

基于 RPA 辅助增强荧光偏振的沙门氏菌检测

薛鹏鹏¹ 陈 伟¹ 徐建国^{1,2} 涂 佳^{1,3} 屈 玮¹

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 嘉兴大学生物与化学工程学院, 浙江 嘉兴 314001; 3. 湖南省林业科学院木本油料资源利用国家重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要: [目的] 提出一种新型荧光偏振 (FP) 检测策略, 通过整合重组酶聚合酶扩增 (RPA) 技术, 实现对沙门氏菌 (*Salmonella*) 的高灵敏度检测。[方法] 该检测机制依赖于靶标 DNA 与特异性引物的同源序列识别; 当沙门氏菌靶标存在时, 引物与靶 DNA 结合并触发链置换反应, 进而启动 DNA 扩增过程。为提高检测灵敏度, 系统采用两项关键设计: 在引物 5' 端修饰 6-羧基荧光素 (6-FAM) 作为荧光报告基团; 引入核酸外切酶 I (Exo I) 选择性水解未结合的引物。[结果] 在 RPA 扩增过程中, 由于扩增产物的相对分子质量显著增加, 6-FAM 标记的 DNA 复合物的旋转自由度受到限制, 导致荧光偏振信号显著增强。经条件优化后, 该方法对沙门氏菌的检测限可达 11 CFU/mL, 且表现出优异的特异性。[结论] 该方法可高效检测沙门氏菌, 其模块化设计原理还可拓展应用于其他食源性病原体的快速诊断。

关键词: 沙门氏菌; 重组酶聚合酶扩增 (RPA); 引物修饰; 荧光偏振; 定量检测

Salmonella detection based on fluorescence polarization enhanced by recombinase polymerase amplification

XUE Pengpeng¹ CHEN Wei¹ XU Jianguo^{1,2} TU Jia^{1,3} QU Wei¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China; 2. College of Biological, Chemical sciences and engineering, Jiaxing University, Jiaxing, Zhejiang 314001, China; 3. National Key Laboratory of Woody Oil Plant Resources Utilization, Hunan Academy of Forestry, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: [Objective] To develop a novel fluorescence polarization (FP) detection strategy and achieve highly sensitive *Salmonella* detection by incorporating recombinase polymerase amplification (RPA) technology. [Methods] The detection mechanism relies on homologous sequence recognition between target DNA and specific primers: When *Salmonella* targets exist, primer and target DNA binding triggers strand displacement and initiates DNA amplification. To enhance sensitivity, two key design features are implemented: 5'-end modification of primers with 6-carboxyfluorescein (6-FAM) as a fluorescent reporter, and selective digestion of unbound primers by exonuclease I (Exo I). [Results] During RPA amplification, the substantially increased molecular weight of amplicons restricts the rotational freedom of 6-FAM-labeled DNA compounds, resulting in significantly enhanced FP signals. After optimization, this method achieves a detection limit of 11 CFU/mL for *Salmonella* with excellent specificity. [Conclusion] This method provides an efficient *Salmonella* detection. Its modular design principle can also be readily adapted for rapid diagnosis of other foodborne pathogens.

Keywords: *Salmonella*; recombinase polymerase amplification (RPA); primer modification; fluorescence polarization; quantitative detection

食源性致病菌已成为全球公共卫生安全的重大威胁。流行病学^[1]研究表明, 由污染食品引发的致病菌感染不仅危害个体健康, 更对全社会福祉造成深远影响。在全球化背景下, 随着食品供应链的复杂化, 食源性疾病呈

基金项目: 国家重点研发项目 (编号: 2024YFF0618100); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2308085MB57); 上海市科委项目 (编号: 22N31900500)

通信作者: 陈伟 (1982—), 男, 合肥工业大学教授, 博士。E-mail: chenweishnu@163.com

徐建国 (1990—), 男, 合肥工业大学副教授, 博士。E-mail: jgxu0816@163.com

收稿日期: 2025-03-15 **改回日期:** 2025-05-25

引用格式: 薛鹏鹏, 陈伟, 徐建国, 等. 基于 RPA 辅助增强荧光偏振的沙门氏菌检测[J]. 食品与机械, 2025, 41(6): 44-50.

Citation: XUE Pengpeng, CHEN Wei, XU Jianguo, et al. *Salmonella* detection based on fluorescence polarization enhanced by recombinase polymerase amplification[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 44-50.

持续增长趋势^[2]。致病菌主要通过污染源、未充分烹调的食品以及加工过程中的交叉污染等途径传播^[3],显著增加了人群暴露风险。

目前,临床常见的食源性致病菌包括弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)^[4-5]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[6-7]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[8-9]、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[10-11]、沙门氏菌(*Salmonella*)^[12-13]、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)^[14]以及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[15-16]等。这些病原体导致的腹泻性疾病具有高度流行性,全球每年约造成5.5亿病例,其中2.2亿为5岁以下儿童^[17-18]。其中,免疫系统发育不完全的儿童群体对食源性致病菌尤为易感。

在众多病原体中,沙门氏菌因其特殊的生物学特性备受关注。作为革兰氏阴性肠杆菌科,沙门氏菌表现出极强的环境适应性:在干燥环境中可存活数周,4℃冷藏条件下保持活性3~4个月,在粪便中维持传染性1~2个月^[19]。目前已鉴定超过2500种血清型^[20-22],其感染会引起典型胃肠炎症状(腹泻、发热、腹痛),甚至危及生命的系统性感染^[18]。因此,建立快速准确的检测方法对防控沙门氏菌感染至关重要。

在致病菌分析技术中,传统细菌培养法^[23]虽为金标准,但存在耗时(24~72 h)、操作繁琐等局限。此外,在分子检测技术中,聚合酶链反应(PCR)^[24]可显著提高检测速度,但仍受限于以下因素:需要复杂的热循环程序(变性—退火—延伸)^[25];依赖精密仪器;易产生气溶胶污染。随着分子生物学和核酸生化领域的迅速发展,等温核酸扩增技术因其操作简便、设备需求低等优势,成为现场检测的理想选择。目前,发展的主要等温扩增技术包括滚环扩增(RCA)^[26]、环介导等温扩增(LAMP)^[27]、重组酶聚合酶扩增(RPA)及杂交链式反应(HCR)等。RPA技术是一种用于快速DNA扩增的分子生物学技术^[28-29]。该技术利用重组酶介导引物与目标DNA的特异性结合,启动链置换反应。在此过程中,单链结合蛋白可稳定置换出DNA单链,使DNA聚合酶能够高效合成互补链,从而在恒温条件(37~42℃)下进行扩增^[30],且能够在15~30 min内实现靶标DNA的高效扩增,其检测灵敏度与PCR相当甚至更优,已被广泛应用于食品安全监测、病原体检测等领域。最新研究表明,RPA与CRISPR-Cas系统^[31]或横向流动试纸条(LFS)^[32]的联用技术可显著提高检测特异性与便携性,目前已被成功应用于非洲猪瘟病毒(ASFV)^[33]和SARS-CoV-2^[34]等病原体的快速诊断。

荧光偏振(fluorescence polarization, FP)作为一种定量免疫测定技术,被广泛应用于生物分子相互作用研究和临床诊断领域^[35]。该技术基于荧光标记分子在溶液中的旋转扩散特性,通过测量荧光分子在偏振光激发下发

射光的偏振度来定量分析分子间相互作用。Fang等^[36-37]研究表明,金纳米颗粒、银纳米材料、金属有机框架和碳纳米材料等纳米材料可作为FP信号增强剂,但其固有的荧光猝灭效应会产生光散射干扰,限制了检测准确性。相较之下,DNA分子因其可编程的序列特异性识别能力和精确的空间构象调控特性,在FP信号调控方面表现出显著优势。DNA分子在长波长区域的低吸收特性使其成为优异的FP信号调控介质^[13],能够通过可逆结合荧光探针实现对FP信号的精确调控。当与核酸等温扩增技术结合时,DNA分子可构建高效的信号放大系统,这一特性为新型诊断技术的发展提供了重要契机。此外,FP技术具有多重显著优势:① 试验成本较低,无需复杂昂贵的仪器设备;② 检测系统易于微型化,具有良好的便携性,适用于现场快速检测;③ 该方法可实现高通量信号输出,满足大规模样本筛查需求^[38]。在操作方面,FP技术具有简便快速的特点,整个检测过程在均相溶液中进行,无需繁琐的分离步骤即可实时检测游离态和结合态示踪物的变化。这种均相检测模式不仅简化了试验流程,还避免了固相分离过程中可能导致的分子活性损失,因而能够更准确地反映分子的性质和行为特征。此外,FP技术对样品需求量少,且具有良好的重现性和灵敏度,使其在细菌检测、免疫分析等领域展现出广阔的应用前景。

研究拟将RPA与荧光偏振技术联用,通过以下策略优化检测性能:针对鼠伤寒沙门氏菌的*invA*毒力基因,上游引物5'端标记6-羧基荧光素;扩增产物中FAM标记的dsDNA片段(177 bp)与游离态相比,因分子旋转弛豫时间差异呈现显著偏振值变化;引入Exo I酶选择性降解未配对引物,使信噪比显著提升。旨在提高沙门氏菌检测灵敏度,简化操作流程,为沙门氏菌现场快速检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DNA扩增引物:上游引物为5'-FAM-ACCCATTGTGTTGGTTGTTACGGCTATTTTG-3',下游引物为5'-GCGGCTGCTCGCCTTTGCTGGTTTTAGGTTTG-3',上海生工生物科技有限公司;

Exo I及其缓冲液(670 mmol/L 甘氨酸-KOH, 67 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT; pH 9.5)、Tris缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, pH 8.2)、1×TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)、10×tris-borate-EDTA (TBE)、25~500 bp DNA Marker、6×loading buffer、ddH₂O、琼脂糖及Luria-Bertani (LB)培养基:上海生工生物科技有限公司;

RPA等温扩增基本核酸试剂盒:苏州先达基因科技有限公司;

MgCl₂等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

沙门氏菌:ATCC-14028,广东省微生物培养保藏中心(GDMCC);

包装牛奶:全脂灭菌纯牛乳,内蒙古伊利实业集团股份有限公司。

1.2 主要仪器设备

低速高温离心机:Heraeus Fresco17型,德国贺利氏公司;

PCR仪:BIO-RAD S1000型,美国伯乐公司;

电泳仪:DYY-6C型,北京六一生物科技有限公司;

凝胶成像系统:ChemIDox型,杭州朗基因科学仪器有限公司;

便携式荧光偏振仪:Sentry 201型,美国Milwaukee公司。

1.3 试验方法

1.3.1 重组酶聚合酶扩增—荧光偏振联用技术的建立

如图1所示,首先从样品中提取DNA并进行重组酶聚合酶扩增:将重组酶—聚合酶复合物与5'端FAM荧光素标记的上游引物及未修饰的下游引物共同孵育,使其与靶标DNA的同源序列特异性结合,从而启动链置换反应并引发DNA合成。在此过程中,单链结合蛋白可稳定被置换的单链DNA,防止其重新退火。随后,在DNA聚合酶的作用下,FAM标记的上游引物沿模板链延伸,合成互补链,最终形成FAM标记的双链DNA产物。由于体系中引物过量,靶标DNA可实现指数级扩增。扩增产物经Exo I处理后呈现差异化响应:当样品中不含沙门氏菌时,Exo I可水解未参与反应的单链引物,导致FAM荧光素解离;由于游离荧光素相对分子质量小,其快速旋转导致荧光偏振信号维持在低水平,有效降低背景干扰。当存在沙门氏菌时,Exo I无法消化双链扩增产物,FAM标记的大分子DNA复合物因其显著增加的相对分子质量会强烈抑制荧光基团的旋转自由度,最终产生显著的FP信号增强。

1.3.2 沙门氏菌培养与DNA提取 将-80℃保存的沙

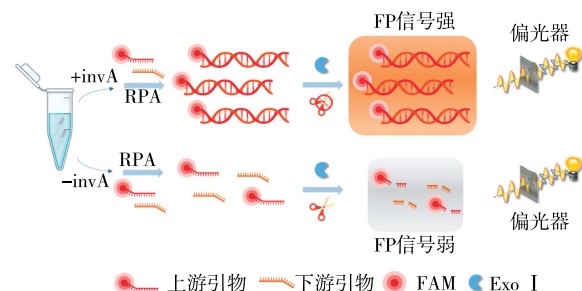


图1 基于重组酶聚合酶扩增增强荧光偏振的沙门氏菌检测原理

Figure 1 Principle of *Salmonella* detection based on fluorescence polarization enhanced by recombinase polymerase amplification (RPA)

门氏菌标准菌株接种于Luria-Bertani(LB)液体培养基中,37℃恒温培养24 h。采用标准平板计数法(稀释涂布法)测定菌液浓度后,进行基因组DNA提取。将菌液以及牛奶加标样品超声5 min使细胞裂解,5 000 r/min离心10 min富集菌体。弃上清后,加入100 μL 1×TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)充分重悬菌体沉淀,5 000 r/min离心5 min,去除未溶解的细胞碎片、蛋白质沉淀等杂质。收集上清液即为基因组DNA溶液,经核酸浓度测定后,用1×TE缓冲液进行梯度稀释,制备不同浓度的DNA标准品,分装后保存于-20℃备用。

1.3.3 RPA扩增 取一支RPA冻干粉,室温下静置5 min以避免试剂吸潮。打开冻干管前12 000 r/min离心10 s,加入20 μL溶解剂和25.2 μL双蒸水(ddH₂O),添加0.4 μL上下游引物(合计0.8 μL,浓度为10 μmol/L)。将混合液均分至两个PCR管中,每管23 μL。分别加入1 μL DNA模板(阴性对照中以ddH₂O替代)及1 μL激活剂(醋酸镁,贮藏于-20℃,需提前解冻)。将PCR管置于PCR仪中,设置程序:37℃温育10 min,80℃加热10 min,终止反应,避免引物二聚体干扰下游检测。

1.3.4 Exo I切割 在扩增产物的反应体系中,依次加入1 μL Exo I (20 U/μL)以及2.9 μL Exo I buffer,混匀后立即移入PCR仪中,25℃酶促反应30 min,80℃加热10 min,最终制得经特异性核酸外切酶处理后的纯化产物。

1.3.5 FP测量 使用已预校准的便携式荧光偏振仪测定FP值。取1 mL pH为8的Tris缓冲液加入专用试管中,并测量其空白信号。加入20.0 μL经恒温酶促合成的终反应液,充分涡旋混匀,于相同检测参数下获取样品管偏振信号强度,读取FP值并记录。

1.3.6 可行性验证 使用4S Red Plus制备2%琼脂糖凝胶浸入1×tris-borate-EDTA(TBE)溶液中,将5 μL RPA扩增产物与2 μL的6×loading buffer充分混匀,于电泳仪中以120 V的恒定电压运行30 min,于凝胶成像系统中获取电泳图像。通过荧光偏振分析技术分别测定未添加Exo I核酸外切酶和添加该酶后体系中FAM标记引物所表征的FP值差异。

1.3.7 条件优化

(1) FAM荧光素修饰位置优化:通过设计4种在上游引物5'端不同T碱基处修饰FAM的引物,包括第1、6、16、28位。分别经过试验后测量FP值,通过信噪比分析筛选出距离引物结合区域最适的FAM荧光素修饰位置以实现最优检测灵敏度。

(2) Exo I浓度优化:利用Exo I水解引物以优化分子检测体系试验中,需要通过梯度浓度试验平衡消除背景信号效率与维持阳性信号强度的关系,采用5,10,15,20,25 U/μL的Exo I浓度梯度的水解体系,分别经过试验

后测量FP值。根据信噪比分析,基于最大信噪比准则筛选出既能使非目标扩增产物充分消化导致背景信号降至可接受阈值之下,又能保证特异性扩增产物引发的荧光偏振值实现显著增强,从而确定Exo I在体系中的最适浓度。

1.3.8 灵敏度检测 在最佳优化条件下,通过系统测定并分析不同浓度梯度的沙门氏菌样本(7.6×10^7 , 7.6×10^6 , 7.6×10^5 , 7.6×10^4 , 7.6×10^3 , 7.6×10^2 , 7.6×10^1 , 7.6×10^0 CFU/mL)所呈现的荧光偏振值变化规律,根据荧光偏振值与细菌浓度关系确定线性检测范围。阴性对照组不添加沙门氏菌,用等体积ddH₂O替代。

1.3.9 特异性检测 选择其他非目标病原体包括铜绿假单胞菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌和阪崎克罗诺杆菌作为干扰体系进行试验,浓度均为 10^7 CFU/mL,并与浓度为 7.6×10^6 CFU/mL的沙门氏菌以及同一浓度下5种菌液的混合物进行同步平行试验,从信号差异度验证检测体系对目标菌的特异性识别能力。

1.3.10 实际样本分析 选取市售包装牛奶作为实际样本载体,采用标准加标回收法评估检测能力,向27 mL牛奶中加入3 mL浓度分别为 7.6×10^2 , 7.6×10^4 , 7.6×10^6 CFU/mL的沙门氏菌,混匀,以模拟 7.6×10^1 CFU/mL(低污染)、 7.6×10^3 CFU/mL(中污染)、 7.6×10^5 CFU/mL(高污染)的真实污染场景,分别取1 mL牛奶加标样本,12 000 r/min离心10 min,沉淀中加入300 μ L SDS裂解液与60 μ L蛋白酶K,混匀,37 $^{\circ}$ C孵育30 min;90 $^{\circ}$ C金属浴加热10 min,12 000 r/min离心10 min,收集上清获得基因组DNA溶液,分装保存于-20 $^{\circ}$ C备用。随后在恒温反应条件下启动重组酶介导的特异性靶标扩增并检测荧光偏振,记录数值。全面验证该技术体系对食品中沙门氏菌快速检测的灵敏度、准确性与抗基质干扰能力。

2 结果与分析

2.1 可行性验证

由图2可知,当检测体系存在靶标DNA时,在177 bp

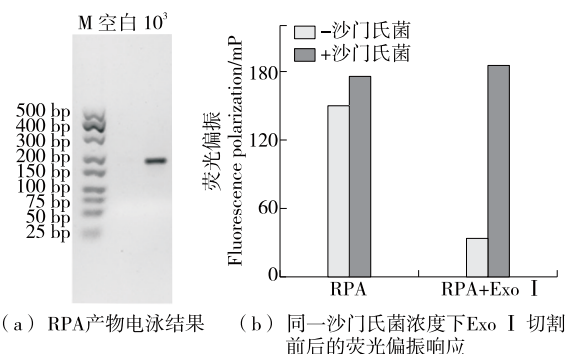


图2 可行性验证

Figure 2 Feasibility verification

相对分子质量标准位置观察到清晰的特异性电泳条带,而与对照体系相比,第2泳道的明亮条带证实了RPA扩增产物的高效合成。在无沙门氏菌时,当检测体系未经过Exo I酶消化时,使用FAM荧光基团标记引物测得较高的基础FP值,导致信噪比处于较低值,而经Exo I酶处理后背景FP值呈现显著衰减现象,这源于Exo I特有的单链核酸外切酶特性,其可特异性水解未参与扩增的游离的FAM标记引物,将其由长链单链核酸切割为相对分子质量显著降低的寡核苷酸片段,从而降低荧光基团分子的体积,加速其溶液中的自由旋转速率,最终导致荧光偏振信号的急剧下降;相较而言,阳性反应体系中生成的完整双链RPA扩增产物具有典型双链核酸刚性结构,能够完全抵抗Exo I酶的降解作用,其维持的大分子体积有效抑制FAM分子的旋转弛豫过程,形成稳定、显著的FP信号增幅,这种差异化响应机制成功实现了将原始信噪比提高至可满足精确定量要求的水平。

2.2 参数优化

2.2.1 最佳FAM荧光素修饰位置 由图3(a)可知,FP值的信噪比随着FAM荧光素与5'端距离逐渐变远而降低。这归因于荧光标记在双链DNA结构中的空间分布特性。

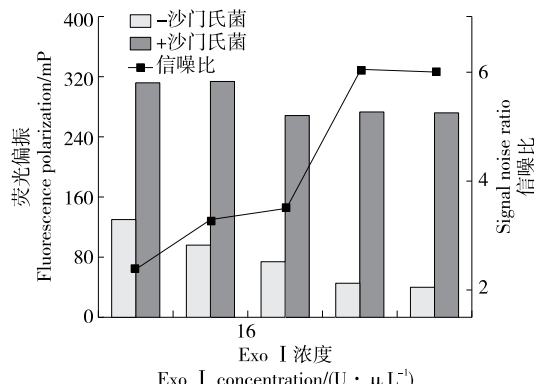
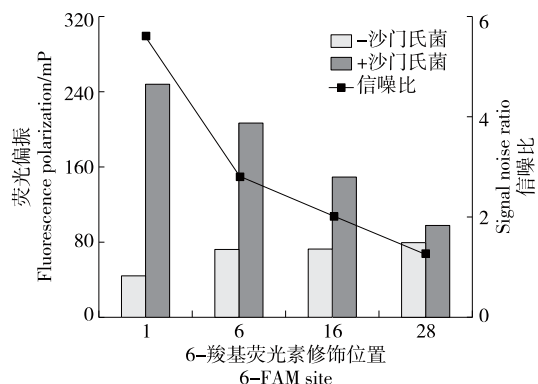


图3 FAM修饰T碱基位置与Exo I浓度的优化

Figure 3 Optimization of FAM modified T base position and Exo I concentration

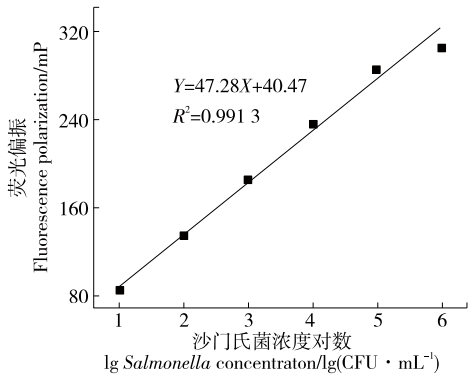
当 FAM 荧光素与引物末端间距增大时,其旋转半径的缩短导致分子旋转角速度升高,而由于荧光偏振强度与分子旋转速率呈负相关的物理机制,使得在最接近 5' 末端(即第 1 位 T 碱基处)修饰 FAM 荧光素时,能够凭借最大的旋转半径和最缓慢的角速度获得最高偏振响应值。因此,选择在引物 5' 端第 1 位 T 碱基上修饰 FAM 的位置作为试验方法的最佳 FAM 荧光素修饰位置。

2.2.2 最佳 Exo I 浓度 由图 3(b)可知,FP 值的信噪比随 Exo I 浓度的升高而增强,且在 20 U/ μ L 时达到最大,此时水解引物效率也达到最高,故选择 20 U/ μ L 为最佳

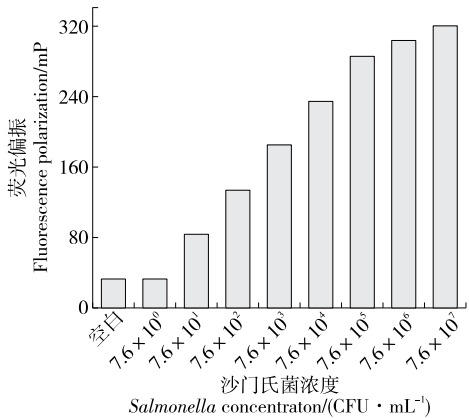
Exo I 浓度。

2.3 灵敏度分析

由图 4 可知,随着沙门氏菌浓度的增加,FP 信号显著增强。这是由于扩增后生成了更多带有 FAM 荧光素的靶标 DNA 双链,从而抑制了更多 FAM 荧光素的自由旋转,最终在偏振光照射下产生更强的 FP 信号。FP 值与沙门氏菌浓度之间的线性回归方程为 $Y=47.28 \lg X+40.47$, $R^2=0.9913$ 。通过空白样品 FP 信号值 3 倍的标准偏差计算出最低检测限为 11 CFU/mL,表明该方法具有较强的灵敏度。



(a) 不同浓度沙门氏菌下 FP 信号值



(b) FP 信号值与沙门氏菌浓度之间的线性关系

图 4 灵敏度检测

Figure 4 Sensitivity detection

2.4 特异性分析

由图 5 可知,浓度较高下,所有非靶标病原体的 FP 信号与阴性对照几乎没有差异,而沙门氏菌及其混合物产生了显著的 FP 信号,表明重组酶聚合酶扩增辅助增强荧光偏振检测方法在沙门氏菌检测中具有优良的特异性。

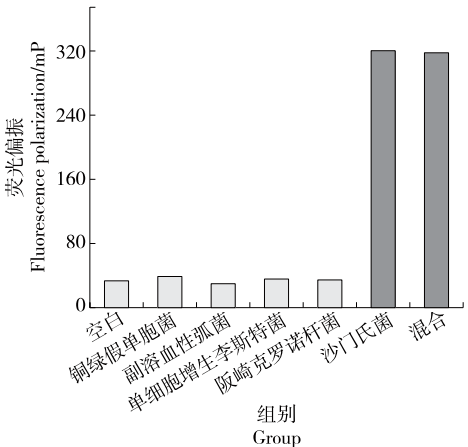


图 5 特异性检测

Figure 5 Specificity detection

2.5 实际样本分析

由表 1 可知,在指定加标浓度下,加标回收率为 95.3%~104.3%,RSD 值均低于 4%,表明该方法在实际应用中具备出色的可靠性及广泛的发展前景。

表 1 牛奶样本中沙门氏菌加标回收试验

Table 1 Standard recovery test of *Salmonella* in milk samples

加标量/ (CFU·mL ⁻¹)	测定值/ (CFU·mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
7.6×10 ¹	7.90×10 ¹	104.0	3.59
7.6×10 ³	7.24×10 ³	95.3	2.64
7.6×10 ⁵	7.39×10 ⁵	97.2	1.98

3 结论

通过对引物 5' 端修饰 6-羧基荧光素,经过重组酶聚合酶扩增后使得 6-羧基荧光素被修饰到靶双链 DNA 上,相对分子质量和体积均显著增大,抑制 6-羧基荧光素的自由旋转,因此荧光偏振增强。同时利用 Exo I 切割未扩增的引物,导致其修饰的 6-羧基荧光素掉落下来,由于其较小的相对分子质量和体积,难以抑制 6-羧基荧光素的

旋转,进而降低背景信号,以此达到高信噪比的效果。综上,试验方法可以实现 $7.6 \times 10^1 \sim 7.6 \times 10^6$ CFU/mL范围内对沙门氏菌的定量检测,最低检测限为11 CFU/mL,且经过1 h反应后即可读取检测结果。尽管该研究在沙门氏菌快速检测领域取得了些许进展,但仍有一些方面值得进一步探索和优化。未来的研究可以从以下几个方向展开:①进一步开发集成化、智能化的现场检测设备。例如,将荧光偏振仪与智能手机等移动终端结合,开发用户友好的检测界面和数据传输系统,实现检测结果的实时分析和远程监控,从而更好地满足食品安全监测和现场筛查的需求。②在更复杂的实际样本(如鸡蛋,肉类样品等)中进一步验证其适用性和稳定性。③未来可探索将该研究开发的检测方法与新兴技术(如CRISPR Cas、微流控芯片、人工智能等)相结合,实现更高通量、更智能化的病原体检测。

参考文献

- [1] GALLO M, FERRARA L, CALOGERO A, et al. Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety [J]. Food Research International, 2020, 137: 109414.
- [2] HAMAIDEH S, OLAIMAT A, AL-HOLY M, et al. The influence of technological shifts in the food chain on the emergence of foodborne pathogens: an overview[J]. Applied Microbiology, 2024, 4(2): 594-606.
- [3] SUNARTI L S. Bacterial contamination in food: sources, risks, and prevention strategies[J]. International Journal of Pathogen Research, 2024, 13(6): 90-100.
- [4] LI C, CHEN X, WEN R Q, et al. Immunocapture magnetic beads enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a method for the sensitive, specific, and visual detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Biosensors, 2022, 12(3): 154.
- [5] 费鹏, 赵胜娟, 姜亦超, 等. 东北市售鸡肉中空肠弯曲杆菌的分离鉴定、分型及耐药性分析[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 46-49.
- FEI P, ZHAO S J, JIANG Y C, et al. Isolation, identification, multilocus sequence typing analysis and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from commercial chicken in northeast China[J]. Food & Machinery, 2018, 34(6): 46-49.
- [6] HAZEN T H, MICHALSKI J M, TENNANT S M, et al. Genomic diversity of non-diarrheagenic fecal *Escherichia coli* from children in sub-Saharan Africa and south Asia and their relatedness to diarrheagenic *E. coli*[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 1 400.
- [7] 曹文凯, 山珊, 刘道峰, 等. 基于dsDNA-CuNCs的荧光ELISA检测牛奶中的 *E. coli* O157:H7[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 38-43, 94.
- CAO W K, SHAN S, LIU D F, et al. A fluorescence ELISA based on dsDNA-CuNCs for the detection of *E. coli* O157:H7 in milk[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 38-43, 94.
- [8] HOWDEN B P, GIULIERI S G, WONG FOK LUNG T, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(6): 380-395.
- [9] 陈小敏, 黄泽璇, 谭礼浩, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对食源性致病菌抑菌机理及应用研究[J]. 食品与机械, 2024, 40(8): 127-134.
- CHEN X M, HUANG Z X, TAN L H, et al. Study on the inhibitory mechanism of epigallocatechin gallate against foodborne pathogens and its application[J]. Food & Machinery, 2024, 40(8): 127-134.
- [10] PENG Y B, XUE P P, WANG R J, et al. Engineering of an adaptive tandem CRISPR/Cas12a molecular amplifier permits robust analysis of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Talanta, 2024, 266: 125061.
- [11] 于晨, 杨露, 管峰, 等. 抑制副溶血性弧菌的乳酸菌筛选鉴定及其生物学特性研究[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 12-18.
- YU C, YANG L, GUAN F, et al. Screening, identification and biological characteristics of lactic acid bacteria inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 12-18.
- [12] XU J G, ZHANG X L, YAN C, et al. Triggering isothermal circular amplification-based tuning of rigorous fluorescence quenching into complete restoration on a multivalent aptamer probe enables ultrasensitive detection of *Salmonella*[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(2): 1 357-1 364.
- [13] ZHANG X L, PENG Y B, YAO L, et al. Self-assembly of multivalent aptamer-tethered DNA monolayers dedicated to a fluorescence polarization-responsive circular isothermal strand displacement amplification for *Salmonella* assay[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(4): 2 570-2 578.
- [14] SCHLECH W F. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(3): 2 018.
- [15] REYNOLDS D, KOLLEF M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update[J]. Drugs, 2021, 81(18): 2 117-2 131.
- [16] 王芳妹, 徐越, 林丹, 等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌实时荧光定量PCR快速检测[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 75-80.
- WANG F M, XU Y, LIN D, et al. Study on the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time fluorescence quantitative PCR in packaged drinking water[J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 75-80.
- [17] EHUWA O, JAISWAL A K, JAISWAL S. *Salmonella*, food safety and food handling practices[J]. Foods, 2021, 10(5): 907.
- [18] POPA G L, POPA M I. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide[J]. Germs, 2021, 11(1): 88-96.
- [19] KUEHN B. Multidrug-resistant salmonella[J]. Jama, 2019, 322(14): 1 344.

- [20] KAAVYA R, PANDISELVAM R, ABDULLAH S, et al. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 400-418.
- [21] GILCHRIST J J, MACLENNAN C A. Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease in Africa[J]. EcoSal Plus, 2019, 8(2): 1-23.
- [22] 宋晟, 高晗, 严礼, 等. 生鲜畜禽肉中沙门氏菌全基因组分析与分子溯源[J]. 食品与机械, 2020, 36(9): 55-62.
- SONG S, GAO H, YAN L, et al. Whole genome analysis and molecular traceability study of *Salmonella* in fresh livestock and poultry meat[J]. Food & Machinery, 2020, 36(9): 55-62.
- [23] BONNET M, LAGIER J C, RAOULT D, et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology[J]. New Microbes and New Infections, 2020, 34: 100622.
- [24] ZHU H L, ZHANG H Q, XU Y, et al. PCR past, present and future[J]. BioTechniques, 2020, 69(4): 317-325.
- [25] JOSHI M, DESHPANDE J D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application[J]. International Journal of Biomedical Research, 2011, 2(1): 81-97.
- [26] XU L L, DUAN J X, CHEN J M, et al. Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies-a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1148: 238187.
- [27] YAN C, CUI J, HUANG L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2020, 26(6): 773-779.
- [28] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 98: 19-35.
- [29] TOMAR S, LAVICKOVA B, GUIDUCCI C. Recombinase polymerase amplification in minimally buffered conditions[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 198: 113802.
- [30] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. The Analyst, 2018, 144(1): 31-67.
- [31] LIU Y J, LIU H, YU G L, et al. One-tube RPA-CRISPR Cas12a/Cas13a rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1278: 341757.
- [32] JI T, ZHANG J L, GAO Y Z, et al. A rapid and visual detection of *Staphylococcus haemolyticus* in clinical specimens with RPA-LFS[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1273: 341534.
- [33] LUAN H R, WANG S J, JU L, et al. *KPI77R*-based visual assay integrating RPA and CRISPR/*Cas12a* for the detection of African swine fever virus[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1358960.
- [34] ZHAO C J, YANG L H, ZHANG X, et al. Rapid and sensitive genotyping of SARS-CoV-2 key mutation L452R with an RPA-*Pf* ago method[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(49): 17151-17159.
- [35] ZHANG H Y, YANG S P, DE RUYCK K, et al. Fluorescence polarization assays for chemical contaminants in food and environmental analyses[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 114: 293-313.
- [36] FANG X, WANG X Y, LI Y X, et al. Fluorescence detection of trace disinfection byproducts by Ag nanoprism-modulated lanthanide MOFs[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(4): 2436-2444.
- [37] AFZALINIA A, MIRZAEI M. Ultrasensitive fluorescent miRNA biosensor based on a "sandwich" oligonucleotide hybridization and fluorescence resonance energy transfer process using an In(III)-MOF and Ag nanoparticles for early cancer diagnosis: application of central composite design[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(14): 16076-16087.
- [38] ZHAO Q, TAO J, UPPAL J S, et al. Nucleic acid aptamers improving fluorescence anisotropy and fluorescence polarization assays for small molecules[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 110: 401-409.