

超分支滚环扩增法检测美洲鳗鲡嗜水气单胞菌

张世佳^{1,2}, 冯建军^{1,2}, 郭松林^{1,2}, 王艺磊^{1,2}, 林 鹏^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 建立了基于锁式探针的超分支滚环扩增检测嗜水气单胞菌的新方法。根据嗜水气单胞菌 ARE 基因上的一段高保守基因序列, 设计锁式探针和对应的扩增引物, 并优化了反应条件。探针在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 ℃ 连接 1 h、63 ℃ 扩增 1 h, 其扩增产物电泳后得到明显条带。在 8 种水产养殖病原菌中, 只有嗜水气单胞菌可以特异性检出, 并且特异性良好, 灵敏度 (1.0×10^3 cfu/mL) 高于免疫法以及常规的 PCR 法。对嗜水气单胞菌人工感染的美洲鳗鲡肌肉样品进行检测, 发现条带清晰可见。该方法的反应过程是在恒温条件下进行, 不需要 PCR 仪, 此外, 样品处理过程简单, 应用水煮法即可进行。

[关键词] 嗜水气单胞菌; 锁式探针; 超分支滚环扩增; 检测

[中图分类号] S 943

Hyper-Branched Rolling Circle Amplification Assay for Detecting *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla rostrata*

ZHANG Shijia^{1,2}, FENG Jianjun^{1,2}, GUO Songlin^{1,2}, WANG Yilei^{1,2}, LIN Peng^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

Abstract: A novel detection for *Aeromonas hydrophila* with hyper-branched rolling circle amplification (HRCA) based on padlock probe was established. A conservative sequence of the unique gene of ARE in *A. hydrophila* was used to design the padlock probe and universal primer pair. The detection conditions were optimized. The result showed that padlock probes were linked with the target sequence of ARE at 16 ℃ for 1 h by the T4 DNA ligase, then amplified at 63 ℃ for 1 h. Finally, the strips of amplified products were effectively detected in electrophoresis. The strain of *A. hydrophila* was positive in HRCA, while 7 other contrast strains were negative in the assay, indicating that the assay had high specificity. The limit of detection was 1.0×10^3 cfu/mL, and the sensitivity of this method was higher than that of immunoassay and conventional PCR. The HRCA was used to detect the muscle tissues from *Anguilla rostrata* infected artificially with *A. hydrophila*. The result indicated the strips were obvious. In the detection, the expensive PCR instrument was not needed because HRCA could be carried under a practically isothermal condition. Moreover, boiling-water-extraction of DNA in real samples simplified the steps, and the method had great potentials for the detection of bacteria in the fields of aquaculture.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; padlock probe; hyper-branched rolling cycle amplification; detection

[收稿日期] 2021-03-15

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2017J01637); 大黄鱼育种国家重点实验室开放基金项目(LYC2019RS06)

[作者简介] 张世佳(1993—), 男, 硕士生, 从事水产病害检测与防治研究。通信作者: 林鹏(1970—), 男, 博士, 教授, 从事水产病害检测与防治研究。E-mail: linpeng@jmu.edu.cn

0 引言

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种人鱼畜共患的病原菌,其存活范围广,能适应多种复杂环境。该菌可致人、鱼、畜感染,同时伴随出血性败血症,严重可致死^[1]。在鱼类养殖环境中也会引起细菌性败血症,造成严重的经济损失。传统的检测方法主要有分离培养法和生理生化法^[2],但这些方法检测周期较长,不能满足快速检测的要求。免疫检测法快速简单、特异性强,然而灵敏度不高^[3]。分子检测手段(如PCR法^[4])特异性强、灵敏度高,但需要较为昂贵的变温仪器,只适合在实验室检测。

基于锁式探针(padlock probe)^[5]的超分支滚环扩增(hyper-branched rolling circle amplification, HRCA)是一种恒温核酸扩增检测法。该方法的原理是,设计特异性的锁式探针与一对通用引物,锁式探针的两端与目标DNA通过互补连接成环,通用引物识别环状锁式探针,实现对锁式探针的超分支滚环扩增,从而达到信号放大的目的^[6]。该技术依赖于探针,只有在两端的捕捉序列与目标DNA完全互配对的前提下才能成环,因此检测特异性强,已成功应用于医学^[7]、食品^[8]、农业^[9]等领域。HRCA由于是恒温扩增,不需要昂贵的仪器,恒温水浴锅便可进行恒温扩增,并和纸基传感器技术相结合^[10],可以直接读取结果。本研究首次将HRCA法应用于水产病原菌嗜水气单胞菌的检测,并在实际样品的提取中应用水煮法^[11],简化了处理步骤。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验菌株

嗜水气单胞菌B11分离于病变鳊鲈,并经Biolog自动生化鉴定系统(Gene III)鉴定为嗜水气单胞菌^[12]。特异性交叉实验所用菌株均来自西班牙普通微生物保藏中心(CETC)。

1.1.2 主要试剂

细菌基因组DNA提取试剂盒(GK4003-100)购自上海捷瑞生物工程有限公司;T4 DNA连接酶、Bst DNA聚合酶、Exonuclease I、Exonuclease III、dNTPs源自美国Biolabs公司;锁式探针和引物由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 主要仪器

HH·S21-4-S恒温水浴锅购自上海坤诚公司;GelDoc-It2 310凝胶成像仪购自美国UVP公司。

1.2 实验方法

1.2.1 探针及引物设计

选取一段嗜水气单胞菌独有的AER基因序列(NC_008570)^[13],采用Primer Premier 5.0及Oligo软件设计探针,探针两端的捕捉序列与待检目标序列靶标互补^[14](见表1,锁式探针中的大写字母序列),探针中间的连接序列采用与嗜水气单胞菌序列相差极大的野猪MSTN中的一段特异性序列作为连接序列和引物扩增的结合序列(见表1,锁式探针中的小写字母序列)。采用TheMfold(<http://www.unafold.org/hybrid2.php>)预测探针的结构,以确保二级结构能值最小,防止发夹结构的产生,同时探针的5'端进行磷酸化修饰,便于环化后探针3'和5'端的末端粘合。针对探针设计一对通用引物P1和P2用于探针的扩增。

1.2.2 DNA提取

根据基因组DNA提取试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 连接反应

10 μ L的连接反应体系:10 \times T4 DNA ligase buffer (50 mmol/L Tris-HCl、0.1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、50%甘油) 1 μ L, 400 U/ μ L T4 DNA连接酶 1 μ L, 250 nmol/L探针 1 μ L、DNA模板 2.5 μ L、用无菌双蒸水补至10 μ L。体系在16 $^{\circ}$ C下反应1 h,然后65 $^{\circ}$ C温育20 min后停止反应。

表1 锁式探针及引物
Tab.1 Padlock probe and primer sequence

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	长度 Length/bp
锁式探针 Padlock probe	TTTCAACGACTGGAACCTACCGGtggtctcacaagtctctgtatgaccttgaccatgggtactaCTTCGTGGC TAGTCTGTGACAGTCCCAGGTCCAACATACG	102
引物 Primer P1	TGGCTCACAAAGTCCTGC	18
引物 Primer P2	AAGCAGGACTTTGTGAGC	18

1.2.4 外切酶处理

连接反应体系中还有许多双链和单链 DNA, 会在扩增的过程中产生背景信号, 可能导致假阳性的结果^[15], 采用 Exonuclease I 和 Exonuclease III 对产物进行处理, 除去连接产物中未成环的探针和 DNA 模板^[16]。20 μL 酶切体系: 连接产物 10 μL , 20 U/ μL Exonuclease I 1 μL , 100 U/ μL Exonuclease III 1 μL , 10 \times buffer (67 mmol/L Glycine - KOH、1 mmol/L DTT、6.7 mmol/L MgCl_2) 2 μL , 用无菌双蒸水补至 20 μL 。酶切体系 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 然后 85 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 后停止酶切。

1.2.5 HRCA 扩增反应

HRCA 反应的 25 μL 扩增体系: 经外切酶处理后的连接产物 4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ P1 1.25 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ P2 1.25 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 0.75 μL , 4 U/ μL *Bst* DNA 聚合酶 1 μL , 10 \times *Bst* DNA polymerase buffer (20 mmol/L Tris - HCl、10 mmol/L KCl、10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 mmol/L MgSO_4 、0.1% Triton X - 100) 2.5 μL , 用无菌双蒸水补至 25 μL 。在 63 $^{\circ}\text{C}$ 下扩增反应 1 h。

1.2.6 扩增产物凝胶电泳

取 5 μL HRCA 产物用 2% (质量分数) 琼脂糖电泳检测, 溴化乙锭染色, 紫外凝胶成像系统照相分析。

1.2.7 HRCA 检测的特异性

分别选取了副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、维氏气单胞菌 (*Aeromonas vickers*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harvey*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 7 种菌株, 划线挑菌后过夜培养, 经平板计数法确定浓度后, 稀释为 1×10^8 cfu/mL 的菌液。然后, 提取 DNA, 按照上述步骤进行连接、酶切、扩增, 进行 HRCA 检测, 同时以嗜水气单胞菌菌株 B11 作为阳性对照、无菌双蒸水作为空白对照, 产物用 2% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 HRCA 检测的灵敏度

选用嗜水气单胞菌 B11 作为阳性菌, 活化菌株, 制作成 1×10^6 cfu/mL 的菌悬液。用 0.9% (体积分数) 的无菌生理盐水对嗜水气单胞菌的菌液进行 10 倍梯度稀释, 稀释到 1×10^2 cfu/mL, 对不同稀释度的菌液提取 DNA 作为模板, 在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ cfu/mL 范围内进行 HRCA 检测, 以确定 HRCA 检测体系的灵敏度。

1.2.9 HRCA 实际样品检测

将购买的美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) 经饥饿处理 3 d 后, 将嗜水气单胞菌用 0.9% (体积分数) 无菌生理盐水稀释为 2×10^7 cfu/mL, 注射到鳗鲡腹腔内, 同时设立 1 组只注射 0.9% 无菌生理盐水^[17]的作为对照组。7 d 后选择无明显发病的鳗鲡, 取其 0.5 g 肌肉组织, 匀浆后沸水加热 10 min, 取上清液 2.5 μL 用于检测^[11]。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌 HRCA 检测体系的建立和优化

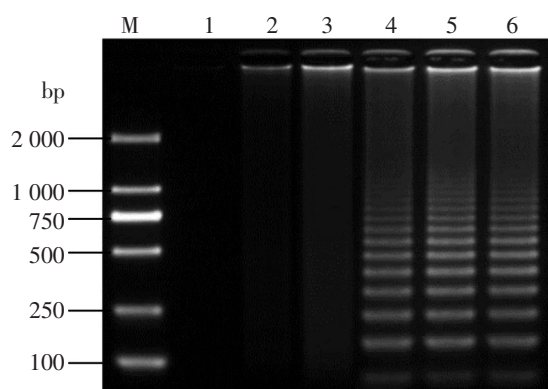
2.1.1 锁式探针浓度的确定

按照 1.2.3 所述的锁式探针连接反应条件, 设置 6 个锁式探针浓度分别为 25 pmol/L、250 pmol/L、

2.5 nmol/L、25 nmol/L、250 nmol/L 和 2.5 mmol/L, 连接反应后依据 1.2.4 和 1.2.5 步骤进行酶切与 HRCA 扩增反应, 产物的电泳结果见图 1。当探针浓度大于或等于 25 nmol/L 时, 条带亮度相近并且清晰; 而低于此浓度, 电泳条带基本看不到。因此选择 25 nmol/L 作为反应体系的探针浓度。此外, 凝胶电泳结果呈阶梯状分布, 条带的大小依次为 102 bp 的整数倍, 这证明电泳的结果与理论值是一致的。

2.1.2 HRCA 扩增温度的确定

HRCA 反应中不同扩增温度的结果见图 2。温度为 51 °C 和 54 °C 时, 没有条带; 57 °C 时, 开始有条带产生, 但不够清晰; 60 °C 和 63 °C 时, 条带最为清晰; 66 °C 时, 条带模糊不清, 没有阶梯状条带产生。故选择 63 °C 作为扩增的温度。

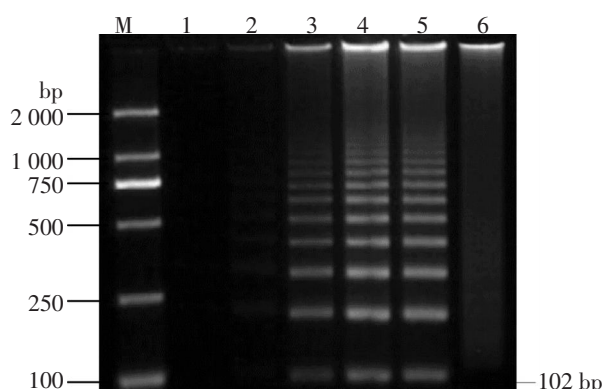


M—DL2000 分子标记;1~6 探针浓度分别为 25 pmol/L、250 pmol/L、2.5 nmol/L、25 nmol/L、250 nmol/L、2.5 mmol/L

M—DL2000 Molecular marker;probe concentrations for 1 to 6 were 25 pmol/L,250 pmol/L,2.5 nmol/L,25 nmol/L,250 nmol/L and 5 mmol/L, respectively

图 1 探针浓度优化结果

Fig.1 Optimization of the probe concentration



M—DL2000 分子标记;1~6 反应温度分别为 51,54,57,60,63,66 °C

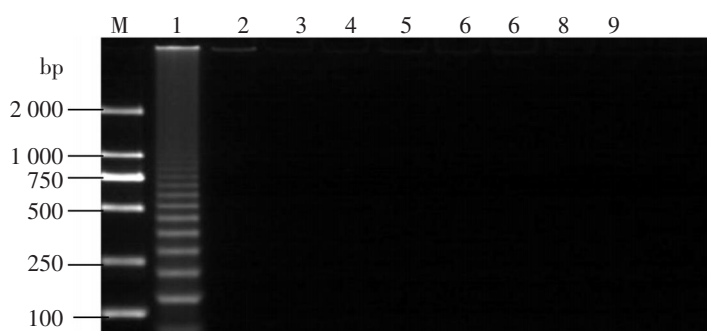
M—DL2000 Molecular marker;temperature set for reaction 1 to 6 were 51,54,57,60,63,66 °C, respectively

图 2 扩增反应温度优化结果

Fig.2 Optimization of temperature for amplification reaction

2.2 HRCA 检测的特异性结果

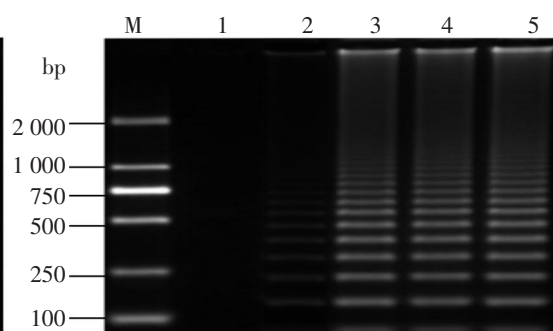
HRCA 特异性检测结果见图 3。8 株实验菌株中, 只有嗜水气单胞菌 B11 可以检测出, 其余 7 株对照菌株均不能检出。这表明, HRCA 检测体系可以特异性地检测出嗜水气单胞菌, 特异性良好, 适用于嗜水气单胞菌的检测。



M—DL2000 分子标记 Molecular marker;1—嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*;2—副溶血弧菌 *Vibrio Parahemolyticus*;3—迟缓爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda*;4—维氏气单胞菌 *Aeromonas vickers*;5—溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*;6—哈维氏弧菌 *Vibrio harvey*;7—产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*;8—霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*;9—双蒸水 ddH₂O

图 3 HRCA 法的特异性验证

Fig.3 The specificity of HRCA



M—DL2000 分子标记 Molecular marker;1— 1×10^2 cfu/mL;2— 1×10^3 cfu/mL;3— 1×10^4 cfu/mL;4— 1×10^5 cfu/mL;5— 1×10^6 cfu/mL

图 4 HRCA 法的灵敏度验证

Fig.4 The sensitivity of HRCA

2.3 HRCA 检测的灵敏度结果

HRCA 检测的灵敏度实验结果见图 4。其最低检测浓度为 1×10^3 cfu/mL, 在该浓度时可以检测得到, 但条带较微弱; 小于该浓度时条带已经不可见; 浓度在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cfu/mL 时, 条带清晰可见。而常规的 PCR 检测手段只能检测到 3×10^4 cfu/mL^[18]。

2.4 HRCA 实际样品检测结果

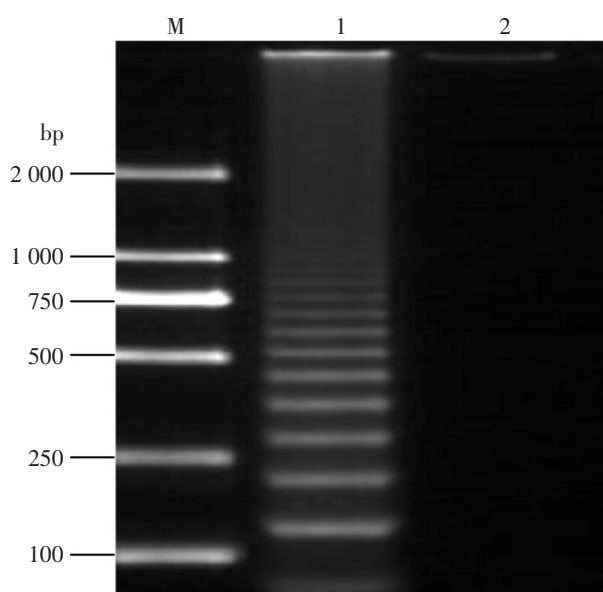
嗜水气单胞菌感染美洲鳗鲡的检测实验结果(见图 5)表明, 感染的美洲鳗鲡样品条带清晰可见, 注射无菌生理盐水的健康鳗鲡样品无条带出现。这证明 HRCA 法能够从感染的鳗鲡样品中检测出嗜水气单胞菌, 该法可用于水产生物病原菌感染的检测。

3 讨论

滚环扩增检测技术依赖于锁式探针对目标 DNA 的特异性结合^[19], 只有探针两端的捕捉序列与待检的目标序列完全互补结合^[20], T4 DNA 连接酶才能将锁式探针连接环化, 若有一个碱基错配, 探针的连接就无法进行^[21], 从而保证了检测的特异性。此外, HRCA 检测的实质是对连接成环的探针进行扩增^[22], 并非对目标 DNA 序列进行扩增^[23], 既减少了交叉污染, 也最大限度地减少了实际样品中抑制因子对检测的影响^[24], 从而放大了信号值, 有助于检测灵敏度的提高。

由于 HRCA 法扩增的是环状探针, 因此没有成环的线性探针和目标 DNA 会对扩增产生背景信号, 影响灵敏度, 为此本研究加入了 Exonuclease I 和 Exonuclease III, 特异性地降解掉了未成环的单链探针^[25]和未反应的 DNA 模板^[26], 效果良好。锁式探针的浓度对 HRCA 检测至关重要。浓度过低, 成环的探针少, 导致 HRCA 的检测信号低, 不能如实反映嗜水气单胞菌的真实含量; 浓度过高, 有可能降解不完全, 使得背景信号增大。本检测的最佳浓度为 25 nmol/L。HRCA 的反应温度包含锁式探针连接温度和扩增反应温度。连接温度是由 T4 DNA 连接酶决定。T4 DNA 连接酶有最适反应温度, 根据试剂盒说明书, 其最适反应温度为 16 °C。而扩增反应温度是由 Bst DNA 聚合酶的最适反应温度决定的。实验证明, 在 60 °C 和 63 °C 时, 条带最为清晰, 而超出了此温度范围, 则没有条带或者条带不清晰, 即 60 ~ 63 °C 为 Bst DNA 聚合酶的最适温度。因此, 本研究选用 63 °C 为 HRCA 反应的扩增温度。

用分子生物学手段检测嗜水气单胞菌, 相较于传统的细菌培养和免疫法, 具有突出的优点——灵敏度高、特异性强, 但其缺点也显而易见——需要较为昂贵的变温仪器。对于 PCR 方法^[27], 如果要做不同菌的高通量检测, 需要设计不同的引物进行多重 PCR, 这不可避免地产生多重 PCR 假阳性和不同引物相互影响扩增效率的问题。而采用 HRCA 法检测嗜水气单胞菌, 其灵敏度为 1×10^3 cfu/mL, 高于免疫法的 4.0×10^4 cfu/mL^[3]和 PCR 法的 3×10^4 cfu/mL^[18]; 并且不需要 PCR 仪, 采用恒温水浴锅即可进行扩增, 大大简化了处理步骤; 此外, 相较于 PCR 方法, 锁式探针的设计在保证中间连接序列不变的前提下, 针对不同目标序列设计不同的捕捉序列, 即可用一对引物扩增多种探针^[28], 可高通量^[29]、多靶标检测^[30], 克服了多重 PCR 进行多种病菌检测时的不利影响。



M—DL2000 分子标记; 1—感染的美洲鳗鲡样品;
2—健康的美洲鳗鲡样品

M—DL2000 Molecular marker; 1—sample of infected *Anguilla rostrata*; 2—practical sample of healthy *Anguilla rostrata*

图 5 实际样品的 HRCA 检测结果

Fig.5 The HRCA assay result of practical sample

4 结论

本文首次应用 HRCA 法进行了嗜水气单胞菌的检测。该法灵敏度高、特异性强, 样品处理简单, 不需要昂贵的仪器, 有可能在水产养殖现场检测中得到推广应用。基于锁式探针的特点, 后续研究可以根据中间连接序列设计一对通用引物, 针对不同菌的目标序列设计不同的捕捉序列, 实现多种水产病原菌的高通量检测, 为水产病害的鉴定及制定治疗方案提供更简洁、快速、高效的检测方法。

[参 考 文 献]

- [1] MENG S, WANG Y, LIU D, et al. Development of cross-priming amplification assays for rapid and sensitive detection of *Aeromonas hydrophila* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(2): 171-178.
- [2] CHAURET C, VOLK C, CREASON R, et al. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(8): 782-786.
- [3] 胡大雁, 钱冬, 刘问, 等. 嗜水气单胞菌 BA-ELISA 的建立及其在病原检测中的应用 [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 80-85.
- [4] HUSSAINI A, JEYASEKARAN G, SHAKILA R J, et al. Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* along with other *Aeromonas* spp. from fish and fishery products by multiplex PCR [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(2): 401-407.
- [5] NIE X, ZHANG C, WANG Y, et al. Application of hyper-branched rolling circle amplification (HRCA) and HRCA-based strip test for the detection of *Chattonella marina* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(18): 15678-15688.
- [6] ZHANG C, SUN R, WANG Y, et al. Comparative detection of *Kareniamini kimotoi* by exponential rolling circle amplification (E-RCA) and double-ligation E-RCA [J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(1): 505-518.
- [7] 张江峰, 张亚丽, 曾照芳, 等. 利用滚环扩增技术快速检测结核分枝杆菌 *rpoB* 基因单碱基突变 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(20): 2155-2158.
- [8] 郝振明, 赵鑫, 吴孝槐. 超分枝滚环扩增技术结合试纸法检测食品中多种转基因组分 [J]. 食品科学, 2010, 31(6): 263-266.
- [9] 李志锋, 王忠文, 冯建军, 等. 基于锁式探针技术的菜豆晕疫病病菌检测技术研究 [J]. 植物检疫, 2016, 30(2): 63-68.
- [10] 黄梦琪, 刘芳, 周小明. 基于滚环扩增技术的纸基显色传感器用于致病菌快速检测 [J]. 激光生物学报, 2017, 26(6): 527-533.
- [11] 熊静, 关瑞章, 郭松林, 等. 不同方法提取鳗鲡病原菌 DNA 模板的差异分析 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2012, 17(3): 161-166.
- [12] GUO S L, YANG Q H, FENG J J, et al. Phylogenetic analysis of the pathogenic genus *Aeromonas* spp. isolated from diseased eels in China [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 101: 12-23.
- [13] 李莲瑞, 卢强, 韩文瑜, 等. 嗜水气单胞菌 *aer* 毒素基因的克隆及核苷酸序列分析 [J]. 广西农业生物科学, 2005(4): 283-286.
- [14] SCHWEITZER B, WILTSHIRE S, LAMBERT J, et al. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(18): 10113-10119.
- [15] SATO K, TACHIARA A, RENBERG B, et al. Microbead-based rolling circle amplification in a microchip for sensitive DNA detection [J]. Lab on a Chip, 2010, 10(10): 1262-1266.
- [16] WU Q Q, JIN W, ZHOU C, et al. Integrated glass microdevice for nucleic acid purification, loop-mediated isothermal amplification, and online detection [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(9): 3336-3342.
- [17] 张晓华, 徐怀恕, 许兵, 等. 中国对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术研究 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 604-610.
- [18] 王璐, 梁利国, 谢骏, 等. 嗜水气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 水产科学, 2013, 32(4): 219-

- 223.
- [19] LIN H, JIANG X, YI J, et al. Molecular identification of *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot on apple using rolling-circle amplification of partial EF-1 α sequence [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(1): 57-68.
- [20] TSUI C K M, WANG B, KHADEMPOUR L, et al. Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountain pine beetles by padlock probes [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 83(1): 26-33.
- [21] SUN J, NHJAFZADEH M J, ZHANG J M, et al. Molecular identification of *Penicillium marneffei* using rolling circle amplification [J]. Mycoses, 2011, 54(6): e751-e759.
- [22] DAVARI M, VAN DIEPENINGEN A D, BABAI-AHARI A, et al. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA) [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(1): 63-70.
- [23] NAJAFZADEH M J, DOLATABADI S, KEISARI M S, et al. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(3): 338-342.
- [24] WANG B, POTTER S J, LIN Y, et al. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2339-2344.
- [25] LARANJO L T, GROSS S J, ZEIGER D M, et al. SSB recruitment of Exonuclease I aborts template-switching in *Escherichia coli* [J]. DNA Repair, 2017, 57: 12-16.
- [26] ZHANG K, FAN Z Q, LI H, et al. Determination of the concentration of transcription factor by using exonuclease III-aided amplification and gold nanoparticle mediated fluorescence intensity: a new method for gene transcription related enzyme detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1104: 132-139.
- [27] HUSSAIN I A, JEYASEKARAN G, SHAKILA R J, et al. Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* along with other *Aeromonas* spp. from fish and fishery products by multiplex PCR [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(2): 401-407.
- [28] HAMIDI S V, GHOURCHIAN H. Colorimetric monitoring of rolling circle amplification for detection of H5N1 influenza virus using metal indicator [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 72: 121-126.
- [29] JOHAN B, PETER G, YACOB A, et al. Microarray-based molecular detection of foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis and swine vesicular disease viruses, using padlock probes [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 143(2): 200-206.
- [30] PAZ-CARRASCO L C, CASTILLO-URQUIZA G P, LIMA A T M, et al. Begomovirus diversity in tomato crops and weeds in Ecuador and the detection of a recombinant isolate of rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting tomato [J]. Archives of Virology, 2014, 159(8): 2127-2132.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)