

滚环等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用

樊兰艳, 甘永琦, 朱 斌*

(广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

摘 要: 食源性致病菌是影响人类食品安全的重要因素。人类食源性致病菌致病率的逐年上升, 引起世界广泛关注。滚环等温扩增(rolling circle amplification, RCA)技术因具有高特异性、高灵敏度、稳定、操作简单等优点, 在食源性致病菌检测中具有广泛的应用前景。近年来以滚环等温扩增技术为基础, 针对食源性致病菌的检测新技术不断得到发展。本文概述了滚环等温扩增技术的基本原理、技术特点、在食品微生物快速检测方面的应用、存在的不足和解决措施, 指明研究发展新方向, 旨在为食源性致病菌在快速、高通量检测需求上增加新方法, 对食品安全监管具有重要意义。

关键词: 滚环等温扩增技术; 食源性致病菌; 检测技术

Application of rolling circle amplification technology in the detection of food-borne pathogenic microorganism

FAN Lan-Yan, GAN Yong-Qi, ZHU Bin*

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: The pathogen of food-borne diseases is an important factor of human food safety. The increasing rate of human disease caused by food-borne pathogenic bacteria has attracted worldwide attention. The rolling circle amplification (RCA) has a wide application prospect in the detection of the pathogen of food-borne diseases due to its high specificity, high sensitivity, stability, simple operation. In recent years, the new detection technology based on RCA for the pathogen of food-borne diseases has been developed continuously. This review described the basic principle and characteristics of RCA, and its application, the existing shortcomings and solutions in rapid detecting food microorganism, pointed out the new direction of research and development, so as to add new methods for rapid detection and high throughput for food-borne pathogenic, which is of great significance for food safety supervision.

KEY WORDS: rolling circle amplification technology; food-borne pathogens; detection technology

0 引 言

由食源性致病菌引发的疾病是食品安全的主要问题, 也是人们广泛关注的-一个重要公共卫生问题^[1-2]。食源性疾病对全球造成巨大负担, 也是造成人类患病的主要原因^[3]。

据世界卫生组织提供的数据显示, 5 岁以下儿童承受 40% 的食源性疾病负担, 每年发生 12.5 万例死亡^[4]。据国家卫生和计划生育委员会统计数据, 2015 年微生物性食物中毒人数最多, 占全年食物中毒总人数的 53.7%, 主要致病因子为沙门氏菌、副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、金黄

基金项目: 南宁市科学技术局项目(20183047-1)、广西食品药品监督管理局科研计划项目[桂食药科 2018-01(直属)]

Fund: Supported by the Nanning Bureau of Science and Technology Project (20183047-1), and the Guangxi Food and Medical Products Administrative Scientific Effort Project [Guangxi Food and Drug Department 2018-01 (directly under)]

*通信作者: 朱斌, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为微生物检验及研究。E-mail: Zhubin1226@sina.com

*Corresponding author: ZHU Bin, Master, Chief Pharmacist, Guangxi Institute for Food and Drug Control, No.9, Qinghu Road, Qingxiu District, Nanning 530021, China. E-mail: Zhubin1226@sina.com

色葡萄球菌及其肠毒素、致泻性大肠埃希氏菌、肉毒毒素等^[5]。因此,食源性疾病构成了一个巨大而且不断扩大的世界性公共卫生问题,如何快速、准确、灵敏地检测出食源性病原微生物已成为控制食品安全问题的关键。

目前,我国对食源性致病菌的检测主要依据 GB 4789 的相关方法,这些传统方法虽然为金标准,但是操作复杂、检测周期较长、每次只能确定或排除一种病原菌,无法满足快速检测需求,而且对于一些未可培养微生物可能会漏检^[6]。因此,寻找和建立新的食源性致病菌的快速检测技术具有重要意义。

近年来,各种等温扩增技术应用而生,成为分子检测实用型技术。其中,滚环等温扩增(rolling circle amplification, RCA)技术因其具有高灵敏度、高特异性、高通量、扩增产物经磷酸化处理后可直接测序、简单易操作等特点备受人们青睐,为食源性致病菌检测提供了新的检测方法,成为研究的热点。本文就 RCA 的原理、特点、在食源性致病菌检测中的应用及其展望等方面进行阐述,旨在为快速、高通量检测食源性致病菌相关研究提供参考依据,对于保证食品安全具有重要意义。

1 RCA 技术概况

1.1 RCA 技术原理

LIZARDI 等^[7]最早将 RCA 技术运用在核酸特异性扩增和检测方面,他们首次提出 RCA 的概念,以 phi29 DNA 聚合酶替代早期使用的 *Escherichia coli* DNA 聚合酶和 T4DNA 聚合酶进行滚环扩增,大大提高了反应效率。其原理是首先设计一条 90 个 bp 的寡核苷酸序列,部分碱基与目标序列杂交,它的两末端相邻,形成一个缺口(图 1A),这个缺口可以用一段小的经磷酸化的寡核苷酸进行粘合,

或者经过 DNA 连接酶连接后成环(图 1B),这个环就称为锁式探针(padlock-probe, PLP)。接着,在 DNA 聚合酶作用下,引物沿着环状模板链延伸,并扩增出与模板序列完全相同的线性链产物(图 1B、C),10 min 的时间获得的 DNA 产物高达 23 kb。与传统的检测手段不同的是, RCA 扩增的是锁式探针而不是目标靶序列。

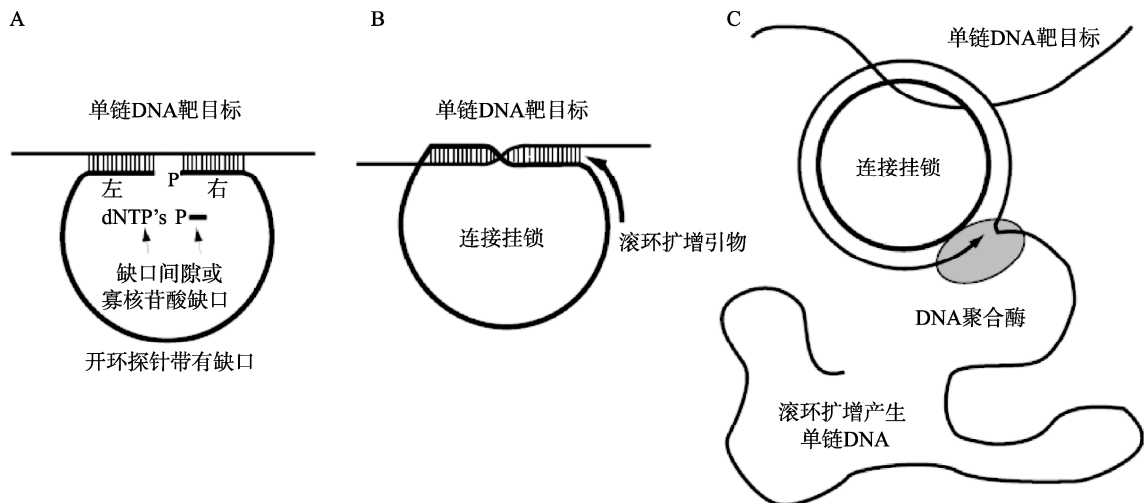
1.2 RCA 的类型

根据引物的数量分为单引物 RCA、双引物 RCA、多引物 RCA。单引物 RCA 又称为线性 RCA,只需要一条引物即可完成扩增^[8]。引物首先与单链环状 DNA 结合后,在具有链置换功能的 DNA 聚合酶的作用下开始延伸,当合成至自身 5'端时,5'端 DNA 开始被置换下来,并继续以环状 DNA 为模板进行无限的复制和延伸,最终得到一条与环状锁式探针序列互补的多个拷贝的单链 DNA 产物。

双引物 RCA 也称为超分支滚环扩增、分支扩增或级联滚环扩增,在单引物 RCA 的基础上,再增加一条与单链环状 DNA 序列相同的单链作为引物,可与单引物 RCA 的产物退火延伸^[7]。新合成的拷贝又作为模板进行反应,且反应链置换不断进行,如此就形成了指数扩增,最终得到一系列大小不同的双链 DNA 复制产物^[9]。

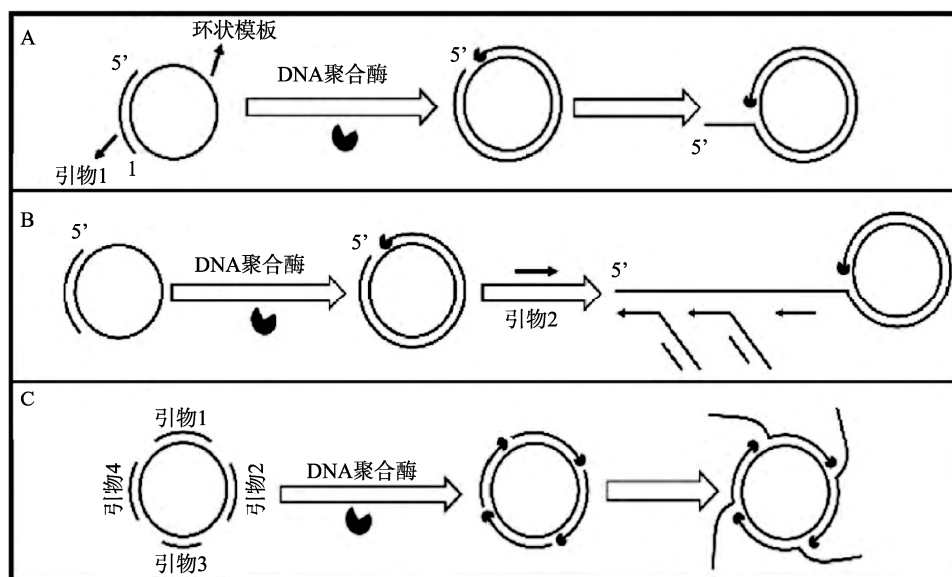
多引物 RCA 原理^[10-11]与双引物 RCA 相似,但在 RCA 扩增中有多条引物参与。这些随机引物可以在环状 DNA 的不同位点同时延伸产生多个复制叉,然后在 DNA 聚合酶的作用下进行链置换合成,在置换非模板链的同时,其他随机引物也开始与非模板链退火延伸,以此类推,进而形成长度不一的模板串联重复双链 DNA,在短时间内获得大量的 DNA^[12]。

3 种类型的 RCA 原理示意图如图 2 所示^[13]。



注: A: 目标序列与锁式探针杂交, 形成缺口; B: 连接挂锁, 结合互补引物进行滚环扩增; C: 链置换 DNA 聚合酶催化的挂锁探针进行滚环扩增; 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)。

图1 锁式探针的连接及滚环扩增
Fig.1 Ligation of PLP and rolling amplification



注: A: 单引物 RCA; B: 双引物 RCA; C: 多引物 RCA。

图 2 RCA 的类型

Fig.2 Types of RCA

1.3 RCA 技术特点

PCA 这种核酸复制的技术在体外进行, 是一种对单链寡核苷酸进行恒温扩增的技术, 不需要依赖大型精密仪器, 有效避免热循环对温控的要求。近年来在多领域检测中有了较为广泛的应用, 如转基因产品检测^[14]、病毒检测^[15]、癌症检测^[16-17]、食品抗生素检测^[18]、蛋白活性检测^[19]、环境真菌筛查^[20]、单核苷酸多态性检测^[21]、食源性致病菌检测^[22-27]等。

该技术具有以下突出的特点: (1)高特异性。锁式探针检测臂的两端只有与检测靶序列完全互补时, 才能连接成环, 但只要有一个碱基错配, 则锁式探针与检测靶序列不能完全互补, 环化反应不能完成, 从而也就不能进行 RCA 反应, 保证了检测的特异性; (2)高灵敏度。RCA 技术具有很强的扩增能力, 可在短时间内对靶序列进行扩增, 其线性滚环扩增效率为 10^5 倍^[28], 而指数型扩增效率可高达 10^9 倍^[7], 这一高灵敏度的特性使其检测达到了单分子水平^[29]; (3)对温控设备要求不高, 操作简单。因为是等温扩增, 只需要水浴锅就可以满足实验, 因此, 该技术特别适合在基层的检验机构推广; (4)具有较高的稳定性。形成的杂交环具有稳定的拓补结构, 能够使滚环扩增反应顺利进行, 能在短时间内扩增得到大量产物。

2 RCA 在食源性致病菌检测中的应用

引起食源性疾病爆发的微生物主要有沙门氏菌属 (*Salmonella*)、弧菌属 (*Vibrio*)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、志贺氏菌 (*Shigella*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 等。目前 RCA 技术用于这些常见的食源性致病菌的检测, 通常根据病原微生物毒素的编码基因来设计一条引物, 如副溶血性弧菌的特异性基因 (*toxR*)、志贺氏菌的侵袭性质粒抗原 H 基因 (*ipaT*)、单核细胞增生李斯特氏菌溶血素基因 (*hlyA*)^[30] 等。还有些根据病原微生物的特异性序列, 如鼠伤寒沙门氏菌管家基因 (*Salmonella PurE*)^[31]。另外菌株的其他组成如抗原、脂多糖等使食用者患病的成分的合成及运输基因也可作为检测目标^[32]。为了保障食品安全, 多种快速检测技术已得到发展, 基于 RCA 的各种生物传感器应用而生, 如基于 RCA 的电化学生物传感器、纳米金颗粒 DNA 生物传感器、表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 传感器、太赫兹 (terahertz) 光谱传感器等, 此外, 还有跨越式 RCA 等, 这些技术对病原菌的检测均有较高的灵敏度和特异性, 详见表 1。

2.1 基于 RCA 的物理声波光波传感器对食源性致病菌的检测

KORDAS 等^[31]使用声波装置结合 RCA 等温扩增法对肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 进行快速检测。通过声波传感器结合 RCA, 对不同的 DNA 扩增和检测方案进行了测试, 包括两种不同温度 (30 °C 和室温) 下的芯片外扩增, 然后进行声学检测以及芯片上扩增, 最后进行室温检测, 目前的检测极限低至每个样本 100 个细菌细胞当量 (bacteria cell equivalent, BCE)。该方法表明, 声学比, 即 DNA 结合过程中观察到的振幅与相位的变化, 是检测产物的最敏感手段, 但无法区分阳性和阴性样品。该方法分析时间快, 且具有可移植性、可进行多分析、样品体积小、功耗低等固有优势。

表1 近年来基于 RCA 技术在食源性致病菌中的检测
Table 1 Detection of food-borne pathogenic bacteria bases on RCA technology in recent years

技术方法	目标菌群	检出限	参考文献
连接酶链式反应和 RCA 技术	克罗诺杆菌 <i>Cronobacter</i> spp.	纯培养物: 8.6×10^1 CFU/mL(荧光法), 7.5×10^2 CFU/mL(比色法); 加标样品: 9.2×10^2 CFU/mL(荧光法), 8.4×10^3 CFU/mL(比色法)	[23]
基于 RCA 的 DNA 水凝胶	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	4×10^3 CFU/mL	[33]
基于 RCA 的比色法	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.2 pmol/L(合成目标序列); 7.4 pg/ μ L(基因组 DNA)	[25]
基于金纳米颗粒和RCA的THz超材料传感器	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	2.77 fmol/L(合成目标序列); 0.08 pg/ μ L(基因组DNA)	[34]
基于 RCA 的酶联比色法	单增李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	4.6×10^2 CFU/mL(纯培养物); 6.1×10^3 CFU/g(加标的生菜样品)	[35]
实时荧光跨越式 RCA 技术	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	8.6×10^0 CFU/mL(人工污染牛奶样品)	[36]
FTA 膜结合跨越式 RCA 技术	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	3.22×10^0 CFU/mL(人工污染牛奶样品)	[37]
实时荧光跨越式 RCA 技术	副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.08×10^1 CFU/g	[38]
跨越式 RCA	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	3.8×10^1 CFU/mL (SYBR GreenI染料法)	[39]
跨越式 RCA	克罗诺杆菌 <i>Cronobacter</i> spp.	3.4×10^2 CFU/mL(焦磷酸沉淀法); 3.4×10^1 CFU/mL (SYBR GreenI染料)	[40]
生物芯片-RCA	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	50 fg/ μ L	[41]

注: FTA 膜(flinders technology associates, FTA)。

YAO 等^[42]以副溶血性弧菌为检测对象,建立了基于 RCA 结合表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)方法。通过 RCA 产物捕获 Au@Ag 探针,提高反应体系中纳米粒子的富集量来增强拉曼信号,成功实现了对副溶血性弧菌的检测,检出限(limit of detection, LOD)低至 1 CFU/mL。

2.2 基于 RCA 化学传感器对食源性致病菌的检测

AISSA 等^[43]将滚环等温扩增的方法与电化学传感器组合用于大肠杆菌的检测,具有较高的灵敏度。这种方法是先将目标菌的 DNA 使用特异性靶向磁探针(magnetic probes, MPs)进行预浓缩,然后在 MPs 上通过 RCA 扩增,并运用两种不同的电化学读出方法结果。用该法对大肠杆菌进行检测,其 LOD 为 $10^{4.3}$ CFU/mL。

HAO 等^[44]设计了一种化学发光共振能量转移传感器来检测金黄色葡萄球菌, 其中金黄色葡萄球菌和 CO^{2+} 增强的 N-(氨基丁基)-N-(乙基异鲁米诺) 功能性花状金纳米粒子 [Co^{2+} enhanced N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol) functional flowerlike gold nanoparticles, Co^{2+} /ABEI-AuNFs] 作为供体, WS_2 纳米片作为受体。当金黄色葡萄球菌存在时发生 RCA 反应, 产生 RCA 产物捕获游离的 cDNA-ABEI-AuNFs 复合物吸附于 WS_2 纳米片上, 保留原有化学发光, 最终实现信号放大。在最优条件下对金黄色葡萄球菌的最低检出限可达 15 CFU/mL, 而在没有目标菌的情况下, 游离的 cDNA-ABEI-AuNFs 复合物完全吸附在 WS_2 纳米薄片上, 化学发光猝灭。

TENG 等^[45]2017 年将一种基于抗体-适配体的异三明治安培生物传感器用于食源性副溶血性弧菌的定量, 金电极表面的抗体首先捕获目标病原体, 然后将免疫复合物与由单链 DNA 探针组成的适配体孵育, 从而形成了一种异质夹层结构, 该结构通过 RCA 放大来增强信号。随后加入甲基蓝作为电子化学 DNA 探针, 设定最佳安培信号为 0.28 V, 涵盖每毫升 $2.2 \sim 2.2 \times 10^8$ CFU 浓度范围, 该方法最低检出限为 2 CFU/mL, 灵敏度高, 并且还能进行定量。

2.3 基于 RCA 的其他生物传感器检测方法的发展

ZHAN 等^[35]建立了一种敏感、特异性强的酶联 RCA (enzyme linked RCA, ELRCA)方法,用于单增李斯特氏菌的检测,用含生物素的探针与链霉亲和素形成复合物(streptavidin labeled with horse radish peroxidase, SA-HRP),在酶底物存在的情况下,HRP 产生化学发色团,可以进行比色检测,该方法对单增李斯特氏菌的纯培养物检出限为 4.6×10^2 CFU/mL,对加标的新鲜生菜的检出限为 6.1×10^3 CFU/g,该方法快速、成本低、灵敏且特异性强。因此,通过改变适配体的特异性,为其他病原菌的检测提供了一个潜在的平台。

李同祥等^[41]建立了一种生物芯片技术和 RCA 技术结合,用于食源性致病菌的检测,以金黄色葡萄球菌为目标菌,其最低检出限达 50 fg/μL。该方法将生物芯片和 RCA 的优势相结合,具有高灵敏性、高特异性,能为食源性致病菌的检测指明新方向。

JIANG 等^[46]为实现微流控元件对细胞灵敏度检测,

提出了一种新的双重 RCA 检测方法。这种方法包括捕获 RCA (cRCA)反应,该反应旨在用长串联重复适配体修饰微流控通道表面,以有效捕获大肠杆菌 O157:H7 细胞。用该法检测橙汁和牛奶中大肠杆菌 O157:H7,检出限达 80 cell/mL。这种微流控装置结合双重 RCA 来增强目标捕获和检测信号,是一种简单而有前景的方法,可以对食品安全检测进行所有敏感细胞检测。

SONG 等^[47]利用 Cell-SELEX 功能化氧化石墨烯和 RCA 对副溶血性弧菌特异性适配体进行筛选,从而快速鉴定食源性病原菌副溶血性弧菌。其特点是功能化的氧化石墨烯(graphene oxide, GO)和等温滚动循环扩增,将聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)和壳聚糖(chitosan, CTS)接在片状氧化石墨烯 GO 分子上合成 PC-GO 材料。PC-GO 可以与靶细胞亲和力和较低的单链 DNA 结合,大大提高了选择效率。细胞结合候选适配体(cell-binding aptamer candidates, CACs)利用互补环介导(complementary ring mediated, CRM)-RCA 扩增 10^7 倍,这是一种独创的单链产物扩增方法,可直接用于下一轮筛选。该方法操作简单、效率高,且不需要昂贵的热循环器。

2.4 RCA 在食源性致病菌快速检测中的发展

RCA 技术结合物理、化学的生物传感器,都是基于适体的生物传感器,对靶标具有较高的结合亲和力和特异性,形成的适配体具有合成和修饰简单、热化学稳定性好、重现性好、灵敏度高、独特优势,但实验设计比较复杂,对操作人员要求较高,需要特殊的仪器进行分析,难以满足基层检验的要求,并且很多国家和地区可能不具备上述 RCA 检测要求的实验条件和仪器水平,所以许多学者致力于研究降低 RCA 的实验条件和仪器水平,以使 RCA 对食源性致病菌的检测更有实用性、推广性。特别是一些基层实验室或检验部门,对病原菌的检测如有一些快速检测方法,这样就能初步对食源性致病菌进行判断,可能在一定程度上降低不必要的损失。因此,为帮助一些检验部门实现快速检测需求,RCA 可视化检测方法研究逐渐受到重视。

LIU 等^[22]研究采用连接酶链反应和滚动循环扩增(ligase chain reaction and rolling circle amplification LCR-RCA)双扩增策略,建立了一种灵敏、特异的检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌的方法。采用 AuNP 探针构建线性 RCA 体系,对克罗诺杆菌进行比色检测,该方法对纯培养物及加标培养物的检出限分别为 7.5×10^2 、 8.4×10^3 CFU/mL。该方法具有快速、高效检测婴幼儿配方奶粉中克罗诺杆菌的潜力。

LI 等^[25]建立了一种测定金黄色葡萄球菌 DNA 的比色微板法,设计了线性挂锁探针来识别目标序列,用生物素标记的捕获探针作为引物启动 RCA。生物素标记的 RCA 产物与地高辛标记的信号探针杂交,固定在 96 孔板的链霉菌亲和素功能化孔上。为了提高灵敏度,将 Aump 抗地高

辛-POx-HRP 偶联物加入到孔中,然后与地高辛标记的信号探针结合,在辣根过氧化物酶催化下由无色变为蓝色。该方法金黄色葡萄球菌靶序列的检出限为 1.2 pmol/L;对基因组 DNA 检出限为 7.4 pg/ μ L,并通过对加标食品样品的分析,验证了该方法的应用前景。

ZHANG 等^[33]研究建立了基于醛基化磁珠、RCA 和 DNA 水凝胶的适体生物传感器,用于可视化、简单、快速检测大肠杆菌 O157:H7。首先,制备了 Mbs@double-stranded DNA (dsDNA)配合物。在靶蛋白存在下,适配体与大肠杆菌 O157:H7 结合,释放大肠杆菌适体启动子(EA-I)。磁性分离收集上清液与引物结合,促发 RCA 反应,形成肉眼可见的水凝胶,该法在 1 h 内对大肠杆菌 O157:H7 检出限为 4×10^3 CFU/mL,在食品安全检测中有潜在的应用前景。

此外,黄梦琪^[30]将 RCA 和试纸条显色相结合用于检测单核增生李斯特氏菌,通过 RCA 扩增对单增李斯特菌的 *hlym* RNA 进行高效特异性扩增,将扩增产物经过 *HhaI* 酶进行特异位点酶切,形成与锁式探针长度相同的片段。酶切后的单链产物不需经过预变性杂交,可直接进行试纸条检测。该方法最优检出限可达到 100 pg/ μ L。整个过程实验反应均可在恒温条件下进行,几个小时内完成,这种方法适用于快速的现场检测,为野外及市场等户外的检测提供了及时、灵敏的结果,避免错失控制食源性疾病爆发的最佳时间,也节约了时间和检测成本。

这些快速检测技术的发展,不仅是对食源性致病菌传统的检测技术的改进和提高,也给食品安全质量增加了一层新保障,对食源性致病菌进行简单准确、灵敏、省时、省力和省成本的快速检验方法已经成为保证食品安全的迫切需求。

3 RCA 的不足及改进措施

尽管 RCA 技术可以缩短食源性致病菌的检测时间,降低对复杂仪器的依赖,为食源性致病菌的现场实时检测及基层实验室提供了一定的基础,但随着人们对食品安全的高度重视,政府部门监管力度逐渐增强,食源性致病菌的检测需求日益增长,出现了不少新变化。对此,RCA 技术需要在一些共性问题上加改进,以适应这些新的需求和变化。

3.1 背景信号问题

理论上,只有目标序列存在的情况下,锁式探针两端才能与目标序列互补,在连接酶作用下成环,但在实际运用中,当离开连接处较远的部位出现不互补的碱基对时,探针也会成环,RCA 扩增也会进行,造成假阳性^[48],尤其是忠实度低的 T4 连接酶,在没有模板的情况下也能成环^[49]。李志锋^[50]在实验中曾证明线性锁式探针能在引物存在的情况下产生拖带或者类似细小条带的背景信号;

而早在2001年,HAFNER等^[51]的研究结果表明,残留的线性锁式探针能进行RCA扩增,产生背景信号,这种现象称为线性靶标多聚体扩增(linear target isothermal multimerization and amplification, LIMA),发生的机制尚未阐明。因此,背景信号造成的假阳性问题是RCA共性问题。

3.2 锁式探针连接效率问题

通常在RCA反应体系中,待测的靶标少,只有部分锁式探针环化,而非靶标DNA分子和靶标DNA分子的序列十分相似,它比靶标DNA分子可能呈现出更高的浓度^[52]。因此,提高锁式探针的连接效率,有利于锁式探针针对靶目标序列的识别,这对于RCA技术运用于食源性致病菌的诊断和检测是至关重要的。

3.3 检测通量问题

为了更好地适用于现场检测和在线检测,许多研究都致力于在单个扩增反应中实现对多种核酸靶标物的检测,期望达到高通量的目的。但是,单纯通过增加引物对同时实现扩增多个目标片段是有一定局限性的,此外,增加引物必然会导致反应体系变得复杂,不同引物之间存在交叉组合的可能,增加非特异可能^[53]。

3.4 解决措施

针对RCA背景信号问题,首先,消除线性锁式探针可以使用特异性核酸外切酶,如核酸外切酶I,能特异性地降解线性ssDNA,而对环状DNA无影响;核酸外切酶III能降解体系中可能存在的dsDNA。SZEMES等^[54]在反应体系中加入核酸外切酶I和核酸外切酶III,取得较理想的结果。其次,锁式探针的不对称设计是提高连接特异性的一个重要方面,比如缩短3'端检测臂增加了探针单碱基错配识别能力从而保证了探针的高度特异性,同时延长5'端检测臂使连接稳定并减少反应体系多靶标引起的潜在错配,可以增加连接特异性。这种不对称设计的优越性在FARUQI等^[55]的方案中得到证实。因此,增强锁式探针的鉴别能力从而达到减少或者控制背景信号的目的。此外,在RCA实际运用过程中,采用固相RCA能够在一定程度上减少背景信号的产生,扩大检测范围^[56]。

对于锁式探针连接效率问题,在实验中证实了与常规的恒温法相比,热循环连接法能明显增加体系内环化的锁式探针,提高检测的灵敏度。此法通常使用耐热的Taq连接酶替代常规的E. coli或T4连接酶进行变性退火循环反应,推测能增加体系内环化锁式探针的原因是由于靶目标片段与锁式探针热变性退火后,与锁式探针结合的靶目标片段脱落下来,成为模板,如此循环反应,从而形成大量的锁式探针,提高检测的特异性和灵敏度。

在检测通量问题上,随着等温扩增芯片化的研究越来越多,等温扩增体系不断缩小,这为食源性致病菌的检测通

量提供了新视角。如液相悬浮芯片技术,该技术能在同一反应孔中加入多种不同的探针微球,检测多达100种特异性靶标序列,可以根据不同的检测需求灵活选择微球体混合液,建立灵活多变的反应体系,真正实现高通量。目前,滚环等温扩增技术结合芯片技术,已在植物病原菌^[57]和医学微生物检测方面有成功报道^[58-59]。

4 结束语

RCA作为恒温扩增技术的一种,可以降低对复杂仪器的依赖,在食源性致病菌的检测种类、最低检出限、检测时间、仪器要求等方面都进步迅速。食物中的致病菌种类通常很多,快速而准确鉴定病原菌种类的检测方法将是以后食源性致病菌研究的新趋势。首先,直接易读的检测结果便于实验人员快速作出判断,也是RCA未来快速发展方向之一。RCA产物结合可视化方法有助于快速对食源性致病菌作出初步判断,这对现场检验是至关重要的;其次,大部分的食源性致病菌检测仍然还局限于检测一种病原菌,而RCA信号扩增具有的特异性、敏感性、与其他核酸序列检测方法的相容性使RCA联合生物芯片技术对多种食源性致病菌进行检测变成可能,这就需要科研人员不断借鉴及追踪更多其他生物检测领域如植物病原菌^[60]、医学致病菌^[61]、藻类^[62-63]等新的RCA联合检测技术及RCA相关生物传感器检测目标DNA^[14]等技术的发展,从而更有效地提高RCA检测食源性致病菌的准确性、便捷性,并降低其成本。RCA及其联合技术在未来将有更多的机会使食源性致病菌的检测从实验室走到户外,具有巨大的市场潜力,也为食品的安全与人类的健康提供更便捷、更廉价的保障。

参考文献

- [1] MOHAMADI E, MOGHADDASI M, FARAHBAKHS A, et al. A quantum-dot-based fluoroassay for detection of food-borne pathogens [J]. J Photoch Photobio B, 2017, 174: 291-297.
- [2] DEB P. Environmental pollution and the burden of food-borne diseases [J]. Foodborne Dis, 2018, 15: 473.
- [3] HAN X, LIU Y, YIN J, et al. Microfluidic devices for multiplexed detection of foodborne pathogens [J]. Food Res Int, 2021, 143(4): 110246.
- [4] 世界卫生组织. 食品安全 [EB/OL]. [2021-04-30]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> [2021-11-17]. World Health Organization. Food safety [EB/OL]. [2020-04-30]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> [2021-11-17].
- [5] 国家卫生健康委员会. 国家卫生计生委办公厅关于2015年全国食物中毒事件情况的通报 [EB/OL]. [2016-04-01]. <http://www.nhc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml> [2021-11-17]. National Health Commission of the People's Republic of China. Notification of the General Office of the National Health and Family Planning Commission on food poisoning incidents in 2015 [EB/OL].

- [2016-04-01]. <http://www.nhc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml> [2021-11-17].
- [6] ASAKURA H, WATARAI M, SHIRAHATA T, *et al.* Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186(10): 1526–1529.
- [7] LIZARDI PM, HUANG XH, ZHU ZR, *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 225–232.
- [8] JIN GX, WANG CM, YANG LL, *et al.* Hyperbranched rolling circle amplification based electrochemiluminescence aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, (63): 166–171.
- [9] HAMIDI SV, GHOURCHIAN H, TAVOOSIDANA G. Real-time detection of H5N1 influenza virus through hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Analyst*, 2015, 140(5): 1502–1509.
- [10] DEAN FB, NELSON JR, GIESLER TL, *et al.* Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification [J]. *Genome Res*, 2001, 11(6): 1095–1099.
- [11] WANG B, POTTER S, LIN Y, *et al.* Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2339–2344.
- [12] HUANG J, LI XY, DU YC, *et al.* Sensitive fluorescent detection of DNA methyltransferase using nicking endonuclease-mediated multiple primers-like rolling circle amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 417–423.
- [13] 占忠旭, 刘巨, 陈博璐, 等. 滚环扩增信号放大技术在生物检测中的应用的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1206–1213.
- ZHAN ZX, LIU J, CHEN BL, *et al.* Progress in rolling circle amplification in biological detection [J]. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1206–1213.
- [14] CHEN DL, ZHANG M, MA MY, *et al.* A novel electrochemical DNA biosensor for transgenic soybean detection based on triple signal amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1078: 24–31.
- [15] LEE H, KIM DM, KIM DE. Label-free fluorometric detection of influenza viral RNA by strand displacement coupled with rolling circle amplification [J]. *Analyst*, 2021, 145: 8002–8007.
- [16] SUN S, YANG S, HU X, *et al.* Combination of immunomagnetic separation with aptamer-mediated double rolling circle amplification for highly sensitive circulating tumor cell detection [J]. *ACS Sens*, 2020, 5(12): 3870–3878.
- [17] HUANG R, HE L, LI S, *et al.* A simple fluorescence aptasensor for gastric cancer exosome detection based on branched rolling circle amplification [J]. *Nanoscale*, 2020, 12(4): 2445–2451.
- [18] HE L, SHEN Z, CAO Y, *et al.* A microfluidic chip based ratiometric aptasensor for antibiotic detection in foods using stir bar assisted sorptive extraction and rolling circle amplification [J]. *Analyst*, 2019, 144(8): 2755–2764.
- [19] JIANG S, LIU M, TANTAI W, *et al.* Aptamer-mediated rolling circle amplification for label-free and sensitive detection of histone acetyltransferase activity [J]. *Chem Commun*, 2021, 57(16): 2041–2044.
- [20] VOIDALESKI MF, GOMES RR, LIMA BJFS, *et al.* Environmental screening of fongsecaea agents of chromoblastomycosis using rolling circle amplification [J]. *J Fungi*, 2020, 6(4): 290.
- [21] QI X, BAKHT S, DEVOS KM, *et al.* L-RCA (ligation-rolling circle amplification): A general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(22): 116.
- [22] LIU J, XIE G, XIONG Q, *et al.* Sensitive dual readout assays based on rolling circle amplification for fluorescent and colorimetric detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. *Food Control*, 2021, 124: 107840.
- [23] LIU J, ZHAN Z, LIANG T, *et al.* Dual-signal amplification strategy: Universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in milk [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(4): 3055–3065.
- [24] LI S, JIANG Y, YANG X, *et al.* In situ rolling circle amplification surface modifications to improve *E. coli* O157:H7 capturing performances for rapid and sensitive microfluidic detection applications [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1150: 338229.
- [25] LI Y, WANG J, WANG S, *et al.* Rolling circle amplification based colorimetric determination of *Staphylococcus aureus* [J]. *Microchim Acta*, 2020, 187(2): 1–10.
- [26] YANG Q, ZHANG Y, LI S, *et al.* Saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(11): 9702–9710.
- [27] ZHOU H, DUAN S, HUANG J, *et al.* An ultrasensitive electrochemical biosensor for *Pseudomonas aeruginosa* assay based on a rolling circle amplification [J]. *Chem Commun*, 2020, 56(46): 6273–6276.
- [28] GUSEV Y, SPARKOWSKI J, RAGHUNATHAN A, *et al.* Rolling circle amplification: A new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 63–69.
- [29] ZHANG DY, ZHANG W, LI X, *et al.* Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification [J]. *Gene*, 2001, 274(1-2): 209–216.
- [30] 黄梦琪. 基于滚环扩增技术的纸基显色传感器用于致病菌快速检测[J]. *激光生物学报*, 2017, 26(6): 527–533.
- HUANG MQ. Rapid and isothermal paper-based gene-sensing of viable pathogens with rolling circle amplification [J]. *Acta Laser Biol Sin*, 2017, 26(6): 527–533.
- [31] KORDAS A, PAPADAKIS G, MILIONI D, *et al.* Rapid *Salmonella* detection using an acoustic wave device combined with the RCA isothermal DNA amplification method [J]. *Sens Bio-Sens Res*, 2016, 11: 121–127.
- [32] 辛亮, 崔艳华, 张兰威. 环介导等温扩增技术快速检测食源性致病菌的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(3): 211–220.
- XIN L, CUI YH, ZHANG LW. Advance of loop-mediated isothermal amplification application in rapid detecting food-borne pathogenic microorganism [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(3): 211–220.
- [33] ZHANG T, TAO Q, BIAN XJ, *et al.* Rapid visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7 by DNA hydrogel based on rolling circle

- amplification [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(3): 377–386.
- [34] YANG K, YU W, HUANG G, *et al.* Highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* by a THz metamaterial biosensor based on gold nanoparticles and rolling circle amplification [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(45): 26824–26833.
- [35] ZHAN ZX, LI H, LIU J, *et al.* A competitive enzyme linked aptasensor with rolling circle amplification (ELARCA) assay for colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2020, 107: 106806.
- [36] 王立娟, 郭威, 张先舟, 等. 实时荧光跨越式滚环等温扩增技术检测食品中的志贺氏菌[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(14): 125–131.
- WANG LJ, GUO W, ZHANG XZ, *et al.* Combining real-time fluorescence with salutatory rolling circle amplification for detection of *Shigella* in food [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(14): 125–131.
- [37] 庄梦晴, 张先舟, 卢鑫, 等. 食品中沙门氏菌 FTA 膜结合跨越式滚环等温扩增检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(4): 275–283.
- ZHUANG MQ, ZHANG XZ, LU X, *et al.* Development of detection method of *Salmonella* in food by salutatory rolling circle amplification combined with FTA card [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(4): 275–283.
- [38] 董晶, 徐慧, 郭威, 等. 实时荧光跨越式滚环等温扩增结合 PMA 检测虾产品中的活副溶血性弧菌[J/OL]. *食品科学*: 1–12. [2022-01-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201229.1058.063.html>
- DONG J, XU H, GUO W, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp products by real-time fluorescence salutatory rolling circle amplification combined with PMA [J/OL]. *Food Sci*: 1–12. [2022-01-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201229.1058.063.html>
- [39] 张蕴哲, 苑宁, 李靳影, 等. 可视化跨越式滚环等温扩增技术检测食品中沙门氏菌[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 304–311.
- ZHANG YZ, YUAN N, LI JY, *et al.* Detection of *Salmonella* in food by visualized salutatory rolling circle amplification technique [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2020, 20(9): 304–311.
- [40] ZHANG Y, YANG Q, LI C, *et al.* Sensitive and visual detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula by saltatory rolling circle amplification method [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 107: 41–48.
- [41] 李同祥, 黄天姿, 孙会刚, 等. 食源性致病菌生物芯片-RCA 检测新方法[J]. *徐州工程学院学报(自然科学版)*, 2019, 34(2): 26–34.
- LI TX, HUANG TZ, SUN HG, *et al.* A new method for detecting food-borne pathogenic bacteria by biochip-RCA [J]. *J Xuzhou Inst Technol (Nat Sci Ed)*, 2019, 34(2): 26–34.
- [42] YAO L, YE Y, TENG J, *et al.* *In vitro* isothermal nucleic acid amplification assisted surface-enhanced Raman spectroscopic for ultrasensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(18): 9775–9780.
- [43] AISSA AB, MADABOOSI N, NILSSON M, *et al.* Electrochemical genosensing of *E. coli* based on padlock probes and rolling circle amplification [J]. *Sensors*, 2021, 21(5): 1749.
- [44] HAO L, GU H, DUAN N, *et al.* An enhanced chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS₂ nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 959: 83–90.
- [45] TENG J, YE Y, YAO L, *et al.* Rolling circle amplification based amperometric aptamer/immuno hybrid biosensor for ultrasensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microchim Acta*, 2017, 184(9): 3477–3485.
- [46] JIANG Y, QIU Z, LE T, *et al.* Developing a dual-RCA microfluidic platform for sensitive *E. coli* O157:H7 whole-cell detections [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1127: 79–88.
- [47] SONG S, WANG X, XU K, *et al.* Selection of highly specific aptamers to *Vibrio parahaemolyticus* using cell-SELEX powered by functionalized graphene oxide and rolling circle amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1052: 153–162.
- [48] 王晓亮, 王星宇, 梁长城, 等. DNA 的滚环扩增技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(16): 358–363.
- WANG XL, WANG XY, LIANG CC, *et al.* Research progress of rolling circle amplification of DNA [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(16): 358–363.
- [49] KUHN H, FRANK-KAMENETSKII MD. Template-independent ligation of single-stranded DNA by T4 DNA ligase [J]. *FEBS J*, 2005, 272(23): 5991–6000.
- [50] 李志锋. 基于锁式探针的豆类四种重要植物病原细菌快速检测技术研究[D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- LI ZF. Rapid detection of four important phytopathogenic bacteria in leguminosae using padlock-based liquichip [D]. Nanning: Guangxi University, 2016.
- [51] HAFNER GJ, YANG IC, WOLTER LC, *et al.* Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase [J]. *Biotechniques*, 2001, 30(4): 852–867.
- [52] 刘倩, 李蓓, 文景芝, 等. 基于锁式探针的滚环扩增技术在植物病原检测中的应用[J]. *植物检疫*, 2009, 23(3): 38–41.
- LIU Q, LI B, WEN JZ, *et al.* Application of rolling circle amplification based on locking probe in plant pathogen detection [J]. *Plant Quar*, 2009, 23(3): 38–41.
- [53] 葛航, 吴朦晨, 张明洲, 等. 食源性致病菌等温扩增检测技术的研究进展[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(7): 874–881.
- GE H, WU MC, ZHANG MZ, *et al.* Research progress of isothermal amplification techniques for detection of food-borne bacteria [J]. *J Inst Anal*, 2019, 38(7): 874–881.
- [54] SZEMES M, BONANTS P, WEERDT M, *et al.* Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8): 70.
- [55] FARUQI AF, HOSONO S, DRISCOLL MD, *et al.* High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification [J]. *BMC Genomics*, 2001, 2(1): 4–14.
- [56] WANG B, POTTER SJ, LIN Y, *et al.* Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2339–2344.
- [57] 李志锋, 王忠文, 冯建军, 等. 基于锁式探针技术快速检测玉米细菌性

- 枯萎病菌和玉米内州萎蔫病菌[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(4): 529–534.
- LI ZF, WANG ZW, FENG JJ, *et al.* Rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* using a padlock probe-based assay [J]. Lett Biot, 2016, 27(4): 529–534.
- [58] NAM J, JANG WS, KIM J, *et al.* Lamb wave-based molecular diagnosis using DNA hydrogel formation by rolling circle amplification (RCA) process [J]. Biosen Bioelectron, 2019, 142: 111496.
- [59] MINERO GAS, TEFIKU E, GARBARINO F, *et al.* On-chip DNA analysis of tuberculosis based on magnetic nanoparticle clustering induced by rolling circle amplification products [J]. IEEE Magn Lett, 2020, 11: 1–5.
- [60] SUKAL AC, KIDANEMARIAM DB, DALE JL, *et al.* Assessment and optimization of rolling circle amplification protocols for the detection and characterization of *Badnaviruses* [J]. Virology, 2019, 529: 73–80.
- [61] HUANG R, HE L, LI S, *et al.* A simple fluorescence aptasensor for gastric cancer exosome detection based on branched rolling circle amplification [J]. Nanoscale, 2020, 12(4): 2445–2451.
- [62] ZHANG C, CHEN G, WANG Y, *et al.* Establishment and application of hyperbranched rolling circle amplification coupled with lateral flow dipstick for the sensitive detection of *Karenia mikimotoi* [J]. Harmful Algae, 2019, 84: 151–160.
- [63] ZHANG C, SUN R, WANG Y, *et al.* Comparative detection of *Karenia mikimotoi* by exponential rolling circle amplification (E-RCA) and double-ligation E-RCA [J]. J Appl Phycol, 2019, 31(1): 505–518.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介

樊兰艳, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品药品化妆品微生物检验等。
E-mail: 416621327@qq.com

朱 斌, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为微生物检验及研究。
E-mail: Zhubin1226@sina.com