



## 生物实验室

## 荧光重组酶介导等温扩增检测食品中单增李斯特菌

黄新新<sup>1</sup> 何宇平<sup>\*1</sup> 袁辰刚<sup>1</sup> 郭德华<sup>1</sup> 赵勇<sup>2</sup> 孙晓红<sup>2</sup> 曾静<sup>3</sup> 郑秋月<sup>4</sup>

1 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心 上海 200135

2 上海海洋大学食品学院 上海 201306

3 中国海关科学技术研究中心 北京 100026

4 大连民族大学生命科学院 辽宁 大连 116600

**摘要:**【背景】单增李斯特菌为肉类及乳制品中常见的食源性致病菌,传统的培养法检测无法满足口岸大批量食品的快速检测要求,建立简便、灵敏、快速及现场可操作的技术至关重要。【目的】建立快速简便的荧光重组酶介导等温扩增(Recombinase-Aided Amplification, RAA)法检测单增李斯特菌,以适应口岸快速通关及监管的实际需求。【方法】根据单增李斯特菌 *hlyA* 基因保守区设计特异性引物、探针,通过引物两两组合结合探针筛选出扩增效率及灵敏度最佳的引物组合,优化反应温度及引物探针浓度,确定最佳反应条件。将建立的荧光 RAA 法应用于食品基质及实际样品检测中,同时与国标 GB 4789.30-2016 进行比对验证。【结果】单增李斯特菌荧光 RAA 最佳反应温度为 42 °C,最佳引物、探针终浓度均为 400 nmol/L。建立的荧光 RAA 法特异性强,纯菌灵敏度达到  $3 \times 10^2$  CFU/mL。加标食品基质牛肉、大西洋鲑鱼及再制干酪 LB2 增菌只需 4 h,即可检测原始浓度分别达到 0.3、3、30 CFU/mL 的单增李斯特菌。荧光 RAA 法只需 5 min 即可观察结果,20–30 min 完成扩增,速度及灵敏度明显高于国标法。【结论】建立的荧光 RAA 法可用于口岸和其他场所进行单增李斯特菌的快速检测与监控。

**关键词:** 单增李斯特菌, 荧光重组酶介导等温扩增, 快速检测, 监控

**Foundation items:** Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2019-02-08-00-10-F01149); Shanghai Natural Science Foundation (19ZR1417400); Agricultural Science and Technology Project of Shanghai Science and Technology Commission (21N31900300)

**\*Corresponding author:** E-mail: heyuping668@163.com

**Received:** 23-07-2021; **Accepted:** 14-09-2021; **Published online:** 22-10-2021

**基金项目:** 上海市科技兴农项目(2019-02-08-00-10-F01149); 上海市自然科学基金(19ZR1417400); 上海市科委农业科技领域项目(21N31900300)

**\*通信作者:** E-mail: heyuping668@163.com

**收稿日期:** 2021-07-23; **接受日期:** 2021-09-14; **网络首发日期:** 2021-10-22

## Detection of *Listeria monocytogenes* in food by fluorescent recombinase-aided amplification

HUANG Xinxin<sup>1</sup> HE Yuping<sup>\*1</sup> YUAN Chengang<sup>1</sup> GUO Dehua<sup>1</sup> ZHAO Yong<sup>2</sup>  
SUN Xiaohong<sup>2</sup> ZENG Jing<sup>3</sup> ZHENG Qiuyue<sup>4</sup>

1 Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China

2 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China

4 College of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning 116600, China

**Abstract:** [Background] *Listeria monocytogenes* is a common contaminated foodborne pathogen in meat and dairy products. The traditional culture method can not meet the rapid detection requirements of large quantities of food at the port. It is very important to establish a simple, sensitive, fast and field operable technology. [Objective] To establish a rapid and simple method for the detection of *Listeria monocytogenes* by recombinase-aided amplification (RAA) to meet the actual needs of port rapid customs clearance and supervision. [Methods] According to the conserved region of *hlyA* gene of *Listeria monocytogenes*, the specific primers and probes were designed. The best primer combination with the best amplification efficiency and sensitivity was selected by the combination of primers and probes. The optimal reaction conditions were determined by optimizing the reaction temperature and the concentration of primers and probes. The established fluorescence RAA method was applied to the detection of food matrix and actual samples, and compared with the national standard GB 4789.30-2016. [Results] The optimum reaction temperature of fluorescence RAA of *Listeria monocytogenes* was 42 °C, and the final concentration of primer and probe was 400 nmol/L. The established fluorescence RAA method showed high specificity and the sensitivity, and the detection limit of the method was  $3 \times 10^2$  CFU/mL in pure culture. The LOD for *Listeria monocytogenes* was 0.3 CFU/mL, 3 CFU/mL and 30 CFU/mL original concentrations under 4 h LB2 enrichment in artificially contaminated beef, Atlantic salmon and processed cheese respectively. The RAA assay produced a positive signal in 5 min, and the whole assay could be completed in approximately 20–30 min. The speed and sensitivity were significantly higher than those of the national standard method. [Conclusion] The fluorescence RAA method can be used for rapid detection and monitoring of *Listeria monocytogenes* at ports or other places.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, fluorescent recombinase-aided amplification, rapid detection, monitor

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)为重要的食源性致病菌,也是李斯特菌中唯一的人畜共患致病菌<sup>[1]</sup>。其对孕妇、老人和儿童等免疫力低下的人群尤为易感,可引发脑膜炎、败血症及流产<sup>[2-3]</sup>,死亡率高达 30%<sup>[1-4]</sup>。由于单增李斯特菌广泛存在于各类食品中,在 4 °C 冰箱保存的食物中也可生长繁殖,并能抵御各种严苛的加工条件,在冷冻及真空包装条件下依旧能存活,造成食品安全的重大隐患<sup>[5]</sup>。目前世界各国将单增李斯特菌列为食品安全检测中法定的项目。

传统的微生物鉴定方法通常以培养和生化分

析相结合,耗时耗力,不适合快速检测及现场分析。近年来,各种分子生物学技术被应用到单增李斯特菌检测中,包括实时荧光 PCR、环介导等温扩增(Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)和微流控芯片等<sup>[6-8]</sup>。这些方法有优点但也存在缺点,荧光 PCR 需要热循环仪且设备较大,只能在实验室使用,无法进行现场检测;LAMP 扩增速度快但特异性不高,容易污染;微流控芯片成本不菲,因而需建立既能进行实验室检测又能现场快速检测的灵敏、简便、快速和低成本检测方法。

重组酶介导等温扩增(Recombinase-Aided

Amplification, RAA)的酶混合物包括重组酶 UvsX、单链 DNA 结合蛋白(Single Stranded DNA Binding Protein, SSB)和 DNA 聚合酶。重组酶 UvsX 从大肠杆菌获得, RAA 技术利用重组酶 UvsX 结合引物对模板 DNA 进行退火, SSB 结合上去形成 D 环结构, 在 DNA 聚合酶的作用下保持模板 DNA 的单链状态进行扩增和延伸。在 37–42 °C 的恒温下, 荧光信号可在 20 min 内获得, 有效缩短了检测时间, 而且在核酸扩增过程中不需要温度变化, 特别适合在现场及资源简易的场所操作。目前重组酶介导等温扩增技术已取得长足的发展, 并被应用在病原体及食品安全等多个检测领域<sup>[9-15]</sup>。

本研究针对口岸中进出口食品需快速检测需求的需求, 建立单增李斯特菌荧光 RAA 检测法, 并在食品基质及实际样品中应用验证, 以期满足大批量进出口食品尤其是肉类、海产品及乳制品中单增李斯特菌的快速检测要求, 提升政府监管力度, 保障食品安全。

1 材料与方法

1.1 菌株

单增李斯特菌(ATCC7644)、英诺克李斯特菌(ATCC33090)、斯氏李斯特菌(ATCC35967)、伊氏李斯特菌(ATCC19119)、格式李斯特菌(ATCC700545)、威氏李斯特菌(ATCC35897)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、奇异变形杆菌(ATCC12453)、肺炎克雷伯氏菌(ATCC13883)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)、产气肠杆菌(ATCC13048)、大肠埃希氏菌(ATCC29522)、迟缓

爱德华氏菌(ATCC15947)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、粪肠球菌(ATCC49452)和溶血性链球菌(ATCC21059)购自上海汉尼生物技术有限公司。单增李斯特菌分离株 M2、M3、M4、M5、M6、M7 为本实验室分离保存, 所有菌株–80 °C 保存于 10% (质量体积分数)甘油肉汤中。

1.2 主要试剂和仪器

荧光 RAA 扩增试剂盒, 江苏奇天基因生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 大连宝生物工程有限公司; 缓冲蛋白胨水、脑心浸液培养基(BHI)、李氏增菌(LB1, LB2)基础培养基, 北京陆桥技术有限责任公司; 李斯特菌显色培养基, 上海中欣生物工程有限公司。荧光 RAA 检测仪, 江苏奇天基因生物科技有限公司; ESCO 生物二级安全柜, 新加坡艺思高科技有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株复苏

从甘油冻存管中取 100 μL 菌液接种到 5 mL BHI 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养过夜。

1.3.2 细菌基因组 DNA 制备

取 1 mL 细菌培养物置于 1.5 mL EP 离心管, 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌液, 弃上清。按照试剂盒方法提取细菌基因组 DNA, –20 °C 保存备用。

1.3.3 引物设计

从 NCBI GenBank 数据库中获得单增李斯特菌 *hlyA* 基因序列, 根据 RAA 引物、探针设计原则设计荧光 RAA 引物和探针序列。引物、探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体序列见表 1。

表 1 单增李斯特菌的荧光 RAA 引物、探针序列

Table 1 Primers and probe sequences of fluorescent RAA for *Listeria monocytogenes*

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>hlyA</i> -F1	CTGTAAATAATAGCTTGAATGTAACTTCGGCGC
<i>hlyA</i> -R1	TCTGCATTCACTCCAAGCGCTTGCAACTGCTC
<i>hlyA</i> -F2	CGCAATCAGTGAAGGGAAAAATGCAAGAAGAAGTC
<i>hlyA</i> -R2	TTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTTTGCCGAAA
<i>hlyA</i> -P	TAGTTTTAAACAAATTACTATAACGTGAA(FAM-dT)(THF)(BHQ-dT)TAATGAACCTACAAG

### 1.3.4 引物的筛选

将 2 条正向引物与 2 条反向引物互相组合,与探针形成 4 个组合,对引物和探针的浓度进行最佳配比筛选,通过荧光信号值的大小以及反应时间筛选最佳引物、探针组合。

### 1.3.5 反应温度的优化

RAA 反应液包括正、反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2.1  $\mu\text{L}$ 、探针(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ 反应缓冲液 25  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , 乙酸镁 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.7  $\mu\text{L}$ 。将 RAA 反应液置于荧光 RAA 检测仪中,在不同温度(30、35、39、42、45  $^{\circ}\text{C}$ )进行反应 30 min,确定最佳扩增温度。

### 1.3.6 引物、探针浓度的优化

在探针终浓度为 120 nmol/L 时将引物终浓度分别稀释为 100、200、400、800 nmol/L,引物终浓度为 400 nmol/L 时对应的探针终浓度分别稀释为 100、200、300、400 nmol/L 进行扩增。比较最佳扩增效果时的引物、探针浓度。

### 1.3.7 特异性检测

选取单增李斯特菌(ATCC7644)、英诺克李斯特菌(ATCC33090)、斯氏李斯特菌(ATCC35967)、伊氏李斯特菌(ATCC19119)、格式李斯特菌(ATCC700545)、威氏李斯特菌(ATCC35897)和单增李斯特菌分离株 M2-M7 以及铜绿假单胞菌(ATCC27853)、奇异变形杆菌(ATCC12453)、肺炎克雷伯(ATCC13883)、鼠伤寒沙门氏(ATCC14028)、产气肠杆菌(ATCC13048)、大肠埃希氏菌(ATCC29522)、迟缓爱德华氏菌(ATCC15947)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、粪肠球菌(ATCC49452)、溶血性链球菌(ATCC21059)等菌株纯培养物,提取 DNA 模板后进行荧光 RAA 检测,验证方法的特异性。

### 1.3.8 灵敏度检测

挑取单增李斯特菌单菌落接种至 BHI 培养液,37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜。用无菌生理盐水做 10 倍梯度稀释,取菌液 1 mL 加入灭菌培养皿,倒入 56  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴的计数琼脂摇匀,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温倒置培养 24 h。每个稀释度做 3 个平行对照,设空白

对照。各稀释度的菌液提取 DNA 后,用荧光 RAA 法检测,观察记录结果。从培养过夜的平板上选取菌落数在 30-300 之间的平板进行菌落计数,计算出菌悬液中单增李斯特菌的浓度,推算出该方法的检测灵敏度。

### 1.3.9 基质中检测限检测

选取牛肉、大西洋鲑鱼及再制干酪等 3 种样品,经 GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》<sup>[16]</sup>检测,无单增李斯特菌污染。将菌液浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL 的单增李斯特菌进行  $10^{-1}$ - $10^{-10}$  稀释。称取 25 g 上述样品,向其中添加不同稀释度的单增李斯特菌纯菌液。将人工污染的样品加到 225 mL LB1 增菌培养基中,采集 1 mL LB1 增菌前培养液提取 DNA,做荧光 RAA 法检测。置 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,取 100  $\mu\text{L}$  LB1 增菌液加入到 10 mL LB2 增菌液中。30  $^{\circ}\text{C}$  培养 2、4、24 h 后采集 1 mL 培养液,提取 DNA 并用 RAA 法进行扩增,观察结果。所有做荧光 RAA 检测的样品同时采用文献<sup>[16]</sup>的标准方法进行检测。

### 1.3.10 实际样品检测

收集上海口岸及市场中 100 份实际样品进行荧光 RAA 检测。所有样品同时采用文献<sup>[16]</sup>的标准方法检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 单增李斯特菌荧光 RAA 方法的建立及优化

#### 2.1.1 扩增温度优化

分别选择 30、35、39、42、45  $^{\circ}\text{C}$  作为扩增温度测试单增李斯特菌 RAA 扩增效果差异,结果表明,30  $^{\circ}\text{C}$  时无扩增信号,42  $^{\circ}\text{C}$  时荧光信号最强,优于 39  $^{\circ}\text{C}$ ;而当扩增温度升为 45  $^{\circ}\text{C}$  时扩增信号减弱,所以最佳扩增温度为 42  $^{\circ}\text{C}$  (图略)。

#### 2.1.2 RAA 不同引物、探针浓度优化

如图 1 所示,探针终浓度为 120 nmol/L、引物浓度为 400 nmol/L 时扩增最平稳,信号最好;而在引物浓度为 400 nmol/L 时,随着探针浓度的升

高(100–400 nmol/L), 扩增信号也随之上升(图 2), 因此选择最佳引物终浓度为 400 nmol/L 和探针终浓度为 400 nmol/L。

### 2.1.3 不同引物和探针组合的筛选测试

将 *hlyA*-F1、*hlyA*-R1、*hlyA*-F2、*hlyA*-R2 两两组合, 测试 F1/R1、F1/R2、F2/R1、F2/R2 引物对结合探针的扩增效果。由图 3 可见, F1/R1/P 对不同稀释度的菌液扩增梯度及灵敏度最稳定, 因此筛选 F1/R1/P 引物、探针组合作为以后的扩增引物。最后确定单增李斯特菌荧光 RAA 最佳反应条件为: 缓冲液 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L,

探针(10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 乙酸镁 2.5  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, 纯化水 14.5  $\mu$ L; 反应管放入荧光检测仪中 42  $^{\circ}$ C 反应 30 min。

### 2.2 特异性测试

特异性荧光 RAA 反应(同 2.1.3), 由图 4 和图 5 显示, 只有单增李斯特菌 ATCC 株及分离株能扩增出特异性条带, 其余菌株均无扩增信号, 表明设计的引物和探针特异性好。

### 2.3 灵敏度测试

对不同稀释度的菌液提取 DNA 进行荧光 RAA 反应(同 2.1.3)。图 6 表明, 单增李斯特菌以

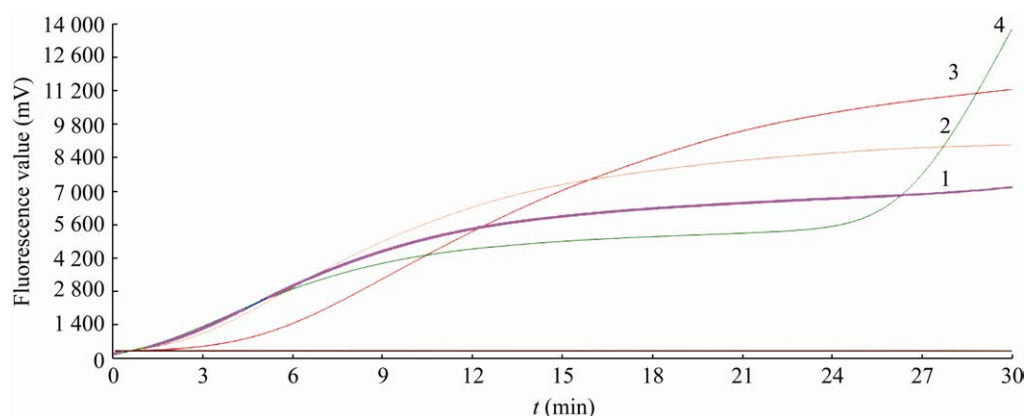


图 1 单增李斯特菌不同引物浓度荧光 RAA 扩增效果

Figure 1 Amplification effects of different primer concentrations of fluorescent RAA for *Listeria monocytogenes*

Note: 1: 100 nmol/L; 2: 200 nmol/L; 3: 400 nmol/L; 4: 800 nmol/L

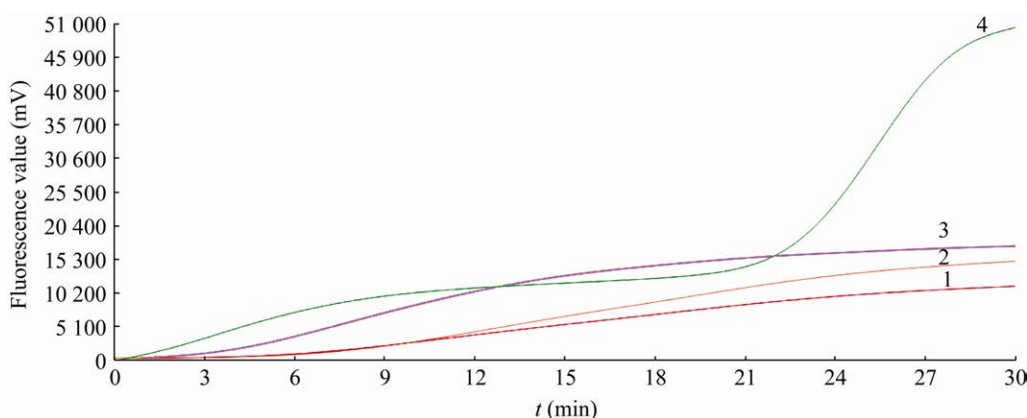


图 2 单增李斯特菌不同探针浓度荧光 RAA 扩增效果

Figure 2 Amplification effect of fluorescent RAA concentration at different probe concentrations for *Listeria monocytogenes*

Note: 1: 100 nmol/L; 2: 200 nmol/L; 3: 300 nmol/L; 4: 400 nmol/L

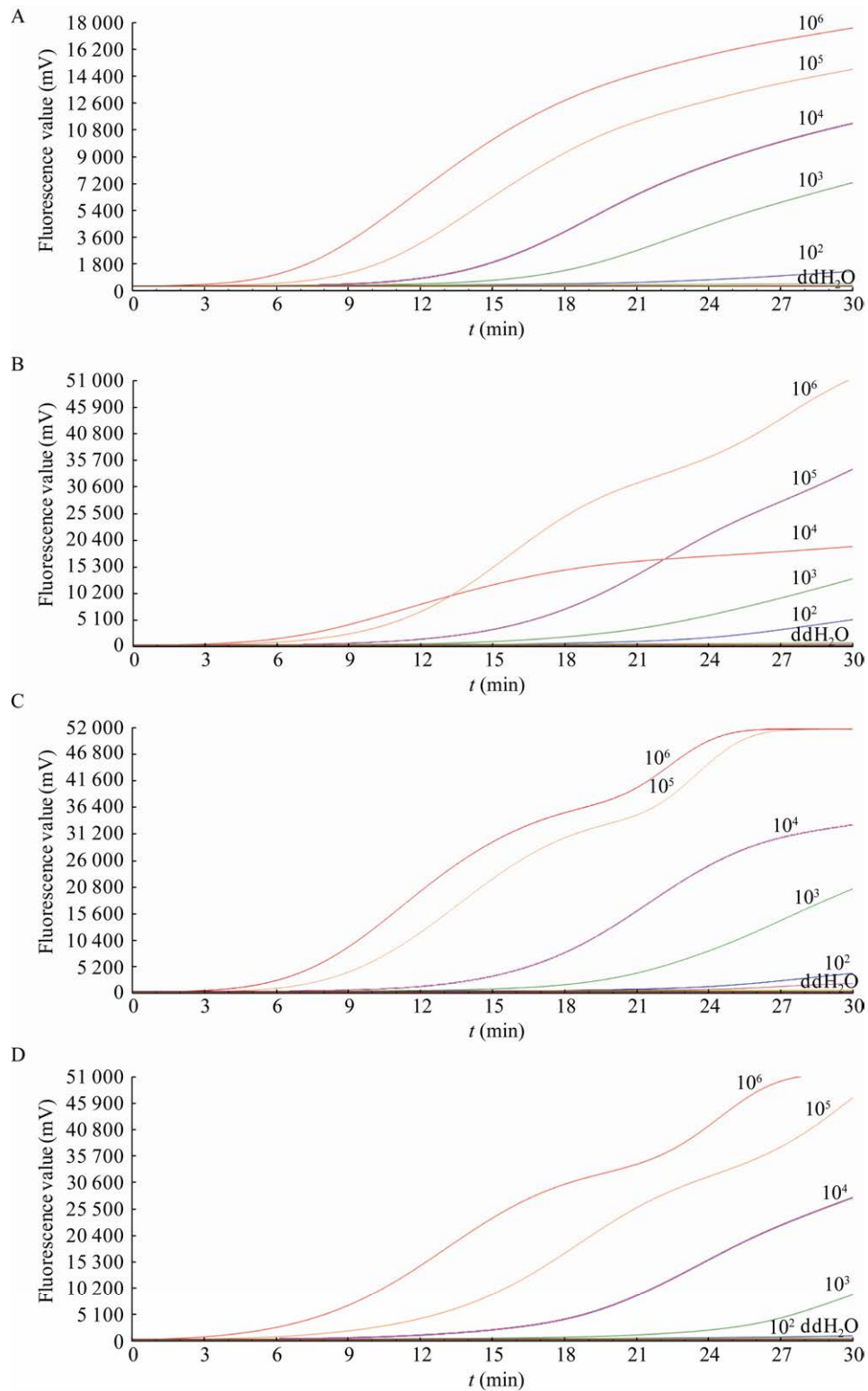


图 3 不同引物探针组合荧光 RAA 测试结果

**Figure 3** Fluorescence RAA test results of different primer probe combination

Note: A: F1/R1/P; B: F1/R2/P; C: F2/R1/P; D: F2/R2/P. The dilution of *Listeria monocytogenes* ranged from 10<sup>6</sup> CFU/mL to 10<sup>2</sup> CFU/mL, ddH<sub>2</sub>O as the negative control

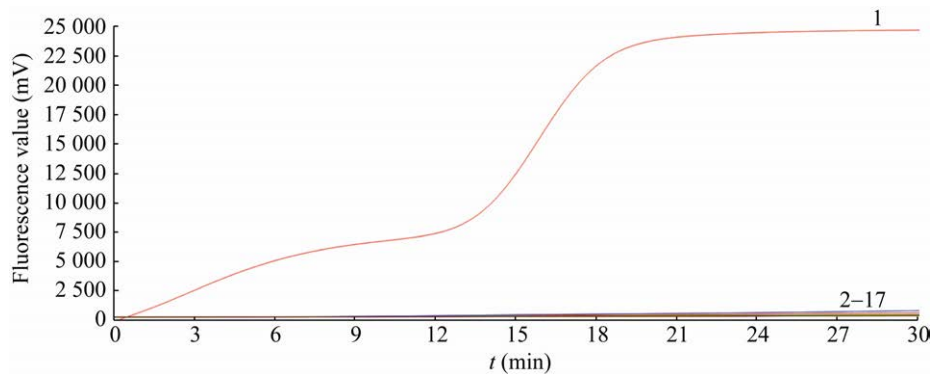


图 4 单增李斯特菌标准株荧光 RAA 特异性反应结果

**Figure 4 Results of fluorescence RAA specific reaction for *Listeria monocytogenes***

Note: 1: *L. monocytogenes* ATCC7644; 2: *P. aeruginosa*; 3: *P. mirabilis*; 4: *K. pneumoniae*; 5: *S. typhimurium*; 6: *E. aerogenes*; 7: *E. coli*; 8: *E. tarda*; 9: *L. innocua*; 10: *L. seeligeri*; 11: *L. ivanovii*; 12: *L. grayi*; 13: *L. welshimeri*; 14: *S. aureus*; 15: *E. faecalis*; 16: *S. hemolyticus*; 17: ddH<sub>2</sub>O

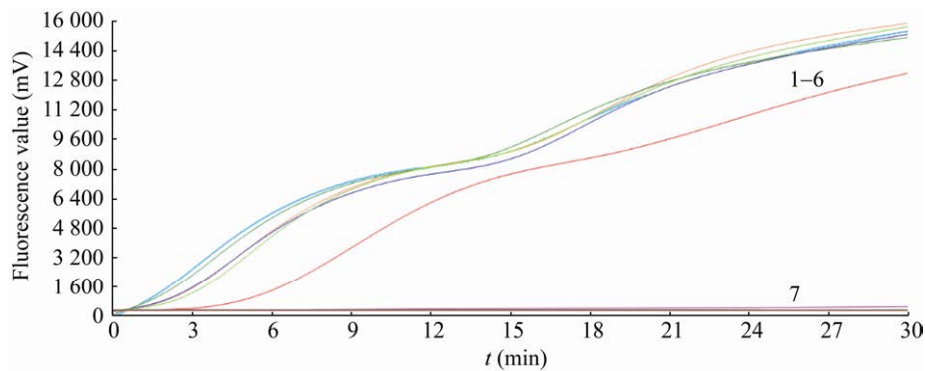


图 5 单增李斯特菌分离菌株荧光 RAA 特异性反应结果

**Figure 5 Results of fluorescence RAA specific reaction of *Listeria monocytogenes* isolated strains**

Note: 1: *L. monocytogenes* M2 strain; 2: *L. monocytogenes* M3 strain; 3: *L. monocytogenes* M4 strain; 4: *L. monocytogenes* M5 strain; 5: *L. monocytogenes* M6 strain; 6: *L. monocytogenes* M7 strain; 7: ddH<sub>2</sub>O

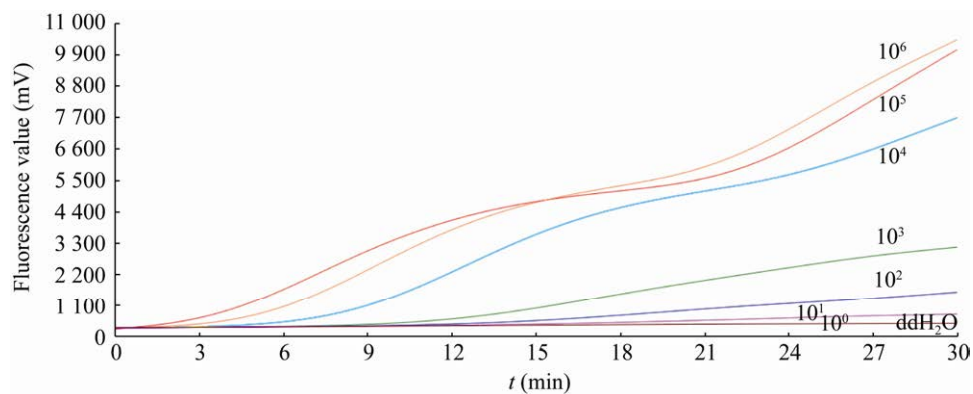


图 6 单增李斯特菌 ATCC7644 荧光 RAA 灵敏度试验

**Figure 6 Fluorescence RAA sensitivity test for *Listeria monocytogenes* ATCC7644**

注: 单增李斯特菌稀释度由  $10^6$ – $10^0$  CFU/mL, ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照

Note: The dilution of *Listeria monocytogenes* ranged from  $10^6$  CFU/mL to  $10^0$  CFU/mL, ddH<sub>2</sub>O as the negative control



引物探针组合 F1/R1/P 进行荧光 RAA 扩增时灵敏度可达  $3 \times 10^2$  CFU/mL。

## 2.4 基质中检出限测试

### 2.4.1 牛肉基质中荧光 RAA 和传统法检出限比较

牛肉样品中添加不同浓度的单增李斯特菌经接种 LB2 二次增菌, 荧光 RAA 反应(同 2.1.3)检测结果见图 7。LB2 增菌 2 h 后荧光 RAA 对牛肉中原始添加单增李斯特菌的检出限可达  $3 \times 10^3$  CFU/mL (图 7A), LB2 增菌 4 h 后即可达到 3 CFU/mL

(图 7B), LB2 增菌 24 h 后荧光扩增值更高(图 7C)。传统划线培养法 LB2 增菌 24 h 后检出限才达到 30 CFU/mL, 可见荧光 RAA 灵敏度及速度明显高于传统划线培养法。

### 2.4.2 大西洋鲑鱼中 RAA 和传统法检出限比较

大西洋鲑鱼样品中添加不同浓度的单增李斯特菌, 荧光 RAA 反应(同 2.1.3)检测结果见图 8。LB2 增菌 2 h 后, 荧光 RAA 对大西洋鲑鱼中原始添加单增李斯特菌的检出限即可达到 3 CFU/mL

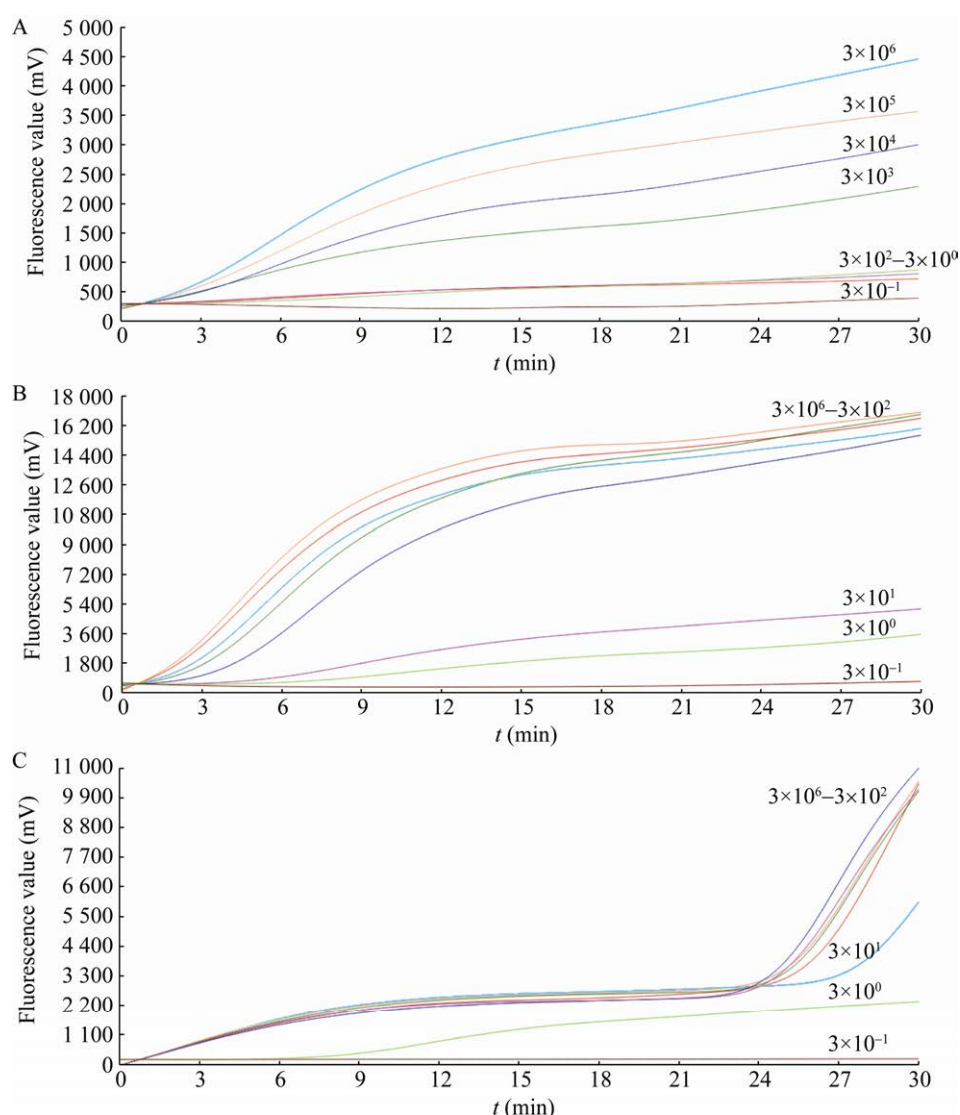


图 7 牛肉基质在 LB2 中不同增菌时间后荧光 RAA 扩增结果

Figure 7 Fluorescence RAA amplification results of beef matrix after different enrichment time in LB2

Note: A: Enrichment 2 h; B: Enrichment 4 h; C: Enrichment 24 h. The dilution of *Listeria monocytogenes* ranged from  $3 \times 10^6$  CFU/mL to  $3 \times 10^{-1}$  CFU/mL, ddH<sub>2</sub>O as the negative control



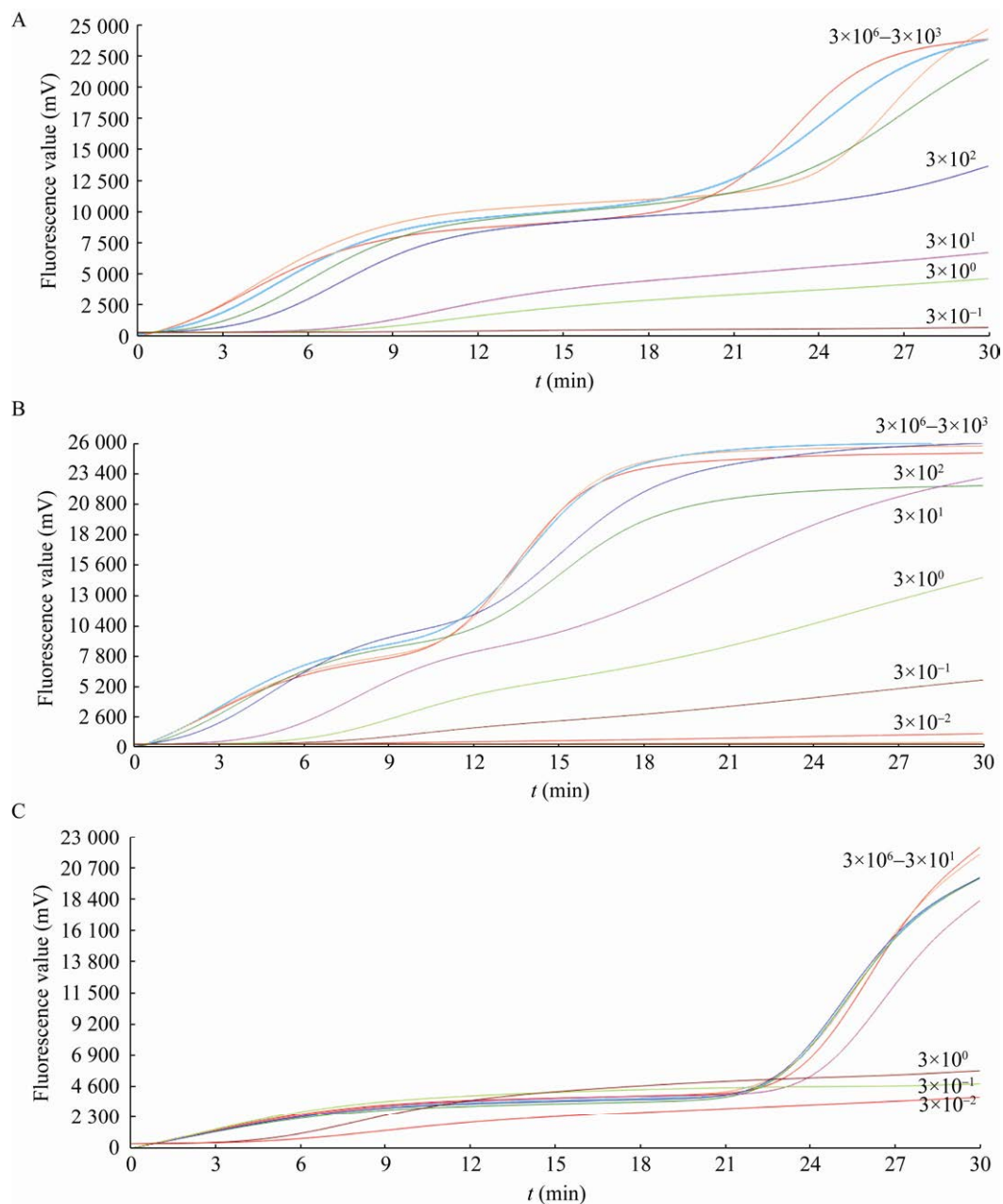


图 8 大西洋鲑鱼基质在 LB2 中不同增菌时间后荧光 RAA 扩增结果

**Figure 8** Fluorescence RAA amplification results of Atlantic salmon matrix after different enrichment time in LB2

注: 单增李斯特菌稀释度由 3x10<sup>6</sup>–3x10<sup>-2</sup> CFU/mL

Note: A: Enrichment 2 h; B: Enrichment 4 h; C: Enrichment 24 h. The dilution of *Listeria monocytogenes* ranged from 3x10<sup>6</sup> CFU/mL to 3x10<sup>-2</sup> CFU/mL

(图 8A); 增菌 4 h 后检测限可达到 0.3 CFU/mL (图 8B); 增菌 24 h 后检测限可达到 0.03 CFU/mL (图 8C)。传统划线培养法则在 LB2 增菌 24 h 后检出限才达到 3 CFU/mL。

**2.4.3 再制干酪中荧光 RAA 和传统法检出限比较**  
再制干酪样品中添加不同浓度的单增李斯特菌, RAA 荧光反应(同 2.1.3)检测结果见图 9。LB2 增菌 2 h 后, 荧光 RAA 对再制干酪中原始添加单

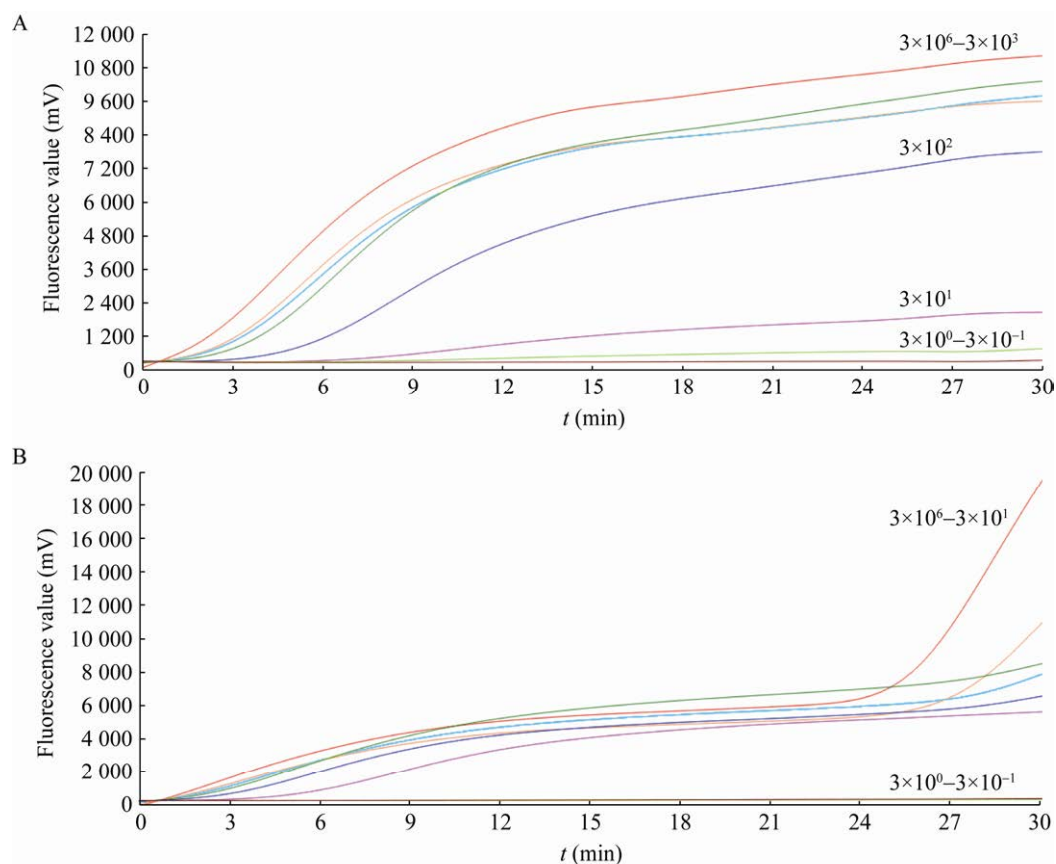


图9 再制干酪基质在LB2中不同增菌时间后荧光RAA扩增结果

Figure 9 Fluorescence RAA amplification results of processed cheese matrix after different enrichment time in LB2

Note: A: Enrichment 4 h; B: Enrichment 24 h. The dilution of *Listeria monocytogenes* ranged from  $3 \times 10^6$  CFU/mL to  $3 \times 10^{-1}$  CFU/mL

增李斯特菌的检出限即可达到  $3 \times 10^2$  CFU/mL (结果未显示); LB2 增菌 4 h 后检出限即可达到 30 CFU/mL (图 9A); LB2 增菌 24 h 后荧光扩增值更高(图 9B)。传统划线培养法则需 LB2 增菌 24 h 后检出限才能达到 30 CFU/mL。

上述 3 种食品基质中添加单增李斯特菌, 经 LB1 预增菌, 再经 LB2 增菌 4 h, 牛肉、大西洋鲑鱼及再制干酪中原始添加的单增李斯特菌检测限即可分别达到 0.3、3、30 CFU/mL, 而对于传统培养法, 则均需 LB2 增菌 24 h 后检测限才分别达到 3、30、30 CFU/mL。由于荧光 RAA 反应只需 20–30 min 即可观察结果, 而传统培养法还需再培养 24 h 后才能出结果, 因而荧光 RAA 在实验的简便性、灵敏度及快速性方面远胜于传统方法。

## 2.5 样品中单增李斯特菌的实际检测

按照文献[16]标准方法对上海口岸跨境及市售的鸡肉、牛肉、大西洋鲑鱼、珍宝蟹及再制干酪等各 20 份共 100 份进行前处理增菌后提取基因组 DNA, 采用建立的荧光 RAA 方法进行检测, 同时采用文献[16]标准方法中推荐的传统划线培养方法进行检测, 结果表明有 2 份鸡肉、2 份牛肉和 1 份大西洋鲑鱼荧光 RAA 方法检测结果呈阳性, 与国家标准 GB 4789.4-2016 检测结果一致。

## 3 讨论与结论

本研究建立了一种快速、简便、灵敏地检测单增李斯特菌的荧光 RAA 法。结果表明, 除了单增李斯特菌标准株 ATCC7644 及分离株有扩增信号, 其余的李斯特菌包括英诺克李斯特菌、斯氏李斯特

菌、伊氏李斯特菌、格式李斯特菌、威氏李斯特菌及 10 种其他菌株均未有扩增, 显示了该方法的高度特异性。

本研究通过优化反应条件, 使荧光 RAA 法检测单增李斯特菌纯菌灵敏度达到  $3 \times 10^2$  CFU/mL。通常 RAA 技术推荐的温度为 39 °C, 而本研究通过优化反应条件, 确定单增李斯特菌荧光 RAA 扩增的最佳温度为 42 °C, 探针的最佳浓度为 400 nmol/L。引物探针的浓度, 尤其是探针浓度对 RAA 法检测低拷贝的 DNA 比较关键。RAA 扩增曲线在菌液浓度稀释到小于  $10^4$  CFU/mL 后呈现明显的下降趋势, 在菌液浓度为  $10^2$  CFU/mL 时扩增信号比较微弱, 影响了灵敏度。这一方面和引物探针的设计有关, 也和最佳反应浓度相关。本研究发现, 将探针终浓度提高到 400 nmol/L 以上可以很好地解决扩增信号低的缺点。绝大部分细菌的 RAA 反应灵敏度可达到  $10^2$  CFU/mL 以上。

在实际食品检测中, 污染的食源性致病菌不如纯菌检测方便和灵敏。受食品基质的干扰及食品加工运输如冷冻、干燥及辐射等的影响, 食源性致病菌通常处于一种受损状态, 因而需要有预增菌及二次增菌的过程。即使是再灵敏、快速的分子生物学方法, 也需要一定程序的增菌时间。不同食品基质表现出来的检测性质也有较大差异。本研究选择经常被单增李斯特菌污染的 3 种食品牛肉、大西洋鲑鱼及再制干酪为代表, 作为人工添加单增李斯特菌的食品基质。研究表明, 3 种人工加标的食品基质在 LB1 预增菌前的荧光 RAA 检测限均只有  $3 \times 10^5$  CFU/mL, 表明基质的检测干扰作用明显(结果未显示); 而在 LB2 二次增菌后 2–4 h 检测限均明显提升。需说明的是 LB2 二次增菌至关重要, 本试验曾尝试在 LB1 增菌后直接进行荧光 RAA 扩增, 但线条比较混乱(结果未显示); 经 LB2 二次增菌后荧光 RAA 的扩增曲线清晰有层次。牛肉、大西洋鲑鱼及再制干酪在 LB2 增菌 4 h 后检测限分别达到了原始添加浓度 3、0.3 及 30 CFU/mL, 大西

洋鲑鱼在 LB2 增菌 2 h 后检测限即可达到 3 CFU/mL。荧光 RAA 法灵敏度及速度均明显优于传统培养法。实际样品的检测结果也与国标法吻合。

近年来随着 RAA 技术的发展, 出现了多种实际应用和检测方式。有学者将 CRISPR/Cas12a 系统与 PCR 及 RAA 技术结合起来检测单增李斯特菌, 灵敏度分别达到 3.37 CFU/mL 和 135 CFU/mL, 检测时间为 15 min, 既快速灵敏度又高<sup>[17-18]</sup>。Xie 等<sup>[12]</sup>利用叠氮溴化丙锭结合 RAA 法去除死菌干扰作用检测食品样品中活的金黄色葡萄球菌, 能检测出人工加标污染奶中富集 3 h 后  $10^2$  CFU/mL 及 6 h 后 10 CFU/mL 的原始活菌。由此可见, 该技术有望在将来引起更多的关注与发展, 进而成为食品安全检测领域的新起点。

## REFERENCES

- [1] De Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(11): 1073-1082
- [2] Carloni E, Rotundo L, Brandi G, Amagliani G. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* by magnetic capture hybridization and multiplex real-time PCR[J]. *Folia Microbiologica*, 2018, 63(6): 735-742
- [3] Bundidamorn D, Supawasit W, Trevanich S. A new single-tube platform of melting temperature curve analysis based on multiplex real-time PCR using EvaGreen for simultaneous screening detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food[J]. *Food Control*, 2018, 94: 195-204
- [4] Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2488
- [5] Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments[J]. *Food Control*, 2017, 75: 1-13
- [6] Bundidamorn D, Supawasit W, Trevanich S. Taqman® probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods[J].

- Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology, 2021, 147: 111696
- [7] Roumani F, Azinheiro S, Carvalho J, Prado M, Garrido-Maestu A. Loop-mediated isothermal amplification combined with immunomagnetic separation and propidium monoazide for the specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in milk products, with an internal amplification control[J]. Food Control, 2021, 125: 107975
- [8] Zhang Y, Hu XZ, Wang QJ. Sensitive and specific detection of *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in milk by microchip electrophoresis combined with multiplex PCR amplification[J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 104876
- [9] Chen C, Li XN, Li GX, Zhao L, Duan SX, Yan TF, Feng ZS, Ma XJ. Use of a rapid reverse-transcription recombinase aided amplification assay for respiratory syncytial virus detection[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2018, 90(2): 90-95
- [10] Xue GH, Li SL, Zhao HQ, Yan C, Feng YL, Cui JH, Jiang TT, Yuan J. Use of a rapid recombinase-aided amplification assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20: 79
- [11] Hu JQ, Wang Y, Su HJ, Ding HM, Sun XC, Gao H, Geng Y, Wang ZC. Rapid analysis of *Escherichia coli* O157:H7 using isothermal recombinase polymerase amplification combined with triple-labeled nucleotide probes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 50: 101501
- [12] Xie GY, Zhou DG, Zhao GJ, Feng XY, Aguilar ZP, Xu HY. Recombinase aided amplification with photoreactive DNA-binding dye for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus*[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology, 2021, 135: 110249
- [13] Zhang XP, Guo LC, Ma RR, Cong LJ, Wu ZH, Wei Y, Xue SJ, Zheng W, Tang SJ. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase-aided amplification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139: 202-204
- [14] Sun XH, Hou LW, Li DR, Zhao Y, Huang XX, He YP, Lan WQ. Research progress on the application of isothermal recombinase amplification in analytical detection[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 265-270 (in Chinese)
- 孙晓红, 后来旺, 李达容, 赵勇, 黄新新, 何宇平, 蓝蔚青. 重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 265-270
- [15] Wei Y, Guo LC, Zhang XP, Huang L, Zheng LY, Ying QJ, Wu ZH, Zheng W. Establishment of recombinase-aided amplification assay for group A *Streptococcus pyogenes* detection[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2018, 41(5): 314-316,323 (in Chinese)
- 魏莹, 郭利川, 张小平, 黄雷, 郑乐怡, 应清界, 吴忠华, 郑伟. 重组酶介导扩增方法快速检测 A 族乙型溶血性链球菌[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2018, 41(5): 314-316,323
- [16] Ministry of Health of the People's Republic of China. National Standard (Mandatory) of the People's Republic of China: National food safety standard Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*. GB 4789.30-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese)
- 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准: 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验 GB 4789.30-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [17] Li F, Ye QH, Chen MT, Xiang XR, Zhang JM, Pang R, Xue L, Wang J, Gu QH, Lei T, et al. Cas12aFDeT: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1151: 338248
- [18] Li F, Ye QH, Chen MT, Zhou BQ, Zhang JM, Pang R, Xue L, Wang J, Zeng HY, Wu S, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 179: 113073