研究基于耦合方法，将 QB 与抗 FITC 单克隆抗体耦合，制备 QB-mAb₁ 共轭物。如图 2 (a) 所示，随着大量 CdSe/ZnS QD 嵌入聚合物基质中，QB 呈准球形；QB 具有良好的均匀性和分散性。为了确认共轭过程，本研究使用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱图像对自由和生物共轭的 QB 进行了研究。图 2 (b) 显示了紫外-可见吸收光谱。从图中可见，QB-mAb₁ 的紫外-可见吸收峰在 278 nm 附近有一个特征性的抗体峰，而 QB 没有，表明该抗体已与 QB 结合。这在图 2 (c) 中也可以观察到，因为发射带的位置在与 mAb₁ 结合时没有明显移动，但 FI 下降。这些现象被认为是由围绕着 mAb₁ 的 QB 有机层造成的。此外，由于 QB-mAb₁ 共轭物比同批次的 QB 大，在琼脂糖凝胶电泳过程中，QB 在凝胶中的迁移速度比 QB-mAb₁ 快（见附录 A 中的图 S5），而且平均流体动力学颗粒尺寸增大（见附录 A 中的图 S6）。这些结果表明，QB-mAb₁ 共轭物制备成功，可用于 SD-LAMP 产品的 LFIAS

检测。

3.3. 实验条件的优化

为了使 SD-LAMP QB 标记的 LFIAS 达到最佳的分析性能，本研究对三个关键因素进行了优化，即 QB-mAb₁ 的性质、标记溶液在共轭垫上的加入量，以及 T 线上抗体的浓度。首先，与 QB 结合的 mAb₁ 的量对 QB-mAb₁ 的结合能力有很大影响。如果 mAb₁ 的量太少，灵敏度就会降低。但是，如果用量过高，QB-mAb₁ 的化学稳定性和胶体稳定性会降低，导致粒子聚集。设定 QB 浓度为 1 mg，分别测试 mAb₁ 浓度为 20 μg、50 μg、100 μg、150 μg、200 μg、250 μg 和 300 μg 时，mAb₁ 与 QB 的比例的影响。如附录 A 中图 S7 (a) 所示，在较低的浓度下，共轭溶液的 FI 随着 mAb₁ 浓度的增加而急剧增加，在 250 μg·mg⁻¹ 时达到最大值，随后又下降。因此，选择 250 : 1 (μg : mg) 作为制备 QB-mAb₁ 的最佳共轭比。接下来，本研究调查了标记量对 LFIAS 的影响。本研究将不同体积 (2 μL、4 μL、6 μL、8 μL、10 μL 和 12 μL) 的 QB-mAb₁ 加入每个共轭垫的 1 cm 处，并记录 T 线和 C 线的 FI。附录 A 中图 S7 (b) 显示了 FI_T/FI_C 比率与不同标记量之间的关系。在 1 cm 的共轭垫上加入 8 μL QB-mAb₁，可提供令人满意的反应，此时 FI_T/FI_C 比值最高。此外，为了进一步改善 QB 标记的 LFIAS 的荧光反应，本研究对涂在 T 线上的 mAb₂ 的浓度进行了优化。本研究在 1~4 mg·mL⁻¹ 的范围内评估了不同浓度的 mAb₂。如附录 A 中图 S7 (c) 所示，随着 mAb₂ 浓度的增加，T 线的 FI 增加到 3 mg·mL⁻¹，达到一个平稳状态。同时，C 线的 FI 相对较高。基于这一分析，本研究选择了 2 mg·mL⁻¹ 的 mAb₂ 作为 T 线的最佳浓度。

表 1 本研究中使用的引物的序列

Primer type	Sequence (5' to 3')	Length base pair (bp)
SD-LAMP ^a		
F3	AGCCGCATTAGCGAAGAG	18
B3	GCGGTCAAATAACCCACGT	19
FIP	Biotin-ACCTGCAGCTCATTCTGAGCAGGGCTCCGGTAATGAGATTGG	42
BIP	FITC-GAAAAGGACCACAAGTTCGCGCTCAGTGAGCATGTCGACGAT	42
Fd	CTGCTCAGAATGAGCTGCAGGT	22
Real-time SD-LAMP		
F3	AGCCGCATTAGCGAAGAG	18
B3	GCGGTCAAATAACCCACGT	19
FIP	BHQ1-ACCTGCAGCTCATTCTGAGCAGGGCTCCGGTAATGAGATTGG	42
BIP	GAAAAGGACCACAAGTTCGCGCTCAGTGAGCATGTCGACGAT	42
Fd	CTGCTCAGAATGAGCTGCAGGT-FAM	22

^a The amplification efficiency of FITC labelled on the BIP was better than FITC labelled on the FIP, which can be seen in Appendix A Fig. S1.

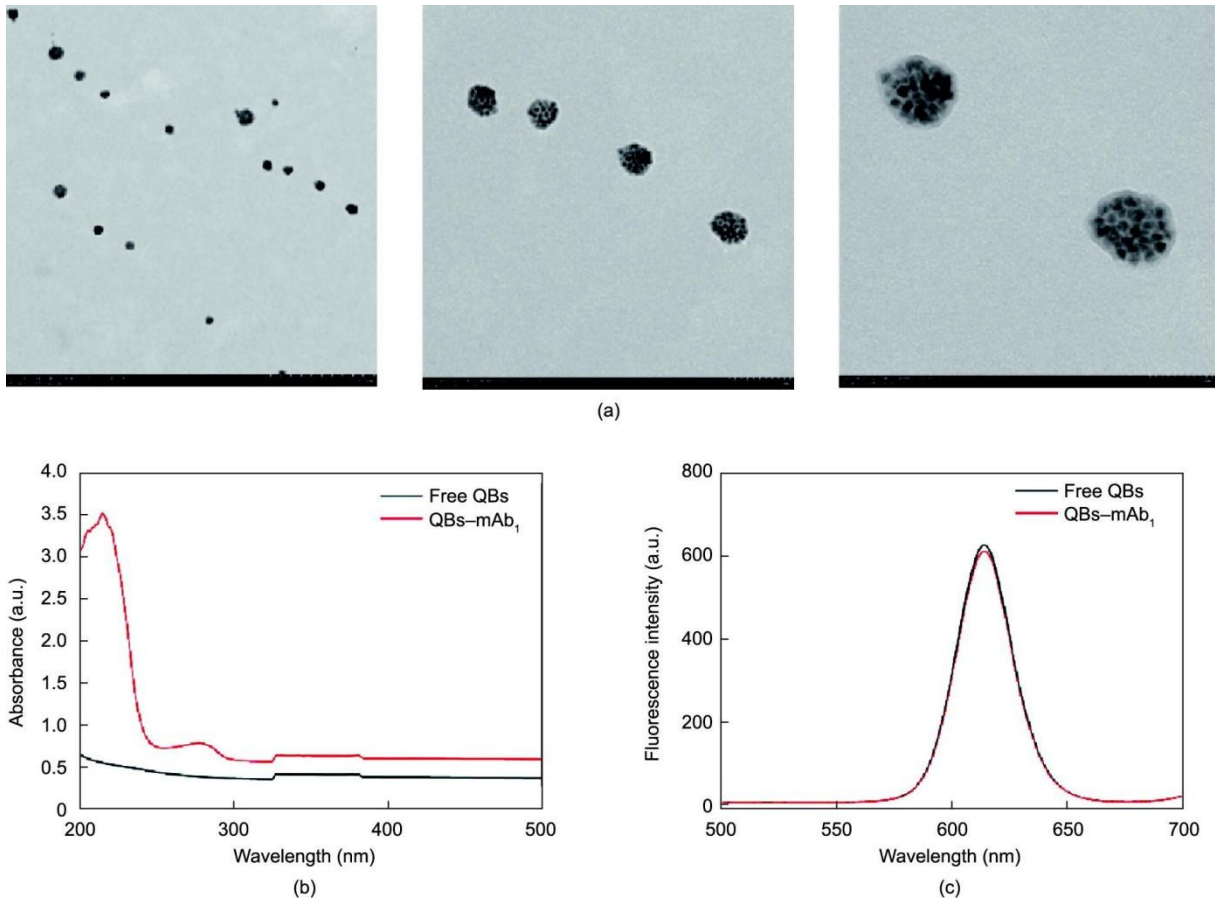


图2. QB和QB-mAb₁共轭物的特征。(a)合成的QB的TEM图像；(b)自由QB(黑线)和QB-mAb₁共轭物(红线)的紫外-可见吸收光谱；(c)荧光发射光谱。关于本图例中对颜色的解释，请参考本文的网络版。a.u.: 任意单位。

3.4. 检测的特异性

特异性结果如图3所示。正如预期的那样，只有ST菌株在T线和C线上显示出高QB荧光信号，而非ST菌株和空白对照在T线上没有观察到荧光信号。此外，LFIAS的结果与聚合酶链反应和SD-LAMP的琼脂糖凝胶结果一致，表明ST检测是准确的。因此，本研究的方法表现出非常高的特异性，这可能要归功于SD探针的应用和LFIAS的捕获能力。

3.5. 检测灵敏度

如图4(a)所示，试条的荧光照片清晰，T线的亮度随着细菌浓度的增加而增加。LFIAS的视觉LOD为 10^3 CFU·mL⁻¹，定义为在紫外线下可以看到的最低细菌浓度。通过分析T线和C线的FI，确定细菌标准溶液相对于其浓度的FI_T/FI_C值，获得了校准曲线[图4(b)]。在 10^2 ~ 10^7 CFU·mL⁻¹范围内有良好的线性关系，相关系数(R^2)为0.9669，计算的LOD值为 10^{-1} CFU·mL⁻¹。此外，利用相同的扩增产物，比较了QB标记的LFIAS和传统的AuNP标记的LFIAS的灵敏度。根据附录A中图S8所示的结果可

知，AuNP标记的LFIAS的视觉LOD为 10^4 CFU·mL⁻¹，其灵敏度是QB标记的LFIAS的1/10。基于QB的荧光方法可以在相对较低的LOD下提供比其他分析方法，如流式细胞术(10^4 CFU·mL⁻¹) [26]和表面等离子体共振(10^5 CFU·mL⁻¹) [27]更好的灵敏度。在其他研究中，应用LAMP和LAMP-LFISA检测不同靶标物种已显示出与当前研究大致相当的灵敏度。例如，Wachiralurpan等[28]报道了LAMP法检测纯培养物中单核细胞增多性李斯特菌的灵敏度为 2.82×10^3 CFU·mL⁻¹。已有研究表明，LAMP-LFISA的LOD低于本研究中的LOD，报道的LOD分别为 20 CFU·mL⁻¹ [29]和 6.7 CFU·mL⁻¹ [30]。本研究认为，这些差异可能反映了不同的成分，包括优化的系统和浓度的变化，如DNA模板的加入量。一些研究规定LAMP [31]使用 $1.5 \mu\text{L}$ 的DNA模板，而其他方法需要 $5 \mu\text{L}$ 的DNA模板[32-33]。此外，与普通LAMP-LFISA相比，本文中方法的另一个优势是在LAMP系统中添加了SD探针，缓解了LFISA中的虚假放大和非特异性检测问题，提高了LAMP在实验室外的利用率。

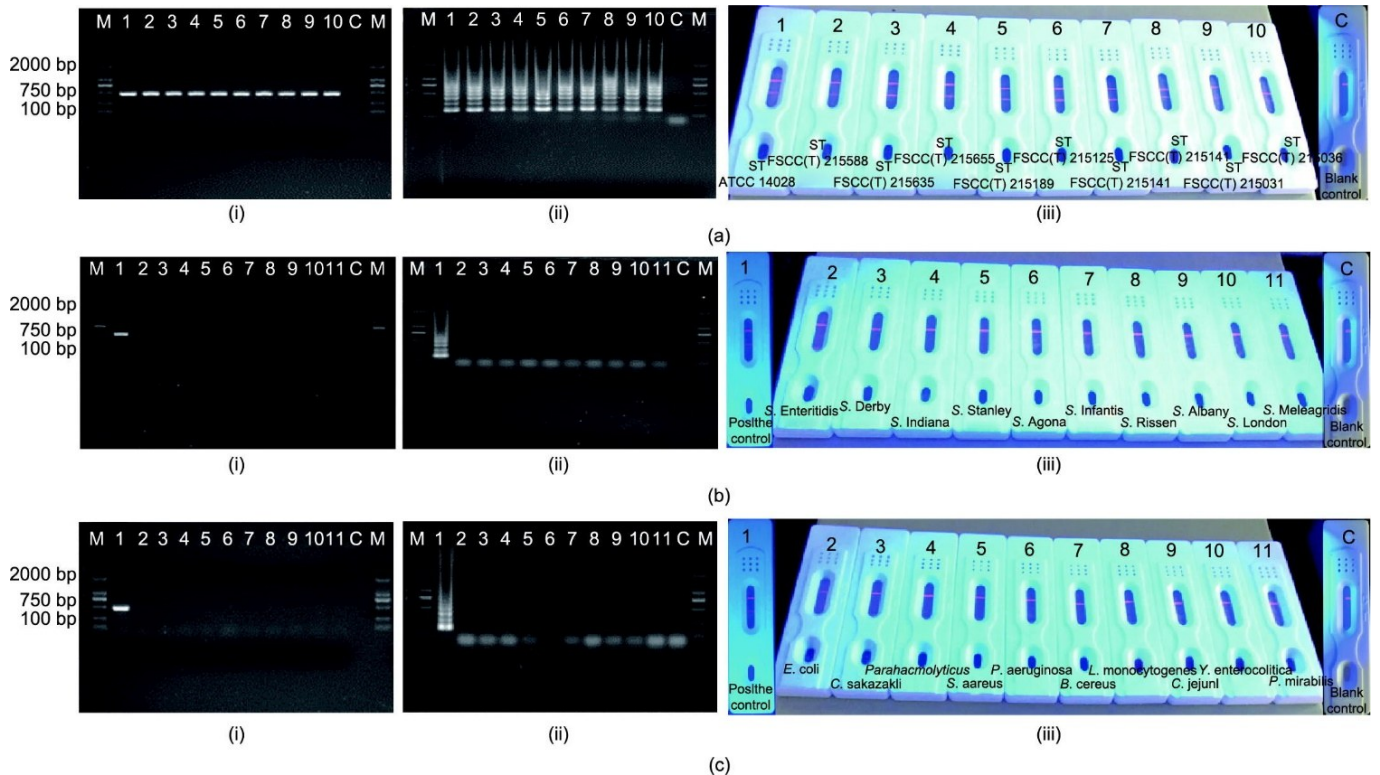


图3. QB 标记的 LFIAS 检测 ST 的特异性。评估是基于 PCR (i) 和 SD-LAMP (ii) 产物的电泳分析以及通过 QB 标记的 LFIAS (iii) 的检测。(a) 来自靶标沙门氏菌的 DNA 模板[泳道 1~10: ATCC 14028、FSCC(I) 215588、FSCC(I) 215635、FSCC(I) 215655、FSCC(I) 215125、FSCC(I) 215141、FSCC(I) 215031、FSCC(I) 215036 的 ST]。(b) 来自非靶标沙门氏菌血清的 DNA 模板 (泳道 1~11: ST, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Indiana*, *S. Stanley*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Albany*, *S. London*, *S. Meleagridis*)。(c) 来自非沙门氏菌菌株的 DNA 模板 (泳道 1~11: ST、大肠杆菌、阪崎弯曲菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、蜡芽孢杆菌、单核细胞增多性李斯特菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌和奇迹变形杆菌); 泳道 C: 空白对照; 泳道 M: DL2000 DNA 标志物。

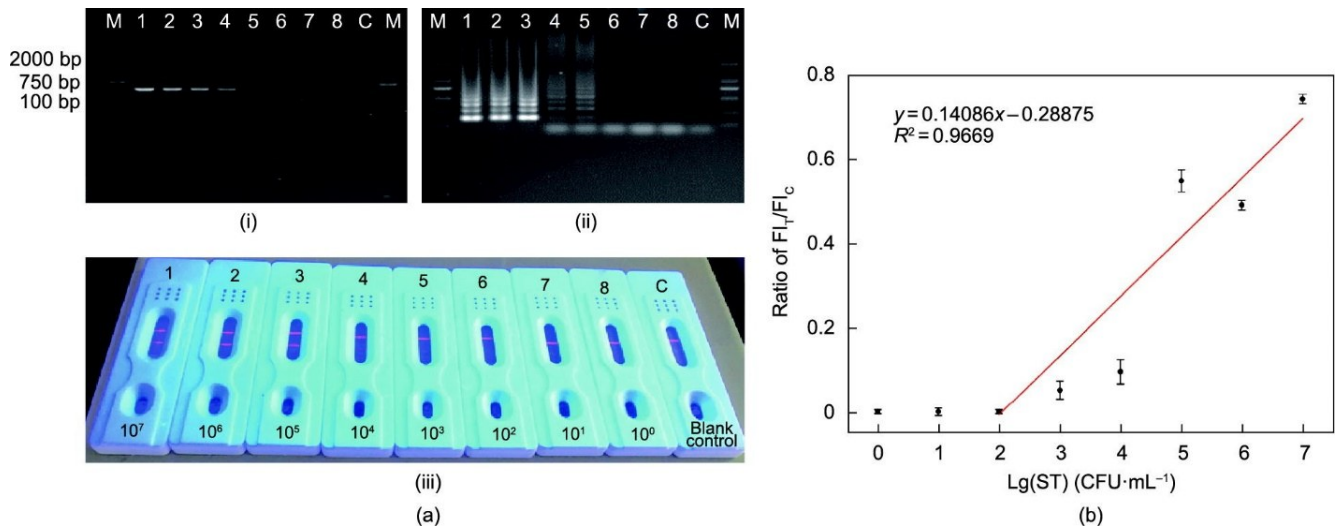


图4. QB 标记的 LFIAS 对基因组 DNA 的灵敏度。(a) 通过 PCR (i)、SD-LAMP (ii) 和 QB (iii) 标记的 LFIAS 进行灵敏度测试的结果, 使用来自 ST ATCC 14028 的纯化靶标 DNA 的 10 倍连续稀释液。1~8 泳道: 10^7 ~ 10^0 CFU·mL⁻¹ 模板 DNA; C 泳道: 空白对照; M 泳道: DL2000 DNA 标志物。(b) 使用 QB 标记的 LFIAS 进行 ST 检测的校准曲线。误差条代表三次重复实验的标准偏差。

3.6. 食物样品中的检测

为了进一步证明本研究的方法对食物样品分析的适用性, 使用饮用水、橙汁、生菜和鸡肉。测试条的图像如图 5 所示。T 线的 FI 随着添加浓度的降低而逐渐褪色, 这

与上述的标准细菌溶液的结果一致。ST 在饮用水、橙汁、生菜和鸡肉中的视觉 LOD 分别为 10^3 CFU·mL⁻¹、 10^4 CFU·mL⁻¹、 10^4 CFU·mL⁻¹ 和 10^5 CFU·mL⁻¹。与纯细菌溶液中的 LOD 相比, 灵敏度的降低是由于 SD-LAMP 反

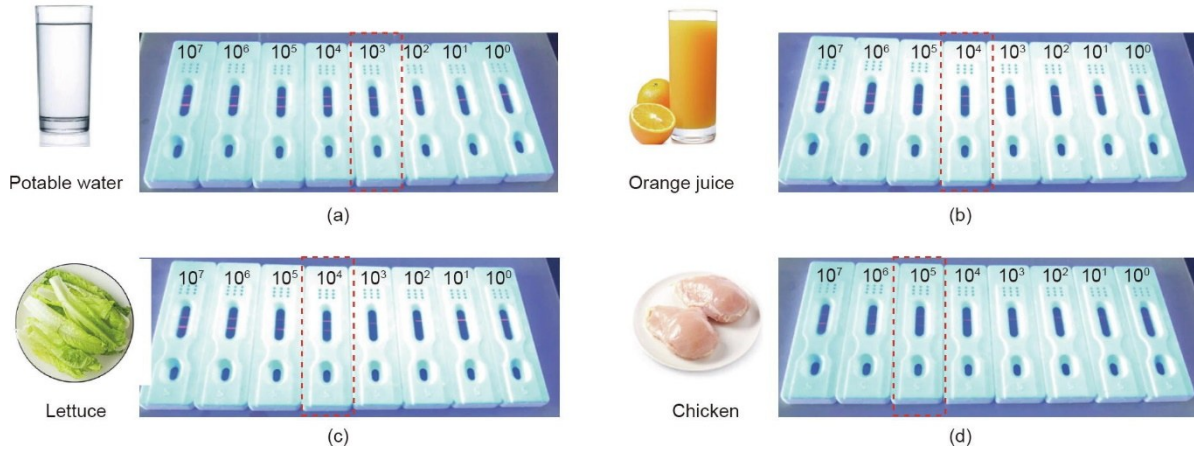


图5. QB 标记的 LFIA 对食物样品中 ST 的检测结果, 红色矩形框代表最低视觉 LOD。(a) 饮用水; (b) 橙汁; (c) 生菜; (d) 鸡肉。

应效率的降低或共轭垫上更多的残留 QB-mAb₁, 表明该方法对食物样品中的 ST 检测有效, 或者对结果几乎没有基质影响。此后, 本研究进一步分析了观察数据与实际数据的相关性 (在被测样品中加入低、中、高水平的标准分析物溶液), 表 2 中显示的结果表明, 加标 ST 的平均回收率在 85%~110% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 值均低于 7.8%。

表 2 本文所提方法对食品样品中加标 ST 的回收效率

Sample	Spiked (CFU·mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (% , n = 3)
Potable water	1.41×10^7	90.78	2.3
	1.41×10^5	94.33	3.2
	1.41×10^3	92.07	4.2
Orange juice	5.60×10^7	94.29	4.7
	5.60×10^5	89.21	7.8
	5.60×10^3	88.98	6.6
Lettuce	2.40×10^7	93.38	3.8
	2.40×10^5	105.11	5.3
	2.40×10^3	85.25	4.8
Chicken	1.35×10^7	110.21	5.3
	1.35×10^5	90.63	4.7
	1.35×10^3	85.00	6.5

RSD: relative standard deviation.

总的来说, 本研究新开发的方法可以在适当稀释后用于对食物样品中的细菌进行分析, 具有较高的准确性和灵敏度。一些样品预处理步骤, 如选择性富集培养[34]和免疫磁性分离技术[35]在基质应用前使用时可以增加相关分析物。这种方法的局限性在于无法区分存活的细胞和死亡的细胞, 因为检测靶标是自由 DNA。然而, 对于 DNA 结合染料, 如一氮化乙锭 (EMA) 和一氮化丙锭 (PMA) [36], 如果在提取基因组 DNA 进行 SD-LAMP 反应之前将这些染料加入样品中, 就可以克服这个局限。

4. 结论

综上所述, 本研究构建了 QB 标记的 LFIA 与 SD-LAMP 相结合的快速检测 ST 的方法。本研究所提出的方法采用 QB 标记的 LFIA 作为信号输出平台, 而 SD-LAMP 反应则是为了进一步提高特异性。研究结果显示, LOD 达到 10^{-1} CFU·mL⁻¹, 线性范围为 $10^2 \sim 10^7$ CFU·mL⁻¹。本研究将该方法应用于食物样品中 ST 的检测, 并获得了令人满意的结果。与现有方法相比, 本研究开发的方法有以下优点: ①将 SD 探针应用于 LAMP, 减少了假阳性结果的发生; ②在 LFIA 中采用 QB 而不是 AuNP 作为探针, 提高了灵敏度。总的来说, 目前的方法不仅简单方便, 省去了对复杂设备的要求, 而且可以进行快速、灵敏的分析, 得到定性和定量的结果。通过改变靶标 LAMP 引物, 可以扩展这种方法, 将该方法用于检测其他类型的病原体。在未来的研究中, 将增加快速的样品预处理步骤, 以提高系统的灵敏度, 并探索 SD 探针与其他等温核酸扩增技术的组合, 实现无设备检测。凭借其出色的性能, 相信这种方法可以被很容易地应用于更多领域的基因检测。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划(2019YFC1606300)、广东省“珠江人才计划”本土创新科研团队项目(2017BT01S174)和广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项资金项目(2018GDASCX-0401)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Yuting Shang, Shuzhen Cai, Qinghua Ye, Qingping

Wu, Yanna Shao, Xiaoying Qu, Xinran Xiang, Baoqing Zhou, Yu Ding, Moutong Chen, Liang Xue, Honghui Zhu, and Jumei Zhang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.024>.

References

- [1] Deng H, Gao Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Anal Chim Acta* 2015;853:30–45.
- [2] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip* 2012;12(14):2469–86.
- [3] Li B, Chen X, Ellington AD. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions. *Anal Chem* 2012; 84(19):8371–7.
- [4] Becherer L, Bakheit M, Frischmann S, Stinco S, Borst N, Zengerle R, et al. Simplified real-time multiplex detection of loop-mediated isothermal amplification using novel mediator displacement probes with universal reporters. *Anal Chem* 2018;90(7):4741–8.
- [5] Rodriguez NM, Linnes JC, Fan A, Ellenson CK, Pollock NR, Klapperich CM. Paper-based RNA extraction, *in situ* isothermal amplification, and lateral flow detection for low-cost, rapid diagnosis of influenza A (H1N1) from clinical specimens. *Anal Chem* 2015;87(15):7872–9.
- [6] Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 59(2):145–57.
- [7] Chen Z, Zhang K, Yin H, Li Qi, Wang L, Liu Z. Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Sci Hum Wellness* 2015;4(2):75–9.
- [8] Dixit KK, Verma S, Singh OP, Singh D, Singh AP, Gupta R, et al. Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12(11): e0006922.
- [9] Tangkanchanapas P, Höfte M, De Jonghe K. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) designed for fast and sensitive on-site detection of Pepper chat fruit viroid (PCFVd). *J Virol Methods* 2018; 259:81–91.
- [10] Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008;3(5):877–82.
- [11] Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques* 2014;58(2):59–68.
- [12] Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Tom SH. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun* 2014;50(28):3747–9.
- [13] Kubota R, Alvarez A, Su WW, Jenkins D. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biol Eng Trans* 2011;4(2):81–100.
- [14] Liu W, Huang S, Liu N, Dong D, Yang Z, Tang Y, et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci Rep* 2017;7(1):40125.
- [15] Ball CS, Light YK, Koh CY, Wheeler SS, Coffey LL, Meagher RJ. Quenching of unincorporated amplification signal reporters in reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification enabling bright, single-step, closed-tube, and multiplexed detection of RNA viruses. *Anal Chem* 2016;88(7):3562–8.
- [16] Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* 2012;53(2):81–9.
- [17] Mashooq M, Kumar D, Niranjana AK, Agarwal RK, Rathore R. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: a new tool for DNA quantification. *J Microbiol Methods* 2016; 126:24–9.
- [18] Nurul Najian AB, Engku Nur Syafirah EAR, Ismail N, Mohamed M, Yean CY. Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Anal Chim Acta* 2016;903:142–8.
- [19] Wang Y, Li H, Wang Y, Zhang L, Xu J, Ye C. Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2017; 8:192.
- [20] Yang Z, Xu G, Reboud J, Kasprzyk-Hordern B, Cooper JM. Monitoring genetic population biomarkers for wastewater-based epidemiology. *Anal Chem* 2017; 89(18):9941–5.
- [21] Zhang Li, Chen Y, Cheng N, Xu Y, Huang K, Luo Y, et al. Ultrasensitive detection of viable *Enterobacter sakazakii* by a continual cascade nanozyme biosensor. *Anal Chem* 2017;89(19):10194–200.
- [22] Phillips EA, Moehling TJ, Bhadra S, Ellington AD, Linnes JC. Strand displacement probes combined with isothermal nucleic acid amplification for instrument-free detection from complex samples. *Anal Chem* 2018; 90(11): 6580–6.
- [23] Ignatov KB, Barsova EV, Fradkov AF, Blagodatskikh KA, Kramarova TV, Kramarov VM. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *Biotechniques* 2014;57(2):81–7.
- [24] Li J, Lv Y, Li N, Wu R, Xing M, Shen H, et al. Robust synthesis of bright multiple quantum dot-embedded nanobeads and its application to quantitative immunoassay. *Chem Eng J* 2019;361:499–507.
- [25] Li X, Li W, Yang Q, Gong X, Guo W, Dong C, et al. Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014; 6(9): 6406–14.
- [26] Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(3):1228–32.
- [27] Subramanian A, Irudayaraj J, Ryan T. Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sens Actuators B Chem* 2006;114(1):192–8.
- [28] Wachiralurpan S, Sriyapai T, Areekit S, Sriyapai P, Thongphueak D, Santiwatanakul S, et al. A one-step rapid screening test of *Listeria monocytogenes* in food samples using a real-time loop-mediated isothermal amplification turbidity assay. *Anal Methods* 2017;9(45):6403–10.
- [29] Ledlod S, Bunroddith K, Areekit S, Santiwatanakul S, Chansiri K. Development of a duplex lateral flow dipstick test for the detection and differentiation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat products based on loop-mediated isothermal amplification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2020;1139:121834.
- [30] Mei X, Zhai X, Lei C, Ye X, Kang Z, Wu X, et al. Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples. *Food Control* 2019;104:9–19.
- [31] Li J, Zhai L, Bie X, Lu Z, Kong X, Yu Q, et al. A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting gene62181533 for the detection of *Salmonella* spp. in foods. *Food Control* 2016;60:230–6.
- [32] Li X, Zhang S, Zhang H, Zhang L, Tao H, Yu J, et al. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. *Int J Food Microbiol* 2009;133(3):252–8.
- [33] Srisawat M, Panbangred W. Efficient and specific detection of *Salmonella* in food samples using a stn-based loop-mediated isothermal amplification method. *BioMed Res Int* 2015;2015:356401.
- [34] Fakh MK, McEvoy JM, Sherwood JS, Logue CM. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check™ real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. *Lett Appl Microbiol* 2006;43(1):78–83.
- [35] Lee H, Hwang J, Park Y, Kwon D, Lee S, Kang I, et al. Immunomagnetic separation and size-based detection of *Escherichia coli* O157 at the meniscus of a membrane strip. *RSC Adv* 2018;8(46):26266–70.
- [36] Telli AE, Doğruer Y. Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using propidium monoazide-quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. *Microb Pathog* 2019;132:109–16.