

食品中空肠弯曲菌荧光重组酶聚合酶扩增检测方法的建立

兰全学¹, 陈佳平², 杨慧¹, 杜文旗¹, 金玉娟¹, 甘莉萍¹, 刘渠¹, 刘小青²

(1. 深圳市龙岗区疾病预防控制中心, 广东深圳 518172) (2. 深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518109)

摘要: 本研究为了实现空肠弯曲菌的快速和便捷检测, 建立了一种基于荧光重组酶聚合酶扩增技术(exo-RPA)快速检测空肠弯曲菌的方法。通过对空肠弯曲菌和对照菌株的exo-RPA检测来判断该方法的特异性。用梯度稀释的空肠弯曲菌作为模板进行检测来分析exo-RPA方法的灵敏度。通过对模拟污染样品检测来分析exo-RPA的应用效果。分别以exo-RPA和荧光PCR检测实际食品样品来分析二者的检测效果。空肠弯曲菌exo-RPA方法可特异检出空肠弯曲菌, 检测灵敏度达到 6.0×10^2 CFU/mL。在模拟污染试验中, 含 2.5×10^1 CFU/mL空肠弯曲菌的增菌液在培养24 h后可以被exo-RPA检测出阳性信号。exo-RPA和荧光PCR对于40份样品的检测结果相同。本研究建立的空肠弯曲菌exo-RPA具有特异、灵敏和抗干扰性强的特点, 方法操作简便快速, 具有较好的应用前景。

关键词: 重组酶聚合酶扩增技术; 空肠弯曲菌; *hipO* 基因

文章篇号: 1673-9078(2020)05-304-309

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.040

Development of a Detection Method for Food-borne *Campylobacter jejuni* Based on Fluorescence Probe-based Recombinase Polymerase Amplification

LAN Quan-xue¹, CHEN Jia-ping², YANG hui¹, DU Wen-qi¹, JIN Yu-juan¹, GAN Li-ping¹, LIU Qu¹, LIU Xiao-qing²

(1. Shenzhen Longgang District Center for Disease Control and Prevention. Shenzhen 518172, China)

(2. Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection. Shenzhen 518109, China)

Abstract: In order to achieve rapid and convenient detection of *Campylobacter jejuni*, a rapid detection method of *Campylobacter jejuni* based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification (exo-RPA) was developed. The specificity of the method was determined by exo-PA detection of *Campylobacter jejuni* and control strains. The gradient-diluted *Campylobacter jejuni* was used as a template to analyze the sensitivity of the exo-RPA method. The application effect of the exo-RPA method was analyzed through detecting the simulated contaminated samples. The exo-RPA and fluorescence PCR were used to test real food samples respectively, in order to analyze their detection effects. The *Campylobacter jejuni* exo-RPA method can specifically detect *Campylobacter jejuni* with a detection sensitivity of 6.0×10^2 CFU/mL. In the simulated contamination tests, the enrichment broth medium containing 2.5×10^1 CFU/mL *Campylobacter jejuni* was tested positive after 24 hours of culture by the exo-RPA assay. The exo-RPA and fluorescence PCR methods led to the same detection results for the 40 samples. The *Campylobacter jejuni* exo-RPA assay developed in this study has high specificity, sensitivity and anti-interference ability. The method is simple, convenient and rapid, with a good application prospect.

引文格式:

兰全学,陈佳平,杨慧,等.食品中空肠弯曲菌荧光重组酶聚合酶扩增检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(5):304-309

LAN Quan-xue, CHEN Jia-ping, YANG hui, et al. Development of a detection method for food-borne *Campylobacter jejuni* based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 304-309

收稿日期: 2019-11-23

基金项目: 深圳市科创委技术攻关项目 (JSGG20160606144217004); 广东省质量技术监督局项目 (2018CZ20)

作者简介: 兰全学 (1977-), 男, 正高级工程师, 研究方向: 微生物检验

通讯作者: 刘小青 (1983-), 女, 工程师, 研究方向: 食品微生物检验

Key words: recombinase polymerase amplification; *Campylobacter jejuni*; *hipO* gene

空肠弯曲菌是一种革兰氏阴性的微需氧菌,属于弯曲杆菌属,在家禽产品中较为常见,可以引起人畜共患疾病。感染空肠弯曲菌的家禽或其它鸟类会出现腹泻的症状^[1]。食用空肠弯曲菌污染的禽肉等动物性食品,则有可能使人发生严重的肠胃炎及其它并发症^[2,3]。随着我国人民生活水平的提高,禽肉等动物性食品的消费量也在逐步提高^[4],为控制被空肠弯曲菌感染的风险,加强对家禽产品生产、销售、消费各环节中空肠弯曲菌的监测有着重要的公共卫生意义。

目前对空肠弯曲菌的检测以分离培养法为主,该方法有着结果准确、可靠的优点,是空肠弯曲菌检测的“金标准”^[5],然而其检测周期通常需要 5~7 d,无法满足快速检测的需求。基于 PCR 的检测技术已发展为快速检测空肠弯曲菌的重要手段^[6-8],还可通过对特异基因序列的检测来区分空肠弯曲菌和其它同源性较高的菌种^[9]。普通 PCR 操作繁琐且易污染,荧光 PCR 仪器价格较为昂贵,限制了 PCR 技术在食品生产企业、基层检测机构的推广应用。因此研发更为快速、便捷的新型检测技术十分重要。

重组酶聚合酶扩增技术(RPA)是一种核酸恒温扩增技术,具有特异、灵敏、快速的特点^[10]。RPA 反应过程中 DNA 分子的解旋和扩增通过重组酶和扩增酶来实现,反应过程在 37~41 °C 恒温条件下持续 15~20 min 即可完成,并且通过结合荧光探针,重组酶聚合酶扩增过程可以实现实时监测,即荧光重组酶聚合酶扩增技术(exo-RPA)。exo-RPA 的反应检测设备相对荧光 PCR 设备更简单、更经济。目前已有文献报道该技术在医学检测、食品检测等领域中应用,包括应用于某些病毒、寄生虫和细菌的检测^[11-14]。

本研究基于荧光重组酶聚合酶扩增技术建立了一种可用于空肠弯曲菌快速检测的方法,该方法具备了重组酶聚合酶扩增技术的优点,有望在食品生产到消费各环节中实现对空肠弯曲菌的快速、便捷检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究使用菌株如表 1 所示,空肠弯曲菌(CICC22936)为标准菌株,空肠弯曲菌 CJ2017001、CJ2017002 和 CJ2017003 为实验室从鸡肉分离空肠弯曲菌,其余非空肠弯曲菌为标准菌株。菌株由深圳市计量质量检测研究院和深圳市龙岗区疾病预防控制中心提供;荧光重组酶聚合酶扩增试剂盒(TwistAmp®

exo kit) 购自英国 TwistDx 公司;空肠弯曲菌检测核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)购自深圳生科原生物股份有限公司;Bolton 肉汤等培养基购自北京陆桥生物技术有限责任公司;实验所用检测食品样品购自当地超市和农贸市场。

表 1 本研究中所用的菌株

Table 1 The bacterial strains used in this research

菌种	菌种编号
空肠弯曲菌	CICC22936
空肠弯曲菌	CJ2017001
空肠弯曲菌	CJ2017002
空肠弯曲菌	CJ2017003
大肠埃希氏菌 O157	NCTC12900
鼠伤寒沙门氏菌	ATCC14028
肠炎沙门氏菌	CMCC(B)50335
副溶血性弧菌	CICC21617
阪崎肠杆菌	ATCC29544
福氏志贺氏菌	CICC21534
粪链球菌	ATCC19433
单核细胞增生李斯特菌	CMCC(B)54001
变形杆菌	CICC49005
金黄色葡萄球菌	ATCC6538
柠檬酸杆菌	ATCC8090
阴沟肠杆菌	ATCC13047
小肠结肠炎耶尔森菌	CMCC(B)52204

1.2 引物与设备

基于空肠弯曲菌马尿酸盐水解酶基因(*hipO*),设计多对荧光重组酶聚合酶扩增所用的引物和荧光探针,引物和荧光探针由上海生工生物工程有限公司合成;exo-RPA 检测设备 T16-ISO 恒温扩增仪购自英国 TwistDx 公司;T16-ISO 恒温扩增仪可以为 exo-RPA 反应提供 37~42 °C 的反应条件,设备自带的荧光检测装置可以用于收集反应中产生的荧光信号。干浴器购自美国 labnet 公司;Fresco 21 冷冻离心机购自美国 Thermofisher 公司;PL2002 电子天平购自瑞士梅特勒-托利多公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 模板提取

取 1 mL 新鲜培养菌液,12000 r/min 离心 2 min,收集菌体,加入 500 μL 灭菌纯水重悬,12000 r/min 离心 2 min 去除上清,重复上述步骤一次,加入 100 μL

灭菌纯水重悬, 于干浴器 100 °C 加热 10 min, 冷却至室温后, 12000 r/min 离心 2 min, 取上清冻存于 -20 °C 备用。

1.3.2 检测方法的建立

参照 TwistAmp® exo kit 试剂盒说明书, 使用说明书推荐的反应体系(包括各组分的加入量), 空肠弯曲菌 exo-RPA 检测体系为 50 μL, 加入 29.5 μL 水化剂, 11.2 μL 去离子水, 正反向引物(10 μM)各 2.1 μL, 荧光探针(10 μM) 0.6 μL, 2 μL DNA 模板和 2.5 μL 醋酸镁离子(280 mM) 混合于 200 μL 的反应管中(表 2), 反应管放置于恒温扩增仪中 39 °C 下反应 15 min。

本研究共设计了 5 对荧光探针和引物组合, 通过

exo-RPA 反应的验证, 确定其中反应效率最高的 1 对荧光探针和引物组合建立方法使用, 序列如表 3 所示。

表 2 exo-RPA 反应体系

Table 2 The reaction system of exo-RPA

组分名称	体积/μL
水化液	29.5
ddH ₂ O	11.2
上游引物/ (10 μM)	2.1
下游引物/ (10 μM)	2.1
探针/ (10 μM)	0.6
DNA 模板	2
醋酸镁离子/ (280 mM)	2.5

表 3 exo-RPA 探针和引物序列

Table 3 The sequences of the probe and primers of exo-RPA

名称	类型	序列(5'-3')
RPA P	荧光探针	CAACCTCACTAGCAAAAATCCACAGCTTCA(FAM-dT)(dSpacer)G(BHQ1-dT)TATTCATAGTCACTG -C3spacer
RPA F	正向引物	GCCATTAAGGACGATGATTAAATTCACAAT
RPA R	反向引物	TGAGTGTTAGAGCATTAGATAATGAAACTAGAAAG

1.3.3 特异性试验

特异性试验所用菌种如表 1 所示, 应用合适的培养基培养菌株, 按 1.3.1 方法制备 DNA 模板, 用上述建立的 exo-RPA 方法进行检测, 每个反应重复三次。

1.3.4 灵敏性试验

将空肠弯曲菌(CICC22936)菌液 10 倍浓度梯度稀释为 6.0×10⁵ CFU/mL、6.0×10⁴ CFU/mL、6.0×10³ CFU/mL、6.0×10² CFU/mL 和 6.0×10¹ CFU/mL, 菌液浓度由平板计数法计算得到, 按 1.3.1 方法制备各浓度的 DNA 模板, 用上述建立的 exo-RPA 方法进行检测, 每个反应重复三次。

1.3.5 模拟污染试验

以市售新鲜鸡肉作为模拟污染试验中的样品, 样品先按照 GB 4789.9-2014 方法未检出空肠弯曲菌。再将样品(10 g)与 Bolton 培养基(90 mL)的比例混合制成增菌液, 共制备 3 份。上述增菌液分别加入空肠弯曲菌(CICC22936)菌液 1 mL, 使空肠弯曲菌的菌浓度分别为 2.5×10³ CFU/mL、2.5×10² CFU/mL 和 2.5×10¹ CFU/mL。增菌液在微需氧条件下 42 °C 培养, 分别取培养时间 0 h、12 h、24 h 的增菌液, 按 1.3.1 方法制备 DNA 模板, 用上述建立的 exo-RPA 方法进行检测, 每个反应重复三次。

1.3.6 实际应用试验

从市场购买共 40 份新鲜鸡肉, 利用 Bolton 肉汤进行增菌培养, 再分别应用荧光 PCR 方法和荧光重组酶聚合酶扩增技术进行检测, 通过检测结果来分析荧光重组酶聚合酶扩增技术的效果。

2 结果与讨论

2.1 荧光重组酶聚合酶扩增反应原理

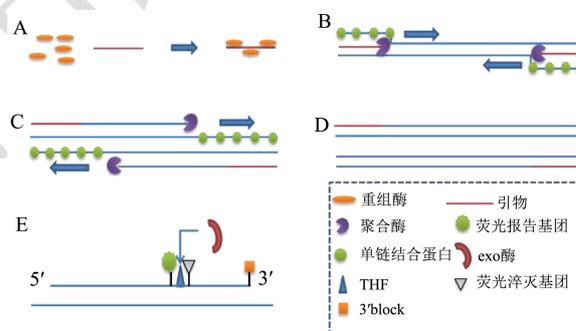


图 1 exo-RPA 反应示意图

Fig.1 Schematic diagram of exo-RPA assay

当 exo-RPA 反应开启后, 重组酶会与引物形成复合物(图 1A), 该复合物会去寻找引物的靶序列区, 重组酶使靶序列区的双链 DNA 解旋, 引物与互补单链结合, 另一条单链则被单链结合蛋白所结合(图 1B)。在聚合酶的作用下, 新合成的 DNA 链沿引物 3' 端方向延伸, 同时重组酶继续解开双链, 单链结合蛋白则与单链结合(图 1C)。最终在重组酶、聚合酶和单链结合蛋白的共同作用下, 形成两条新的 DNA 双链(图 1D)。exo-RPA 反应体系中含有一个长约 50 个碱基荧光探针, 在它的第 30 个碱基附近的两个 T 碱基上分别标记一个荧光报告基团和淬灭基团, 在两个基团之间插入了一个四氢呋喃残基(tetrahydrofuran residue, THF)。当荧光探针与 DNA 分子靶序列结合

并形成双链后, THF 位点可被具有 3'-5' 外切酶活性的核酸外切酶 III (exo 酶) 识别并切开, 于是荧光报告基团和淬灭基团分开, 荧光信号产生并与扩增产物的累积相同步 (图 1E), 在 10~20 min 内便可检测到荧光信号。

2.2 检测方法的建立

exo-RPA 对空肠弯曲菌检测效果如图 2 所示。exo-RPA 检测结果以荧光增加值在 50 以上认定为阳性结果, 反之则为阴性结果。

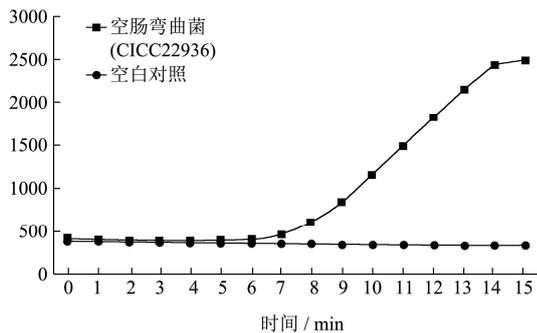


图 2 exo-RPA 对空肠弯曲菌的检测

Fig.2 The detection of *Campylobacter jejuni* by exo-RPA assay

2.3 特异性

表 4 exo-RPA 特异性检测结果

Table 4 The results of the exo-RPA assay for specificity

菌种	exo-RPA 检测结果
空肠弯曲菌 CICC22936	阳性
空肠弯曲菌 CJ2017001	阳性
空肠弯曲菌 CJ2017002	阳性
空肠弯曲菌 CJ2017003	阳性
大肠埃希氏菌 O157 NCTC12900	阴性
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	阴性
肠炎沙门氏菌 CMCC(B)50335	阴性
副溶血性弧菌 CICC21617	阴性
阪崎肠杆菌 ATCC29544	阴性
福氏志贺氏菌 CICC21534	阴性
粪链球菌 ATCC19433	阴性
单核细胞增生李斯特菌 CMCC(B)54001	阴性
变形杆菌 CICC49005	阴性
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	阴性
柠檬酸杆菌 ATCC8090	阴性
阴沟肠杆菌 ATCC13047	阴性
小肠结肠炎耶尔森菌 CMCC(B)52204	阴性

特异性试验结果如表 4 所示, 空肠弯曲菌 (CICC22936、CJ2017001、CJ2017002 和 CJ2017003) 均出现明显的扩增曲线, 各曲线荧光值均在 6 min 内

开始快速增加, 说明反应体系中出现核酸扩增, 检测结果为阳性。这表明 exo-RPA 方法具有良好的种内保守性, 可以有效避免出现漏检的情况。所有非空肠弯曲菌的检测结果均为阴性, 说明反应体系中未出现非特性核酸扩增。结果表明建立的检测方法特异性强, 有望在实际检测应用中准确地区分空肠弯曲菌和非空肠弯曲菌。

2.4 灵敏性

在 exo-RPA 反应中, 不同的引物对与同一个荧光探针分别组合, 扩增效率会略有不同^[15], 引物对之间的二级结构, 以及引物与靶序列的非特异性结合都会影响到扩增效率。本研究中试验了多组引物对与荧光探针组合效果 (数据未显示), 根据试验结果选取扩增效率最佳的引物、探针组合建立方法。

三次重复试验表明, 菌浓度 $6.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^2$ CFU/mL 的 DNA 模板检测结果为阳性, 菌浓度越高出现扩增曲线的时间越早, 并且荧光增加值全部大于 50。检测结果如图 3 所示。菌浓度 6.0×10^1 CFU/mL 的 DNA 模板未出现扩增曲线, 荧光增加值与阴性对照的相似, 未超过 50, 因而认定其为阴性结果。建立的 exo-RPA 可以检出 6.0×10^2 CFU/mL 的目标菌, 虽然略低于已报道的荧光 PCR 方法灵敏性达到 8.7×10^1 CFU/mL 的水平^[16], 但其检测设备更简单, 反应时间更短, 较荧光 PCR 更加便捷。

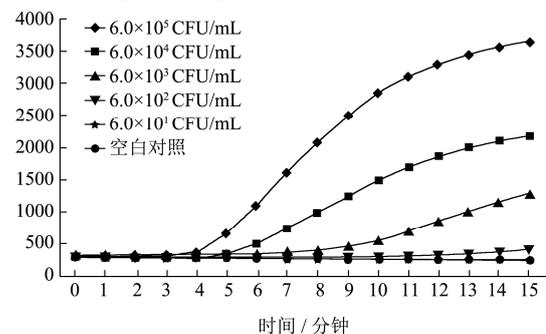


图 3 空肠弯曲菌 exo-RPA 灵敏性测试结果

Fig.3 The analysis of the sensitivity of *Campylobacter jejuni* exo-RPA

2.5 模拟污染试验

三次重复试验表明, 增菌液培养 0 h 后 (即未培养), 只有菌浓度为 2.5×10^3 CFU/mL 的增菌液检出阳性结果。增菌液培养 12 h 后检测结果与培养 0 h 检测结果一致。培养 24 h 后的所有增菌液检测结果阳性。模拟污染试验结果如图 4 所示。模拟污染试验结果显示, 空肠弯曲菌在培养初期生长速度可能教缓慢, 足够的增菌培养时间对于提高检出率是必要的。对于受

空肠弯曲菌污染较严重的样品, *exo*-RPA 检测方法具有在无增菌条件下对样品中的目标菌直接检出的潜力。

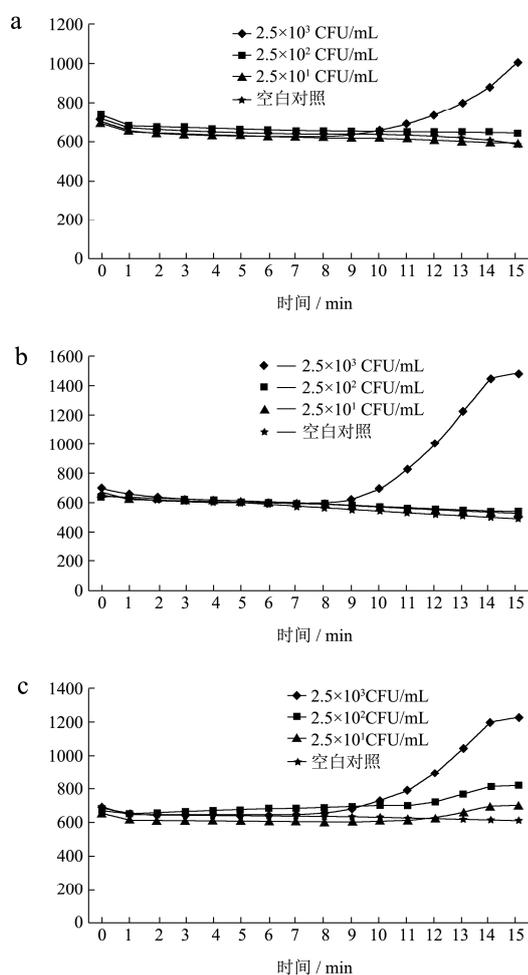


图4 模拟污染试验结果

Fig.4 The results of simulated sample detection

注: a 培养 0 h; b 培养 12 h; c 培养 24 h.

2.6 实际应用试验

表5 两种检测方法结果比较

Table 5 The results of detection of real food samples by using two methods

	荧光 PCR		合计
	阳性	阴性	
<i>exo</i> -RPA 方法	阳性	12	12
	阴性	0	28
合计	12	28	40

对 40 份新鲜鸡肉的 Bolton 增菌培养液, 荧光 PCR 方法检出 12 份样品阳性, 荧光重组酶聚合酶扩增技术也检出 12 份样品阳性, 且阳性样品相同, 结果数据统计如表 5 所示, 以荧光 PCR 作为金标准, *exo*-RPA 方法的灵敏度和特异度均 100%, 其结果的准确性可以

荧光 PCR 相当。

模拟污染试验结果和实际应用试验结果表明, 建立的方法在具有实际利用价值, 与常用的初筛方法荧光 PCR 检测结果一致, 但其检测时间更短, 不需要依赖昂贵的荧光 PCR 设备。

3 结论

3.1 随着我国禽肉等动物性食品的消费量也在逐步提高, 为控制被空肠弯曲菌感染的风险, 加强对家禽产品生产、销售、消费各环节中空肠弯曲菌的监测有着重要的公共卫生意义。以往的生化培养检测法、PCR 检测法存在着检测周期过长或设备昂贵等问题, 这都一定程度上限制了方法的使用。本研究基于荧光重组酶聚合酶扩增技术建立了一种新型的食品中空肠弯曲菌快速检测方法。因该方法可以恒温、快速对目标菌 DNA 扩增并检测, 因而它可以与低成本的简易设备配合使用, 这大大方便了检测工作, 因而它在食品生产企业、基层检测机构中具有良好的应用前景。

3.2 本研究发现空肠弯曲菌 *exo*-RPA 具有良好的检测特异性, 灵敏性可以达到 6.0×10^2 CFU/mL。含 2.5×10^1 CFU/mL 空肠弯曲菌的样品增菌液经 24 h 增菌后可被检测出阳性信号。与荧光 PCR 方法相比, 两种方法对食品样品检测效果一致。空肠弯曲菌 *exo*-RPA 检测方法有望作为一种新型的检测方法应用于食品生产、销售、消费各环节空肠弯曲菌的监测。

参考文献

- [1] Ruiz-Palacios G M, Escamilla E, Torres N. Experimental *Campylobacter diarrhea* in chickens [J]. Infection and Immunity, 1981, 34(1): 250-255
- [2] Blaser M J, LaForce F M, Wilson N A, et al. Reservoirs for human campylobacteriosis [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1980, 141(5): 665-669
- [3] Fitzgerald C. *Campylobacter* [J]. Clinics in Laboratory Medicine, 2015, 35(2): 289-298
- [4] 罗洁霞,徐克.我国居民家庭膳食蛋白质和脂肪摄入量比较 [J].中国食物与营养,2019,25(2):79-83
- [5] LUO Jie-xia, XU Ke. The comparison of protein and fat intake of households in our country [J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(2): 79-83
- [5] 胡哲,王振国,刘金华,等.利用 PCR 技术检测鸡肉产品中的空肠弯曲菌[J].吉林农业大学学报,2005,27(6):671-674
- [5] HU Zhe, WANG Zhen-guo, LIU Jin-hua, et al. The detection of *Campylobacter jejuni* in chicken products by using PCR [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2005, 27(6):

- 671-674
- [6] Rodgers J D, Simpkin E, Lee R, et al. Sensitivity of direct culture, enrichment and PCR for detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler flocks at slaughter [J]. Zoonoses and Public Health, 2016, 64(4), 262-271
- [7] Ramachandran N, Ramlal S, Batra H V. Confirmed identification and toxin profiling of *Campylobacter jejuni* using a thermo stabilized multiplex PCR formulation [J], APMIS, 2017, 125(7), 641-649
- [8] Haas K, Overesch G, Kuhnert P A. Quantitative real-time PCR approach for assessing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonization in broiler herds [J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(4), 604-608
- [9] De Boer P, Rahaoui H, Leer R J, et al. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: A comparison to classic culturing and enrichment [J]. Food Microbiology, 2015, 51, 96-100
- [10] Daher R K, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7), 947-958
- [11] Yang M, Ke Y, Wang X, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive EBOV-RPA test for rapid diagnosis of Ebola virus disease [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 20943
- [12] Nair G, Ramirez J D, White A C, et al. Detection of *Entamoeba histolytica* by recombinase polymerase amplification [J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2015, 93(3), 591-95
- [13] Liu H, Zang Y X, Du X, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella bacteria* [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025
- [14] Chen J, Wang Y, Liu X, et al. Development of propidiummonoazide-recombinase polymerase amplification (PMA-RPA) assay for rapid detection of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* [J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 41: 32-38
- [15] Liu X, Yan Q, Huang J, et al. Influence of design probe and sequence mismatches on the efficiency of fluorescent RPA [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(6): 95
- [16] Van Lint P, De Witte E, De Henau H, et al. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. /EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(3): 535-542

(上接第 121 页)

- [27] 刘萌, 蓝莓 MAP 贮藏保鲜技术研究[D].烟台:烟台大学, 2012
LIU Meng. Study on the modified atmosphere packaging storage of blueberries and logistics technology [D]. Yantai: Yantai University, 2012
- [28] Xu Fang-xu, Liu Shi-yang. Control of postharvest quality in blueberry fruit by combined 1-methylcyclopropene (1-MCP) and UV-C irradiation [J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(9): 1695-1703
- [29] 曹森, 马超, 龙晓波, 等. 1-MCP 结合乙烯吸附剂对蓝莓贮藏品质及生理的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 265-271
CAO Sen, MA Chao, LONG Xiao-bo, et al. Effect of 1-MCP coupling with ethylene adsorbent treatment on storage quality and physiological of blueberry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(19): 265-271
- [30] 郭丹, 韩英群, 郝义. 箱式气调保鲜对蓝莓果实贮藏期及货架期品质生理影响[J]. 西北农业学报, 2016, 25(12): 1829-1836
GUO Dan, HAN Ying-qun, HAO Yi. Effect of box modified atmosphere storage on quality and physiology of blueberry during storage and shelf-life [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2016, 25(12): 1829-1836
- [31] 马超, 曹森, 龙晓波, 等. 基于主成分分析法对不同处理蓝莓鲜果模拟运输及货架品质的评价[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 30-37
MA Chao, CAO Sen, LONG Xiao-bo, et al. Evaluation on simulative transportation and shelf quality of blueberries by different treatments based on principal component analysis [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(1): 30-37
- [32] 刘丙花, 王开芳, 王小芳, 等. 基于主成分分析的蓝莓果实质地品质评价[J]. 核农学报, 2019, 33(5): 927-935
LIU Bing-hua, WANG Kai-fang, WANG Xiao-fang, et al. Evaluation of fruit texture quality of blueberry based on principal component analysis [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(5): 927-935