

分类号：  
学 号：20232113042

密 级：  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 基于 RAA-LFD 技术的鼠伤寒沙门氏菌和鸡白痢 沙门氏菌联合检测方法的建立

学 位 申 请 人	左伟业
指 导 教 师	王鹏雁教授 任静静讲师
申请学位门类级别	兽医硕士
学 科、专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	不区分研究方向
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子  
2026 年 6 月

分类号：  
学 号：20232113042

密 级：  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 基于 RAA-LFD 技术的鼠伤寒沙门氏菌和鸡白痢 沙门氏菌联合检测方法的建立

学 位 申 请 人	左伟业
指 导 教 师	王鹏雁教授 任静静讲师
申请学位门类级别	兽医硕士
学 科、专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	不区分研究方向
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2026 年 6 月



**Establishment of a combined detection method for *Salmonella typhimurium* and *Salmonella pullorum* based on RAA-LFD technology**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

**Master of Agriculture**

**By**

**Weiye Zuo**

Techniques for diagnosing and controlling animal diseases

Dissertation Supervisor: Prof. Pengyan Wang

Lecturer. Jingjing Ren

June, 2026

Shihezi, Xinjiang, China

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 

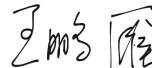
时间：2026年5月18日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 

时间：2026年5月18日

导师签名： 

时间：2026年5月18日



## 课题来源

丝绸之路经济带创新驱动发展试验区、乌昌石国家自主创新示范区科技发展计划创新型产业集群

课题名称：优质畜产品产业集群—黄羽肉鸡产业提质增效关键技术与集成示范

课题编号：2022LQ01001



## 摘要

鸡白痢沙门氏菌 (*Salmonella pullorum*, *S. pullorum*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) 每年都会给家禽生产带来沉重的经济负担。因此, 及时检测家禽粪便中的 *S. pullorum* 和 *S. typhimurium* 对于维护家禽健康和控制疾病传播至关重要。RAA-LFD 技术是一种结合重组酶辅助扩增 (RAA) 和侧流层析试纸条 (LFD) 的快速检测方法, 广泛应用于病原体检测和食品安全监测。为实现对家禽养殖业细菌病的快速检测需求, 本试验以家禽粪便为样本, 基于 RAA-LFD 技术分别构建了可视化单重检测 *S. pullorum* 和 *S. typhimurium* 快速检测方法以及联合双重 RAA-LFD 检测方法, 以期望为基层筛查 *S. pullorum* 和 *S. typhimurium* 提供高效便捷的筛选工具, 从而预防和减少家禽沙门氏菌病的产生。

目的: 本研究通过 *S. pullorum* 和 *S. typhimurium* 特异性基因分别构建了单重 RAA-LFD 的技术及双重 RAA-LFD 并对其初步评价及临床检测, 为基层沙门氏菌快速检测提供了新的方法。

方法: (1) 单重 RAA-LFD 检测方法构建采用蛋白酶 K 结合快速水煮法提取 DNA; 通过普通 PCR 和 RAA-琼脂糖凝胶电泳筛选最佳引物, 优化 RAA-LFD 反应体系组分分配比及引物浓度、反应时间、温度等条件; 通过纯菌液及基因组 DNA 梯度检测确定检测下限; 选取 100 pg/ $\mu$ L 和 10 fg/ $\mu$ L 进行 5 组重复性试验评价方法稳定性; 通过人工污染样本确定最低富集时间; 采集临床粪便样本, 与其他方法比较评价总符合率和一致性。

(2) 双重 RAA-LFD 检测方法构建设计双重检测探针, 系统优化反应体系组分及条件; 经纯菌液与基因组样本验证检测灵敏度; 选取 100 pg/ $\mu$ L 和 10 fg/ $\mu$ L 进行 5 组重复性试验评价稳定性; 采集临床粪便样本, 与其他方法比较评价总符合率和一致性。

结果: (1) 单重检测 *S. pullorum*: 建立基于 *IpaJ* 基因的 RAA-LFD 方法。最佳条件为引物 4  $\mu$ M、37°C、18 min。该方法特异性 98.97%, 灵敏度达 45.3 fg/ $\mu$ L (基因组) 和  $2.37 \times 10^2$  CFU/mL (菌液), 较传统 PCR 提高 100~1000 倍。临床样本 (103 份) 检测显示, 与国标法及多重 PCR 总符合率 97.09% (Kappa=0.712)。

(2) 单重检测 *S. typhimurium*: 建立基于 *STM4497* 基因的 RAA-LFD 方法。最佳条件为引物 10  $\mu$ M、38°C、20 min。特异性 98.23%, 灵敏度达 57 fg/ $\mu$ L (基因组) 和  $5.91 \times 10^1$  CFU/mL (菌液), 较传统 PCR 提高 1000 倍。临床样本 (120 份) 检测显示, 与国标法 (GB 4789.4-2024) 及多重 PCR 总符合率 97.50% (Kappa=0.786)。

(3) 双重同步检测: 构建 *S. pullorum* 与 *S. typhimurium* 双重 RAA-LFD 平台。最佳条件为 37°C、20 min (引物浓度分别为 4  $\mu$ M 和 8  $\mu$ M)。检测限分别为  $2.37 \times 10^2$  CFU/mL 和  $5.91 \times 10^1$  CFU/mL, 灵敏度较多重 PCR 提升 100~1000 倍。粪便样本 (90 份) 验证显示, 总符合率 96.67% (Kappa>0.75)。

结论: 研究成功建立了针对 *S. pullorum* 和 *S. typhimurium* 的单重 RAA-LFD 检测方法, 并在此基础上进一步构建了可同时检测两种菌的双重 RAA-LFD 体系。本研究中, RAA-LFD 检测结果与国家

标准方法及多重 PCR 检测高度吻合。本方法在特异性、灵敏度、检测时效性、操作便捷性及可视化呈现等核心指标上均达到显著优势，精准适配基层实验室及现场快速诊断的实战需求，为病原体即时检测提供了高效可靠的技术支撑。

**关键词：**鸡白痢沙门氏菌；鼠伤寒沙门氏菌；重组酶辅助扩增；测流层析试纸条；可视化检测

## Abstract

*Salmonella pullorum* (*S. pullorum*) and *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) impose a heavy economic burden on poultry production every year. Therefore, timely detection of *S. pullorum* and *S. typhimurium* in poultry feces is crucial for maintaining poultry health and controlling disease transmission. The RAA-LFD technology is a rapid detection method that combines recombinase-aided amplification (RAA) and lateral flow chromatography test strips (LFD). It is widely used in pathogen detection and food safety monitoring. To meet the rapid detection needs of bacterial diseases in the poultry farming industry, this experiment used poultry feces as samples and constructed visual single-detection rapid testing methods for *S. pullorum* and *S. typhimurium* based on RAA-LFD technology, as well as a combined dual RAA-LFD detection method. The aim is to provide efficient and convenient screening tools for the grassroots screening of *S. pullorum* and *S. typhimurium*, thereby preventing and reducing the occurrence of poultry *Salmonella* diseases.

**Objective:** In this study, single RAA-LFD technology and dual RAA-LFD were constructed using specific genes of *S. pullorum* and *S. typhimurium*, and their preliminary evaluation and clinical testing were conducted. This provides a new method for rapid detection of *Salmonella* at the grassroots level.

**Methods:** (1) The single RAA-LFD detection method was constructed by using proteinase K combined with rapid boiling method to extract DNA; the optimal primers were screened through common PCR and RAA-agarose gel electrophoresis, and the composition ratio, primer concentration, reaction time, temperature and other conditions of the RAA-LFD reaction system were optimized; the detection limit was determined through pure bacterial liquid and genomic DNA gradient detection; 5 sets of repeatability tests were conducted using 100 pg/ $\mu$ L and 10 fg/ $\mu$ L to evaluate the stability of the method; the minimum enrichment time was determined through artificial contaminated samples; clinical fecal samples were collected and compared with other methods to evaluate the total coincidence rate and consistency.

(2) The dual RAA-LFD detection method involves constructing and designing dual detection probes, systematically optimizing the components and conditions of the reaction system; verifying the detection sensitivity through validation with pure bacterial solutions and genomic samples; selecting 100 pg/ $\mu$ L and 10 fg/ $\mu$ L for 5 sets of repeatability tests to evaluate stability; collecting clinical fecal samples and comparing them with other methods to evaluate the total coincidence rate and consistency.

**Results:** (1) Single detection of *S. pullorum*: A RAA-LFD method based on the *IpaJ* gene was established. The optimal conditions were 4  $\mu$ M primer, 37°C, and 18 min. The specificity of this method was 98.97%, and the sensitivity reached 45.3 fg/ $\mu$ L (genomic) and  $2.37 \times 10^2$  CFU/mL (culture), which was 100-1000 times higher than traditional PCR. The detection of clinical samples (103 samples) showed that

the total concordance rate with the national standard method and multiplex PCR was 97.09% (Kappa = 0.712).

(2) Single detection: *S. typhimurium*: Developed a RAA-LFD method based on the *STM4497* gene. The optimal conditions were 10  $\mu\text{M}$  primer, 38°C, and 20 minutes. The specificity was 98.23%, and the sensitivity reached 57 fg/ $\mu\text{L}$  (genomic) and  $5.91 \times 10^1$  CFU/mL (culture), which was 1000 times higher than traditional PCR. The detection of clinical samples (120 samples) showed that the total concordance rate with the national standard method (GB 4789.4-2024) and multiplex PCR was 97.50% (Kappa = 0.786).

(3) Dual synchronous detection: A dual RAA-LFD platform for *S. pullorum* and *S. typhimurium* was constructed. The optimal conditions were 37°C for 20 minutes (with primer concentrations of 4  $\mu\text{M}$  and 8  $\mu\text{M}$  respectively). The detection limits were  $2.37 \times 10^2$  CFU/mL and  $5.91 \times 10^1$  CFU/mL respectively, and the sensitivity was increased by 100 to 1000 times compared to multiple PCR. The validation of fecal samples (90 samples) showed that the total coincidence rate was 96.67% (Kappa > 0.75).

Conclusion: This study successfully developed a rapid RAA-LFD assay for the individual detection of *S. pullorum* and *S. typhimurium*, and on this basis, a dual RAA-LFD system capable of simultaneously detecting both bacteria was further constructed. The detection results of this method are highly consistent with the national standard method and the results of multiplex PCR. This method demonstrates significant advantages in core indicators such as specificity, sensitivity, detection timeliness, operational convenience, and visual presentation. It precisely meets the practical needs of grassroots laboratories and on-site rapid diagnosis, providing efficient and reliable technical support for the immediate detection of pathogens.

**Key words:** *Salmonella pullorum*; *Salmonella typhimurium*; recombinant enzyme-assisted amplification; lateral flow test strips

## 英语缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
ST	Salmonella typhimurium	鼠伤寒沙门氏菌
SP	Salmonella pullorum	鸡白痢沙门氏菌
SE	Salmonella enteritidis	肠炎沙门氏菌
E.coli	Escherichia coli	埃希氏大肠杆菌
KP	Klebsiella pneumoniae	肺炎克雷伯菌
HS	Heidelberg Salmonella	海德堡沙门氏菌
EF	Enterococcus faecalis	粪肠球菌
LM	Listeria monocytogenes	单增李斯特菌
PP	Putrefactive Pseudomonas	恶臭假单胞菌
SA	Staphylococcus aureus	金黄色葡萄球菌
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
RAA	Recombinase-assisted amplification	重组酶辅助扩增
RPA	Recombinase polymerase amplification	重组酶聚合酶扩增
mPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction	多重聚合酶链式反应
bp	Base Pair	碱基对
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	实时荧光 PCR 法
AGE	Agarose gel electrophoresis	琼脂糖凝胶电泳
LFD	Lateral flow test strip	测流层析试纸条
POCT	Point-of-Care Testing	即时检测
ATCC	American Type Culture Collection	美国菌种保藏中心
GDMCC	Microbial Culture Preservation Center of Guangdong Province	广东微生物培养保存中心
BAM	Bacterial Analysis Manual	细菌分析手册
NC	Negative control	阴性对照

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
英语缩略词表 .....	V
第一章 绪论 .....	1
1.1 研究的目的和意义 .....	1
1.2 <i>S. pullorum</i> 概述 .....	2
1.3 <i>S. typhimurium</i> 概述 .....	2
1.4 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 常见检测技术 .....	3
1.4.1 微生物分离鉴定法 .....	3
1.4.2 多重 PCR 法 .....	4
1.4.3 实时荧光 PCR 法 .....	4
1.4.4 生物传感器技术 .....	4
1.4.5 环介导等温扩增技术 .....	5
1.4.6 微流控技术 .....	6
1.5 重组酶介导等温扩增技术 .....	7
1.5.1 RAA 技术的原理 .....	7
1.5.2 设计引物原则 .....	7
1.5.3 RAA 扩增产物的检测方法 .....	8
1.6 技术路线 .....	9
第二章 鸡白痢沙门氏菌 RAA-LFD 法的建立和应用 .....	11
2.1 实验材料 .....	11
2.1.1 实验菌株 .....	11
2.1.2 主要试剂 .....	12
2.1.3 主要仪器设备 .....	12
2.2 实验方法 .....	13
2.2.1 菌株培养 .....	13
2.2.2 基因组 DNA 的提取 .....	13
2.2.3 引物的设计 .....	14
2.2.4 重组质粒的构建 .....	15
2.2.5 引物的筛选 .....	15
2.2.6 RAA-LFD 方法反应条件的优化 .....	16

2.2.7 RAA-LFD 的特异性评价 .....	16
2.2.8 RAA-LFD 的灵敏度评价 .....	16
2.2.9 重复性 .....	16
2.2.10 模拟样品检测 .....	16
2.2.11 临床样品检测 .....	17
2.3 实验结果 .....	17
2.3.1 <i>S. pullorum</i> 的 <i>IpaJ</i> 基因保守区域分析结果 .....	17
2.3.2 <i>S. pullorum</i> 重组质粒构建结果 .....	18
2.3.3 引物的筛选 .....	18
2.3.4 RAA-LFD 反应条件的优化 .....	19
2.3.5 RAA-LFD 检测特异性分析 .....	20
2.3.6 RAA-LFD 检测灵敏度分析 .....	20
2.3.7 重复性结果 .....	21
2.3.8 模拟样品检测结果 .....	22
2.3.9 临床样品检测结果 .....	23
2.4 讨论 .....	24
2.5 小结 .....	26
第三章 鼠伤寒沙门氏菌 RAA-LFD 法的建立和应用 .....	27
3.1 实验材料 .....	27
3.1.1 实验菌株 .....	27
3.1.2 主要试剂 .....	28
3.1.3 主要仪器设备 .....	28
3.2 实验方法 .....	28
3.2.1 菌株培养 .....	28
3.2.2 基因组 DNA 的提取 .....	28
3.2.3 引物的设计 .....	28
3.2.4 重组质粒的构建 .....	29
3.2.5 引物的筛选 .....	29
3.2.6 RAA-LFD 方法反应条件的优化 .....	30
3.2.7 RAA-LFD 的特异性评价 .....	30
3.2.8 RAA-LFD 的灵敏度评价 .....	30
3.2.9 重复性 .....	30
3.2.10 模拟样品检测 .....	30
3.2.11 临床样品检测 .....	31

3.3 实验结果 .....	31
3.3.1 <i>S. typhimurium</i> 的 <i>STM4497</i> 基因保守区域分析结果 .....	31
3.3.2 <i>S. typhimurium</i> 重组质粒构建结果 .....	32
3.3.3 引物的筛选 .....	32
3.3.4 RAA-LFD 反应条件的优化 .....	33
3.3.5 RAA-LFD 检测特异性分析 .....	33
3.3.6 RAA-LFD 检测灵敏度分析 .....	34
3.3.7 重复性结果 .....	35
3.3.8 模拟样品检测结果 .....	36
3.3.9 临床样品检测结果 .....	37
3.4 讨论 .....	38
3.5 小结 .....	39
第四章 鸡白痢沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌双重 RAA-LFD 方法的建立和应用 .....	41
4.1 实验材料 .....	41
4.1.1 实验菌株 .....	41
4.1.2 主要试剂 .....	42
4.1.3 主要仪器 .....	42
4.2 实验方法 .....	42
4.2.1 菌株的培养 .....	42
4.2.2 基因组 DNA 的提取 .....	42
4.2.3 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 双重 RAA-LFD 引物和探针的设计 .....	42
4.2.4 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 的双重 RAA-LFD 法扩增 .....	43
4.2.5 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 双重 RAA-LFD 方法反应体系的优化 .....	44
4.2.6 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 双重 RAA-LFD 法特异性评价 .....	45
4.2.7 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 双重 RAA-LFD 的灵敏度评价 .....	45
4.2.8 <i>S. pullorum</i> 和 <i>S. typhimurium</i> 重复性评价 .....	45
4.2.9 模拟样品检测 .....	45
4.2.10 临床样品检测 .....	46
4.2.11 数据分析 .....	46
4.3 实验结果 .....	46
4.3.1 双重 RAA-LFD 法反应体系的建立 .....	46
4.3.2 双重 RAA-LFD 法特异性分析 .....	48
4.3.3 双重 RAA-LFD 法灵敏度分析 .....	49
4.3.4 双重 RAA-LFD 法重复性检测 .....	51