

基于 CRISPR-Cas13 的单增李斯特菌 RNA 快速检测方法的建立

曾红棱, 张婷, 邓锐杰, 任尧, 贾利蓉

(四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065)

摘要: 为实现食品中单增李斯特菌污染的快速检测, 本研究构建了一种基于 CRISPR-Cas 系统和 Broccoli 适配体的 RNA 均相检测技术。利用 Cas 13 与 crRNA 锚定序列结合形成识别元件 crRNA-Cas13 复合物, 靶标 RNA 存在时可激活 Cas 13 的非特异性 RNase 活性, 并利用点亮型 RNA 适配体 Broccoli 作为信号探针, 监测 crRNA-Cas13 的活化状态。荧光值的变化与单增李斯特菌浓度存在线性关系, 用来检测单增李斯特菌。本研究所构建的检测可在 30 min 内完成对于单增李斯特菌的识别与检测, 检出限为 148 CFU/mL, 对细菌具有良好的检测特异性, 可区分大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和蜡样芽孢杆菌。在牛奶模型中单增李斯特菌的加标回收率为 95.15%~97.99%。该方法具有较好的灵敏度、特异性, 可直接靶向检测致病菌 RNA, 无需逆转录、PCR 扩增和核酸标记, 简化了实验流程, 对于实现食品中单增李斯特菌的现场检测及生物安全控制具有重要意义。

关键词: 单增李斯特菌; CRISPR-Cas13; 快速检测; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2021)05-256-261

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0113

Establishment of A Rapid RNA Detection Method for *Listeria monocytogenes* Based on CRISPR-Cas13

ZENG Hong-ling, ZHANG Ting, DENG Rui-jie, REN Yao, JIA Li-rong

(College of Biomass Science and Engineering Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to realize the rapid detection of *Listeria monocytogenes* contaminated in food, a homogeneous RNA detection technology based on the CRISPR-Cas system and Broccoli aptamer was constructed in this study. Cas 13 was combined with the crRNA anchor sequence to form crRNA-Cas13 complex as a recognition element. The presence of target RNA activated the non-specific RNase activity of Cas13, and the light-up RNA aptamer Broccoli was used as the signal probe to monitor the activation state of crRNA-Cas13. There is a linear relationship between the change of fluorescence value and the concentration of *Listeria monocytogenes*, which is used to detect *Listeria monocytogenes*. The process for identification and detection of *Listeria monocytogenes* can be completed within 30 minutes with a detection limit of 148 CFU/mL. This method has good detection specificity for bacteria and can distinguish *E. coli*, *S. enterica*, *Salmonella typhimurium* and *B. cereus*. The recovery rate was 95.15%~97.99% in the milk model samples spiked with *Listeria monocytogenes*. Therefore, this method has good sensitivity and specificity, and can directly target the pathogen RNAs without reverse transcription, PCR amplification and nucleic acid labeling, which simplifies the experimental process and is of great of significance for realizing on-site detection and biosafety control of *Listeria monocytogenes* in food.

Key words: *Listeria monocytogenes*; CRISPR-Cas13; rapid detection; food safety

引文格式:

曾红棱,张婷,邓锐杰,等.基于 CRISPR-Cas13 的单增李斯特菌 RNA 快速检测方法的建立[J].现代食品科技,2021,37(5):256-261, +309

ZENG Hong-ling, ZHANG Ting, DENG Rui-jie, et al. Establishment of a rapid RNA detection method for *Listeria monocytogenes* based on CRISPR-Cas13 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 256-261, +309

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22074100; 31701565); 成都市科技项目 (2019-YF05-01380-SN)

作者简介: 曾红棱 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 贾利蓉 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学、果蔬加工及贮藏、功能性食品领域基础研究、应用技术及产业化研究

单增李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 是一种重要的食源性致病菌, 其广泛存在于土壤、植物、水, 人及动物粪便中, 主要污染食品基质为肉类、熟食、乳制品及海鲜类食品^[1], 感染可导致败血症, 脑膜炎, 肠胃炎和流产^[2], 其在冷藏温度和高盐浓度 (10% NaCl) 下仍能保持生存和增长^[3], 因此, 单增李斯特菌污染对于食品安全及人类健康皆构成了巨大威胁。为了有效防止单增李斯特菌的危害, 迫切需要发展一种高度特异性、快速、准确的食品中检测方法。

单增李斯特菌的检测方法依赖培养富集, 然后是传统的生化培养法培养、免疫学法或以聚合酶链式反应 (PCR) 为基础的分子生物学方法^[4]。传统培养法检测周期较长, 约为 4~6 d^[5], 无法满足大量样品的检测。免疫学法^[6]主要包括 ELISA, 免疫胶体金技术和免疫磁分离技术, 可以实现不依赖培养的单增李斯特菌检测, 有望实现现场检测, 然而, 抗体比较昂贵, 较难保存, 限制了这些方法的广泛应用。针对核酸的检测技术^[7]传统 PCR, 多重 PCR (mPCR) 和实时定量 PCR (qPCR) 可鉴定和高灵敏检测不同微生物。Liu Z 等^[8]开发了基于 DNAzyme 的 PCR 信号级联扩增技术, 可实现肉眼检测食品中的李斯特菌。但 PCR 引物的设计极为关键, 否则容易非特异性扩增产生假阳性或假阴性结果, 且对于温度和仪器要求较高。等温核酸扩增的出现可消除核酸扩增技术对控温设备的依赖。Feng J 等^[9]将核酸适配体与 LAMP 检测技术结合, 建立了对单增李斯特菌的 AMC-LAMP 可视化检测体系, 检出限为 5 CFU/mL。此外, 一些基于荧光、比色、表面等离子共振、电化学的传感器检测技术^[10-13]也得到了发展。GUO Y^[14]结合免疫磁捕获和聚集诱导发光 (AIE) 检测单核细胞增生李斯特, 无需任何预富集, 且具有良好的选择性, 加标回收率在 95.37% 至 101.90%。

但以 DNA 为检测模板的核酸分析方法无法区分死菌和活菌, 假阳性率较高, 且通常认为活菌对于食品安全及人类健康风险更大^[15]。由于 RNA 分子通常具有较短的半衰期, 在死菌中迅速降解, 因为认为 RNA 检测更适用于准确检测活致病菌^[16]。CRISPR-

Cas (成簇的规则间隔的短回文重复序列) 是一类特殊的核酸蛋白复合体, 可依赖靶标单链 RNA, 切割无关的 ssRNA, 适用于 RNA 检测^[17]。Zhou J 等^[18]建立了一种基于 CRISPR-Cas13a 检测金黄色葡萄球菌的方法, 通过靶标 RNA 激活 Cas13a-crRNA 复合物的切割能力, 切割荧光探针, 导致荧光值增加, 该方法具有较高的灵敏性, 特异性, 可在 4 h 内完成检测。但目前基于 CRISPR-Cas13a 的检测方法仍然需要通过逆转录过程获得 cDNA, 再进一步核酸扩增, 此外一般需要在 RNA 报告探针的两端修饰荧光基因和淬灭基团, 检测成本昂贵, 操作流程也较为繁琐, 无法满足同时具有高效率、高灵敏度、强特异性和低成本的需求。

因此设计了一种 CRISPR-Cas 13 直接切割 RNA 序列以检测活性致病菌的方法, 以 Broccoli 适配体作为信号探针, 后者可特异结合荧光染料产生荧光信号^[19], 无需化学合成和修饰。该方案无逆转录、无核酸扩增, 可定量检测活的单增李斯特菌, 检测耗时短, 具有较高的选择性和灵敏度, 有望实现食品中单增李斯特菌的实时现场检测。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

单增李斯特菌 (*L. monocytogenes*) (ATCC 19115)、大肠杆菌 (*E. coli*) (ATCC 25922)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. enterica*) (ATCC 14028) 和蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) (ATCC 14579) 由中国工业培养收藏中心 (CICC) 提供; 所有 DNA 寡核苷酸序列 (表 1) 均购于上海生工生物技术有限公司 (并通过 PAGE 进行纯化); Cas 13 (cat. no. 32117) 购于 Tolobio, 中国上海; phi 29 DNA 聚合酶和 T7 RNA 聚合酶购自 Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA); DNase I, dNTPs 和 rNTPs 购自 New England Biolabs (Ipswich, MAUSA); 5-二氟-4-羟基苄基咪唑烷酮 (DFHBI-1T) 购自 Lucerna (美国布鲁克林); 细菌总 RNA 分离试剂盒购自上海生工生物技术有限公司; 所有溶液采用分子生物级水 (美国纽约康宁) 配制。

表 1 核苷酸序列表

Table 1 Oligonucleotide sequences

名称	SEQ ID NO.	序列 (5' to 3')
L-crRNA	1	GGTCAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
L-Broccoli	2	GAGCCACACTCTACTCGACAGATACGAATATCTGGACCCGACCGTCTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
promoter	3	TAATACGACTCACTATAGGG

美国伯腾 Biotek Synergy H1 多功能酶标仪; 美国 SCIOLOGEX (赛洛捷克) D3024R 台式高速冷冻型微量离心机; 上海一恒 THZ-100 恒温培养摇床。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养及核酸提取

所有菌株分别在 NB 培养基中过夜培养得到菌液, 梯度稀释后取适宜的 3 个连续梯度稀释液进行涂布平板计数。同时取 1 mL 不同浓度培养菌液 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 M, pH=7.4) 洗涤沉淀, 用细菌总 RNA 分离试剂盒提取纯化总 RNA。所有 RNA 在进一步分析前保存在 -80 °C。

1.2.2 Broccoli 适配体和 crRNA 的制备

50 μ L 反应体系中包含 5 μ L 10 \times phi 29 聚合酶缓冲液, 5 μ L L-Broccoli (10 μ M), 5 μ L 启动子 (promoter) (10 μ M), 90 °C 变性 3 min, 室温反应 30 min; 加入 0.3 μ L phi 29 DNA 聚合酶 (10 U/ μ L) 和 1 μ L dNTPs (dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP 分别为 10 mM), 30 °C 孵育 30 min, 孵育使其延伸形成双链; 再加入 10 μ L 5 \times 转录缓冲液, 1 μ L T7 RNA 聚合酶 (20 U/ μ L), 2 μ L rNTPs (ATP, GTP, CTP 和 TTP 分别为 25 mM) 和 20.7 μ L 水, 37 °C 孵育 6 h, 转录结束后, 加入 2 μ L DNase I 在 37 °C 下 4 h 去除 DNA 模板, 然后在 75 °C 灭活 15 min, 得到 Broccoli 适配体。分子识别探针 crRNA 的制备方法同上。

1.2.3 靶标 RNA 的检测

取 2.2 中制备得到的 Broccoli 适配体 4 μ L (50 μ M), crRNA 4 μ L (1.5 μ M), 加入 0.3 μ L Cas 13 (10 μ M), 4 μ L 10 \times Cas 13 buffer, 4 μ L DFHBI-1T (100 μ M) 以及 4 μ L 不同浓度的靶标 RNA, 加水至反应总体积为 40 μ L, 37 °C 孵育 30 min, 检测荧光。其中激发波长为 468 nm, 发射波长范围 498~650 nm, 检测步长 2 nm, 记录不同活菌浓度下的荧光值。

1.2.4 特异性检测

每 40 μ L 反应体系包括 0.3 μ L Cas 13a (10 μ M)、10 \times Cas 13 buffer、4 μ L Broccoli 适配体 (50 μ M)、4 μ L crRNA、4 μ L DFHBI-1T (100 μ M), 分别加入 2.2 中提取的不同细菌 RNA, 混匀, 37 °C 孵育 30 min, 检测荧光。

1.2.5 牛奶样品中单增李斯特活菌的检测

将单增李斯特菌接种至液体培养基过夜, 将培养液用生理盐水进行梯度稀释, 采用平板计数。然后取 1 mL 稀释菌液接种到 9 mL 牛奶中, 将污染的牛奶 4 °C, 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清^[20], 用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.1 M, pH=7.4) 洗涤沉淀, 用细菌总 RNA 分离试剂盒提取纯化总 RNA, 检测样品中 RNA 方法如 1.2.3 所述。

1.2.6 数据处理

每个样品设 3 个平行, 测定结果以平均值 \pm 标准差表示。采用 Origin 9.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 检测原理

检测原理如图 1 所示, 靶标 RNA 仅存在于活菌中, 死菌中 RNA 会迅速降解, 根据靶标 RNA 的序列设计 crRNA, 其中 crRNA 包括向导序列和锚定序列。依赖锚定序列, crRNA 可识别并结合 Cas13 形成 Cas13-crRNA 复合物, 令 crRNA 的向导序列与靶标 RNA 反向互补, 当样品中存在靶标 RNA 时, 其通过碱基互补配对与 Cas13-crRNA 复合物结合, Cas13 的非特异性 RNase 活性被激活, 可切割无关的单链 RNA (ssRNA)^[21]。我们引入 Broccoli 适配体作为信号探针监测 CRISPR-Cas13 的激活状态, 一旦 Broccoli 适配体被剪切, 其结构遭到破坏, 将无法结合并打开 DFHBI-1T 染料的荧光, 产生荧光淬灭。因此通过 Broccoli/DFHBI-1T 复合物的荧光强度可以指示靶标 RNA 的存在, 进而实现对单增李斯特活菌的快速检测。

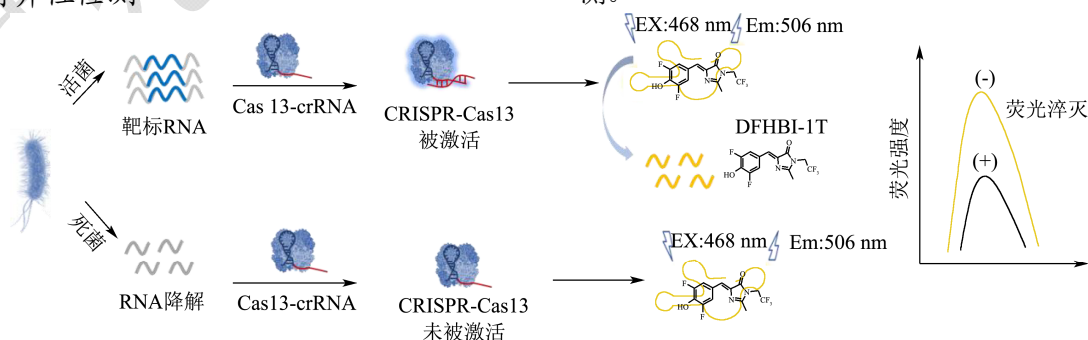


图 1 检测原理图

Fig.1 Schematic illustration of CRISPR-Cas13 for detection of *L. monocytogenes*

首先对 Broccoli/DFHBI-1T 的荧光指示作用进行验证, 结果如图 2 所示。自由状态下 DFHBI-1T 染料荧光信号微弱(对照组 1), 加入 crRNA 后荧光值无明显变化(对照组 2), 但加入 Broccoli 适配体后(对照组 3), 荧光强度从 214 激增至 16386, 表明 Broccoli 适配体可特异性结合并打开 DFHBI-1T 染料, 形成 Broccoli/DFHBI-1T 复合物, 发射强烈的荧光信号, 与文献报道一致^[22]。并且 Broccoli 适配体可以通过体外转录和扩增, 扩增速率与 PCR 相当, 允许等温扩增^[23]。当加入 Cas13 和 crRNA, 荧光信号无明显变化(对照组 5)。其次对 CRISPR-Cas13 的信号识别能力进行验证, 当加入一段与 crRNA 部分互补的单链 RNA(crRNA), Cas13 的非特异性 RNase 活性被激活, 剪切 Broccoli 适配体产生荧光淬灭(对照组 4)。当加入单增李斯特菌的 RNA 时, 荧光强度减弱(从 15706 降至 6496), 说明靶标 RNA 可以激活 Cas 13 的剪切活性, 进而剪切非靶标 Broccoli 适配体。

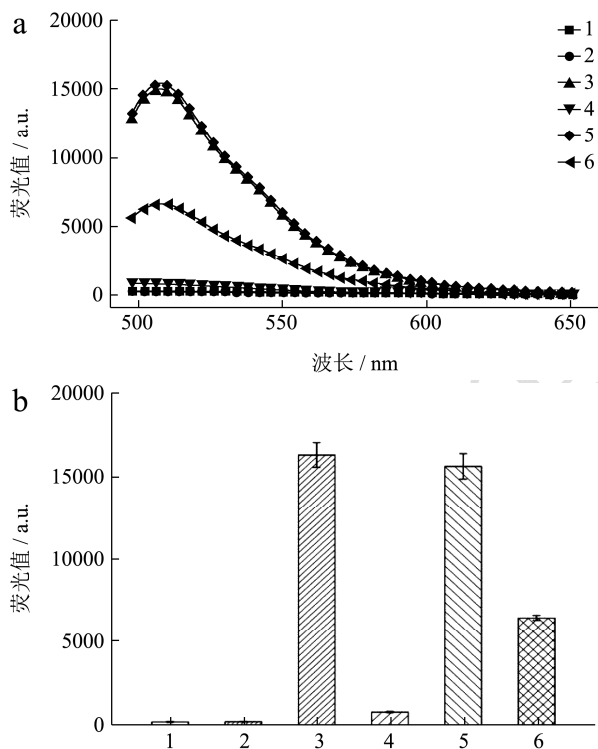


图 2 原理验证图

Fig.2 Validation of CRISPR-Cas13 assays for *L. monocytogenes* detection

注: a: 荧光光谱图; b: 荧光强度图。1~6 分别为: DFHBI-1T; crRNA+DFHBI-1T; DFHBI-1T+Broccoli; crRNA+crRNA+DFHBI-1T; Cas13-crRNA+Broccoli+DFHBI-1T; Cas13-crRNA+Broccoli+DFHBI-1T+ target RNA。

2.2 实验条件优化

为了扩大该检测方法的信噪比, 对实验条件进行

进一步优化。首先根据单增李斯特菌 16s rRNA 片段, 设计了不同的 L-crRNA 序列, 并应用 Primer-BLAST 进行比对, 筛选得到 10 条序列, 再通过体外转录得到 crRNA, 结果如图 3a 所示, T8 序列可特异性结合靶标 RNA, 激活 Cas 蛋白的剪切活性, 信噪比为 2.25, 优化的 L-crRNA 的核苷酸序列如表 1 所示。此外, crRNA 的缺乏或丰富导致信噪比降低^[15], 因此对 crRNA 与 Cas 13 的比例进行优化, 保持 Cas13 浓度为 100 nM, Cas13: crRNA 比值范围为 1:1~3:1。结果表明, 当 Cas 13a 和 crRNA 浓度为 2:1 时时, 信噪比最大为 3.32(图 3b)。

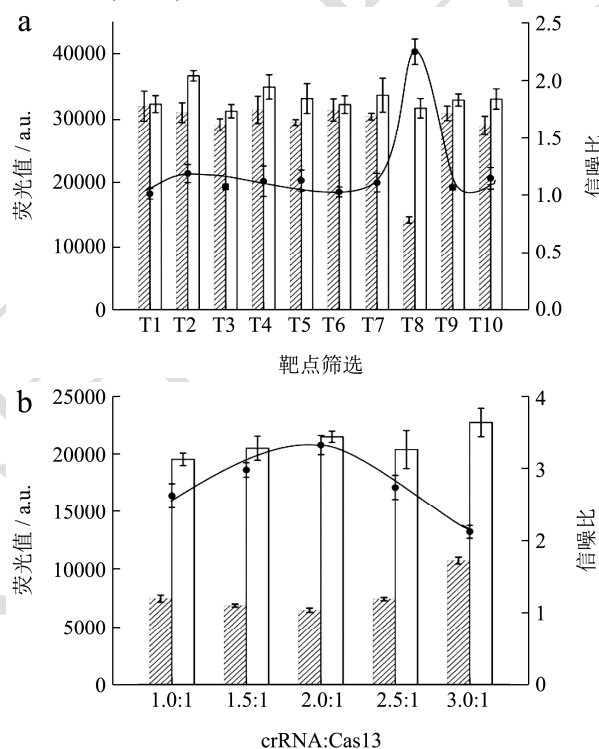


图 3 CRISPR-Cas13 体系实验优化

Fig.3 Optimization of CRISPR-Cas13 based assay

注: a: crRNA 靶点筛选; b: crRNA:Cas13 比例优化。

2.3 线性范围与检出限

为验证 CRISPR-Cas13 对单增李斯特菌检测的灵敏度。以系列单增李斯特菌菌液浓度为横坐标 (0, 2.3×10^0 , 2.3×10^2 , 2.3×10^3 , 2.3×10^4 , 2.3×10^5 , 2.3×10^6 , 2.3×10^7 CFU/mL), 以该浓度下的荧光值为纵坐标绘制标准曲线。如图 4, 荧光强度随着单增李斯特菌浓度的增加而降低, 线性检测范围为 $2.3 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^6$, 拟合线性方程为 $y = -2415.2x + 21854$, $R^2 = 0.9953$, LOD (最低检测限) = 148 CFU/mL。由于检测对象为 RNA, 提取方法以及 RNA 易降解的特性^[24], 且未进行核酸扩增, 导致该检测方法检测限略高。相比较利用 RNA 检测单增李斯特菌的其他方法, 周振森等^[25]以 RAN

检测为模板,利用 Opti Gene Genie 便携式仪器和反转录 LAMP 扩增,检出限为 10 CFU/mL,但该方法需要特定仪器,不适用于现场检测。徐匆等^[26]在此基础上进行改进,以 HNB 作为指示剂,对单增李斯特菌的 RNA 进行反转录及环介导等温扩增,建立一种单增李斯特菌的 RT-LAMP-HNB 检测方法,可直接依据颜色变化判读结果。Ma CC 等^[27]建立一种基于 RNA 检测的 RT-LAMP 方法,可用于检测鲜切水果和蔬菜中的活单增李斯特活菌,检测限低至 1 CFU/mL。但由于实验过程中的污染及人员操作,LAMP 方法的超灵敏性有时仍会导致假阳性结果。此外,LAMP 还需要 4 至 6 个引物,相比其他等温扩增方法,引物设计更为复杂^[28],且对于反应温度有严格要求。因此,基于 CRISPR-Cas13 检测单增李斯特菌的方法,无需逆转录和核酸扩增,可实现对单增李斯特菌的快速、定量检测。

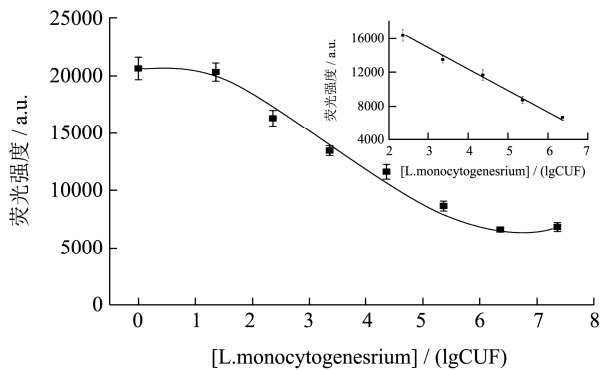


图4 单增李斯特菌的定量检测

Fig.4 The relationship between *[L. monocytogenes]* and fluorescence response of CRISPR-Cas13 based array

注:内嵌图为取 $2.3 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^6$ CFU/mL 做线性拟合。

表2 牛奶样品中单增李斯特菌的检测

Table 2 Determination of *L. monocytogenes* spiked in the milk (n=3)

样品	平板计数法/[lg(CFU/mL)]	荧光强度/(a.u.)	CRISPR-Cas13/[lg(CFU/mL)]	回收率/%
牛奶 1	4.0	12661±471	3.81±0.19	95.15±4.88
牛奶 2	4.4	11590±493	4.25±0.20	96.58±4.64
牛奶 3	5.4	9079±377	5.29±0.16	97.99±2.90

3 结论

本实验结合 CRISPR-Cas13 作为信号识别元件, Broccoli 适配体为信号探针,可对单增李斯特菌特异性识别,无需任何富集或平板培养过程,可在 30 s 完成对于单增李斯特活菌的识别与检测,检出限为 148 CFU/mL。该方法无逆转录、无核酸扩增和核酸标记,识别和扩增皆可在恒温条件进行,降低了对于人员和精准控温设备的要求,适用于单增李斯特菌的现场检测,且直接检测致病菌 RNA 可有效避免死菌对实验结果的干扰。由于 CRISPR-Cas13 系统的可编程性,

2.4 特异性

为了验证该检测方法的特异性,本实验选取了食品中危害较大的三种食源性致病菌进行特异性实验。实验结果如图 5 所示,单增李斯特菌的 crRNA 序列对单增李斯特菌具有很强的识别能力,加入靶标 RNA 可特异性结合 crRNA,激活 Cas13 的酶切活性造成荧光猝灭,荧光值降低。相反,加入沙门氏菌、大肠杆菌和蜡样芽孢杆菌时,荧光值几乎无差异,未达到荧光猝灭的效果。表明该检测方法对单增李斯特菌具有较好的特异性。

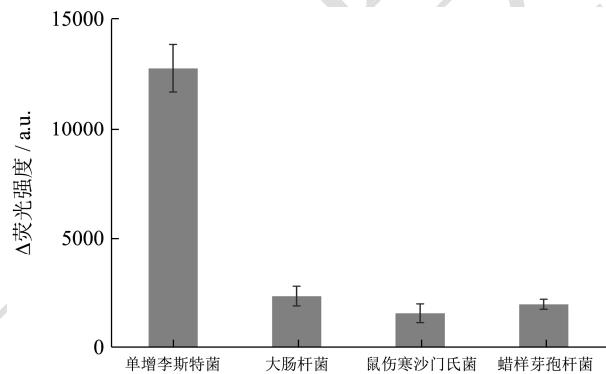


图5 特异性分析

Fig.5 Specificity test of *L. monocytogenes* detection

2.5 实际样品检测

为了验证该检测方法在食品检测中的可行性,本实验选取牛奶样品进行验证,结果如表 2,样品加标回收率为 95.15%~97.99%,表明该方法能实现复杂组分的食品基质中单增李斯特菌的准确、快速检测。

该检测可针对不同细菌设计 crRNA 的向导序列,具有较强的特异性和灵敏度,实现对不同的细菌的快速检测,为建立食品中快速和现场检测致病菌提供一种通用检测方案。

参考文献

[1] Maria Sebastián, Arilla-Luna S, Bellalou J, et al. The biosynthesis of flavin cofactors in *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(15): 2762-2776

[2] 丁建英,韩剑众.食品中单增李斯特菌的存在现状及检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(12):171-174

- DING Jian-ying, HAN Jian-zhong. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in food and its determination method progress [J]. Food Research and Development, 2008, 29(12): 171-174
- [3] 刘珊珊,赵森,孙涛,等.单增李斯特菌的生长特性及其在冷藏牛奶中的预测模型[J].食品工业科技,2017,38(2):187-190,195
- LIU Shan-na, ZHAO Sen, SUN Tao, et al. Growth properties of *Listeria monocytogenes* and predicting models in refrigerated milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 187-190, 195
- [4] 尚从珊.食源性致病菌单增李斯特菌检测技术的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(14):4702-4707
- SHANG Cong-shan. Research progress of detection technology for food-borne pathogenic *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(14): 4702-4707
- [5] 胡冰雪,舒沿沿,潘道东,等.荧光假单胞菌、沙门氏菌和单增李斯特菌多重 PCR 检测方法的建立[J].食品科学,2016, 37(20):209-214
- HU Bing-xue, SHU Yan-yan, PAN Dao-dong, et al. A multiplex PCR method for simultaneous detection of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* [J]. Food Science, 2016, 37(20): 209-214
- [6] 刘玉申.单核细胞增生性李斯特菌可视化检测方法的建立与评价[D].长春:吉林大学,2019
- LIU Yu-shen. Establishment and evaluation of visual detection method for *Listeria monocytogenes* [D]. Changchun: Jilin University, 2019
- [7] Abdolhazadeh A, Dolgosheina E V, Unrau P J. RNA detection with high specificity and sensitivity using nested fluorogenic mango NASBA [J]. RNA, 2019, 25(12): 1806-1813
- [8] Liu Z, Yao C, Yang C, et al. Development of DNA zyme-based PCR signal cascade amplification for visual detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Analytical Biochemistry, 2018, 553: 7-11
- [9] Feng J, Dai Z, Tian X, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* based on combined aptamers magnetic capture and loop-mediated isothermal amplification [J]. Food Control, 2017, 85: 443-452
- [10] Wang H, Yanbin L Slavik M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor [J]. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 2007, 15(1): 67-76
- [11] Liu Z, Yao C, Wang Y, et al. A G-quadruplex DNA zyme-based LAMP biosensing platform for a novel colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Analytical Methods, 2018, 10(8): 848-854
- [12] Zhang X, Tsuji S, Kitaoka H, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* at a very low level using simultaneous enrichment broth and multichannel SPR biosensor [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(10): 2357-63
- [13] Chen Q, Wang D, Cai G, et al. Fast and sensitive detection of foodborne pathogen using electrochemical impedance analysis, urease catalysis and microfluidics [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 86: 770-776
- [14] Guo Y, Zhao C, Liu Y, et al. A novel fluorescence method for the rapid and effective detection of *Listeria monocytogenes* using aptamer-conjugated magnetic nanoparticles and aggregation-induced emission dots [J]. The Analyst, 2020, 145(11): 3857-3863
- [15] Ting Zhang, Wenhui Zhou, Xiaoya Lin, et al. Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112906
- [16] Techathuvanan C, D'Souza D H. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(10): 3509-4516
- [17] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442
- [18] Zhou J, Yin L, Dong Y, et al. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1127: 225-233
- [19] Kartje Z J, Janis H I, Mukhopadhyay S, et al. Revisiting T7 RNA polymerase transcription *in vitro* with the broccoli RNA aptamer as a simplified real-time fluorescent reporter [J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100175
- [20] 贾甜甜.牛奶中三种常见食源性致病菌快速检测方法的建立[D].北京:中央民族大学,2019
- JIA Tian-tian. Establishment of rapid detection methods for three common foodborne pathogens in milk [D] Beijing: Minzu University of China, 2019