

等温核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展

秦 爱¹, 张明娟¹, 邓方进², 王 娟¹, 袁 磊¹, 李根容^{1*}

(1. 重庆市计量质量检测研究院, 重庆 400020; 2. 广域铭岛数字科技有限公司, 重庆 401123)

摘 要: 等温扩增技术是近年来发展迅速的一种新型核酸扩增技术, 其反应过程始终维持在恒定的温度下, 降低了对精密仪器和检测场地的要求, 并大幅度缩短了检测时间, 更能满足准确、快速、灵敏、便携的日常检测需求。目前, 食源性致病菌仍是影响食品安全的主要因素之一, 等温核酸扩增技术已成功应用于部分食源性致病菌的检测中, 具有广阔的应用前景, 有望成为食源性致病菌快速检测的新方法。本文综述了环介导核酸等温扩增、滚环扩增、跨越式滚环扩增、重组酶聚合酶扩增、等温多自配引发扩增、单引物等温扩增、依赖解旋酶的等温扩增、链置换扩增、交叉引物扩增 9 种等温核酸扩增技术的扩增原理和优缺点, 及其在食源性致病菌检测中的应用研究进展, 提出了样品前处理、引物设计、结果判读、检测灵敏度、检测通量方面存在的共性问题, 并给出相应解决措施, 以期等为温核酸扩增技术在食源性致病菌快速检测中的实际应用和相关标准的制定提供研究思路。

关键词: 食源性致病菌; 等温核酸扩增; 快速检测; 技术难点; 解决措施

Research progress of isothermal nucleic acid amplification techniques in the detection of foodborne pathogens

QIN Ai¹, ZHANG Ming-Juan¹, DENG Fang-Jin², WANG Juan¹, YUAN Lei¹, LI Gen-Rong^{1*}

(1. Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 400020, China;
2. Guangyu Mingdao Digital Technology Co., Ltd., Chongqing 401123, China)

ABSTRACT: Isothermal amplification technology is a new type of nucleic acid amplification technology that has developed rapidly in recent years. Its reaction process is always maintained at a constant temperature, which reduces the requirements for precision instruments and detection sites, and greatly shortens the detection time, which can better meet the daily detection requirements of accuracy, rapid, sensitivity and portability. At present, foodborne pathogens are still one of the main factors affecting food safety. Isothermal nucleic acid amplification technology has been successfully applied to the detection of some foodborne pathogens, which has broad application prospects and is expected to become a new method for rapid detection of foodborne pathogens. This paper reviewed the amplification principles, advantages and disadvantages of the 9 kinds of isothermal nucleic acid amplification techniques, including loop-mediated isothermal amplification, rolling circle amplification, saltatory rolling circle amplification, recombinase polymerase

基金项目: 重庆市市场监督管理局科研计划项目(CQSJKJ2021039)

Fund: Supported by the Scientific Research Program Project of Chongqing Administration for Market Regulation (CQSJKJ2021039)

*通信作者: 李根容, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品、食品相关产品及化工产品安全检验。E-mail: 734253977@qq.com

*Corresponding author: LI Gen-Rong, Master, Professor, Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, No.3, Yangliu North Road, Chongqing 400020, China. E-mail: 734253977@qq.com

amplification, isothermal multiple self-matching-initiated amplification, single primer isothermal amplification, helicase dependent amplification, strand displacement amplification, crossing priming amplification, and the research progress of the application in detection of foodborne pathogens. Besides, this paper proposed some drawbacks shared in sample pretreatment, primer design, result interpretation, detection sensitivity and detection flux, and given the corresponding solutions, in order to provide research ideas for the practical application of isothermal nucleic acid amplification technology in rapid detection of foodborne pathogens and the formulation of relevant standards.

KEY WORDS: foodborne pathogens; isothermal nucleic acid amplification; rapid detection; technical difficulties; solutions

0 引言

食源性致病微生物是影响食品安全的主要因素之一,目前国内外食源性疾病仍以食源性病原微生物致病为主。我国开展食源性致病菌检测主要依靠 GB 4789 系列的传统培养法,该方法虽具有技术成熟、准确性较高等优点,但检验周期长(4~7 d)、操作烦琐、特异性与敏感度较低,有些属内种间生化差别不明显等。传统培养法已不能满足我国公共卫生突发事件应急检测的需要。因此更快速、更高通量和更简便的核酸扩增技术应运而生,核酸扩增技术因具有高效率、高灵敏度和高准确性等优势,发展迅速。早期的变温核酸扩增技术在食源性致病菌的检测中应用较为广泛,但其扩增反应需要不断的升温降温过程,依赖于价格高昂的精密仪器,而等温核酸扩增技术,其反应过程始终维持在恒定温度下,降低了对精密仪器和检测场地的要求,并大幅度缩短了检测时间,更能满足准确、快速、灵敏、便携的日常检测需求。

目前常用的等温核酸扩增技术有环介导核酸等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、跨越式滚环扩增(saltatory rolling circle amplification, SRCA)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、等温多自配引发扩增(isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA)、单引物等温扩增(single primer isothermal amplification, SPIA)、依赖解旋酶的等温扩增(helicase dependent amplification, HDA)、链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)、交叉引物扩增(crossing priming amplification, CPA)等。目前,分析等温核酸扩增技术扩增原理和优缺点的文献较多^[1-2],本文将不再详尽描述,而主要以 GB 4789 系列中涉及的食源性致病菌为研究目标,综述等温核酸扩增技术及其扩展技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展,并提出了其存在的共性问题和未来解决措施,为后续等温核酸扩增技术在食源性致病菌快速检测中实际场景的应用和相关国家检测标准的制定提供参考和依据。

1 等温核酸扩增技术

1.1 环介导核酸等温扩增

LAMP、IMSA 和 CPA 扩增原理相似,均采用混合式引物,在靶序列的多个区域设计多条引物完成扩增^[3-4]。LAMP 是目前检测市场占比最大的等温核酸扩增技术,广泛应用于沙门氏菌^[5-7]、单核细胞增生李斯特氏菌^[8-9]、金黄色葡萄球菌^[10-11]、副溶血性弧菌^[12]、大肠埃希氏菌 O157:H7^[13-15]、阪崎肠杆菌^[16-17]等食源性致病菌的快速检测。LEE 等^[8]开发了一种基于比色法的 LAMP 检测方法,利用 HRPzyme 分子信标,能够快速、特异地识别香菇中的 6 种李斯特氏菌,克服了钙绿素、SYBR Green 染料法和焦磷酸镁沉淀法中非特异性扩增而导致假阳性的问题。LAMP 因引物较多,较难实现多重核酸扩增,但越来越多研究者为提高检测通量,开发出一系列微流控芯片和多重 LAMP 检测方法。姚延禄等^[5]基于 LAMP 研发了一种离心式微流控芯片,通过离心力沿微流体通道泵送液体,无需复杂流体驱动设备,实现了在单个芯片上同时检测沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 的效果,可大幅度缩短检测时间,提高检测效率,但该项研究暂未应用到其他食源性致病菌检测中,仍需研发覆盖率更广的芯片并推入市场,提高市场占有率。

1.2 等温多自配引发扩增

IMSA 是 2013 年中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所发明的一项基于 LAMP 扩增原理和巢式聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物设计理念的新型等温扩增技术^[18]。LAMP 和 IMSA 主要差异表现在:引物识别位点数目、IMSA 外引物引入茎引物序列、产生比 LAMP 更多的能自我配对的结构(理论上 IMSA 比 LAMP 具有更高扩增效率)。CHEN 等^[19]建立了一套封闭在离心管的 IMSA 试剂盒用以检测牛奶中的金黄色葡萄球菌,使用者仅通过肉眼观察颜色变化进行结果判读,提高了检测效率,也可有效避免气溶胶污染,适用于基层企业。王琪等^[20]和乐振穹等^[21]分别构建了大肠埃希氏菌 O157:H7 和沙门氏菌的快速检测,并测试出人工污染样本最短增菌 10 和 6 h 可被 IMSA 法检出,明显短于 GB 4789 中大肠埃希氏菌

O157:H7 的 24 h 和沙门氏菌的 42 h, 其改善效果较好, 但仍可通过特异性基因的选择、引物和实验条件的不断优化进一步压缩增菌时间的效果。

1.3 交叉引物扩增

CPA 是 2008 年杭州优思达公司开发的一种新型等温扩增技术, 是中国首个具有自主知识产权的体外核酸扩增技术。LAMP 与 CPA 的不同点在于引物的具体设计不同, 导致形成的中间产物和终产物结构不同。近几年, CPA 技术的研究性报道较少, 研究对象仅有沙门氏菌^[22-23]和副溶血性弧菌^[24]两种。丛秋实等^[23]建立了鸡肠炎沙门氏菌的可视化 CPA 检测方法; 李雪彤^[24]则针对副溶血性弧菌分别建立了实时荧光定量 CPA 法和交叉引物扩增-磷酸根可视化检测方法。目前等温核酸扩增技术的发展仍受限于结果的高效判读和可视化显示, 纳米金显色、pH 响应显色、碱土金属指示剂显色、沉淀可视法和荧光可视法等可视化检测方法可以摆脱对检测设备的依赖, 实现结果可视化的便捷性将为等温核酸扩增技术向偏远地区和基层企业的推广提供更强大的助力。

1.4 重组酶聚合酶扩增

RPA 通过重组酶使单链引物与双链 DNA 模板互补配对, 启动 DNA 复制, 不需要 DNA 解链过程^[25]。RPA 是除了 LAMP 外的另一个应用市场较广的检测技术。近年来, RPA 技术已成功应用于沙门氏菌^[26-28]、金黄色葡萄球菌^[27-30]、副溶血性弧菌^[27,28,31]、大肠埃希氏菌 O157:H7^[32]、单核细胞增生李斯特氏菌^[27,33-34]的快速检测。DU 等^[33]将 RPA 与侧流层析试纸条(lateral flow assay, LFA)相结合用于单核细胞增生李斯特氏菌快速可视化检测, 富集 6 h 后, 检出限由 1.5×10^1 CFU 降低至 1.5×10^0 CFU。对检测样本进行预增菌操作, 将大幅度改善检测效果, 提高食源性致病菌的检出率。RPA 因体系较为简单, 能更好地实现多重核酸扩增, MA 等^[28]建立了海产品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的多重 RPA-LFA 检测方法, 能够在 15 min 内同时完成 3 种食源性致病菌的核酸扩增和结果可视化判读, 具有较高检测效率。

1.5 依赖解旋酶的等温扩增

HDA 模拟体内 DNA 复制过程, 利用 UvrD 解旋酶在恒温 65℃条件下打开 DNA 双链, 再用 DNA 单链结合蛋白稳定解开的单链为引物提供模板, 最后在 DNA 聚合酶作用下实现循环扩增^[35]。目前 HDA 仅在沙门氏菌^[36-37]、副溶血性弧菌^[38]和阪崎肠杆菌^[39]的快速检测中有相关文献报道。DU 等^[36]将 HDA 和 LFA 结合, 实现了 90 min 以内的沙门氏菌可视化快速检测, 该方法对加标的鸡肉和婴儿营养谷物样本在进行 2 h 增菌后, 检出限降低至 1.3~1.9 CFU/g。研究者使用加标样本对方法进行验证, 但通常选取牛奶等成分简单、杂质较少的样本进行, 而成品牛奶被食源性致病菌污染的概率极低, 所以在方法构建时, 建议参照《食

品安全监督抽检实施细则》等文件, 选取易被污染的食品种类进行方法测试, 不仅更贴合实际检测场景, 进一步验证方法的应用前景, 也有利于将方法从实验室研究推向实际的市场应用。

1.6 链置换扩增

SDA 是基于酶促反应的等温扩增技术, 利用限制性内切酶、具有链置换活性的 DNA 聚合酶和 2 对引物进行扩增, 具有较高的敏感性和特异性^[40]。WU 等^[41]将测流层析传感器与 SDA 结合, 仅扩增细胞膜上捕获的对大肠埃希氏菌 O157:H7 外膜特异的适配体, 检出限低至 10 CFU。该方法实现了无需 DNA 提取的快速检测, 突破了传统 DNA 扩增方法的局限性, 是个全新的研究方向。ZHANG 等^[42]建立了基于 G-四链体的 PCR-SDA 双重扩增检测沙门氏菌的方法, 利用 PCR 产物触发 SDA 反应, 进行信号二次放大, 产生肉眼可见的彩色化合物, 实现了沙门氏菌的可视化快速检测。传统 PCR 技术和等温核酸扩增技术的结合十分巧妙, PCR 扩增为等温核酸扩增积累大量引物, 确保了实验的灵敏度, 对低丰度 DNA 样本具有较大应用前景。

1.7 单引物等温扩增

SPIA 的核心是一条由 5'端 RNA 部分和 3'端 DNA 部分组成的嵌合引物及可以切割 DNA/RNA 杂合链中 RNA 部分的 RNA 酶。在等温反应过程中, 经过 RNA 降解、新引物结合、链置换的循环过程实现快速扩增^[43]。近年来, SPIA 已成功应用于金黄色葡萄球菌^[44]、沙门氏菌^[45]、副溶血性弧菌^[46]、单核细胞增生李斯特氏菌^[47]的快速检测。YANG 等^[47]建立了鸡肉样本中单核细胞增生李斯特氏菌的可视化 SPIA 检测, 其荧光可视法检出限为 1.4 CFU/g, 沉淀可视法检出限为 14 CFU/g, 与常规 PCR 法相比, SPIA 法检出限比 PCR 低 10 倍~100 倍。该方法不仅可以直接肉眼观察并判定结果, 还保证了检测的灵敏度, 为可视化技术在食源性致病菌检测中的应用提供了指导意义。

1.8 滚环扩增

RCA 是基于连接酶连接、引物延伸与链置换扩增反应的等温核酸扩增技术^[48]。近年来, RCA 技术已成功应用于沙门氏菌^[49-50]、金黄色葡萄球菌^[51]、单核细胞增生李斯特氏菌^[52]、大肠埃希氏菌 O157:H7^[53]、阪崎肠杆菌^[54]的快速检测。刘健慧等^[49]将 PCR 与 RCA 联用, 利用 PCR 产物触发 RCA 反应, 进行信号二次放大, 最后通过荧光信号强度检测实现牛奶样本中沙门氏菌的快速检测。该方法无需样本的预增菌操作, 检出限低至 4.28 CFU/mL, 具有较高的检测灵敏度和较强的特异性, 是一种全新的基于 RCA 的沙门氏菌快速检测方法。WANG 等^[51]提出了一种磁分离技术(magnetic separation, MS)结合 RCA 检测金黄色葡萄球菌的策略(MS-RCA), 该策略制备了基于万古霉素抗生素的磁珠用于金黄色葡萄球菌的富集, 富集过程仅需 50 min, 明显短

于 GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》中预增菌所需的 18~24 h。优化样品前处理方法和增菌时间,将缩短整体检测时间,提高检测效率。

1.9 跨越式滚环扩增

RCA 反应模板需要单链环状 DNA,否则需要变性退火或环化,为解决该难题,河北农业大学科研团队开发了 SCRA 技术,SCRA 能够以非闭环 DNA 为模板启动扩增^[55],无需环化模板。SRCA 技术已成功应用于沙门氏菌^[56-57]、金黄色葡萄球菌^[58-59]、副溶血性弧菌^[60-61]、单核细胞增生李斯特氏菌^[62-63]、阪崎肠杆菌^[64]的快速检测。庄梦晴等^[56]利用 FTA 膜能实现模板 DNA 快速提取的特性,将 FTA 膜与 SRCA 结合,使扩增反应在能够集约化检测的凹孔板中进行,实现了牛奶样本中沙门氏菌的快速检测,检出限低至 3.22 CFU/mL。将样本前处理、DNA 提取和核酸扩增集约在同一环境中完成是实现高通量检测的有效方法,有助于等温核酸扩增技术在大批量快速现场检测场景中的应用。GUO 等^[58]利用叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)染料可区分死菌与活菌的特性,构建了 PMA-SRCA 的荧光可视化方法,对猪肉样本中活的金黄色葡萄球菌进行检测,解决了 DNA 等温核酸扩增无法区分死活菌的难题,且该方法的灵敏度较 PMA-PCR 方法提高了 1000 倍,并降低了假阳性结果的检出率。

2 不同等温核酸扩增技术比较

不同等温核酸扩增技术在反应体系组成、反应条件、结果判读方式等方面均各有优劣。本文收集整理了 10 种等温核酸扩增技术的扩增温度、扩增时间和优缺点等关键信息(表 1),其扩增流程图和技术发展路线图见图 1~2。

分析各等温核酸扩增技术的体系组成可知:LAMP、CPA、IMSA 和 SDA 均采用多条引物完成扩增,导致其引物设计工作较其他技术而言更为困难,产物也更加复杂,与生物工程分析的适配性较差,后续需建立一系列较为明确的引物设计规则,优化生物工程试剂盒以推进其技术的进一步发展;而 RPA、HDA、SPIA、RCA 等技术则更多的依赖于反应高效的重组酶、解旋酶、连接酶和逆转录酶,酶的优劣直接影响其反应灵敏度和检测效率,开发更优质的酶及优化其反应体系是亟待解决的难题。

3 等温核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的应用

等温核酸扩增技术具有较高的检测效率、灵敏度和特异性,已广泛应用于食源性致病菌的检测。以 GB 4789 中 5 种常见的食源性致病菌为研究目标,等温核酸扩增技术及其扩展技术的应用研究见表 2~6。分析可知:(1)方法的选择:相比于基础技术的应用研究,研究者更倾向于其扩展技术的研究和多重核酸扩增体系的构建(mLAMP、mRPA、

mSRCA 等),例如:与 PCR 和 CRISPR 联用实现信号放大;与 PMA 联用实现活的致病菌检测;与功能性磁珠联用,实现致病菌或 DNA 的富集等;(2)基质的选择:研究者在选取实验基质时,不再仅仅选取菌液和牛奶等成分简单的样本,而是结合致病菌的污染特性选取更合适的实验样本,例如:沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌更易污染肉类和糕点类食品,副溶血性弧菌更易污染水产品等;(3)检出限:研究者构建了具有较低检出限的扩增体系,且对样本进行富集操作可以进一步降低检出限,提高检测灵敏度,对低污染度样本具有较大应用前景;(4)判读方法的选择:研究者更倾向于选择直接便携的可视化判读方法(LFA、颜色可视法、荧光可视法和沉淀可视法等)进行体系构建。可视化判读可以摆脱对仪器和场所的依赖,在食物中毒等突发情况和基层企业的大批量样本筛查等场景具有极大发展潜力。

4 共性问题和解决措施

现行食源性致病菌国家检验标准中仍以传统培养法和 PCR 法为主,等温核酸扩增技术中,仅有 LAMP 和 CPA 应用于食源性致病菌检测,并建立了一系列的进出口检验检疫行业标准(SN/T 2754 系列标准和 SN/T 3567 系列标准)和少量地方标准。重组酶介导链替换核酸扩增法(recombinase-aid amplification, RAA)是与 RPA 扩增原理相似的一种国产扩增技术,二者的区别在于酶和蛋白来源不同,海关总署基于 RAA 建立了一系列出口食品的动物源性成分检测标准(SN/T 5227 系列标准)。等温核酸扩增技术具有众多优势,但未能大量应用于相关检验标准的制定,主要原因仍是其技术上存在以下共性问题。

4.1 样品前处理

其一,现场检测时难以实现现场核酸提取和纯化,无法实现全过程现场检测。为了解决该难题,LI 等^[65]构建了包括核酸提取、核酸扩增和视觉检测的一体化平台,以此为参考,未来可以研发更多样化的一体化检测平台或试剂盒,减少外源气溶胶污染的可能,且增加便携性,有助于等温核酸扩增技术在应急处理等快速筛查场景的推广应用。其二,对样本进行预增菌可提高食源性致病菌检出率,但预增菌一般花费时间较长。为了缩短前处理时间,可使用功能性磁珠^[14,51]对食源性致病菌进行富集,或采用 FTA 膜^[56]或经壳聚糖修饰的二氧化硅膜^[65]对细菌裂解后释放的 DNA 和 RNA 进行高度富集。无论是富集食源性致病菌还是富集核酸,都能大幅度缩短整个检验过程所需时长,提高检验灵敏度,更好地发挥等温核酸扩增技术扩增快速的优势。其三,传统的 DNA 等温核酸扩增无法区分死菌与活菌,导致结果可能出现假阳性。建议利用 PMA 染料能特异区分死活菌的特性,将其与等温核酸扩增技术结合,实现样本中活的食源性致病菌的检测,降低检测假阳性。

表 1 等温核酸扩增技术关键信息
Table 1 Key information of isothermal nucleic acid amplification technologies

方法	发明年份	发明国家	引物数量	酶种类	是否预加热	扩增温度/°C	扩增时间/min	模板	产物	结果判读	优势	劣势	参考文献
LAMP	2000	日本	4~6	Bst DNA 聚合酶	否	60~65	40~60	DNA	DNA	AGE、RF、FLA 油度法、传感器、化学可视法	特异性高、灵敏度高、扩增效率高, 检测方式多样	靶序列短, 引物设计复杂, 假阳性高, 易污染, 非特异性扩增难以区分	[3]
IMSA	2013	中国	6	Bst DNA 聚合酶	否	60~65	60	DNA	DNA	AGE、RF、化学可视法	灵敏度高、特异性强、成本低、结果易判读	靶序列短, 引物设计复杂, 假阳性高, 易污染, 非特异性扩增难以区分	[18]
CPA	2008	中国	4~5	Bst DNA 聚合酶, 甜菜碱	否	63	60	DNA	DNA	AGE、FLA、化学可视法	具有完全自主知识产权、操作简单	反应体系复杂, 方法不稳定, 有假阳性现象	[24]
RPA	2006	英国	2	T4 uvsX 重组酶、Bsu 聚合酶	否	37~42	15~40	DNA	DNA	AGE、RF、FLA、化学可视法	检测极限低, 核心试剂易于保存, 有助于现场诊断	试剂昂贵、引物设计规则不明	[25]
HDA	2004	美国	2	UvrD 解旋酶、Exo-Klenow 聚合酶	否	37	100~120	DNA	DNA	AGE、RF、ELASA	原理简单, 具有高保真性, 引物设计难度较小	扩增效率受解旋酶解旋速度限制, 反应时间较长	[35]
SDA	1992	美国	4	限制性核酸内切酶、链置换活性 DNA 聚合酶	是	37~40	30~120	DNA	DNA	AGE、RF、FLA、化学可视法	高灵敏度, 简便, 反应速度快, 对设备要求低	酶选择复杂, 成本高, 产物不均一, 检测手段有待提高	[40]
SPIA	2005	美国	1	RNase H、强链置换活性的 DNA 聚合酶	是	55~60	30~60	DNA	DNA	AGE、RF、化学可视法	忠实性高, 单引物减少引物二聚体的形成, 不受 RNA 干扰	嵌合引物设计难度高, 模板是单链核酸, 需热变性处理	[43]
RCA	1995	美国	1~2	连接酶、φ29 DNA 聚合酶	否	30~65	60~90	单链环状 DNA	DNA	AGE、RF、FLA	高通量, 不易污染。产物经磷酸化后可直接测序	引物设计复杂, 酶价格高, 锁式探针合成困难	[48]
SRCA	2013	中国	2	Bst DNA 聚合酶	否	60~65	60~90	DNA	DNA	AGE、RF、FLA、ECI、化学可视法	无需人为环化模板, 缩短检测时间, 操作简便	需进行大量预实验筛选出 1 对特异性强的引物	[55]

注: 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELASA); 电化学法(electrochemical, ECI); 琼脂糖凝胶电泳(agarose gel electrophoresis, AGE); 实时荧光(real-time fluorescence, RF)。

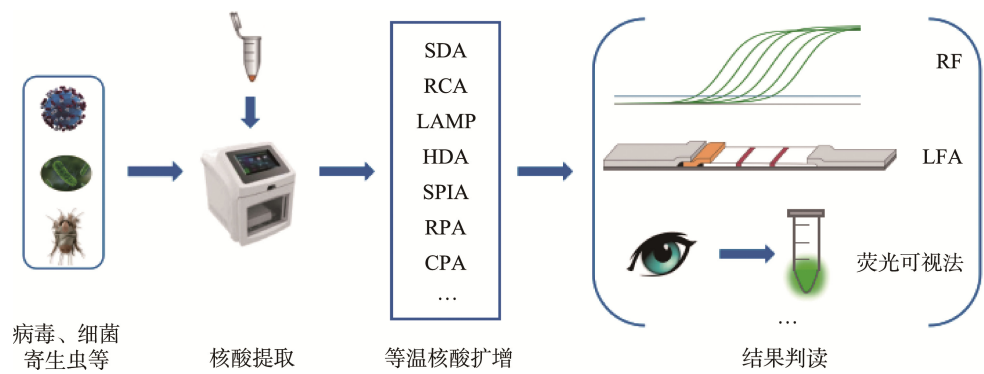


图 1 等温核酸扩增技术扩增流程图

Fig.1 Flow chart of isothermal nucleic acid amplification technology

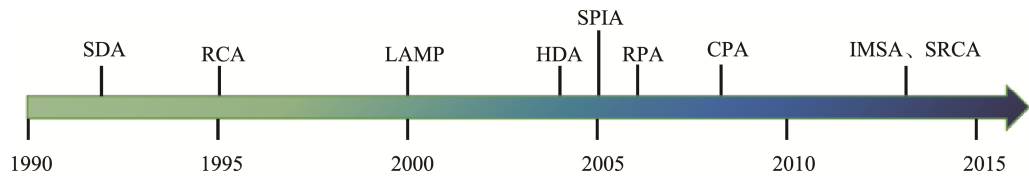


图 2 等温核酸扩增技术发展路线图

Fig.2 Development roadmap of isothermal nucleic acid amplification technology

表 2 等温核酸扩增技术在沙门氏菌检测中的应用

Table 2 Application of isothermal nucleic acid amplification in *Salmonella* detection

扩增方法	基质	扩增 温度/℃	扩增 时间/min	检出限	结果判读	参考文献
LAMP	橙汁、羊肉、虾等	65	60	4~6 CFU/25 g (mL)	LFA	[7]
PMA-CPA	年糕、馒头、米粉	65	60	10 ³ CFU/mL	颜色可视法	[22]
HDA	发酵乳	65	120	2.6×10 ² CFU/g	AGE	[37]
mRPA	菌液	37	15	10 CFU/mL	LFA	[27]
mSRCA	牛奶	62	45	10 CFU/mL	RF	[57]
PCR-RCA	牛奶	59	60	4.28 CFU/mL	荧光检测法	[49]
IMSA	面包	63	45	3.17 CFU/25 g (富集 6 h)	RF	[21]
PCR-SDA	菌液	62	15	22 copies/mL	酶标仪法	[42]

表 3 等温核酸扩增技术在单核细胞增生李斯特氏菌检测中的应用

Table 3 Application of isothermal nucleic acid amplification in *Listeria monocytogenes* detection

扩增方法	基质	扩增 温度/℃	扩增 时间/min	检出限	结果判读	参考文献
LAMP	金针菇	59.7	50	10 CFU/g	颜色可视法	[8]
mLAMP	菌液	65	60	10 ³ copies/μL	RGB 图像处理	[5]
SCRA	牛奶	65	75	4.4×10 ² CFU/mL	荧光可视法	[62]
PMA-SRCA	牛奶	62	40	15.6 CFU/mL	RF	[63]
Cas12a-RPA	牛奶	37	50	10 CFU mL	荧光可视法	[34]
mRPA	菌液	37	15	10 CFU/mL	LFA	[27]
SPIA	生鸡	61	/	1.4 CFU/g(荧光可视法) 14 CFU/g(沉淀可视法)	荧光可视法 沉淀可视法	[47]
SEA	猪肉	61	40	1.0 CFU/g(富集 4 h)	颜色可视法	[65]

注: /表示无此项。

表 4 等温核酸扩增技术在金黄色葡萄球菌检测中的应用
Table 4 Application of isothermal nucleic acid amplification in *Staphylococcus aureus* detection

扩增方法	基质	扩增 温度/°C	扩增 时间/min	检出限	结果判读	参考文献
LAMP	基因组 DNA	60	60	20 copies/反应	荧光可视法	[11]
RPA	猪肉、虾等	40~42	10	38 CFU/mL (g)	沉淀可视法	[29]
mRPA	牛奶、果汁	39	25	10 CFU/反应	AGE	[30]
PMA-SRCA	猪肉及其制品	61	50	66 CFU/g	荧光可视法	[58]
MS-RCA	果汁	37	60	3.3×10 ² CFU/mL	RF	[51]
Cas12a-SRCA	菌液	62	60	3 CFU/mL	ECI	[59]
IMSA	牛奶	63	45	10 ² CFU/mL	荧光可视法	[19]

表 5 等温核酸扩增技术在大肠埃希氏菌 O157:H7 检测中的应用
Table 5 Application of isothermal nucleic acid amplification in *Escherichia coli* O157:H7 detection

扩增方法	基质	扩增 温度/°C	扩增 时间/min	检出限	结果判读	参考文献
LAMP	牛肉	60	50	1.3 CFU/mL(富集过夜)	LFA	[13]
IMS-PMA-LAMP	生菜	63	40	81 CFU/g	LFA	[14]
Cas12a-LAMP	生菜	58.8	60	4.8 CFU/g	荧光可视法	[15]
RPA	牛肉、西兰花	39	15	7 CUF/25 g(富集 6 h)	LFA	[32]
mRPA	菌液	37	15	10 CFU/mL	LFA	[27]
SDA	牛奶、水、苹果汁	50	30	10 CFU/g(mL)	LFA	[41]
RCA	菌液	37	40	4×10 ³ CFU/mL	DNA 水凝胶可视法	[53]
IMSA	牛肉、羊肉	63	45	9.1 CFU/25g(富集 10 h)	RF	[20]

表 6 等温核酸扩增技术在副溶血性弧菌检测中的应用
Table 6 Application of isothermal nucleic acid amplification in *Vibrio parahaemolyticus* detection

扩增方法	基质	扩增 温度/°C	扩增 时间/min	检出限	结果判读	参考文献
tRCA-LAMP	牡蛎	65	50	22 CFU/g	RF	[12]
mRPA	鲑鱼、虾、鳕鱼	37	15	83 CFU/mL	LFA	[28]
Cas12a-RPA	虾	37	20	10 ² CFU/g	荧光可视法	[31]
PMA-SRCA	虾	62	95	2.08×10 ¹ CFU/g	RF	[60]
Cas12a-SRCA	菌液	62	50	3.6 CFU/mL	荧光分光光度法	[61]
SPIA	牡蛎	61	30~60	42 CFU/g	荧光可视法	[46]
RAA-CRISPR	虾	37	30	73 CFU/g	RF	[66]

4.2 引物设计

部分等温核酸扩增技术引物复杂, 设计难度大, 目前没有较为成熟统一的设计方法和软件。ZHANG 等^[12]将 tRCA 与 LAMP 结合, 仅借助 LAMP 其中的 2 条引物完成扩增, 摆脱了复杂的引物设计过程。核酸等温扩增技术的发展及市场应用, 需克服引物设计的难关, 等温核酸扩增技术之间互相融合, 无疑为克服引物设计难题提供了新思路。未来的研究中, 可考虑开发成熟的引物设计软件以助力等温核酸技术发展。

4.3 结果判读

目前等温核酸扩增技术常用的结果判读法包括 AGE、RF、LFA、荧光可视法、沉淀可视法、免疫磁珠技术、微流控芯片、化学可视化反应等, 方法虽多但如何与扩增方法实

现完美契合仍需继续摸索。因不同等温核酸扩增技术特点不同, 产物组成不同, 需根据其特点选择合适的结果判读方法, 如 LAMP、IMSA 和 CPA 等多引物扩增技术, 其扩增产物长度呈阶梯状, 电泳检测时易出现拖尾现象; 如 LAMP 的荧光可视法需加入 SYBR Green 染料, 加入染料的过程容易造成二次污染。在实际应用中, 各个判读方法各有利弊, 需根据实际需求进行大量实验探索后进行优化选择。

4.4 检测灵敏度

绝大多数等温核酸扩增方法的灵敏度与经典荧光定量 PCR 相比, 仍有一定差距。为了提高检测灵敏度, 可以借助不同方法实现信号的二次放大, 例如 CRISPR/Cas 系统能特异性地识别靶标 DNA 并裂解单链报告荧光探针^[15,31,34,59], Cas12、Cas13、Cas14 和 Cas9 都能将等温核酸扩增提升到

更灵敏、更特异、更高效的水平,二者的结合在检测领域具有极大的发展潜力。另外,将 PCR 与等温核酸扩增技术相结合^[43,49,54],PCR 扩增为等温核酸扩增积累的大量引物进一步触发等温核酸扩增反应,实现信号二次放大,确保实验的灵敏度,对低丰度 DNA 样本具有较大应用前景。

4.5 检测通量

为提高等温核酸扩增的检测通量,较多研究者在单个等温核酸扩增反应中添加多组引物以实现多靶标检测,即多重等温核酸扩增^[27,28,30,57]。JIN 等^[27]将多重 RPA 与 LFA 结合,通过在试纸条上标记 5 种不同抗体,实现了多重扩增产物在同一试纸条上进行结果检测的效果,该方法能够同时对 5 种食源性致病菌进行定量检测,且检出限低至 10 CFU/mL。多重等温核酸扩增虽提高了检测通量,但与 RPA 等本身引物较少的等温核酸扩增技术较为契合,而 LAMP、IMSA 和 CPA 等引物较多,多重扩增将导致体系更加复杂化,致使灵敏度降低,且增加了非特异性扩增的可能。目前热门的微流控芯片也能有效调高检测通量,伴随着微流控芯片的发展,等温核酸扩增的体系逐渐缩小,将核酸的提取、扩增、检测集约在小型芯片上,单位面积内可容纳多个独立的反应体系,可以有效解决检测通量较低的问题。

5 结论与展望

目前,等温核酸扩增技术虽存在较多技术难点,但弥补了常规 PCR 对场地和仪器的依赖,大幅度缩短了检测周期,在食源性致病菌的快速检测中具有极大的发展潜力,是食源性致病菌核酸检测技术未来发展的方向。在未来的研究中,等温核酸扩增技术仍需以一体化、高通量化、多重化和便捷化为研究目标,从各个技术难点出发,优化前处理方法、引物设计方法、产物检测方法等以提高检测效率;与微流控芯片、试纸条和单管多重核酸扩增等学科交叉技术相结合,提高检测通量;研发小型化仪器或无仪器的结果判读,增加便捷性;研发完善国产核酸等温扩增技术,打破技术壁垒。只有更好地发挥等温核酸扩增快速、灵敏、便捷的特点,才能为食品安全检测的发展提供更强大的技术支持。

参考文献

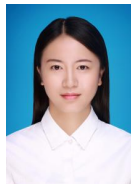
- [1] XIA XH, YANG H, CAO JJ, *et al.* Isothermal nucleic acid amplification for food safety analysis [J]. *Anal Chem*, 2022, 153: 116641.
- [2] 陆璐, 邱万伟, 丁巧玲, 等. 基于核酸等温扩增的侧流层析试纸条在病原微生物检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1462–1470.
LU L, QIU WW, DING QL, *et al.* Research progress of side flow chromatography strip based on isothermal amplification of nucleic acid in the detection of pathogenic microorganisms [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(5): 1462–1470.
- [3] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [4] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol Cell Probe*, 2002, 16(3): 223–229.
- [5] 姚延禄, 曹宁, 周新丽. 基于环介导等温扩增的离心式微流控芯片检测 3 种致病菌[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(5): 255–261.
YAO YL, CAO N, ZHOU XL. The detection of three pathogens bacteria by centrifugal microfluidic chip based on LAMP methodology [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(5): 255–261.
- [6] VITTAL R, MOHANRAJ JR, CHAKRABORTY G. Rapid detection of *Salmonella* spp. from meat: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2022, 16(2): 929–936.
- [7] ZHANG Y, FARWIN A, YING JY. Directly interface microreaction tube and test strip for the detection of *Salmonella* in food with combined isothermal amplification and lateral flow assay [J]. *Food Microbiol*, 2022, 107: 104062.
- [8] LEE JE, KIM SA, MUN H, *et al.* A rapid and colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on HRP-mimicking molecular beacon for the detection of major 6 *Listeria* species in enoki mushroom [J]. *Food Control*, 2022, 133: 108569.
- [9] SRISAWAT W, SAENGTHONGPINIT C, NUCHCHANART W. Development of loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick as a rapid screening test for detecting *Listeria monocytogenes* in frozen food products using a specific region on the ferrous iron transport protein B gene [J]. *Vet World*, 2022, 15(3): 590–601.
- [10] 邹作成, 王西, 刘雪兰, 等. 基于 *nuc* 基因的环介导等温核酸扩增(LAMP)可视化技术检测食源性金黄色葡萄球菌[J/OL]. *中国动物传染病学报*: 1-7. [2022-10-11]. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210629.009
ZOU ZC, WANG X, LIU XL, *et al.* Development of loop mediated isothermal amplification (LAMP) visualization technique based on *nuc* gene for detection of food borne *Staphylococcus aureus* [J/OL]. *Chin J Anim Infect Dis*: 1-7. [2022-10-11]. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210629.009
- [11] 王芳, 董菁, 李艳妮, 等. 基于核酸分子光开关的闭环可视化环介导等温扩增检测方法[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(4): 646–651.
WANG F, DONG J, LI YN, *et al.* A visualized closed-tube detection method for loop-mediated isothermal amplification based on nucleic acid molecular light switch [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(4): 646–651.
- [12] ZHANG BY, SUN WH, RAN LL, *et al.* Anti-interference detection of *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic food based on target-cyclized RCA with dynamic adapter followed by LAMP [J]. *Foods*, 2022, 11(3): 352.
- [13] XIA XF, ZHANG BC, WANG J, *et al.* Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by loop-mediated isothermal amplification coupled with a lateral flow assay targeting the *z3276* genetic marker [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15: 908–916.
- [14] WEN YY, TAN YJ, ZHAO LC, *et al.* Rapid on-site detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce using immunomagnetic separation combined with PMAXX-LAMP and nucleic acid lateral flow strip [J]. *Microchem J*, 2022, 178: 107348.
- [15] LEE SY, OH SW. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Talanta*, 2022, 241: 123186.
- [16] FU SQ, QIN X, WANG ZH, *et al.* Screening of specific nucleic acid targets for *Cronobacter sakazakii* and visual detection by loop-mediated isothermal amplification and lateral flow dipstick method in powdered

- infant formula [J]. J Dairy Sci, 2021, 104(5): 5152–5165.
- [17] YANG XY, JIANG YJ, SONG Y, *et al.* Point-of-care and visual detection of *Salmonella* spp. and *Cronobacter* spp. by multiplex loop-mediated isothermal amplification label-based lateral flow dipstick in powdered infant formula [J]. Int Dairy J, 2021, 118: 105022.
- [18] 马学军, 丁雄, 聂凯, 等. 新型等温自配引发扩增技术(IMSAs): 中国, CN104388581A[P]. 2015-03-04.
- MA XJ, DING X, NIE K, *et al.* A new isothermal multiple self matching initiation amplification technique (IMSAs): China, CN104388581A [P]. 2015-03-04.
- [19] CHEN XL, WANG HH, LIU C, *et al.* Technical note: Development of a closed-tube isothermal multiple self-matching-initiated amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk samples [J]. J Dairy Sci, 2021, 104(3): 3569–3574.
- [20] 王琪, 徐文娟, 石盼盼. IMSA 技术快速检测肠出血大肠杆菌 O157:H7 方法的建立及应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 263–269.
- WANG Q, XU WJ, SHI PP. Development and application of IMSA for rapid detection of enterohaemorrhage *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(17): 263–269.
- [21] 乐振涛, 陈东才, 张细玲, 等. IMSA 技术快速检测沙门氏菌方法的建立及应用[J]. 生物技术, 2020, 30(3): 255–261, 274.
- LE ZQ, CHEN DC, ZHANG XL, *et al.* Establishment and application of IMSA technology in the rapid detection on *Salmonella* [J]. Biotechnology, 2020, 30(3): 255–261, 274.
- [22] OU AF, WANG K, YE YR, *et al.* Direct detection of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella* in real food system by a rapid and accurate PMA-CPA technique [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 634555.
- [23] 丛秋实, 师东方. 鸡肠炎沙门氏菌可视化交叉引物等温扩增检测技术的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(11): 1171–1177.
- CONG QS, SHI DF. Application and preliminary application of visual cross priming amplification in detection of *Salmonella enteritidis* [J]. Chin J Prev Vet Med, 2021, 43(11): 1171–1177.
- [24] 李雪彤. RT-qSCPA 及 CPAP 可视化方法快速检测副溶血弧菌体系建立 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- LI XT. Establishment of rapid detection system of *Vibrio parahaemolytica* by RT-QSCPA and CPAP visualization methods [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [25] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, *et al.* DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204.
- [26] LI XM, ZHENG T, XIE YN, *et al.* Recombinase polymerase amplification coupled with a photosensitization colorimetric assay for fast *Salmonella* spp. testing [J]. Anal Chem, 2021, 93(16): 6559–6566.
- [27] JIN B, MA B, LI JL, *et al.* Simultaneous detection of five foodborne pathogens using a mini automatic nucleic acid extractor combined with recombinase polymerase amplification and lateral flow immunoassay [J]. Microorganisms, 2022, 10(7): 1352.
- [28] MA B, LI JL, CHEN K, *et al.* Multiplex recombinase polymerase amplification assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens in seafood [J]. Foods, 2020, 9(3): 278.
- [29] HU JQ, WANG Y, DING HM, *et al.* Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 331: 108691.
- [30] TRAN DH, TRAN HT, PHAM TNM, *et al.* Direct multiplex recombinase polymerase amplification for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in food [J]. Mol Biol Res Commun, 2022, 11(1): 1–10.
- [31] JIANG HJ, TAN R, JIN M, *et al.* Visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* using combined CRISPR/Cas12a and recombinase polymerase amplification [J]. Biomed Environ Sci, 2022, 35(6): 518–527.
- [32] ZHAO LW, WANG JF, CHEN MN, *et al.* Development and application of recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of *Escherichia coli* O157 in food [J]. Food Anal Method, 2022, 15: 1843–1850.
- [33] DU XJ, ZANG YX, LIU HB, *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for *Listeria monocytogenes* detection in food [J]. J Food Sci, 2018, 83(4): 1041–1047.
- [34] TIAN YC, LIU T, LIU C, *et al.* An ultrasensitive and contamination-free on-site nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR-Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification [J]. LWT-Food Sci Technol, 2021, 152: 112166.
- [35] GARCÍA SB, CASTRO RM, ÁLVAREZ NLS, *et al.* Helicase-dependent isothermal amplification: A novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(3): 679–693.
- [36] DU XJ, ZHOU TJ, LI P, *et al.* A rapid *Salmonella* detection method involving thermophilic helicase-dependent amplification and a lateral flow assay [J]. Mol Cell Probes, 2017, 34: 37–44.
- [37] 王赞, 李献, 王慧, 等. 发酵乳中沙门氏菌依赖解旋酶恒温基因扩增快速检测方法的建立[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(4): 5.
- WANG Z, LI X, WANG H, *et al.* Helicase-dependent isothermal DNA amplification for rapid detection of *Salmonella* in fermented milk [J]. J Dairy Sci Technol, 2021, 44(4): 5.
- [38] 韩灵芝, 马翠萍, 牛淑妍. 依赖解旋酶等温核酸扩增方法检测副溶血性弧菌[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2018, 39(S1): 17–20.
- HAN LZ, MA CP, NIU SY. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by helicase dependent isothermal nucleic acid amplification method [J]. J Qingdao Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2018, 39(S1): 17–20.
- [39] XU D, MING X, GAN M, *et al.* Rapid detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula by thermophilic helicase-dependent isothermal amplification combined with silica-coated magnetic particles separation [J]. J Immunol Methods, 2018, 462: 54–58.
- [40] WALKER GT, FRAISER MS, SCHRAM JL, *et al.* Strand displacement amplification-an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique [J]. Nucl Acids Res, 1992, 20(7): 1691–1696.
- [41] WU W, ZHAO S, MAO Y, *et al.* A sensitive lateral flow biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification [J]. Anal Chim Acta, 2015, 861: 62–68.
- [42] ZHANG Y, LI ST, TIAN JJ, *et al.* Universal linker polymerase chain reaction-triggered strand displacement amplification visual biosensor for ultra-sensitive detection of *Salmonella* [J]. Talanta, 2021, 222: 121575.
- [43] KURN N, CHEN P, HEATH JD, *et al.* Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications [J]. Clin Chem, 2005, 51(10): 1973–1981.
- [44] 明若阳, 张蕴哲, 杨倩, 等. 实时荧光单引物等温扩增技术检测牛乳中的金黄色葡萄球菌[J]. 食品科技, 2018, 43(8): 325–329.
- MING RY, ZHANG YZ, YANG Q, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by real-time fluorescence single primer isothermal amplification [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(8): 325–329.
- [45] 王妙妹, 范春刚, 郑玮丽, 等. 可视化单引物等温扩增技术检测发酵乳

- 制品中沙门氏菌的研究[J]. 农产品加工, 2021, (17): 53–56.
- WANG MS, FAN CG, ZHENG WL, *et al.* Study on detection of *Salmonella* in fermented dairy products by visual single primer isothermal amplification method [J]. *Farm Prod Process*, 2021, (17): 53–56.
- [46] YANG Q, GUO W, LIU Y, *et al.* Novel single primer isothermal amplification method for the visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Anal Method*, 2021, 14: 1995–2002.
- [47] YANG Q, XU H, ZHANG YZ, *et al.* Single primer isothermal amplification coupled with SYBR Green II: Real-time and rapid visual method for detection of *Listeria monocytogenes* in raw chicken [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 128: 109453.
- [48] FIRE A, XU SQ. Rolling replication of short DNA circles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4641–4645.
- [49] 刘健慧, 张先舟, 张蕴哲, 等. 基于 G-四链体的 PCR-RCA 双重扩增技术检测沙门氏菌[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 325–333.
- LIU JH, ZHANG XZ, ZHANG YZ, *et al.* Detection of *Salmonella* by G-quadruplex based PCR-RCA double amplification [J]. *Food Sci*, 2022, 43(12): 325–333.
- [50] XIE GY, ZHAN ZX, YE Y, *et al.* Hybrid RCA-DLS assay combined with a PCR for sensitive *Salmonella enteritidis* detection [J]. *Anal Biochem*, 2022, 646: 114647.
- [51] WANG YT, WANG ZZ, ZHAN ZX, *et al.* Fluorescence detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin functionalized magnetic beads combined with rolling circle amplification in fruit juice [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1189: 339213.
- [52] 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.
- [53] 张彤, 陶晴, 卞晓军, 等. 基于滚环扩增技术的 DNA 水凝胶用于大肠杆菌 O157:H7 的可视化快速检测[J]. 分析化学, 2021, 49(3): 377–386.
- ZHANG T, TAO Q, BIAN XJ, *et al.* A DNA hydrogel based on roll ring amplification technique was used for visual and rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(3): 377–386.
- [54] LIU J, ZHAN ZG, LIANG TB, *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.
- [55] 孟兆祥, 张伟, 檀建新, 等. 一种 DNA 扩增的新技术: 利用热稳定的 Bst DNA 聚合酶驱动跨越式滚环等温扩增反应[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(9): 892–898.
- MENG ZX, ZHANG W, TAN JX, *et al.* A new method: Thermo-stable Bst DNA polymerase drives saltatory rolling circle amplification [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2013, 29(9): 892–898.
- [56] 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 saltatory rolling circle amplification combined with FTA card [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(4): 275–283.
- [57] GUO W, YANG Q, LIU J, *et al.* Multiple fluorescent saltatory rolling circle amplification (SRCA) for simultaneous and sensitive detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in food [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 168: 113875.
- [58] GUO W, YANG Q, ZHANG YZ, *et al.* Rapid and visual detection of viable *Staphylococcus aureus* in pork and pork products by PMA and saltatory rolling circle amplification [J]. *Eur Food Res Technol*, 2022, 248: 1625–1634.
- [59] HUANG LQ, YUAN N, GUO W, *et al.* An electrochemical biosensor for the highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* based on SRCA-CRISPR/Cas12a [J]. *Talanta*, 2022, 252: 123821.
- [60] 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]. 食品科学, 2021, 42(24): 289–295.
- DONG J, XU H, GUO W, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in edible crustaceans by fluorescence saltatory rolling circle amplification combined with propidium monoazide [J]. *Food Sci*, 2021, 42(24): 289–295.
- [61] 董换哲, 苑宁, 张蕴哲, 等. 跨越式滚环等温扩增技术结合 CRISPR/Cas12a 定量检测海产品中的副溶血性弧菌[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 289–295.
- DONG HZ, YUAN N, ZHANG YZ, *et al.* Saltatory rolling circle amplification combined with CRISPR/Cas12a for quantitative detection *Vibrio parahaemolyticus* in sea foods [J]. *Food Sci*, 2022, 43(14): 289–295.
- [62] PRASAD MCB, MILTON AAP, MENON VK, *et al.* Saltatory rolling circle amplification assay for simple and visual detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products [J]. *Int Dairy J*, 2022, 137: 105498.
- [63] 王新潮, 张蕴哲, 杨倩, 等. PMA-RF-SRCA 检测乳中单增李斯特氏菌活菌[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(8): 48–52, 57.
- WANG XC, ZHANG YZ, YANG Q, *et al.* Detection of live *Listeria monocytogenes* in milk by real-time fluorescence saltatory rolling circle amplification combined with propidium monoazide [J]. *China Dairy Ind*, 2022, 50(8): 48–52, 57.
- [64] ZHANG YZ, 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.
- [65] LI Y, YAN CY, CHEN J, *et al.* An all-in-one nucleic acid enrichment and isothermal amplification platform for rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2022, 139: 109096.
- [66] LV XR, CAO WW, ZHANG H, *et al.* CE-RAA-CRISPR assay: A rapid and sensitive method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Foods*, 2022, 11(12): 1681.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



秦爱, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为分子生物学和食品微生物学检验。
E-mail: qinai4846@163.com

李根容, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品、食品相关产品及化工产品安全检验。

E-mail: 734253977@qq.com