

全细胞 SELEX 法筛选单增李斯特菌的 ssDNA 适配体

孙程, 徐宝霞, 徐珍霞, 陈福生, 吴仁蔚

(华中农业大学食品科学与技术学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 以单增李斯特菌活细胞为靶标, 采用指数富集配基的系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 从含 40 个随机碱基序列的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 文库中筛选与之特异性结合的适配体。酶联适配体吸附法 (ELASA) 测定筛选过程中次级文库与单增李斯特菌结合力的变化。对筛选得到的适配体进行序列测定, RNA structure 软件预测二级结构, ELASA 测定适配体与靶标的结合能力和特异性。结果显示, 每轮筛选后次级文库与靶标的亲和力增强, 特异性适配体逐步得到富集。测序获得 23 条适配体, 其序列同源性不高, 但预测的二级结构有些相似, 根据二级结构将其分为 3 个群, 分析结果表明二级结构与适配体的亲和力有关。挑选亲和力较强的 21 号 (Lma-21) 和 35 号 (Lma-35) 适配体能特异性地识别单增李斯特菌。本研究为开发食源性病原菌单增李斯特菌的新型检测试剂提供了基础材料。

关键词: 单增李斯特菌; ssDNA 适配体; 全细胞 SELEX; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2018)08-110-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.017

Selection of ssDNA Aptamers of *Listeria monocytogenes* by Whole SELEX

SUN Cheng, XU Bao-xia, XU Zhen-xia, CHEN Fu-sheng, WU Ren-wei

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this paper, aptamers against *Listeria monocytogenes* live cells were screened by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) from single-stranded DNA (ssDNA) library which contained 40 random bases. During the SELEX selection, affinity ability between ssDNA sub-library and *L. monocytogenes* was evaluated by enzyme linked aptamer absorbent assay (ELASA). The characteristics of aptamers including sequence, secondary structure, affinity and specificity to *L. monocytogenes* were studied. The results revealed that aptamers were enriched after 15 SELEX rounds and the affinity against target enhanced round by round. The aptamers of 23 different sequences obtained via sequencing were divided into 3 groups, according to the similarity of secondary structure predicted by RNA structure program. Also, it indicated that the secondary structure was related with the binding ability against the target. Two aptamers named Lma-21 and Lma-35 with high affinity could specifically recognize *L. monocytogenes*. This work provided necessary materials for the development of new type of detection reagents against *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; ssDNA aptamer; whole cell- SELEX; secondary structure

李斯特菌属共有 17 个种^[1], 只有单核细胞增生李斯特菌 (以下简称单增李斯特菌) 对人具有致病性, 能引起严重的李斯特菌病^[2], 病死率高达 20%~30%, 特别是对孕妇、新生儿、年老体弱和免疫缺陷的人危害更大^[3-5]。它引起的散发与爆发性病例绝大多数与食品受到污染有关, 一般与即食食品也包括二次污染的烹饪食物有关, 已报道的有乳制品、肉制品、冷冻食品、鲜切果蔬, 甚至冰激凌等^[6-10], 在多个国家和地区都引起过李斯特菌食物中毒事件。该菌被世界卫生

组织列为四大食源性病原菌之一, 在美国位居微生物引起的食源性致死病例第三位, 自 2000 年在欧洲的发病也呈逐年增高的趋势^[11]。各国政府和国际组织都制定了严格的食物安全限量标准^[12-14]。

为了减少单增李斯特菌引起的食物中毒事件的发生, 对食品和生产环境进行监测是必不可少的手段。随着科学技术的发展, 各种新型检测方法和检测试剂不断被开发和应用。适配体, 一种能够特异性识别靶标的新型配体, 有望成为生物抗体的替代物, 受到国内外学者的高度关注。适配体是从合成的随机寡核苷酸文库中筛选得到的能与靶分子特异性结合的单链 DNA 或 RNA^[15,16]。无论作为治疗、诊断还是检测试剂, 适配体都具有独特的优势。如库容量大; 靶分子范围广, 包括真核细胞、蛋白质、细菌、病毒、核酸和小分子物质等^[17]; 识别抗原结构精细, 可以区分结

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201374); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2662015PY152) 资助

作者简介: 孙程 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全

通讯作者: 吴仁蔚 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与食品安全

构类似物或交叉抗原的鉴别诊断^[18]；性质稳定，对酸碱和热有很好的耐受性；可以连接染料、药物、多肽、蛋白、金属离子、抗体和酶等以满足不同使用目的；无需使用实验动物，可通过化学合成法无限获取并且批次间差异小^[19]。所以有关适配体筛选方法、构效关系及其应用方面的研究进展飞速^[20-24]。

本研究以单增李斯特菌为靶标，采用全细胞 SELEX 技术筛选 ssDNA 适配体，经序列测定、二级结构分析，以及 ELASA 法进行分析，以获得特异性好、亲和力高的适配体，为开发单增李斯特菌的富集和检测方法提供新型试剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ssDNA 文库与引物

ssDNA 长 85 bp，两端为引物序列，中间为随机序列，序列为 5'-AAGGATCCGAACGCTGCTGGTAT--(N40)--AGTGTGAGCGGCGGAATTCAT-3'。引物：引物 I 5'-AAGGATCCGAACGCTGCTGGTAT-3'；

引物 II 5'-CGCCGCTCAACACTGAATTCAT-3'；

引物 III 5'-(Digoxin)AAGGATCCGAACGCTGCTGGTAT-3'；

引物 IV 5'-(Biotin)CGCCGCTCAACACTGAATTCAT-3'。

ssDNA 文库与引物均由生工生物工程技术有限公司（上海）合成，引物 III 和引物 IV 分别做地高辛和生物素标记。

1.1.2 实验用菌株

单增李斯特菌 C53004-1598 由中国兽医微生物菌种保藏管理中心提供。单增李斯特菌 ATCC15313、绵羊李斯特菌 (*L. ivanovii*) ATCC 19119、格氏李斯特菌 (*L. grayi*) ATCC25401、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*) ATCC 33090、威尔氏李斯特菌 (*L. welshimeri*) ATCC35897、西李氏李斯特菌 (*L. seeligeri*) ATCC35967 均由中国食品药品检定研究院提供。

1.1.3 主要试剂

小分子量 DNA 纯化试剂盒为美国 Mobio 公司产品；抗地高辛抗体碱性磷酸酶为 Roche 公司产品；链霉亲和素磁珠 M-280 为 Invitrogen 公司产品；质粒提取试剂盒；PCR 相关试剂和 pMD18-T vector 均为北京天根生化科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 SELEX 筛选过程^[16]

取 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ssDNA 文库 6 μL 加到 600 μL 选择缓冲液的 EP 管中，96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后立即冰浴。与 10^8 CFU/mL 菌液 120 μL 混合后于室温震荡结合 1 h。12000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，弃上清。600 μL 选择缓冲液重悬沉淀，重复洗涤后 ssDNA 与菌体结合物用 100 μL 无菌 ddH₂O 于 96 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min，离心后吸取上清液获得次级文库，为了获得特异性强亲和力高的适配体，对筛选过程进行不断调整（表 1），同时进行反相筛选去除与 EP 管表面结合的 ssDNA。重复上述步骤循环筛选。

表 1 SELEX 的筛选条件

Table 1 Condition of SELEX selection

筛选轮数	菌液体积/ μL	洗涤次数	与菌液孵育时间/min
1~4	120	3	60
5~8	100	5	45
9~12	80	7	30
13~15	50	7	15

1.2.2 次级文库的制备

1~15 轮筛选过程中加热洗脱的次级文库引物 I 和引物 IV 进行 PCR 扩增以增加产量，对 PCR 的退火温度和模板量两个因素进行了优化。反应体系为 2 $\times$ Taq PCR Mix 15 μL 、10 μM 上下游引物各 1 μL 、模板（即筛选的次级文库）、去离子水补足体积。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s，不同温度退火 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s。PCR 产物经 10% 非变性 SDS-PAGE 凝胶电泳进行检测，然后进行硝酸银染色观察。链霉亲和素磁珠 M-280 去除互补链（操作过程按照说明书进行），得到 ssDNA 次级文库，用于下一轮筛选。

1.2.3 次级文库结合能力的测定^[21]

筛选得到的 ssDNA 次级文库用引物 III 和引物 IV 扩增，扩增产物利用 M-280 磁珠吸附去除生物素标记的互补链后，获得地高辛标记的 ssDNA，将 100 pmol ssDNA 与 1.6×10^{10} CFU 单增李斯特菌在 500 μL 选择缓冲液中结合 30 min，12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，弃上清。加入 100 μL 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，弃上清，重复洗涤 3 次。加 100 μL p-NPP 溶液显色，2 mol/L 氢氧化钠 100 μL 终止反应，酶标仪测定 405 nm 的吸光度值 ($A_{405\text{nm}}$)。评价各轮筛选的次级文库与靶标的结合能力。

1.2.4 适配体结构分析

最终获得的 ssDNA 文库经扩增后连接 pMD-18T 载体，转化埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 感受态细胞，挑选阳性克隆子由生工生物有限

公司测序。将测序获得的 23 条适配体序列经 DNAMAN 和 RNA Structure 分析一级结构的同源性和预测二级结构。

1.2.5 适配体与靶标的结合能力与特异性分析

合成 23 条适配体,按照 1.2.3 方法以 ELASA 法测定其与单增李斯特菌的结合能力,以及识别不同种李斯特菌与非李斯特菌的特异性。每个实验重复 3 次,经独立样本 T 检验,在 $\alpha=0.01$ 的水平上对适配体识别单增李斯特菌与其它细菌的特异性进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增条件的确定

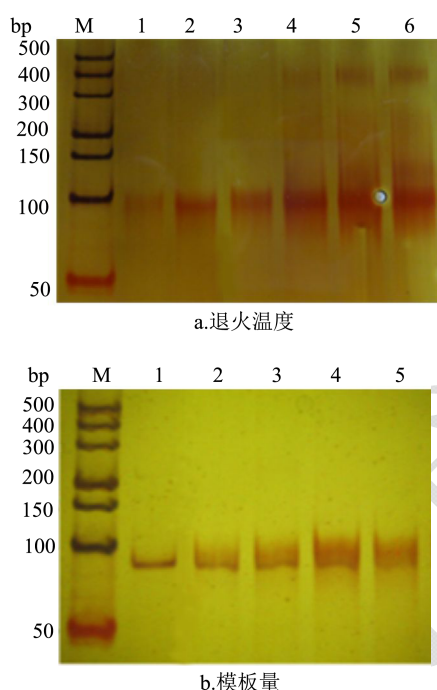


图 1 PCR 扩增次级文库的反应条件

Fig.1 Reaction condition of sub-library amplification by PCR

注: a: 退火温度,泳道 M: DNA marker; 泳道 1~6 分别为 66 °C, 68 °C, 70 °C, 72 °C, 74 °C, 76 °C。b: 模板量,泳道 M: DNA marker; 泳道 1~5 分别为 1 pmol, 2 pmol, 3 pmol, 4 pmol, 5 pmol。

本研究主要对 PCR 扩增的退火温度和模板量进行了优化,结果见图 1。随着退火温度升高产物增加,至 72 °C 达到最大。在 ssDNA 模板量为 1 pmol 时 PCR 产物电泳条带整齐,没有拖尾弥散,随着模板量增加 dsDNA 没有明显增加,ssDNA 增多,说明在当前 PCR 反应体系中加入的 ssDNA 模板过剩。所以在本次 PCR 反应体系中 ssDNA 模板使用量为 1 pmol,反应的退火温度采用 72 °C。

2.2 SELEX 过程次级文库的富集

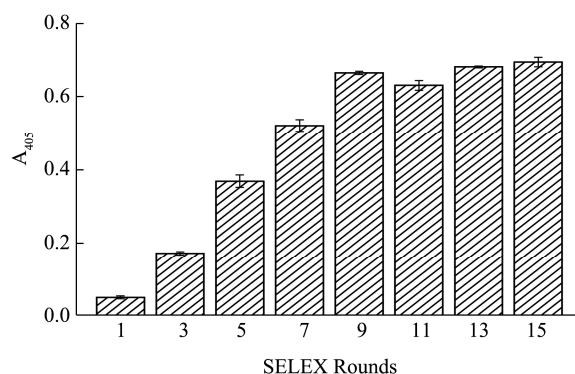


图 2 ELASA 测定次级文库的富集

Fig.2 Enrichment of ssDNA sub-libraries evaluated by ELASA

图 2 显示 ELASA 法测得的次级文库与单增李斯特菌结合的吸光度值。 A_{405nm} 从第 1 轮的 0.051 到第 15 轮的 0.69,提高了 13.5 倍,说明随着筛选轮数的增加二者的结合能力不断增强,特异性的适配体不断得到富集,13 轮到 15 轮的结果表明次级文库的结合趋于饱和。

2.3 适配体序列及二级结构预测

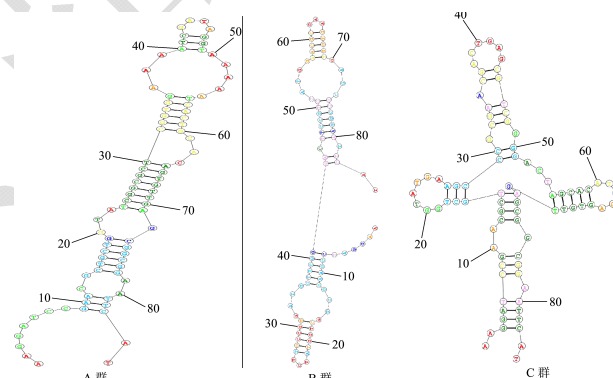


图 3 RNA Structure 预测适配体二级结构

Fig.3 Secondary structures of aptamers predicted by RNA

Structure

测序共获得 23 条适配体,随机序列区见表 2, DNAMAN 分析适配体随机序列非常多样化,在随机序列区最多有 8 个连续相同的碱基,如适配体 10 和 45 有相同序列-TGGCCAAC-,适配体 7 和 32 有相同序列-TTTTTTTT-,其次为适配体 29、43 和 44 有 7 个连续相同的碱基-TCGGGGA-其余适配体之间连续相同碱基序列较少。

RNA Structure 进行二级结构预测,以自由能最低作为适配体的二级结构,结果发现一些序列不同的适配体二级结构却相似,根据二级结构的相似性将 23 条适配体分为 A、B、C3 个群,取每个群自由能最低的适配体结构作为代表(见图 3)。A 群适配体所占比

例最高（12/23），有口袋结构，连续的茎环和发夹结构。B 群适配体所占比例最少（3/23），似乎有 2 个分开的茎环结构。C 群（8/23）有多个茎环结构，口袋结构。

2.4 适配体与靶标的结合能力与特异性分析

ELASA 法测定 23 条适配体与单增李斯特菌的结合能力，结果见表 2，说明经过多轮筛选亲和力较高的适配体得到富集，但不同的适配体结合能力有差异。靶标的结合能力与其二级结构有相关性。

选取的 21 和 35 号适配体特异性分析结果见图 4，其不仅能识别筛选用菌株，而且能识别其它单增李斯特菌菌株，且相比于其它种李斯特菌、肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌的识别能力差异极显著($p<0.01$, $n=3$)，说明这 2 条适配体能特异性识别单

增李斯特菌。这为特异性富集和检测单增李斯特菌奠定重要基础。

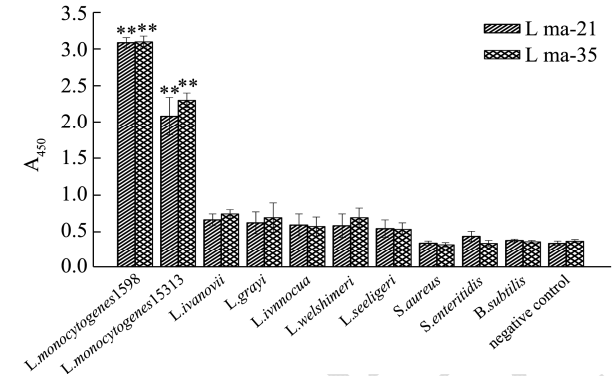


图 4 21 号和 35 号适配体的特异性

Fig.4 Specificity of aptamers Lma-21 and Lma-35

注：**表示 21 号和 35 号适配子对单增李斯特菌的识别相比比其他菌具有极显著性差异。

表 2 适配体特性分析

Table 2 The characteristic of aptamers

Aptamer	Sequences of random region (5'→3')	与靶标结合能力(A _{405nm})
4 ^a	CTCACTGATCGATCTCTAATACATTTTATTTCTTACGTTCT	3.27±0.08
6 ^a	GGTCCGTGAAGACGTCTGATGTCCGGAAGCGCGGTACA	2.08±0.02
7 ^a	TTTTCTTTTTTGCTTCTTTCTTTTTTTTTTTTGCTC	1.73±0.03
10 ^a	CTGGTACACTGGCCAACAACGCCGTTTTATCTTTACAG	1.1±0.04
19 ^a	CAATAGGAAGTACGCTCCGTGGTCTGGAGGTGAAGGTCAA	1.11±0.09
20 ^a	GAAGGACACTTGTCCCTGCACGCACAACGGGTAGTACCT	3.16±0.03
21 ^a	AAAAACGGCCTATTAACAGAACCGGTGACGCAATAGGTAC	3.32±0.11
22 ^a	TTGTTGAAGGACCAACTGGATCAATACAGAGCGAAGCCCA	2.43±0.07
23 ^a	GGTCACTGATTCTACCGTTAGGTCCAACAGTACGCACGAA	2.52±0.02
29 ^a	AGGTCCTCGGGGAGCCTGAGAGGCGGGGCGCAAGCTGGAT	0.80±0.05
32 ^a	CTTTTTTTTGTTTTTTTCTCTCTTTTTTTCTTTTTTTTC	2.52±0.08
43 ^a	AGTTATCTCGGGGAATGAAAAGACGGTGATGCGTATGTCA	2.67±0.08
45 ^a	GGCCCGTAGAAGGACATCGCCCTGTGGCCAACCTAGGTGG	2.59±0.04
48 ^a	CGGCGCTCGGTGGAAAATCGATAGGTAAAAATCACTGCAC	3.32±0.11
15 ^b	ACGTAACCTGCGGTTGCAGGATCATGCCCAAGTCCAAACG	1.86±0.07
17 ^b	GTTGCCGGGATGGTTTCGGGACTTCCGTCCATGGAACGCGA	1.21±0.12
52 ^b	GCGATGCTGAAGAGGAGGGAAATGAGGTCCGCAGCGGGAG	3.14±0.07
11 ^c	CCTCGCCGGTGCGGACAATAGGCAGCTATGCAAGACGGGA	2.45±0.007
25 ^c	GCGCACGTTACAATTTCTAAGCGAAGGTTCCGCCACCGATA	2.35±0.09
33 ^c	ACACAGCCAGTCCACAGTGGATGGGACGAACTTACAAATG	0.89±0.035
35 ^c	CCGCCAGCCTTTAATGGCTTGTTTAAATCGCATCTGGACAC	3.27±0.04
39 ^c	ATGATCGAGTCGGACCAGATATCTCCCCCTATTCTTAGGG	1.54±0.03
44 ^c	GAAGCCCGGAACGACTGAGCGTCGGGGACTAGCACATCG	3.17±0.05

注：a、b、c：适配体二级结构群。

3 讨论

3.1 全细胞 SELEX 是以整个真核或原核细胞作为筛

选的靶标，细胞表面蛋白和一些未知的结构都可以是适配体结合的目标。通过这种方法筛选适配体不需要对表面蛋白有太多的了解，这反而有助于发现用于诊

断和成像的新型生物标志物^[17]。而且采用全细胞作为靶标,通常细胞不固定,可以保持抗原决定簇的天然结构不发生变化。该方法在筛选病原菌的适配体方面具有优势^[25]。

3.2 虽然李斯特菌属中只有单增李斯特菌对人具有致病性,但由于他们的生理生化特性和在环境中的存活能力相似,因此其它几种李斯特菌的检出可能意味着有单增李斯特菌的存在或者说明环境条件允许单增李斯特菌的存在、生长,因此一定程度上具有指征作用^[26,27]。本研究在适配体筛选过程中采用全细胞作为靶标,目的是尽可能保持抗原决定簇的天然结构不发生变化,而且在筛选过程中未对其它李斯特菌进行反向筛选,目的是能够同时获得具有属特异性和种特异性的适配体。Lma-21 和 Lma-35 适配体表现出特异性识别单增李斯特菌的能力,而李斯特菌属特异性适配体结果将在后续进行深入研究,该研究对后续开展以适配体进行菌体富集和检测的研究具有重要意义。

3.3 本研究获得的适配体,通过软件分析,序列同源性不高,分析原因可能是筛选过程使用的靶标是全细胞,菌体表面存在较多的抗原表位,而适配体识别抗原表位极为精细,甚至咖啡因和茶碱这样的结构类似物也能被识别^[18],这增加了与靶标结合的适配体库的丰度,造成适配体序列同源性不高。此结果与 Duan^[28]的结果吻合。

3.4 在进行二级结构分析时发现,一些序列不同的适配体二级结构却相似。Heiat 等^[23]也发现不同适配体序列可以形成相似的二级结构,而且与靶标的亲和力有差异,他们认为仅仅分析序列同源性和二级结构都不能很好地阐明适配体与靶标的相互作用。许多学者对适配体的高级结构进行了深入研究,普遍认为它们的分子间作用包括精密的平面叠加,特异性的氢键结合和分子形状的互补等,这种识别的基本原理与许多细胞识别、生物抗体以及核酸识别是一致的^[23,24]。笔者正对筛选得到的适配体高级结构进行分析,以明确适配体识别抗原位点的分子基础和核心序列,为修饰适配体,提高特异性和亲和力提供参考。

4 结论

本研究以单增李斯特菌为靶标,采用全细胞 SELEX 技术筛选 ssDNA 适配体,经序列测定和二级结构分析表明适配体的高级结构与其识别靶标的能力明显相关。经 ELASA 法分析,获得了能特异性识别单增李斯特菌的适配体,且亲和力高。本研究为后续开发富集和检测方法提供了可持续获取的基础材料,弥补了生物抗体的一些不足之处。

参考文献

- [1] Orsi R H, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5273-5287
- [2] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2010, 16(1): 16-23
- [3] Wadhwa D R, Smith MA. Pregnancy-related listeriosis [J]. birth defects research, 2017, 109(5): 324-335
- [4] Preußel K, Milde-Busch A, Schmich P, et al. Risk factors for sporadic non-pregnancy associated *Listeriosis* in Germany-immunocompromised patients and frequently consumed ready-to-eat products [J]. PLoS One, 2015, 10(11): 1-15
- [5] Gómez D, Azón E, Marco N, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment [J]. Food Microbiology, 2014, 42: 61-65
- [6] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis [J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1236-1243
- [7] Currie A, Farber J M, Nadon C, et al. Multi-province listeriosis outbreak linked to contaminated deli meat consumed primarily in institutional settings, Canada, 2008 [J]. Foodborne Pathogen and Disease, 2015, 12: 645-652
- [8] Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis associated with jensen farms cantaloupe-United States, August-September 2011. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, 2011, 60: 1357-1358
- [9] John G B, Taylor P, Tiffany M. Development of a fluorescent enzyme-linked DNA aptamer-magnetic bead sandwich assay and portable fluorometer for sensitive and rapid *Listeria* detection [J]. Journal of Fluorescence, 2015, 25(1): 173-183
- [10] Wang P, Yang H, Hu Y, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in import food products of China from 8 provinces between 2005 and 2007 [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(4): 212-216
- [11] Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States [J]. Infection Genetics and Evolution, 2015, 35: 172-183
- [12] European Commission (EC). (2005). Commission regulation

- on microbiological criteria for foodstuffs. (EC) No 2073/2005 [J]. Official Journal of the European Union, L338, 1-26
- [13] Food and Drug Administration (FDA). (2008). Compliance policy guide. Sec. 555.320. *Listeria monocytogenes* accessed june 2014
- [14] GB 29921-2013, 食品安全国家标准食品中致病菌限量[S]
GB 29921-2013, the national food safety standard for the limit of pathogenic bacteria in food [S]
- [15] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6287): 818- 822
- [16] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510
- [17] Yüce M, Ullah N, Budak H, et al. Trends in aptamer selection methods and applications [J]. Analyst, 2015, 140(16): 5379-5399
- [18] Jenison R D, Gill S C, Pardi A, et al. High-resolution molecular discrimination by RNA [J]. Science, 1994, 263: 1425-1429
- [19] Jayasena S D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics [J]. Clinical Chemistry, 1999, 45(9): 1628-1650
- [20] Mao Y, Huang X, Xiong S C, et al. Large-volume immunomagnetic separation combined with multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in lettuce [J]. Food Control, 2016, 59: 601-608
- [21] John G Bruno. Development of a Fluorescent enzyme-linked DNA aptamer-magnetic bead sandwich assay and portable fluorometer for sensitive and rapid *Listeria* detection [J]. Journal of Fluorescence, 2015, 25(1): 173-183
- [22] 郎春燕,江树勋,邵碧英,等.应用 SELEX 技术筛选沙门氏菌抗原的适配体[J].食品科学,2011,32(13):194-197
LANG Chun-yan, JIANG Shu-xun, SHAO Bi-ying, et al. The aptamer against *Salmonella* antigen screened via SELEX [J]. Food Science, 2011, 32(13): 194-197
- [23] Heiat M, Najafi A, Ranjbar R, et al. Computational approach to analyze isolated ssDNA aptamers against angiotensin II [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 230: 34-39
- [24] Hermann T, Patel D J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. Science's Compass, 2000, 287: 820-826
- [25] Suh S H, Dwivedi H P, Jaykus L, et al. Development and evaluation of aptamer magnetic capture assay in conjunction with real-time PCR for detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2014, 56(2): 256-260
- [26] Suh S H, Jakus LA. Nucleic acid aptamers for capture and detection of *Listeria* spp [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(4): 454-461
- [27] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584
- [28] Duan N, Ding X H, He L X, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2013, 33(1): 239-243