

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.05.015

PCR双向开启硫黄素T/G四链体 探针无标记检测牛奶中沙门氏菌方法研究

尚慧杰, 徐建国, 彭育勃, 陈伟, 姚丽

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:文章提出一种基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的硫黄素 T(ThT)/G-四链体探针无标记检测牛奶中沙门氏菌(*Salmonella*)方法。以沙门氏菌的 *invA* 基因为检测目标,设计特异性发卡引物,通过 PCR 和特异功能的 G-四链体实现对沙门氏菌的检测。结果表明,该检测方法操作简便、特异性强、灵敏度高。在最优反应体系下,沙门氏菌的浓度与信号输出值具有良好的线性关系,其回归方程为 $Y=27.149X+0.292$, $R^2=0.981$,其线性范围为 $10^2\sim 10^6$ CFU/mL。纯菌样品和实际样品都能在细菌浓度为 10^2 CFU/mL 时检测出信号,表明该方法具有抗基质效应。研究结果为食源性致病菌的检测提供了一种新思路。

关键词:G-四链体;硫黄素 T;沙门氏菌;无标记检测;聚合酶链式反应(PCR)

中图分类号:TS252.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2025)05-0677-06

Bidirectional switch-on thioflavin T/G-quadruplex probe for polymerase chain reaction-based label-free detection of *Salmonella* in milk

SHANG Huijie, XU Jianguo, PENG Yubo, CHEN Wei, YAO Li

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: A method for the label-free detection of *Salmonella* in milk by thioflavin T/G-quadruplex probe combined with the polymerase chain reaction(PCR) was established. In this method, the *invA* gene of *Salmonella* was employed as the detection target, and the PCR amplification was conducted using specifically designed hairpin primers encoded with G-quadruplex function unit. The results showed that the detection of *Salmonella* in milk was simple, specific and sensitive. Under the optimal reaction system, there was a good linear relationship between the *Salmonella* concentration and the signal output value. The regression equation was fitted to be $Y=27.149X+0.292$ ($R^2=0.981$) with a linear range of $10^2\sim 10^6$ CFU/mL. Moreover, bacteria with concentrations as low as 10^2 CFU/mL can be detected in both pure and real samples, indicating that the method has a good anti-matrix effect. This study provides a new avenue for the detection of foodborne pathogens via molecular nucleic acid amplifications.

Key words: G-quadruplex; thioflavin T(ThT); *Salmonella*; label-free detection; polymerase chain reaction(PCR)

沙门氏菌^[1](*Salmonella*)是一种会导致食源性疾病的革兰氏阴性菌,常存在于未煮熟的牛肉、家禽或鱼、生鸡蛋、牛奶、生水果或蔬菜中^[2-4]。感

染沙门氏菌的人或带菌者的粪便会污染食品,很容易使人发生食物中毒。相关数据表明,在世界各国细菌性食物中毒的案例中,沙门氏菌引起的

收稿日期:2022-12-15;修回日期:2023-02-28

基金项目:安徽省重点研究与开发计划资助项目(202004h07020029;202104a07020008)

作者简介:尚慧杰(1994—),女,河南周口人,合肥工业大学硕士生;

徐建国(1990—),男,安徽六安人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:jgXu0816@163.com;

陈伟(1982—),男,江苏海安人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师。

食物中毒案例一直位居榜首^[5-8]。

为了保证食品安全,各种检测沙门氏菌的方法纷至沓来。目前,沙门氏菌的检测方法有传统标准检测方法^[9]、分子生物学方法^[10-13]、免疫学方法^[14]等。其中:传统的检测方法步骤多、时间长;免疫学方法能够节省一定的检测时间,但其不稳定、贮存时间短;核酸分子扩增技术因其特异性强、灵敏度高、便利等优点成为最常用的一种检测方法。但是,传统的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)需要与电泳表征相结合得到可视化的结果,并且不能准确定量。实时荧光定量 PCR^[15]能够进行定量分析,但其价格昂贵,需要专业人员和专业实验室,在应用上受到了很大限制。

G-四链体是由富 G 序列通过分子内或分子间 Hoogsteen 氢键连接成具有四股核苷酸链的 DNA 二级结构,特定的阳离子(K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 等)位于二级结构中心,进一步形成更稳定结构^[16-18]。在一定条件下,G-四链体可以与小分子结合形成具有特定生物活性的复合物结构。例如,G-四链体可以结合硫黄素 T(ThT)形成具有超强荧光的复合物。

硫黄素 T 因其价格低廉、使用方便、反应速度快等优点得到广大研究者的青睐。研究发现,ThT 能够对 G-四链体进行特异性识别并响应^[19],因此是 G-四链体优秀的配体和荧光指示剂。众所周知,ThT 自身背景信号低,单独存在于溶液中几乎没有荧光。当溶液中存在 G-四链体时,ThT 迅速识别 G-四链体,荧光信号显著增强,因此,ThT 被用于无标记荧光生物传感器。文献^[20]以 ThT/G-四链体为信号分子,开发出一种新的、简便的、低成本的、高灵敏度的单增李斯特菌检测方法。

基于以上特性,本文以沙门氏菌的特异性基因 *invA* 为目标,提出一种 PCR 双向开启硫黄素 T/G-四链体探针无标记检测牛奶中沙门氏菌方法,用于牛奶中沙门氏菌的快速灵敏检测。首先,设计 2 个包含有 G-四链体序列和发卡结构的上、下游引物,在目标物存在的条件下,上、下游引物迅速进行聚合酶链式反应,打开上、下游引物发卡序列中的发卡部分同时释放出 G-四链体序列,形成两端悬挂有 G-四链体序列的双链;然后,将 KCl 和 ThT 加入到扩增产物中,G-四链体结构形成和识别反应快速发生;最后,进行荧光信号的测量和输出。本研究基于 PCR 和硫黄素 T/G-四链

体探针构建一种新的无标记生物传感平台,以期为食源性致病菌的快速、灵敏检测提供一种新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

牛奶购置于当地超市;Taq PCR Mix 预混液(2×,不含染料)、20×PBS 缓冲液、DNA Marker、loading buffer、琼脂糖、1×TBE 电泳液、ddH₂O、1×TE 缓冲液、4S Red plus 核酸染料、硫黄素 T 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;单核细胞增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*, ATCC 19111)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*, ATCC 33844)、大肠杆菌 O157:H7(*E. coli* O157:H7, ATCC 43888)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 65389)和沙门氏菌(*Salmonella*, CMCC 50010)均由广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC)提供;实验所用引物均购于生工生物工程(上海)股份有限公司,所用引物序列如下。

上游引物: GGGTAGGGCGGGTTGGG/
iSp18/CCCAACCCGCCCTACCCGCGAGTGG
TAAATTATTCCGAT;

下游引物: GGGTAGGGCGGGTTGGG/
iSp18/CCCAACCCGCCCTACCCGCCAGACAG
TGGTAAAGCTC.

其中:波浪线部分为 G-四链体序列;下划线部分为特异性引物序列。

1.2 主要仪器

本实验所用仪器有:JA2003 电子分析天平(上海雷磁有限公司);SI-0246 微型涡旋混合仪(美国 SI 科技有限公司);F97 Pro 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司);Heraeus Fresco17 低温高速离心机(浙江新春兰科技有限公司);T1001 热循环 PCR 仪(美国伯乐公司);LG2080 型凝胶成像分析仪(杭州朗基科学仪器有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 的提取

将各种菌株接种至 Luria-Bertani(LB)培养基中,在恒温培养箱中 37 °C 条件下培养 24 h。使用稀释涂布平板法将稀释后的菌悬液均匀接种至 LB 培养基上,37 °C 条件下培养 24 h 后计算菌落总数。

实验中所用细菌 DNA 模板依据文献^[21]方

法并细微修改进行提取。实验用 $0.4\ \mu\text{m}$ 的滤膜富集细菌菌液,取下富集后的滤膜放入 $20\ \text{mL}$ 的玻璃瓶中,加入适量的 $1\times\text{TE}$ 缓冲液超声 $5\ \text{min}$,将超声裂解后的溶液转移到新的 $1.5\ \text{mL}$ 无菌离心管中, $8\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$,所得上清即为提取的细菌 DNA。

1.3.2 检测沙门氏菌的检测

扩增反应液的总体积为 $25\ \mu\text{L}$,其中 PCR Mix $12.5\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 $0.7\ \mu\text{L}$,DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$,用无菌去离子水补齐至 $25\ \mu\text{L}$ 。运行程序如下: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $5\ \text{min}$, $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $52\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $30\ \text{s}$,运行 36 个循环;延伸 $5\ \text{min}$,产物 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。将 $2\ \text{mmol/L}$ 硫黄素 T 和 $50\ \text{mmol/L}$ KCl 各 $1\ \mu\text{L}$ 加入到扩增产物中, $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下孵育 $40\ \text{min}$ 。孵育完成后,在混合物中加入 $90\ \mu\text{L}$ ddH₂O,使用 F97 Pro 荧光分光光度计测定溶液中 G-四链体的荧光强度,激发波长设定为 $490\ \text{nm}$,荧光发射波长在 $500\sim 600\ \text{nm}$ 范围内收集,激发和发射的狭缝宽度均设置为 $10\ \text{nm}$,光电倍增管(PMT)检测器电压设置为 $650\ \text{V}$ 。

2 结果与讨论

2.1 沙门氏菌的检测原理

硫黄素/G-四链体探针结合聚合酶链式反应无标记检测牛奶中沙门氏菌的实验原理如图 1 所示。图 1 中:正向引物和反向引物的 5' 端都被修饰一段核苷酸序列,以形成稳定的发卡结构;修饰的正向引物和反向引物均由 4 个功能区组成,包含 G-四链体序列(蓝色)、Spacer 18(黑色)、G-四链体互补序列(灰色)、正向引物(橙色)、反向引物(绿色)。

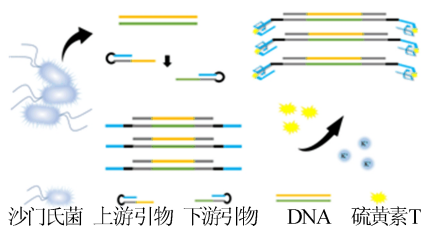


图 1 无标记生物传感器检测沙门氏菌的原理

G-四链体序列在 K^+ 作用下转化为稳定的 G-四链体结构。Spacer 18 发卡结构的环部可以阻断 Taq DNA 聚合酶的延伸。G-四链体互补序列与 G-四链体序列结合,使引物形成稳定的发夹结构。正向引物和反向引物可识别沙门氏菌的靶

DNA 片段,启动聚合酶链式反应。在没有目标物的情况下,聚合酶链式反应不会发生,不能释放出游离的 G-四链体序列,正向引物和反向引物始终处于稳定的发夹结构。当目标物存在时,聚合酶链式反应迅速进行,正向引物和反向引物的发夹结构被打开,形成两端悬挂游离的 G-四链体序列的 dsDNA。当 K^+ 出现时,dsDNA 产物两端悬挂的 G-四链体序列快速捕获 K^+ 并被诱导形成 G-四链体结构。信号分子硫黄素 T 加入能够嵌入 G-四链体结构的中心体凹槽中,G-四链体结构对其迅速识别、响应。此时,整个体系产生强烈的荧光信号,从而实现目标物沙门氏菌的检测。更重要的是,荧光强度可以准确反映牛奶中沙门氏菌的浓度。

2.2 可行性分析

为了评估实验的可行性,本文进行了荧光表征实验,结果如图 2 所示。图 2 结果与预期的效果一致:当没有目标物时观察到略低的荧光信号,表明在没有沙门氏菌的情况下会产生一定的背景;加入目标物沙门氏菌后,可以观察到荧光强度显著增加,与对照组相比显示出更强的荧光信号。为了给出更直观的结果,对沙门氏菌检测的信噪比($F/F_0 = 3.00$)和荧光信号差值($F - F_0 = 128.51$)进行评估,其中 F 和 F_0 分别表示样品中未加入和加入沙门氏菌的荧光信号。结果表明,本文构建的反应体系可以很容易地检测到沙门氏菌。因此,PCR 双向开启硫黄素 T/G-四链体探针无标记检测沙门氏菌是一种有效的方法。

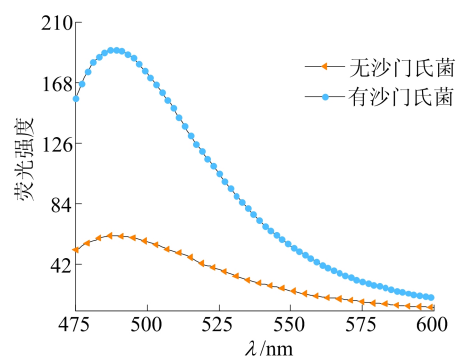


图 2 样品中有、无沙门氏菌时的荧光光谱图

2.3 实验条件的优化

退火温度决定 PCR 特异性与产量,因此首先对实验中的退火温度进行优化,如图 3 所示。特异性引物的理论退火温度为 $55\ ^\circ\text{C}$,实验中的引物 5' 端修饰有发卡结构,导致引物的退火温度有一

定的差异。由图 3 可知:当退火温度从 48.4 °C 升高到 50.5 °C,溶液中荧光强度差值(当前荧光强度与背景荧光强度的差值)也开始增强;当退火温度继续上升,从 50.5 °C 上升到 60.7 °C 时,溶液中的荧光强度差值开始降低。因此,最优退火温度为 50.5 °C。

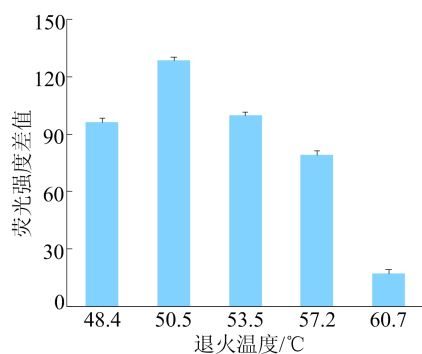


图 3 PCR 退火温度的优化

引物浓度会影响最终输出的荧光信号强度。PCR 产物量随着引物量的增加而增加,荧光强度也会随着 PCR 产物量的增多而增强,引物浓度对荧光强度差值的影响如图 4 所示。从图 4 可以看出:随着引物浓度的升高,溶液中的荧光强度差值也随之升高;当引物浓度提高到 0.36 $\mu\text{mol/L}$ 时,荧光强度差值达到最大,继续增加引物浓度,荧光强度差值保持不变。因此,选择 0.36 $\mu\text{mol/L}$ 为最优的引物浓度。

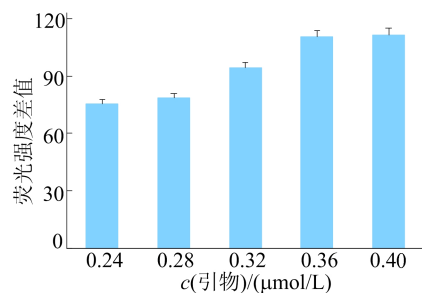


图 4 PCR 引物浓度的优化

硫黄素 T 是一种荧光指示剂,能与 G-四链体结构结合产生强烈的荧光信号。因此,有必要对硫黄素 T 的浓度进行优化,如图 5 所示。

硫黄素 T 浓度过低,不能与 G-四链体完全结合,荧光信号偏低;硫黄素 T 浓度过高,能与 G-四链体完全结合,荧光信号能完全输出,但是多余的硫黄素 T 会造成浪费。由图 5 可知,随着硫黄素 T 的浓度逐渐增大,荧光强度差值相应地逐渐增加;当硫黄素 T 浓度增加到 2.0 mmol/L 后,溶液

中的荧光强度差值几乎不变,达到平稳。因此,硫黄素 T 的最优浓度为 2.0 mmol/L。

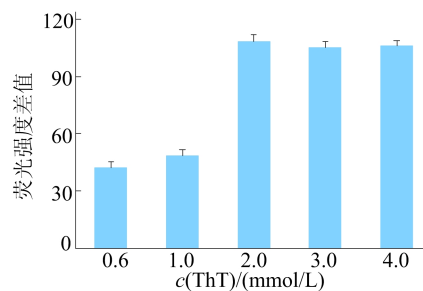


图 5 硫黄素 T 浓度的优化

2.4 灵敏度和特异性

将 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL 的沙门氏菌菌液按照实验中的方法进行细菌 DNA 的提取,得到不同细菌浓度下的细菌模板。在优化的反应条件下,采用构建的反应体系对不同细菌浓度菌液的荧光强度进行检测,结果如图 6a 所示。由图 6a 可知,随着细菌浓度的增加,溶液中的荧光强度也随之增加。在细菌浓度为 $10^2 \sim 10^6$ CFU/mL 范围内,细菌浓度与荧光强度之间存在良好的线性关系,如图 6b 所示。

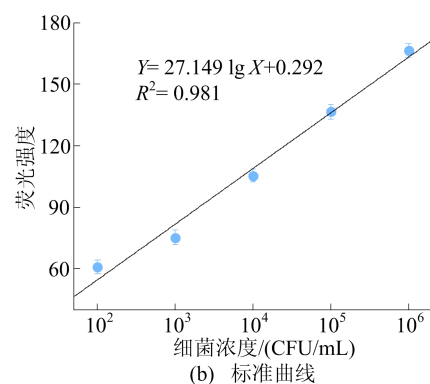
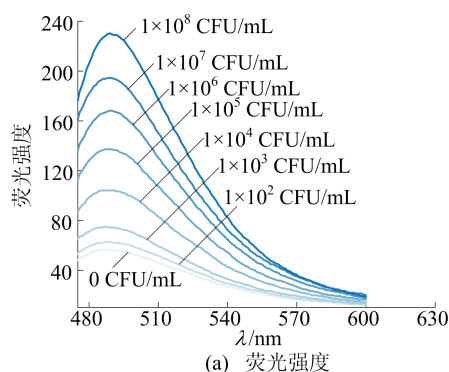


图 6 菌液的荧光强度及其标准曲线

为了探究本文所提出检测方法的特异性,本研究选取 5 种不同的细菌进行实验,结果如图 7 所示。

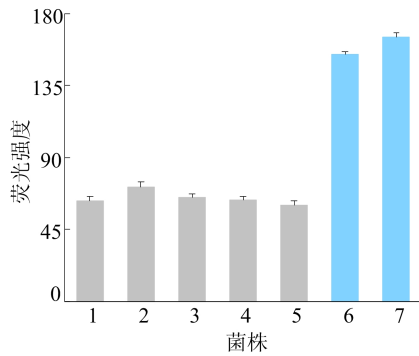


图7 无标记生物传感器对不同菌株的响应

图7中:1代表空白对照菌株;2代表单核细胞增生李斯特菌株;3代表副溶血性弧菌株;4代表大肠杆菌菌株;5代表金黄色葡萄球菌菌株;6代表5种混合细菌菌株;7代表沙门氏菌株。

从图7可以看出,在相同实验条件下,沙门氏菌株的荧光强度明显高于空白对照菌株和其他菌株,且在沙门氏菌株和其他菌株同时存在时,很容易将其区分。结果表明,该检测方法可以快速检测沙门氏菌,且不受非目标细菌的干扰。

2.5 实际样品检测结果

为了测试本文检测方法在实际应用中的可行性,将沙门氏菌加入牛奶中进行检测。取3 mL的沙门氏菌加到27 mL无菌牛奶中,充分混匀,按照上述反应程序,完成实际样本牛奶中沙门氏菌的检测,结果如图8所示。

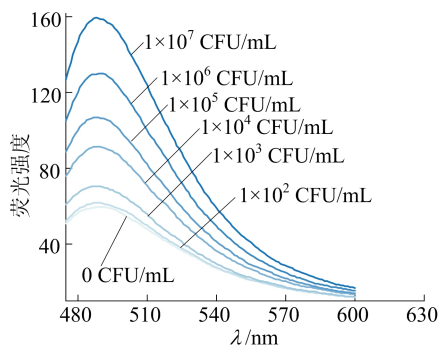


图8 牛奶中不同浓度沙门氏菌的检测结果

由图8可知,溶液中荧光强度随着牛奶中沙门氏菌浓度的增加而增加,在 10^2 CFU/mL时仍能检出信号。实际样品和纯菌样品检测结果表明,本文提出的检测沙门氏菌方法具有很强的抗基质效应。

3 结 论

本研究以沙门氏菌特异性基因 *invA* 为靶基

因,提出了一种聚合酶链式反应双向开启硫黄素T/G-四链体探针无标记检测沙门氏菌的方法,采用该方法构建的无标记生物传感平台特异性强、灵敏度高、易于操作、稳定性好。该生物传感器将聚合酶链式反应和硫黄素T/G-四链体探针相结合,可以快速实现对沙门氏菌的检测,为食源性致病菌的检测提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] THAMES H T, SUKUMARAN T A. A review of Salmonella and campylobacter in broiler meat: emerging challenges and food safety measures[J]. Foods, 2020, 9(6): 776.
- [2] 孙晋跃,张衡,张娇娇,等. 超声联合乳酸处理对沙门氏菌游离及生物膜菌体的杀菌作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(10): 270-278.
- [3] 孙瑜. 沙门氏菌的认识及检测方法概述[J]. 中国高新技术, 2022(11): 102-104.
- [4] 黎财慧,姚丽锋,张晴阳,等. 沙门氏菌活菌实时PCR检测方法研究[J]. 中国口岸科学技术, 2022, 4(10): 71-78.
- [5] 马恺,周翌婧,郑东宇,等. 2015-2020年江苏省食源性疾主动监测沙门氏菌情况分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(6): 33-37.
- [6] BAYRAC C, EYIDOGAN F, OKTEN H A. DNA aptamer-based colorimetric detection platform for *Salmonella enteritidis*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 98: 22-28.
- [7] LI X, ZHENG T, XIE Y N, et al. Recombinase polymerase amplification coupled with a photosensitization colorimetric assay for fast *Salmonella spp.* testing[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(16): 6559-6566.
- [8] XU J, ZHANG X, 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, 2021, 94(2): 1357-1364.
- [9] 李傲,贾波,刘枫,等. 沙门氏菌分析检测方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(2): 5-8, 18.
- [10] SHEN Y, XU L, LI Y. Biosensors for rapid detection of Salmonella in food: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 149-197.
- [11] DU J, WU S, NIU L, et al. A gold nanoparticles-assisted multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella typhimurium*, *listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Analytical Methods, 2020, 12(2): 212-217.
- [12] INAYAKA A C, NGO T A, KANT K, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 129: 224-230.

(下转第687页)

番茄果实成熟过程中作为负调控因子发挥作用,这将为延长果实的货架期、减少农业损失提供新的依据。

[参 考 文 献]

- [1] KURINA A B, SOLOVIEVA A E, KHRAPALOVA I A, et al. Biochemical composition of tomato fruits of various colors[J]. Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2021, 25(5):514.
- [2] CLINTON S K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease[J]. Nutrition Reviews, 1998, 56(2):35-51.
- [3] LEIVA-BRONDO M, VALCARCEL M, CORTES-OLMOS C, et al. Exploring alternative germplasm for the development of stable high vitamin C content in tomato varieties [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 133(40):84-88.
- [4] RAIOLA A, TENORE G C, BARONE A, et al. Vitamin E content and composition in tomato fruits: beneficial roles and bio-fortification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12):29250-29264.
- [5] BOHM V. Lycopene and heart health[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(2):296-303.
- [6] FRIEDMAN M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(40):9534-9550.
- [7] WANG X, PAN L, WANG Y, et al. *PpIAA1* and *PpERF4* form a positive feedback loop to regulate peach fruit ripening by integrating auxin and ethylene signals[J]. Plant Science, 2021, 313(37):111084.
- [8] 马芮, 李瑞雪, 郑煜聆, 等. 蓝莓 AP2/ERF 基因家族鉴定及其在休眠解除过程中的表达分析研究[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(12):2854-2864.
- [9] XIAO Y, CHEN J, KUANG J, et al. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(8):2499-2510.
- [10] 李鹤鹏. 番茄 *SIERF. F4* 转录因子在果实成熟及响应干旱胁迫中的功能分析[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [11] CAI X T, XU P, ZHAO P X, et al. Arabidopsis *ERF109* mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation[J]. Nature Communications, 2014, 5(1):5833.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 681 页)

- [13] 李师莹, 魏晓锋, 尹会方, 等. 沙门菌多重 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国家禽, 2022, 44(1):102.
- [14] BRANDO D, LIEBANA S, PIVIDORI M I. Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles[J]. New Biotechnology, 2015, 32(5):511-520.
- [15] HYEON J Y, MANN D A, WANG J, et al. Rapid detection of *Salmonella* in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification [J]. Poultry Science, 2019, 98(12):6973-6979.
- [16] XI H, JUHAS M, ZHANG Y. G-quadruplex based biosensor: a potential tool for SARS-CoV-2 detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 167:112494.
- [17] 刘健慧, 孙炜, 封龙宽, 等. G-四链体特性及其基于核酸辅助检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2):415-422.
- [18] YANG H, ZHOU Y, LIU J. G-quadruplex DNA for construction of biosensors [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 132:116060.
- [19] 刘双娜. 硫黄素 T 与包含 GA 平行双链之间作用及分析应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- [20] ZHAN X, LIU J, YAN L, et al. Sensitive fluorescent detection of *Listeria monocytogenes* by combining a universal asymmetric polymerase chain reaction with rolling circle amplification [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 169:181-187.
- [21] EVELYN, SILVA F V M. Ultrasound assisted thermal inactivation of spores in foods: pathogenic and spoilage bacteria, molds and yeasts [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105:402-415.

(责任编辑 闫杏丽)