

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2022.01.013

• 技术与方法 •

中成药中沙门氏菌 实时荧光 PCR 检测法的建立及优化

刘卫德, 刘绪平, 章瑛, 储梅君, 鄢雷娜

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是常见的一类具有严重危害的致病性革兰氏阴性杆菌。据估计, 全球每年由于沙门氏菌感染致病人达 8000 万 ~ 9400 万, 其中死亡人数达 5.9 万 ~ 15.5 万^[1-2]。沙门氏菌在自然界中广泛分布, 并可在动植物体定植, 而中成药绝大部分都是由动植物加工炮制而成, 且大量丸散膏丹的处方中常有原粉入药, 因此, 监测中成药中的沙门氏菌是评价药品质量的重要指标^[3]。

沙门氏菌检测分析主要可分为传统培养分离法、免疫学方法及分子生物学方法^[4]。传统培养分离法操作简单、成本低, 但操作过程及检测周期长, 单一方法对部分血清型灵敏度及特异性也不够^[5-6]; 免疫学方法具有检测迅速、特异性强等特点, 但是其检测灵敏度相对较低, 同时难以进行大批量检测^[7-8]; 分子生物学方法兼具检测特异性强、灵敏度高、检测周期短等特点, 近年来发展迅速^[9-11], 但其在药品沙门氏菌检测中的应用探索不多。而 2020 年版《中国药典》与前几版药典保持一致, 沙门氏菌检测方法仍采用传统培养分离法^[12]。为探索分子生物学方法在中成药沙门氏菌检测中的可行性, 本研究拟基于实时荧光 PCR 技术, 建立一种中成药中沙门氏菌的特异性检测方法, 为药品中沙门氏菌的快速检测提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 SPL-250 生化培养箱购自天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; 恒温培养摇床购自上海新苗医疗器械制造有限公司; 荧光定量 PCR 仪 CFX96Touch、定性 PCR 仪 C1000、基础电泳仪 PowerPac Basic、凝胶成像仪 ChemiDoc MP 均为美国 Bio-Rad 公司产品; 超微量紫外/可见分光光度计 Spectra Max Quick Drop 购自美谷分子; 台式高速冷冻离心机 5424R 为艾本德股份有限公司产品。

1.1.2 试剂与培养基 缓冲蛋白胨水 (BPW)、胰酪大豆胨液体培养基 (TSB)、乳糖肉汤培养基 (LB)、营养肉汤培养基 (NB) 及 90 mm 胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA) 预制平皿均购自北京陆桥生物有限公司; Es Taq DNA Polymerase (5 U/μl) 购自康为世纪生物科技有限公司。

1.1.3 菌种 乙型副伤寒沙门氏菌购自中国食品药品检定研究院。

1.1.4 药品 女金胶囊 (批号 1708080) 购自江西汇仁药业股份有限公司; 牛黄蛇胆川贝液 (批号 180512) 购自江西南昌桑海制药厂; 健胃消食片 (批号 18012001) 购自江

中药业股份有限公司; 乌鸡白凤丸 (批号 171201) 购自江西药都樟树制药有限公司。

1.1.5 引物探针 根据文献调研^[13], 并采用 NCBI 网站 Primer-BLAST 软件在线分析后, 确定了沙门氏菌检测引物探针, 见表 1, 引物探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 引物探针序列

名称	序列 (5' → 3')
正向引物	GCTATTTTCGTCGGCAATGA
反向引物	GCGACTATCAGTTACCGTGGA
探针	FAM-TAGCCAGCGAGGTGAAAACGACAAAGG-BHQ1

1.2 方法

1.2.1 前增菌培养基选择 取女金胶囊及乌鸡白凤丸各 4 份, 每份 10 g; 健胃消食片置无菌匀浆器中粉碎后, 取 4 份, 每份 10 g; 牛黄蛇胆川贝液 4 份, 每份 10 ml。上述供试品分别置无菌三角瓶中, 并于每种药品的 4 份样品中分别加入 BPW、TSB、LB 及 NB 培养基至 200 ml, 振荡溶解混匀, 作为供试液。上述供试液中分别加入 1 ml 沙门氏菌菌液 (小于 100 CFU/ml), 至 36 °C 培养箱中培养 16 h, 并以不加入沙门氏菌的供试品溶液作为阴性对照。另取上述 4 种培养基各 200 ml, 置无菌三角瓶中, 分别加入 1 ml 沙门氏菌菌液 (小于 100 CFU/ml), 作为阳性对照, 至 36 °C 培养箱中培养 16 h。取上述培养后的增菌液, 用生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 取各稀释级稀释液各 1 ml 涂布于 TSA 培养基上, 每个稀释级涂布 2 个平皿, 置于 36 °C 培养箱中培养 24 h, 点计各稀释级平板上的菌落数, 计算增菌液中沙门氏菌浓度。

1.2.2 前增菌条件选择 前期研究发现, 部分固体供试品加入培养基及沙门氏菌菌液后, 采用摇床振荡培养时, 增菌效果不理想, 为研究恒温振荡培养的转速对沙门氏菌生长的影响, 进行如下试验。

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20192BBGL70052); 江西省药品监督管理局科研项目 (2019JS30)

作者单位: 330029 南昌, 江西省药品检验检测研究院/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心

通信作者: 鄢雷娜, Email: ylnrains@126.com

收稿日期: 2021-07-15

取女金胶囊 4 份, 每份 10 g, 加入 TSB 培养基至 200 ml, 振荡溶解混匀, 再加入 1 ml 沙门氏菌菌液 (小于 100 CFU/ml), 分别置 36 °C 的恒温培养箱及转速为 200、150、100 r/min 的恒温培养摇床中培养 16 h。同时以等量 TSB 培养基中加入等量沙门氏菌菌液后, 置相同条件下培养, 作为阳性对照。取上述培养后的增菌液, 按 1.2.1 中方法计算增菌液中沙门氏菌浓度。

1.2.3 增菌与 DNA 提取 根据 1.2.1 ~ 1.2.2 中结果, 于无菌锥形瓶中加入 TSB 至 200 ml, 再加入 1 ml 小于 100 CFU/ml 的沙门氏菌菌液, 置于 36 °C 恒温培养箱中过夜培养 (约 16 h) 后, 作为增菌液, 用于后续 DNA 提取。同时以不加沙门氏菌菌液的 TSB 培养基同法培养作为阴性对照。

采用热裂解法提取沙门氏菌 DNA, 取上述增菌液 1 ml, 置 1.5 ml 无菌离心管中, 以 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 菌体沉淀以 200 μ l 无菌水重悬, 于 95 °C 水浴锅加热 10 min, 再以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 PCR 反应模板 DNA 溶液, 并以超微量紫外/可见分光光度计测定 DNA 溶液的 $A_{260/280}$ 比值。

1.2.4 定性 PCR 扩增 以乙型副伤寒沙门氏菌基因组 DNA 为模板, 用表 1 中引物, 采用以下 PCR 反应体系及条件进行扩增:

PCR 反应体系: PCR 缓冲液 2.5 μ l、Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.2 μ l、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.5 μ l、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l、模板 1 μ l、ddH₂O 补足至 25 μ l。

PCR 检测条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s、50 ~ 65 °C 梯度退火 30 s、72 °C 延伸 20 s, 30 次循环; 72 °C 再延伸 5 min; 4 °C 保存。

PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 进行纯化、测序, 测序结果于 NCBI 网站以 BLAST 软件分析是否为沙门氏菌序列。

1.2.5 实时荧光 PCR 扩增及优化 根据 1.2.4 中确定的扩增参数, 建立实时荧光 PCR 扩增体系及条件。通过设置反应体系中各组分的加入量梯度, 调整反应体系中 buffer、dNTPs、引物及探针浓度, 确定最适反应体系。按照上述最适反应体系, 通过设置退火温度梯度, 调整退火时间等参数, 确定最适反应条件。

1.2.6 DNA 提取方法比较 按照 1.2.3 中方法制备增菌液, 并同时以热裂解法及试剂盒方法 (柱提取法) 提取沙门氏菌 DNA, 通过测定 DNA 溶液的 $A_{260/280}$ 比值, 计算 DNA 浓度。分别以两种方法提取的 DNA 作为反应模板, 按照 1.2.5 中确定的最佳反应体系及条件, 进行实时荧光 PCR 检测, 比较两种提取方法的优劣。

1.2.7 菌体纯化 中药制剂成分均比较复杂, 为减小其对 PCR 扩增反应的干扰, 有必要对增菌离心后菌体进行纯化处理, 以提高 DNA 模板的纯度。取乌鸡白凤丸样品 10 g, 置无菌锥形瓶中, 照 1.2.3 中方法制备增菌液, 用于后续

DNA 提取。取上述菌液 1 ml, 置 1.5 ml 无菌离心管中, 采用如下方法对菌体进行纯化: ①根据沙门氏菌悬浮生长的特点, 采用低速离心 (1000 r/min, 30 s) 除去沉淀杂质, 再高速离心 (12 000 r/min, 2 min) 获得菌体沉淀; ②高速离心 (12 000 r/min, 2 min) 获得菌体沉淀, 再用生理盐水洗涤菌体沉淀除去部分可溶性杂质, 提高菌体的纯度; ③两种方法同时使用。分别提取 DNA 后, 进行实时荧光 PCR 检测, 比较菌体前处理对检测结果的影响。

1.2.8 检测应用 取 1.1.4 中药品各 10 g 或 10 ml, 置无菌锥形瓶中, 加入 TSB 至 200 ml, 作为供试品溶液; 同法制备另加入 1 ml 小于 100 CFU/ml 沙门氏菌菌液的供试液, 作为供试品阳性对照溶液; 无菌锥形瓶中, 加入 TSB 至 200 ml, 作为阴性对照溶液。上述溶液分别置于 36 °C 恒温培养箱中过夜培养 (约 16 h) 后, 按本研究中最终确定的方法提取 DNA 并检测分析, 同时按《中国药典》2015 年版四部 1106 中的方法进行平行检测, 并对检测结果进行比较分析。

2 结果

2.1 前增菌培养基选择

不同培养基中加入药品后的增菌计数结果见表 2, 供试品阴性对照溶液中菌浓度均小于 500 CFU/ml。从表中结果可知, 四种培养基在加入药品后, 增菌效果胰酪大豆胨液体培养基>营养肉汤培养基>乳糖肉汤培养基>缓冲蛋白胨水, 且以胰酪大豆胨液体培养基增菌时, 加入了药品的供试品组菌液浓度与不加入药品的阳性对照比较无明显差异, 因此, 确定采用胰酪大豆胨液体培养基作为前增菌培养基, 用于后续研究及检测, 同时也与药典的前增菌培养基保持一致。

2.2 培养条件选择

沙门氏菌在加入了女金胶囊的胰酪大豆胨液体培养基中的增菌结果见表 3, 从表中结果可知, 加入药品后采用静置培养的方法沙门氏菌增菌效果最好, 与阳性对照菌浓度相当 (不加女金胶囊的阳性对照在各种转速条件下沙门氏菌浓度均在 10⁸ CFU/ml 以上), 说明在加入药品后, 采用摇床振荡培养的方法会抑制沙门氏菌的生长。推断其原因可能是固体药品在高速的旋转过程中, 由于存在较大的剪切力等原因, 会对菌体产生机械损伤, 导致沙门氏菌无法正常生长繁殖。

2.3 定性 PCR 扩增

采用 1.2.3 中方法能够可靠地提取到沙门氏菌 DNA, $A_{260/280}$ 比值在 1.7 ~ 2.0 范围内, 可用于后续的 PCR 检测。以该 DNA 为模板, 通过调整反应条件 (最适退火温度为 64 °C 左右), PCR 扩增结果见图 1, 从图中可见条带大小与预期一致 (约 260 bp), 且为单一条带。经测序分析证实, 扩增出的序列为沙门氏菌基因序列。说明引物能特异性扩增出沙门氏菌特征序列, 可用于后续实时荧光 PCR 扩增研究。

表 2 不同培养基对沙门氏菌的增菌效果比较

培养基	加入药品	各稀释级菌落数（CFU/皿）								菌浓度 （CFU/ml）
		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		
缓冲蛋白胨水（BPW）	/	不可计		63	65	7	6	1	0	6.4×10 ⁷
	女金胶囊	不可计		39	43	5	3	0	0	4.1×10 ⁷
	乌鸡白凤丸	13	19	1	2	0	0	0	0	1.6×10 ⁶
	健胃消食片	不可计		98	110	14	12	1	1	1.3×10 ⁸
	牛黄蛇胆川贝液	不可计				64	62	4	5	6.3×10 ⁸
胰酪大豆胨液体培养基（TSB）	/	不可计		不可计		58	57	7	5	5.8×10 ⁸
	女金胶囊	不可计		不可计		43	41	6	3	4.2×10 ⁸
	乌鸡白凤丸	不可计		94	131	12	15	1	2	1.4×10 ⁸
	健胃消食片	不可计		不可计		85	93	8	10	8.9×10 ⁸
	牛黄蛇胆川贝液	不可计		不可计		47	65	5	9	5.6×10 ⁸
乳糖肉汤培养基（LB）	/	不可计		143	151	9	16	1	1	1.5×10 ⁸
	女金胶囊	不可计		123	115	16	12	1	3	1.4×10 ⁸
	乌鸡白凤丸	不可计		94	88	10	7	2	0	9.1×10 ⁷
	健胃消食片	不可计		77	91	8	6	1	1	8.4×10 ⁷
	牛黄蛇胆川贝液	不可计		138	152	20	16	0	2	1.8×10 ⁸
营养肉汤培养基（NB）	/	不可计		不可计		31	30	4	2	3.1×10 ⁸
	女金胶囊	不可计		176	192	21	17	2	3	1.9×10 ⁸
	乌鸡白凤丸	不可计		213	241	26	22	3	4	2.4×10 ⁸
	健胃消食片	不可计		不可计		35	31	4	6	3.3×10 ⁸
	牛黄蛇胆川贝液	不可计		不可计		26	32	3	3	2.9×10 ⁸

表 3 不同转速时沙门氏菌的增菌结果

转速 (r/min)	各稀释级菌落数 (CFU/皿)								菌浓度 (CFU/ml)
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		
200	4	3	0	0	0	0	0	0	35
150	18	24	3	1	0	0	0	0	210
100	29	24	2	5	0	0	0	0	270
静置	不可计		不可计		26	34	3	2	3.0 × 10 ⁸

2.4 实时荧光 PCR 扩增

以定性 PCR 的扩增体系及条件为基础,建立实时荧光 PCR 检测方法,通过调整反应体系中各组分的加入量(如 buffer 的量,见图 2A)及反应条件(如退火温度,见图 2B),最终确定的实时荧光 PCR 反应体系及条件如下:

PCR 反应体系为:模板 2 μl、PCR 缓冲液(含 Mg²⁺ 15 mmol/L) 5 μl、上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl、探针(10 μmol/L) 0.5 μl、dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2 μl、Taq 酶

(5 U/μl) 0.2 μl、ddH₂O 补足至 25 μl。

PCR 检测条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s、60 °C 退火 30 s 并收集荧光, 40 次循环; 4 °C 保存。

2.5 DNA 提取方法比较

以两种方法提取的 DNA 为模板,进行实时荧光 PCR 扩增后的结果见图 3。结果显示,以热裂解法提取的 DNA 反应 Ct 值较小,说明其 DNA 浓度高;而以试剂盒法提取的 DNA 反应终点荧光强度较高,说明其 DNA 纯度高,因此受体系中杂质的抑制程度低,反应更高效。总体来看,热裂解法简便快捷,成本低廉,能够满足检测需要,因此,可用于后续研究。

2.6 菌体纯化检测结果

采用 1.2.7 中 3 种方法提取 DNA 后,进行实时荧光 PCR 检测的结果见图 4,结果显示,采用方法③提取的模板具有最小的 Ct 值,为最佳处理方法。

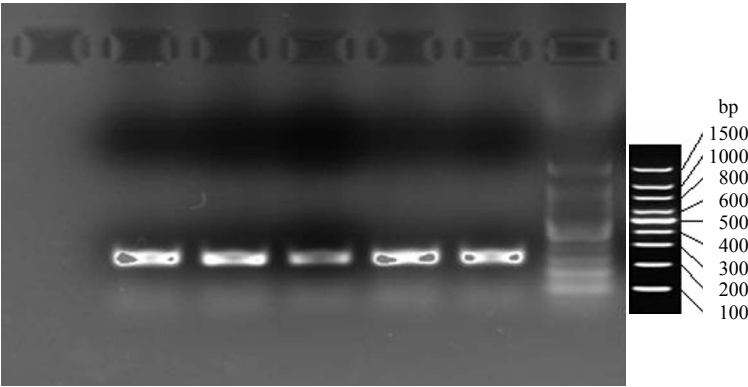


图 1 PCR 扩增产物电泳图

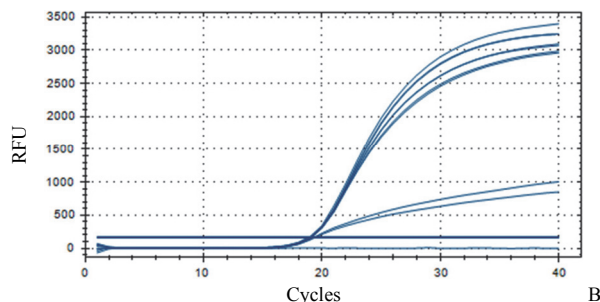
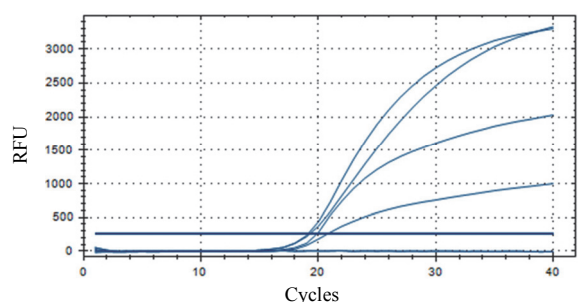


图 2 调整反应体系及条件的检测结果 (A: Buffer 浓度梯度; B: 退火温度梯度)

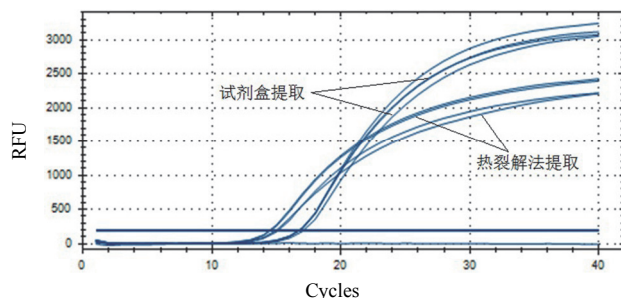


图 3 不同方法提取 DNA 扩增结果比较

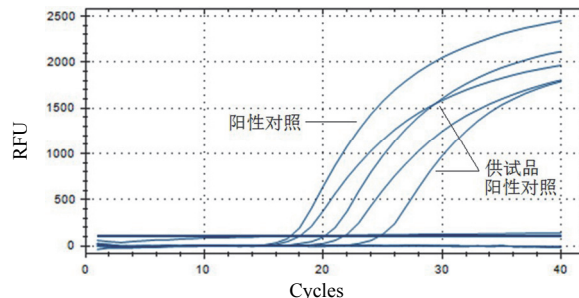


图 5 4 批样品实际检测结果

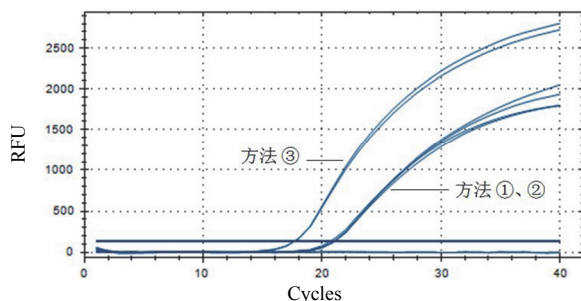


图 4 不同菌体纯化方法扩增结果

2.7 检测应用

采用本研究建立的方法检测 4 批中成药, 结果见图 5。阳性对照菌液及供试品阳性对照菌液均有典型的 S 形荧光增长曲线, 而所有供试品溶液及阴性对照均无荧光增长曲线, 说明 4 批样品均未污染沙门氏菌, 且在该增菌条件下样品均对乙型副伤寒沙门氏菌的生长无抑制作用。另外, 按药典方法检测的结果与上述结果一致。说明本研究建立的方法能够满足中药制剂中沙门氏菌检测的需要, 可作为药典方法的有效补充。

3 讨论

本研究以乙型副伤寒沙门氏菌为阳性菌, 通过优化前增菌培养基及培养条件, 调整反应体系及条件, 比较菌体纯化及 DNA 提取方法, 最终建立了一种中成药中沙门氏菌实时荧光 PCR 检测方法, 采用该方法检测 4 批中成药, 结果与《中国药典》检测方法完全一致。与《中国药典》方法相比, 本研究建立的方法能够在 24 h 内完成中成药中沙门氏菌检测, 具有检测时间短、特异性强、灵敏度高^[14]、不易交叉污染等特点, 可作为一种中成药中沙门氏菌的快速检

测技术, 成为药典方法的有效补充。另外, 本研究经适当调整后还可应用于中药材、中药饮片及食品等材料中的沙门氏菌污染检测, 具有一定的推广应用前景。

通常微生物在振荡培养的情况下有更高的增殖效率, 但在研究中发现, 加入了中成药的培养液中采用振荡培养时会显著抑制沙门氏菌的繁殖, 推测振荡培养过程中产生的剪切力可能会对沙门氏菌产生较大的机械损伤^[15], 培养过程中应注意避免, 以免出现假阴性结果。同时, 中药制剂成分复杂, 很多成分可能会对沙门氏菌的生长产生抑制或杀灭作用, 且制剂中往往还有其他微生物同时存在, 它们也将消耗营养物质并对生长环境产生影响^[16-18]。为保障在前增菌过程中沙门氏菌能够得到充分的生长繁殖, 以利于后续的 PCR 扩增及检测, 对于不同的药品必要情况下应进行增菌方法的验证, 必要时可采用薄膜过滤法冲洗等消除制剂对沙门氏菌的生长抑制作用后, 再进行增菌检测。同时, 与药典检测方法一样, 阳性与阴性对照的设置对控制检测结果的质量十分重要, 为避免出现假阴性结果, 需同时设置阳性对照与供试品阳性对照^[12]。

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases in the WHO regions. Geneva: World Health Organization, 2015:84-86.
- [2] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J, 2018, 16(12):e05500.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Volume 1, 2020. Beijing: China Medical Science Press, 2020. (in Chinese)

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [4] Jin J. Comparison of different methods for detection of *Salmonella enteritidis*. *Chin J Sch Doctor*, 2018, 32(2):139-140, 142. (in Chinese)
金晶. 肠炎沙门菌不同检测方法比较. *中国校医*, 2018, 32(2):139-140, 142.
- [5] Sun YL, Wu B, Qin C, et al. Studies on culture conditions of *Salmonellae* in food. *Chin J Microecol*, 2006, 18(1):48, 52. (in Chinese)
孙玉岭, 吴斌, 秦成, 等. 食品中沙门菌培养条件的研究. *中国微生物学杂志*, 2006, 18(1):48, 52.
- [6] Chen HJ, Zhang CP, Li JG, et al. Effect of different enrichment broth and culture medium on isolation effects of *Salmonella*. *China Poultry*, 2011, 33(24):20-23. (in Chinese)
陈惠娟, 张纯萍, 李金贵, 等. 不同增菌液和培养基对沙门菌分离效果的比较研究. *中国家禽*, 2011, 33(24):20-23.
- [7] Yang LJ, Ye L, Zhao YM, et al. Feature of *Salmonella* and its research progress in detection. *China Feed*, 2019, (17):93-97. (in Chinese)
杨凌君, 叶玲, 赵奕敏, 等. 沙门氏菌的特征及检测方法研究进展. *中国饲料*, 2019, (17):93-97.
- [8] Zhang P, Feng F. Research progress of *Salmonella* detection techniques and methods. *J Food Saf Qual*, 2015, (5):1834-1841. (in Chinese)
张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2015, (5):1834-1841.
- [9] Chen DN, Han YY, Li J, et al. Establishment of a real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Salmonella* in stool samples of humans and animals. *Dis Surveill*, 2020, 35(2):151-155. (in Chinese)
陈丹妮, 韩营营, 李杰, 等. 利用实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测人及动物粪便中的沙门菌. *疾病监测*, 2020, 35(2):151-155.
- [10] Tian S, Guo WG, Bao RL, et al. Establishment of rapid detection method for salmonella by real-time fluorescence quantitative PCR. *Lett Biotechnol*, 2019, 30(6):805-809, 816. (in Chinese)
田赛, 郭卫光, 包仁龙, 等. 沙门菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立. *生物技术通讯*, 2019, 30(6):805-809, 816.
- [11] Liu XP, Li JL, Xiong J, et al. Establishment of PCR method for detecting foodborne *Salmonella*. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(24):3548-3550. (in Chinese)
刘绪平, 李景莲, 熊骏, 等. 食源性沙门菌 PCR 检测方法的建立. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(24):3548-3550.
- [12] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Volume 4, 2020. Beijing: China Medical Science Press, 2020. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [13] Ma K, Li BM, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation. *Microbiology*, 2014, 41(11):2369-2377. (in Chinese)
马凯, 李宝明, 白羽, 等. 基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌, 志贺氏菌和金黄色葡萄球菌. *微生物学通报*, 2014, 41(11):2369-2377.
- [14] Liu WD, Zhang WT, Yi Q, et al. Detection of *Salmonella* in traditional Chinese medicine preparations by real-time fluorescence quantitative PCR. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(7):836-840. (in Chinese)
刘卫德, 张文婷, 易巧, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测中药制剂中沙门菌. *中国现代应用药学*, 2021, 38(7):836-840.
- [15] Gong JS, Wang X, Han XG, et al. Effects of different bacterial culture condition on the expression of avian *Salmonella* Fimbrial genes. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(1):116-122. (in Chinese)
龚建森, 王鑫, 韩先干, 等. 不同培养条件对禽源沙门菌菌毛基因表达的影响. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(1):116-122.
- [16] Wang KX, Liang ZW, Cao JW. Effects of 20 kinds of Chinese herbal extracts on the bacteriostatic effect and growth curve of *Salmonella* in vitro. *Guide Chin Poultry*, 2018, 35(4):54-56. (in Chinese)
王克祥, 梁滋旺, 曹积武. 20 种中药提取液对沙门菌的体外抑菌效果及生长曲线的影响. *中国禽业导刊*, 2018, 35(4):54-56.
- [17] Liu Y, Li SH, Li HS, et al. Antibacterial effects of 12 kinds of traditional Chinese medicine on *Salmonella* in vitro. *J Traditional Chin Vet Med*, 2020, 39(1):17-19. (in Chinese)
刘勇, 李淑红, 李海山, 等. 12 种中药对沙门菌的体外抑菌效果. *中兽医医药杂志*, 2020, 39(1):17-19.
- [18] Li D, Yu D, Zeng FL, et al. Combined antibacterial effect of five traditional medicines against *Salmonella choleraesuis*. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(2):318-322. (in Chinese)
李东, 于丹, 曾范利, 等. 5 种中药对猪霍乱沙门菌的抑菌作用. *中国兽医学报*, 2019, 39(2):318-322.

(上接第 52 页)

- [33] Alves NJ, Turner KB, Daniele MA, et al. Bacterial nanobioreactors--directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(44):24963-24972.
- [34] Fan E, Chauhan N, Udatha DBRKG, et al. Type V secretion systems in Bacteria. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(1).
- [35] Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front Microbiol*, 2019, 10:1100.
- [36] Gu H. Role of flagella in the pathogenesis of *helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*, 2017, 74(7):863-869.
- [37] Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, et al. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000, 182(14):4068-4076.
- [38] Qu J, Cao S, Wei Q, et al. Synthetic multienzyme complexes, catalytic nanomachineries for cascade biosynthesis in vivo. *ACS Nano*, 2019, 13(9):9895-9906.
- [39] Wei Q, He S, Qu J, et al. Synthetic multienzyme complexes assembled on virus-like particles for cascade biosynthesis in cellulose. *Bioconjug Chem*, 2020, 31(10):2413-2420.