

重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展

王 帅^{1,2}, 杨艳歌², 吴占文^{1,2}, 李红娜², 李 涛², 孙冬梅^{1,*}, 袁 飞^{2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163000;

2.中国检验检疫科学研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全), 北京 100176)

摘要: 随着人民生活水平的提高, 食品安全问题也越来越受到社会关注, 其中生物(微生物)因子是影响食品安全的最主要因素。食品安全研究领域针对生物(微生物)因子的检测技术众多, 其中等温扩增技术因不需依赖复杂的仪器设备, 能够快速、准确地进行生物成分检测而被广泛应用, 尤其是新发展起来的重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、重组酶介导等温扩增(recombinase-aided amplification, RAA)和酶促重组等温扩增(enzymatic recombinase amplification, ERA)技术。这3种等温扩增技术相对于其他等温扩增技术具有反应条件更温和、引物设计更简单等优点, 且检测原理相似, 本文对这3种技术进行对比研究, 从原理、概念以及近年来在食源性致病菌快速检测方面的研究应用情况进行综述, 概括其在食品检测中的优势和面临的实际问题, 并对未来的发展前景进行展望。

关键词: 重组酶聚合酶扩增; 重组酶介导等温扩增; 酶促重组等温扩增; 食源性致病菌; 快速检测

A Review of the Application of Recombinase Polymerase Amplification, Recombinase-Aided Amplification and Enzymatic Recombinase Amplification in Rapid Detection of Foodborne Pathogens

WANG Shuai^{1,2}, YANG Yange², WU Zhanwen^{1,2}, LI Hongna², LI Tao², SUN Dongmei^{1,*}, YUAN Fei^{2,*}

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China; 2. Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: With the improvement of people's living standards, food safety has attracted more and more social attention. Organisms, especially microorganisms, are the most important factor that affects food safety. There are many methods currently available to detect biological (microbial) factors in the field of food safety, including isothermal amplification technology especially the new techniques of recombinase polymerase amplification (RPA), recombinase-aided amplification (RAA) and enzymatic recombinase amplification (ERA), which is widely used for food safety detection because it can detect biological ingredients rapidly and accurately without relying on complicated instruments. The three isothermal amplification techniques require milder reaction conditions and simpler design of primers than others, despite having similar principles. In this article, we review the principles and concepts of these techniques and their recent application in the rapid detection of food pathogens, summarize their advantages and problems in food inspection, and present future prospects.

Keywords: recombinase polymerase amplification; recombinase-aided amplification; enzymatic recombinase amplification; foodborne pathogens; rapid detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220526-322

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)09-0297-09

收稿日期: 2022-05-26

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1603606; 2018YFC1603500);

中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项(2020JK012)

第一作者简介: 王帅(1998—)(ORCID: 0000-0002-3153-7906), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: 15846761937@163.com

*通信作者简介: 孙冬梅(1971—)(ORCID: 0000-0002-9480-8742), 女, 教授, 博士, 研究方向为应用微生物学。

E-mail: sdmlzw@126.com

袁飞(1974—)(ORCID: 0000-0002-7215-1989), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食源性病原微生物。

E-mail: feiyuan@163.com

引文格式:

王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297-305. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220526-322. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Shuai, YANG Yange, WU Zhanwen, et al. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2023, 44(9): 297-305. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220526-322. <http://www.spkx.net.cn>

民以食为天, 食以安为先。食品安全问题关系到人民群众的生命安全, 是关系到中华民族的未来, 因此我国党和政府高度重视食品安全问题。致病性微生物污染是造成食品安全问题最主要的因素。据统计, 美国每年因食源性致病微生物造成的经济损失高达65亿~349亿美元^[1]。近年来, 我国食物中毒事件频发, 2008—2015年因致病微生物造成的食品安全事件占食物中毒总量的74%^[2]。因此, 食源性致病微生物的快速筛查和风险控制是保证食品安全的刚性需求。随着食品流通速度的不断加快, 操作繁琐、耗时较长的传统检测方法越来越不能满足食品安全检测的需要。因此, 开发使用便捷、耗时较短的快速检测方法是保证当今时期食品安全的重要措施之一。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是替代传统培养法的有力手段, 是公认最可靠的快速筛查技术, 具有准确、快速、灵敏、重复性好、容易标准化等优点, 目前已在食品检测领域占有重要地位^[3]。然而, PCR需要变性、退火、延伸3个不同温度的循环反应, 需要依赖能够迅速调节温度的变温设备完成检测, 如PCR仪。然而PCR仪的精密性导致该方法不适合在环境复杂的检测现场使用。等温扩增技术 (isothermal amplification technology, IAT) 是指在某一恒定温度下即可完成核酸扩增的技术。这类技术无需PCR仪等精密仪器, 适用于进行现场快速检测^[4]。其中重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)、重组酶介导等温扩增 (recombinase-aided amplification, RAA) 和酶促重组等温扩增 (enzymatic recombinase amplification, ERA) 技术均可在37~42 °C下完成扩增, 具有反应温度更低、反应速率更快、灵敏度更高、引物设计更简单等特点, 成为了目前学者们研究快速检测方法时关注的热点。

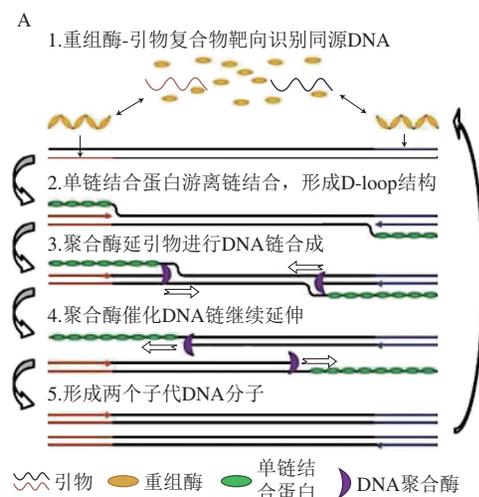
研究发现, 这3种IAT技术具有很多相似之处, 目前虽有文献综述了RPA技术在医学检验、微生物检测的研究情况, 然而尚缺乏3种IAT技术的比较研究及在食源性致病微生物快速检测方面的综述。因此本文通过比较RPA、RAA及ERA技术的原理及区别, 总结和分析

这3种IAT技术在食源性致病菌快速检测方面的研究进展, 并展望该领域未来的发展前景, 以期对相关领域研究提供参考。

1 RPA、RAA和ERA概述

1.1 RPA、RAA和ERA反应原理

Piepenburg等^[5]于2006年首次提出RPA技术, 其通过重组酶、重组酶加载因子和单链结合蛋白与引物和靶序列的相互作用, 完成核酸靶序列的体外扩增。具体反应流程为: T4 UvsX蛋白在T4 UvsY蛋白的帮助下与引物结合形成复合体, 这种复合体能够识别模板DNA上的靶序列并将靶序列周围的DNA双链结构打开形成置换环 (displacement loop, D-loop) 结构; 此时T4 gp32蛋白会与单链DNA结合, 阻止DNA重新形成双链结构; 接下来, 由反应体系中的ATP供能, T4 UvsX蛋白与引物脱离, 引物在DNA聚合酶的作用下从3'端开始延伸, 形成新的DNA链。RPA技术反应原理如图1A^[6]所示。RAA技术与RPA的反应原理相似^[7], 区别在于变换了反应体系中的关键酶和蛋白, RAA技术反应原理如图1B^[8]所示。于继彬等^[9]在2019年开发出ERA技术, 该技术与RPA和RAA具有相似之处, 不同点在于该反应所依赖的重组酶来源于低温噬菌体, 并且对特定位点氨基酸进行修饰, 具有良好的扩增速度和特异性, 反应原理如图1C^[9]所示。



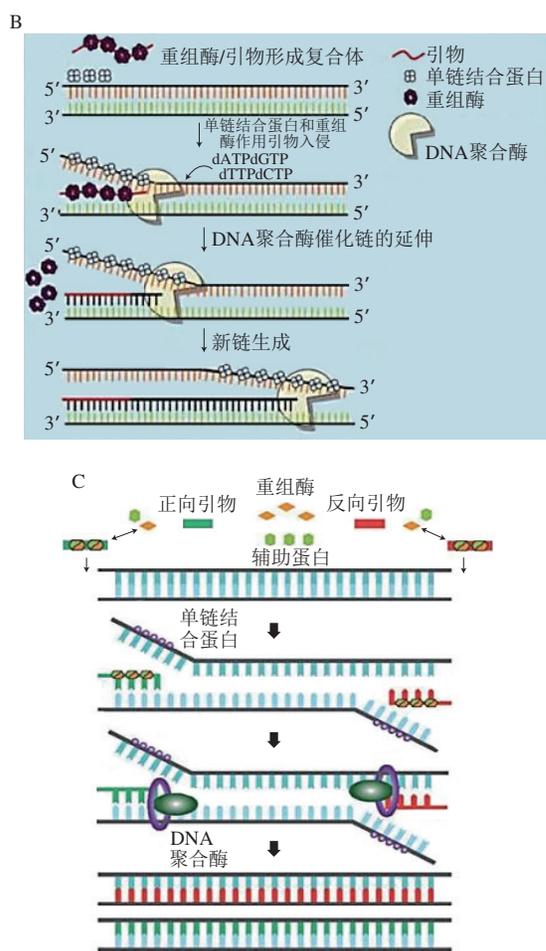


图1 RPA (A)、RAA (B) 和ERA (C) 反应原理图^[6,8-9]

Fig. 1 Schematic diagrams of the principles of RPA (A), RAA (B) and ERA (C)^[6,8-9]

1.2 RPA、RAA和ERA的异同

RPA、RAA和ERA这3种技术的反应原理、条件等都十分相似，最大的区别在于使用的酶和蛋白来源不同。目前研究中3种技术的相同点在于：1) 反应原理。这3种技术均是利用UsvX蛋白具有DNA依赖性的ATP酶活性，能在gp32蛋白存在且与单链DNA结合的情况下，通过水解ATP产能置换与单链DNA同源的双链DNA片段形成D-loop结构。2) 反应条件。这3种技术所需要的反应温度均在40℃左右，反应引物都只需要1对。3) 反应

体系。这3种技术均需要聚乙二醇、二硫苏糖醇、醋酸镁等成分，其中镁离子作为关键辅助因子，其用量对检测结果具有重要影响，当镁离子浓度过高时，3种技术均会出现不同程度的非特异性扩增，浓度过低时则会导致3种技术检测时间延长。不同点在于3种技术的重组酶来源不同：RPA的重组酶来源于T4噬菌体^[6]；RAA的重组酶来源于细菌和真菌^[7]；ERA所用的重组酶则是将低温噬菌体的UsvX蛋白通过定点突变并进行人工筛选的重组蛋白。由于3种技术涉及的酶来源不同，相应的酶活力也各不相同：RAA采用的来源于细菌和真菌的DNA聚合酶和重组酶相较于RPA具有更高的活性^[7]；ERA技术使用的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和荧光假单胞菌来源DNA聚合酶活力高于大肠杆菌来源Klewnow exo-聚合酶^[8-9]。这3种技术中涉及的差异成分如表1所示。

1.3 RPA、RAA和ERA的引物设计

由于RPA、RAA和ERA具有独特的37~42℃反应条件，因此对引物的设计有着严格的要求，普通PCR引物不适用，这3种技术要求的引物比一般PCR的引物长，通常以28~35 nt为宜。引物过短会降低重组率，影响扩增速度和检测灵敏度。引物过长则在扩增过程中可能会产生二聚体或者发卡结构等其他二级结构，从而影响核酸扩增的产量。并且在设计引物时，变性温度不再是影响扩增引物的关键因素，所以在设计引物时无需考虑其 T_m 。此外引物GC碱基含量应在40%~60%且连续GC碱基不能超过4个^[10]，引物中应避免能形成二聚体的结构；虽然已有报道的最长扩增片段为1 941 bp^[11]，但根据3种技术开发提供的引物设计建议，扩增片段范围最好在80~300 bp之间，扩增片段过长或过短会导致DNA扩增的效果降低，同时也会降低反应的灵敏性。

构建荧光型RPA、RAA和ERA技术还需要设计特殊的探针。这类探针较TaqMan探针有更高的设计要求。荧光型RPA、RAA和ERA探针要求在序列中间位置设计，长度46~52 bp^[8-10]；其中四氢呋喃（tetrahydrofuran, THF）位点的5'端一般至少30 bp，3'端一般至少15 bp。荧光团与猝灭团只能标记在胸腺嘧啶上，荧光团与猝灭团间距在1~5 bp，因为更大的间隔会导致基底值偏高、信噪比偏低，从而降低猝灭效率。

表1 RPA、RAA和ERA差异成分
Table 1 Comparison of RPA, RAA and ERA

试剂种类	差异成分/来源		
	RPA	RAA	ERA
DNA重组酶	T4噬菌体	天蓝色链霉菌重组酶；枯草芽孢杆菌重组酶；酿酒酵母重组酶；大肠杆菌解旋酶RecQ	与低温噬菌体UsvX蛋白具有相同功能的突变体
重组酶辅助因子	T4 UsvY蛋白	UsvY（来自T4、T6噬菌体的重组蛋白）	与低温噬菌体UsvY蛋白具有相同功能的突变体
单链结合蛋白	T4 gp32蛋白	大肠杆菌SSB蛋白	与低温噬菌体gp32蛋白具有相同功能的突变体
DNA聚合酶	<i>Bsu</i> DNA聚合酶大片段或 <i>Sau</i> DNA聚合酶大片段	大肠杆菌重组Klewnow exo-聚合酶	金黄色葡萄球菌聚合酶I大片段或枯草芽孢杆菌聚合酶I大片段或荧光假单胞杆菌聚合酶I大片段
肌酸激酶	来源不明	来源不明	G268N突变型兔肌激酶或鳀肌激酶

两者中间1个核苷酸用THF取代,且荧光团或猝灭团与THF碱基间隔为0、1 bp或2 bp。探针的3'端需要加上阻断基团进行修饰封闭,如C3-间隔、磷酸盐、胺、生物素或四乙二醇等。

2 RPA、RAA和ERA技术研究进展

RPA和RAA技术在食源性致病微生物的检测方面已有广泛研究,ERA技术作为新兴的一种IAT技术,现有报道主要集中在病毒检测方面,鲜有应用于食源性致病微生物检测的报道。为促进食源性致病微生物检测研究,本文综述这3种技术的国内外研究及应用进展。

2.1 RPA研究进展

2.1.1 发文量统计

RPA技术作为上述3种技术中创立时间最早的IAT技术,相关研究最为深入。分别在PubMed和中国知网两个数据库中以“Recombinase Polymerase Amplification”“重组酶聚合酶扩增技术”作为主题词进行检索,发表时间范围限定为2006—2021年。相关文献的数量如图2所示。距离Piepenburg等^[5]首次提出RPA技术4年后,才出现关于RPA的研究报道,此后RPA技术相关发文量呈现逐年上升的趋势,2020年的两个数据库合计发文量达到了243篇,这些文章主要集中在食源性致病微生物和医学检测等方面,基本覆盖了常见的致病微生物。

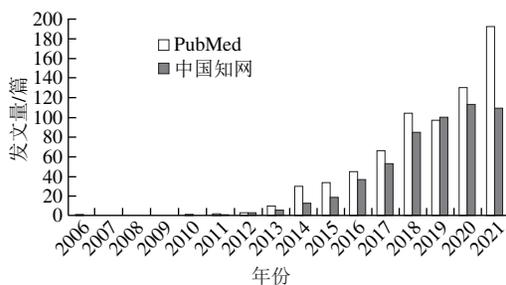


图2 2006—2021年PubMed和中国知网中出版的RPA相关文献的数量

Fig. 2 Number of RPA related articles published in PubMed and China National Knowledge Infrastructure from 2006 to 2021

2.1.2 RPA技术在食源性致病微生物检测方面的研究

目前应用RPA技术在食源性致病微生物检测方面的研究报道较多,其中,在对单一病原菌检测方面,何洁等^[12]根据单核细胞增生李斯特菌的溶血素基因*hlyA*设计了一对引物,经过实验证明该方法的特异性良好,检出限可低至0.5 ng/μL。刘立兵等^[13]针对产气荚膜梭菌*plc*基因设计了RPA引物探针和实时荧光定量PCR引物探针,实验结果显示两种方法的检出限均为10² CFU/g,但RPA方法耗时(20 min)明显短于实时荧光法(55 min)。Geng Yunyun等^[14]则对空肠弯曲杆菌的*hipO*基因进行分析,设计出的RPA引物能够在16 min内检测出牛奶中是否

污染空肠弯曲杆菌。在针对多种病原菌同时检测方面,王凤娇等^[15]建立了一种能够同时对食品中沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽孢杆菌进行检测的多重荧光RPA体系,并对当地超市售卖的米饭、羊肉和白菜汤等食品进行检测,其检测结果与国标法一致。温尔英等^[16]建立了一种检测霍乱弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌的三重RPA检测体系,能够同时对水产品中易污染的3种弧菌进行检测,对冻虾仁等商品的检测结果显示,该研究建立的三重RPA检测方法与传统鉴定方法结果完全一致,人工模拟的复杂污染样品也显示当污染量为10¹ CFU/g时3种目标菌均能够准确检出。

2.1.3 RPA与其他技术联用在食源性致病微生物方面的研究

RPA可以与其他技术联合以提高对食源性致病微生物检测的性能。例如与侧流试纸条(lateral flow dipstick, LFD)技术相结合,提高检测的灵敏度和现场适用性。Hu Jinqiang等^[17]将RPA与LFD技术结合用于鼠伤寒沙门氏菌的快速检测,建立的RPA-LFD技术对人工污染检测的最低检出限达到了1.95 CFU/mL。张珊珊等^[18]将布鲁氏菌RPA检测体系与LFD技术结合,建立的RPA-LFD技术最低检测限为5.89 CFU/mL,用该方法对20份山羊样品进行了检测,结果显示该方法与酶联免疫吸附试验法的检测结果一致,证明该方法可应用于临床样本布鲁氏菌的检验。兰全学等^[19]建立了针对大肠杆菌O157:H7的RPA-LFD检测方法,该方法的灵敏度与酶联免疫吸附试验法和侧向流动免疫法检测结果一致,同时能够降低反应成本,适用于现场检测,相较于PCR法检测的灵敏度提高了10倍。此外,RPA技术与基因芯片结合可提高检测通量。Yin Juxin等^[20]将数字PCR原理应用到RPA反应建立了数字RPA方法,并将荧光检测集成在芯片中,建立了一种快速检测大肠杆菌O157:H7、单核细胞增生李斯特菌及肠炎沙门氏菌的方法,该方法可在45 min内确定牛奶是否被上述3种致病微生物污染,检出限可达10个细胞/芯片,实现了对食源性致病微生物的快速、多通道检测。

此外,RPA技术还可以与成簇规律间隔短回文重复及其相关基因(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated gene, CRISPR/Cas)系统相结合,可以提高反应的特异性、灵敏度、多重性、现场性等。2017年,Gootenberg等将RPA技术与CRISPR技术结合,“双剑合璧”为核酸IAT检测技术,开发了一种特异性强、灵敏度高的酶报告解锁(specific high sensitivity enzymatic reporter UnLOCKing, SHERLOCK)核酸检测系统,从而创建了一个新的平台,检测灵敏度可达到阿摩尔(attomolar)级,能够识别单个碱基差异^[21],实现了对大肠杆菌和铜绿假单胞菌的高灵敏、高特异快速检测^[22]。同时为了突破SHERLOCK系统不能定量、依赖荧光设备读取检测

结果、一次只能检测一种核酸等局限性,随后他们又对SHERLOCK系统进行完善,开发了通过一次反应可以同时检测多个靶标的SHERLOCK v2核酸检测技术,可以实现对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等的多重荧光定量,定量检测限可低至2 amol/L;进一步地,为了解决读取结果依赖仪器设备的问题,他们又用FAM-生物素标记开发了简便的检测试纸条,实现了SHERLOCK v2系统在野外或现场对病原菌的快速检测^[22]。此后研究者们陆续开展了RPA与CRISPR技术结合的食物源性致病微生物的快速检测。如李焱笑^[23]、Tian Yachen^[24]等均采用RPA技术与CRISPR结合建立了单核细胞增生李斯特菌的检测方法,可将灵敏度可以提高到 1.5×10^{-3} ng/ μ L^[23], Tian Yachen等^[24]还使用胰岛素注射器和Eppendorf管作为反应器,在保证灵敏性和特异性的基础上有效降低了实验的假阳性率。Wang Yunqing等^[25]等开发了一种基于CRISPR/Cas12a的准确超敏感鉴别平台(OCTOPUS)一锅工具箱,可快速鉴别牛奶等复杂基质食品中大肠杆菌O157:H7和金黄色葡萄球菌,从基因组DNA提取到一锅法反应,整个检测流程不超过50 min,检测限达到了1 CFU/mL。

2.1.4 RPA在活细胞检测方面的研究

以上报道的RPA技术虽然能够克服传统培养法耗时较长的局限性,但无法区分细胞的死活,死亡的食源性致病菌会导致假阳性的产生。为了克服这一问题,研究者们探索建立能够区分活菌的RPA扩增技术。翟立公等^[26]研究发现使用叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)对检测样品进行处理后再进行RPA扩增,能够有效地降低非活菌DNA导致的假阳性。该方法利用PMA在光照条件下不能穿透活细胞细胞膜,只能穿透死细胞受损的细胞膜并对DNA进行不可逆修饰的原理,使得PMA处理后的死菌DNA不能被RPA反应扩增,采用这一方法能够有效地检测样品中活的德尔卑沙门氏菌的数量。

2.2 RAA研究进展

2.2.1 RAA技术在食源性致病菌检测方面的研究

随着RAA技术的发展,使用该技术对食源性致病微生物进行检测的研究也日益增多。其中,在乳品中的致病菌检测方面,崔荣飞等^[27]使用RAA技术建立了一种快速检测牛奶中单核细胞增生李斯特菌的方法,其检出限为 8.62×10^2 CFU/mL;黄新新等^[28]针对克罗诺杆菌的ompA基因保守区设计了RAA引物探针,模拟污染实验证明增菌2 h后可以检测污染量为 10^{-2} CFU/mL的克罗诺杆菌,灵敏度相较于传统划线培养法提高了10倍;Mu Dan等^[29]建立了大肠杆菌O157:H7的RAA检测方法,在脱脂乳、生菜和湖水中的检出限分别为 5.4×10^1 、 7.9×10^1 、 5.2×10^1 CFU/mL,在实际检测时具有非常好的可行性;魏莹等^[30]利用RAA技术建立了快速检测A族乙型溶血性链球菌的方法,结果证实所建立的方法特异性好,灵敏度

可达10 拷贝/ μ L。此外,张小平^[31]、郭雨^[32]等根据沙门氏菌invA基因设计了引物探针,建立了能够快速检测沙门氏菌的RAA方法;虽然两者的靶标基因均为invA基因,但后者建立的实时荧光RAA方法的灵敏度更高,通过含有目的片段的质粒进行分析,灵敏度可达10 拷贝/ μ L,是前者的10倍。

2.2.2 RAA与其他技术联用在食源性致病菌检测方面的研究进展

和RPA技术相似,也有将RAA技术与CRISPR、LFD等技术联用的报道。RPA技术与LFD技术联用方面,后来旺等^[33]根据金黄色葡萄球菌高度保守的耐热核酸酶编码基因(nuc)设计了RAA扩增引物,并结合LFD技术对结果进行判断,所建立的RAA-LFD法对金黄色葡萄球菌纯菌液的检出限为 1.83×10^2 CFU/mL,在对实际样品的检测中发现,RAA-LFD法与PCR法相比有一例假阳性,推测可能是因为RAA-LFD法的检测限较PCR法更低,另外由于RAA法具有较高的食品基质耐受性,因此这也可能是造成RAA-LFD法检出阳性而PCR法未检出的原因。RPA技术与CRISPR/Cas系统联用方面,如针对副溶血性弧菌,卢盼等^[34]在tdh基因特异性区域设计了RAA检测引物,与CRISPR/Cas12a系统联合,对DNA的最低检测浓度可达77.5 pmol/L;葛以跃等^[35]利用Cas13a的切割活性对荧光探针切割产生荧光信号以避免RAA荧光探针复杂的设计环节的特点,设计了CRISPR/Cas13a-RAA副溶血性弧菌快速分子检测方法,同时由于Cas13a的信号扩大效应,RAA的检测灵敏度也提高到10 拷贝/反应。Li Fan等^[36]将CRISPR/Cas12a与RAA技术结合用于检测单核细胞增生李斯特菌,该研究证实,单独使用RAA法的最低检出限为 1.35×10^2 CFU/mL,CRISPR/Cas12a与RAA结合后对模板DNA的检测限下降到0.64 amol/L。RPA技术能够同时与LFD和CRISPR/Cas技术联合,钱佳婕^[37]将RAA技术与CRISPR/12a和LFD技术结合,建立了一种金黄色葡萄球菌检测平台,对菌液的检出限可达1 CFU,对人工污染酱油、豆汁、果奶和牛奶样品检测的灵敏度均可达到 2×10^1 CFU/mL。

GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》^[38]规定的检测项目中,已采用RPA和RAA技术进行食源性致病菌检测的研究如表2所示。目前,针对单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等常见食源性致病菌的RPA及RAA检测方法较多。而针对感染率较低但对人体危害严重的食源性致病菌的检测方法较少。例如唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种),该类菌产生的米酵菌酸对人体的危害极大,人误食后致死率接近100%,但目前报道的对该菌的检测方法仍限于培养法与实时定量荧光PCR法。因此应加大这类食源性致病菌RPA、RAA或ERA检测方法的开发。

表2 采用RPA和RAA技术对GB 29921—2021规定的食源性致病菌检测项目的研究
Table 2 Studies on the detection of foodborne pathogens specified in China's national standard GB 29921—2021 by RPA and RAA

对象	检测技术	观察方式	基质	通量	检测时间	灵敏度	参考文献
沙门氏菌	RPA	荧光	羊肉、鸡肉、西兰花	单通	20 min	1.1×10^{-3} ng/ μ L	[39]
	RPA	电泳	牛肉、米饭	三重	20 min	10^4 CFU/mL	[15]
	RPA	侧向流动试纸	牛奶	单通	10 min	1 fg DNA	[17]
	数字RPA-芯片	荧光	牛奶	三重	45 min	10 个细胞	[20]
	RAA	荧光	/	单通	20 min	10^2 拷贝/ μ L	[31]
	RAA	荧光	番茄	单通	20 min	10 拷贝/ μ L	[32]
大肠杆菌 O157:H7	RPA	LFD	牛奶、猪肉	单通	20 min	12 CFU/mL	[19]
	数字RPA-芯片	荧光	牛奶	三重	45 min	10 个细胞	[20]
	RAA	荧光	脱脂乳、生菜	单通	20 min	54 CFU/mL	[29]
副溶血性弧菌	RPA	荧光	鱼类、贝类	单通	15 min	0.35 pg/ μ L DNA	[40]
	RPA	荧光	耗油、鲑鱼	单通	5~12 min	1.02×10^2 拷贝/反应	[41]
	RPA-芯片	荧光	/	三重	20 min	10^1 CFU	[42]
金黄色葡萄球菌	RPA	电泳	牛奶、猪肉	单通	35 min	1×10^1 CFU/mL	[43]
	RPA-CRISPR/Cas12a	荧光	牛奶	双重	50 min	1 CFU/mL	[25]
	RAA-CRISPR/Cas12a	LFD	牛奶、酱油	单通	30 min	1 CFU	[37]
	RAA	荧光	牛奶	单通	20 min	10 CFU/mL	[44]
	RAA-LFD	LFD	牛奶	单通	20 min	4 fg/ μ L DNA	[33]
	RAA-CRISPR/Cas13a	荧光	肉类及相关制品	单通	20 min	1×10^1 CFU/mL	[45]
单核细胞增生李斯特菌	RPA	电泳	牛肉、米饭	三重	20 min	1.3×10^5 CFU/mL	[15]
	RPA	电泳	猪肉	单通	30 min	0.5 ng/ μ L DNA	[12]
	数字RPA-芯片	荧光	牛奶	三通	45 min	10 个细胞	[20]
	RPA-CRISPR/Cas13a	荧光	/	单通	5~40 min	1.5×10^{-3} ng/ μ L	[23]
	RPA-CRISPR/Cas12a	荧光	牛奶	双重	50 min	1 CFU/mL	[25]
	RPA-CRISPR/Cas12a	荧光	牛奶	单通	45 min	10 CFU/mL	[24]
	RAA	荧光	牛奶	单通	20 min	8.62×10^2 CFU/mL	[27]
RAA-CRISPR/Cas12a	荧光	草鱼	单通	15 min	77.5 pmol/L DNA	[36]	
克罗诺杆菌	RPA-LFD	LFD	奶粉、米粉、牛肉	单通	15 min	1.7×10^3 CFU/mL	[46]
阪崎肠杆菌	RAA	荧光	婴儿奶粉及婴儿米粉	单通	20 min	1×10^2 CFU/mL	[28]
铜绿假单胞菌	RPA-CRISPR/Cas13a	荧光	/	单重	30 min~3 h	attomolar级	[21]
	RPA-CRISPR/Cas13a	荧光	/	多重	30 min~3 h	attomolar级	[22]

注：/ 文献未报道。

2.3 ERA研究进展

ERA技术是国内自主研发的一种新型核酸IAT技术,相较于RPA和RAA来说诞生时间较晚,目前,运用其进行研究的报道较少,鲜见对食源性致病微生物检测的研究,仅检索到Meng Qingzhou等^[47]采用ERA-CRISPR技术进行了食品中腐败微生物的研究,建立了便捷、即时的啤酒腐败菌的检测方法,最低可以检出10 拷贝DNA。目前该技术的研究主要集中在人畜病原体 and 癌症基因检测方面。Zhang Wuyin等^[48]建立的猪圆环病毒3型ERA-CRISPR/Cas12a方法可以检出最低7个拷贝的DNA片段,对实际样本的检出率与实时荧光法相同。曾宇晨等^[49]建立的非洲猪瘟病毒基因ERA检测方法的检测下限可达到 10^2 拷贝/ μ L。刘迪等^[50]针对猫疱疹病毒设计了ERA扩增引物,结合LFD技术建立了快速检测猫疱疹病毒的现场检测方法,该方法的灵敏度可达 7.86×10^1 拷贝/ μ L,较普通PCR法高10倍;采用该方法对30份实际样品进行检测,结果显示,PCR法检出5份阳性,ERA-LFD法

检出6份阳性,ERA扩增片段经测序分析证明与靶标基因一致。Deng Zhongliang等^[51]将ERA与CRISPR/Cas12a结合建立了一种能够快速检测肺炎支原体的方法,可通过检测ERA的荧光强度快速判断检测结果,该方法对纯培养菌的灵敏度为1 拷贝/ μ L,且对92例临床样本的检测方法与实时荧光定量PCR法检测结果完全相同,证实了该方法的准确性。Liu Peng等^[52]依托ERA-CRISPR/Cas12a技术建立了一种快速检测链霉素耐药性结核杆菌方法,相较于通过培养法进行药敏试验,该方法能够在60 min内检出临床样本中是否包含耐药性结核杆菌,且研究结果显示两种方法的检测结果完全一致。除了病原体检测,ERA方法还被应用于癌症细胞耐药基因检测等方面。Liu Yin等^[53]使用ERA-CRISPR技术建立了一种快速检测癌症细胞耐药基因FLT3-F691L的方法,40 min即可获得检测结果。目前,该技术的研究刚刚起步,作为一种国产自主知识产权的高效IAT技术,未来在检验检疫、临床医学等诸多行业中将发挥重要作用。

3 结 语

致病菌导致的食源性疾病是人类健康面临的最大挑战之一。随着科学的不断发展,越来越多的新型检测技术应用于食源性致病菌的检测。相较于传统的培养法和PCR法,IAT技术更加适用于复杂的现场快速检测环境。目前,已有的IAT技术多达十几种,除了本文介绍的3种技术外,还有环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[54]、链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)^[55]、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)^[56]等。这些技术与PCR技术相比具有一些共同的优势:例如都能够在恒温条件下完成对特定DNA或RNA片段的扩增,可以通过添加染料等方式实现检测结果可视化,具有很高的灵敏度。然而,这些技术的缺点也很明显:如LAMP技术需要4条引物才能进行,引物设计复杂且通量不高;SDA技术需要95℃预热,反应耗时普遍在2h以上;RCA技术需要通过复杂方法获取环状模板,且需要较长的反应时间。相较而言,本文所述的RPA、RAA和ERA这3种IAT技术具有操作简单、检测时间短、灵敏度高、且可脱离对传统检测设备的依赖。但仍然存在以下不足之处:1)由于灵敏度较高,检测时容易产生假阳性;2)引物设计虽然相对于其他IAT技术(如LAMP、RCA)来说较为简单,但仍比普通PCR要求高,不能完全套用PCR引物的设计原则,且目前暂无专门的引物设计软件;3)能够扩增的DNA片段较小,难以扩增较大DNA片段等。

总的来说,RPA和RAA技术在食源性致病菌的检测方面研究已较为深入,但采用ERA技术的报道较少,目前主要集中在病毒的检测与癌症基因检测方面,在食源性致病菌检测方面具有很大的发展潜力。通过总结以往研究,对未来这3种技术在致病微生物快速检测方面提出以下建议:1)筛选更加适用于现场快速检测的样品前处理和DNA提取方法,从而提高模板的数量和纯度,促进这3种技术在现场快速检测应用中的准确性和灵敏度,如报道的煮沸法和一步核酸提取法^[57]。2)这3种技术均可以在37~42℃反应,接近人体温度,未来可以在现场利用人体温度或者自发热的材料包直接进行扩增反应,建立现场无需依赖检测设备的快速检测方法。3)由于这3种技术独特的反应条件,因此对引物和探针设计有着严格的要求,目前的引物和探针设计不像传统PCR那样成熟,也没有设计软件可以使用。但这3种技术引物探针设计原则相似,未来可以开发同时可应用于3种技术的引物探针设计软件或网站,简化工作者在应用这3种技术时进行引物探针设计的工作量,并有助于筛选到最佳的寡核苷酸引物探针组合,从而提高检测效率。4)目前ERA技术缺少在食源性致病菌检测方面的研究,通过

前期实验发现,该技术相较于RPA和RAA具有更高的灵敏度和检测效率,未来可开发针对食源性致病菌的ERA快速检测方法,同时考虑与CRISPR、LFD、芯片等技术结合,以提高检测的灵敏度和特异性。5)由于这3种技术反应的灵敏度较高,容易受到气溶胶的污染而导致假阳性。所以未来可考虑建立DNA提取与检测一体的一锅式检测方法或试剂盒,减少反复开盖的过程,从而减少气溶胶污染的可能性。6)传统的核酸检测技术不能区分活菌与死菌,目前有报道指出通过核酸结合染料可对活菌和死菌进行区分。建议将这3种技术与如PMA等核酸结合剂联合使用,从而能够区分待检样品中是否含有活的食源性致病微生物,以更客观公正地评价食品的安全和风险。

参考文献:

- [1] 庞国芳,孙宝国,陈君石,等.中国食品安全现状、问题及对策战略研究(第二辑)[M].北京:科学出版社,2020:65.
- [2] 陈小敏,杨华,桂国弘,等.2008—2015年全国食物中毒情况分析[J].食品安全导刊,2017(25):69-73. DOI:10.3969/j.issn.1674-0270.2017.25.028.
- [3] 刘秀梅.食源性疾病监控技术的研究[J].中国食品卫生志,2004(1):3-9. DOI:10.3969/j.issn.1004-8456.2004.01.001.
- [4] 葛航,吴滕晨,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. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2019.07.019.
- [5] PIEPENBURG O, WILLIAMS C, ARMES N, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): 1115-1121. DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- [6] TwistDx™ Limited. TwistAmp® liquid combined instruction manual[EB/OL]. <https://www.twistdx.co.uk/support/rpa-assay-design/>.
- [7] 吕蓓,程海荣,严庆丰,等.用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J].中国科学:生命科学,2010,40(10):983-988. DOI:10.1360/052010-508.
- [8] 汤赛君,于小兰,王秀东,等.等温核酸扩增反应试剂及等温核酸扩增方法:CN102816756A[P].(2012-12-12)[2022-05-26]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=kxaUMs6x7-4I2jr5WTdXti3zQ9F92xu0rfl_ITgx9xh6jrvLwujARsIG_8qcRXowAn1OSIYFGM1MBxP23ibomUxPWEGiEQCu&uniplatform=NZKPT.
- [9] 于继彬,李俊,马陈翠,等.一种常温核酸扩增反应:CN109971834A[P].(2022-11-25)[2023-03-27]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=kxaUMs6x7-4I2jr5WTdXti3zQ9F92xu0djlSA8-Y0a-w2p-ld1Ocs33GKf08nqT56pKvEtN1tPWb8GvwiJVRZfnW2Mhd5JT0&uniplatform=NZKPT>.
- [10] TwistDx Ltd. TwistAmp® combined instruction manual[EB/OL]. <https://www.twistdx.co.uk/support/rpa-assay-design/>.
- [11] WANG J, WANG J, GENG Y, et al. A recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of African swine fever virus[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2017, 81(4): 308-312.
- [12] 何洁,朱超,黄珊珊,等.食品中单核细胞增生李斯特菌的重组酶聚合酶扩增检测方法的建立[J].中国食品卫生杂志,2021,33(3):274-278. DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.006.
- [13] 刘立兵,李睿文,陈志敏,等.产气荚膜梭菌实时荧光PCR和实时荧光RPA检测方法的建立和比较[J].食品科学,2020,41(4):268-272. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181026-307.

- [14] GENG Yunyun, LIU Guanhui, LIU Libing, et al. Real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in food samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 157: 31-36. DOI:10.1016/j.mimet.2018.12.017.
- [15] 王凤娇, 秦超, 廖倩, 等. 3种常见食源性致病菌多重重组酶聚合酶扩增检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8121-8127. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.20.030.
- [16] 温尔英, 郑耿东, 陈文婉, 等. 海水弧菌三重重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法的建立[J]. 中国口岸科学技术, 2020(10): 35-39. DOI:10.3969/j.issn.1002-4689.2020.10.005.
- [17] HU Jinqiang, HUANG Runna, SUN Yanting, et al. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella* Typhimurium in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 5(158): 25-32. DOI:10.1016/j.mimet.2019.01.018.
- [18] 张珊珊, 李楠, 郝镭, 等. 布鲁氏菌RPA-LFD快速检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(10): 1215-1220. DOI:10.16656/j.jissn.1673-4696.2021.0173.
- [19] 兰全学, 陈佳平, 杨慧, 等. 侧向流动型重组酶聚合酶扩增技术检测食品中大肠埃希氏菌O157[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 302-307.
- [20] YIN Juxin, ZOU Zheyu, HU Zhenming, et al. A "Sample-in-Multiplex-Digital-Answer-Out" chip for fast detection of pathogens[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(5): 979-986.
- [21] GOOTENBERG J, ABUDAYYEH O, LEE J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356: 438-442. DOI:10.1126/science.aam9321.
- [22] GOOTENBERG J, ABUDAYYEH O, KELLNER M, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360: 439-444. DOI:10.1126/science.aaq0179.
- [23] 李焱笑. 基于CRISPR/Cas13a及RPA单增李斯特菌检测方法的建立和应用[D]. 长春: 吉林大学, 2021: 75.
- [24] TIAN Yachen, LIU Tao, LIU Cheng, 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 Science and Technology, 2021, 152: 112166. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112166.
- [25] WANG Yunqing, KE Yuqing, LIU Wenjia, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level[J]. ACS Sensors, 2020, 5(5): 1427-1435. DOI:10.1021/acssensors.0c00320.
- [26] 翟立公, 黄菊, 李港回, 等. 德尔卑沙门氏菌分子等温活菌检测体系的建立[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1214-1223. DOI:10.13344/j.microbiol.china.210769.
- [27] 崔荣飞, 赵义良, 田梅, 等. 重组酶介导扩增技术快速检测食品中单核细胞增生李斯特菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1773-1777. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.05.026.
- [28] 黄新新, 何宇平, 郑秋月, 等. 荧光重组酶介导等温扩增快速检测食品中克罗诺杆菌属[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(22): 8774-8781. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.22.019.
- [29] MU Dan, ZHOU Donggen, XIE Guoyang, et al. The fluorescent probe-based recombinase-aided amplification for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Molecular and Cellular Probes, 2021, 60: 101777. DOI:10.1016/j.mcp.2021.101777.
- [30] 魏莹, 郭利川, 张小平, 等. 重组酶介导扩增方法快速检测A族乙型溶血性链球菌[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2018, 41(5): 314-316; 323. DOI:10.16408/j.1004-9770.2018.05.003.
- [31] 张小平, 郑乐怡, 魏莹, 等. 重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2017, 40(5): 317-319. DOI:10.16408/j.1004-9770.2017.05.004.
- [32] 郭雨, 刘常宏, 卜元卿, 等. 重组酶介导等温核酸扩增方法快速检测土壤沙门氏菌[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 1041-1047. DOI:10.13344/j.microbiol.china.200410.
- [33] 后来旺, 李达容, 邓波, 等. 金黄色葡萄球菌RAA-LFD快速检测方法的建立与应用[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 331-339. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201215-178.
- [34] 卢盼, 李哲, 李臻鹏, 等. 基于CRISPR-Cas12a蛋白的副溶血弧菌及*tdh*基因检测分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(3): 390-395. DOI:10.3784/jbjc.202108090442.
- [35] 葛以跃, 苏璇, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a结合重组酶介导的扩增快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J]. 现代预防医学, 2019, 46(20): 3777-3781.
- [36] LI Fan, YE Qinghua, CHEN Moutong, et al. Cas12aFDet: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1151: 338248. DOI:10.1016/j.aca.2021.338248.
- [37] 钱佳婕. CRISPR/Cas12a系统在新冠病毒和金黄色葡萄球菌即时检测中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 82-83.
- [38] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准预包装食品中致病菌限量: GB 29921—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [39] 刘立兵, 耿云云, 姜彦芬, 等. 沙门氏菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 298-303. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20170906-094.
- [40] 刘小青, 严琼英, 陈国培, 等. RPA等温扩增技术检测副溶血性弧菌[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 112-118. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.01.019.
- [41] GENG Y Y, TAN K, LIU L B, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 186. DOI:10.1186/s12866-019-1562-z.
- [42] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens[J]. Microchimica Acta, 2014, 181(13/14): 1715-1723. DOI:10.1007/s00604-014-1198-5.
- [43] 吴华华, 王锦鑫, 谷庆花, 等. 金黄色葡萄球菌重组酶聚合酶扩增方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(8): 797-801. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.202001012.
- [44] XIE G, ZHOU D, ZHAO G, et al. Recombinase aided amplification with photoreactive DNA-binding dye for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 135: 110249. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110249.
- [45] 苏璇, 葛以跃, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a辅助RAA快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(3): 253-258. DOI:10.13350/j.cjpb.200302.
- [46] 陈纯阳, 张宸宁, 史爱莹, 等. 重组酶等温扩增试纸条快速检测阪崎克罗诺杆菌[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 306-312. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190411-152.
- [47] MENG Qingzhou, YANG Hongmei, ZHANG Guiquan, et al. CRISPR/Cas12a-assisted rapid identification of key beer spoilage

- bacteria[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 74: 102854. DOI:10.1016/j.ifset.2021.102854.
- [48] ZHANG Wuyin, XU Liang, LIU Qi, et al. Enzymatic recombinase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for ultrasensitive, rapid, and specific porcine circovirus 3 detection[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 60: 101772. DOI:10.1016/j.mcp.2021.101772.
- [49] 曾宇晨, 龚浪, 王京煜, 等. 基于B646L、EP402R、MGF360/505基因的非洲猪瘟病毒ERA检测方法的建立[J]. *华南农业大学学报*, 2021, 42(5): 33-40. DOI:10.7671/j.issn.1001-411X.202101031.
- [50] 刘迪, 许鑫燕, 郑亚婷, 等. 猫疱疹病毒ERA-LFD检测技术的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(1): 11-18. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0007.
- [51] DENG Zhongliang, HU Haiyang, TANG Dan, et al. Ultrasensitive, specific, and rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* using the ERA/CRISPR-Cas12a dual system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 811768. DOI:10.3389/fmicb.2022.811768.
- [52] LIU Peng, WANG Xinjie, LIANG Juan, et al. A Recombinase polymerase amplification-coupled cas12a mutant-based module for efficient detection of streptomycin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 796916. DOI:10.3389/fmicb.2021.796916.
- [53] LIU Yin, CHEN Yanling, HUANG Shisheng, et al. Rapid and sensitive diagnosis of drug-resistant FLT3-F691L mutation by CRISPR detection[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 25(8): 753276. DOI:10.3389/fmolb.2021.753276.
- [54] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1-5. DOI:10.1007/s12275-015-4656-9.
- [55] TOLEY B, COVELLI I, BELOUSOV Y, et al. Isothermal strand displacement amplification (iSDA): a rapid and sensitive method of nucleic acid amplification for point-of-care diagnosis[J]. *Analyst*, 2015, 140(22): 7540-7549. DOI:10.1039/c5an01632k.
- [56] MOHSEN M, KOOL E. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2016, 49(11): 2540-2550. DOI:10.1021/acs.accounts.6b00417.
- [57] 王丹丹, 李莉, 杨艳歌, 等. 克罗诺杆菌属快速检测体系的建立[J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 286-292. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200210-079.