DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260128004
引用格式: 王晓庆, 陈惠, 雷新宇, 等. 重组酶聚合酶扩增-侧流层析技术检测乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 52–59.
WANG XQ, CHEN H, LEI XY, *et al*. Detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products by recombinase polymerase amplification-lateral flow technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 52–59. (in Chinese with English abstract).

重组酶聚合酶扩增-侧流层析技术检测乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌

王晓庆[1,2], 陈　惠[1,2], 雷新宇[1,2], 周红杏[1,2], 陈文璋[1,2], 黄潇宁[1,2], 贺　燕[1,2*]
(1. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙　410117; 2. 湖南省产商品质量检验研究院, 长沙　410117)

摘　要: 目的　以特异性基因 16S rRNA 和溶血素编码基因 *hly* 为靶序列, 建立重组酶聚合酶扩增-侧流层析技术(recombinase polymerase amplification-lateral flow, RPA-LF)检测乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌的方法。**方法**　根据目标序列保守片段设计适用于 RPA-LF 的引物和探针, 筛选最佳引物探针组合, 建立相关检测方法并对其反应条件进行优化。**结果**　RPA-LF 优化条件后, 总反应时间仅为 20 min, 即可用肉眼直观观察到检测结果。该方法与 8 种常见的食源性病原微生物无交叉反应, 具有较好的特异性。能够区分李斯特氏菌同属菌, 表明该方法对李斯特氏菌同属菌具有抗干扰性。最低检出限可达到 82 fg/μL, 菌含量约为 1.8×10^2 CFU/mL, 表明该方法具有较高的灵敏度。此外, 用该方法进行常规样品检测可获得与传统微生物方法一致的检测结果。**结论**　本研究中建立的应用于单核细胞增生李斯特氏菌溶血素基因的 RPA-LF 检测方法, 具有仪器依赖性低、操作简便、灵敏度高、特异性好, 结果直观可视等优点, 为该菌现场的快速检测和筛选诊断提供了一条新的思路。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; 重组酶聚合酶扩增技术; 侧流层析; 快速检测

Detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products by recombinase polymerase amplification-lateral flow technology

WANG Xiao-Qing[1,2], CHEN Hui[1,2], LEI Xin-Yu[1,2], ZHOU Hong-Xing[1,2], CHEN Wen-Zhang[1,2], HUANG Xiao-Ning[1,2], HE Yan[1,2*]
(1. *Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning of Hunan Province*, *Changsha* 410117, *China*; 2. *Hunan Institute of Commodity Quality Inspection*, *Changsha* 410117, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) detection method for the detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products, targeting the species-specific 16S rRNA gene

收稿日期: 2026-01-28
基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2024JJ8265)
第一作者: 王晓庆(1988—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为病原微生物、食品安全检测。E-mail: 410287470@qq.com
***通信作者:** 贺燕(1982—), 女, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全与工艺研发。E-mail: 45023091@163.com

and the hemolysin-encoding gene *hly*. **Methods** Primers and probes suitable for RPA-LF were designed based on the conserved fragments of the target sequence, and the optimal primer-probe combination was selected, the corresponding detection method was established, and its reaction conditions were optimized. **Results** Under optimized conditions, the total reaction time of the RPA-LF assay was only 20 min, and the results could be observed visually by the naked eye. The method showed no cross-reactivity with 8 kinds of common foodborne pathogenic microorganisms, demonstrating good specificity. It could also distinguish *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species, indicating good anti-interference ability against bacteria from the same genus. The limit of detection was as low as 82 fg/μL, corresponding to approximately 1.8×10^2 CFU/mL, demonstrating high sensitivity. Furthermore, when used for routine sample detection, the method yielded results consistent with those obtained by traditional microbiological methods. **Conclusion** The RPA-LF method targeting the hemolysin gene of *Listeria monocytogenes* established in this study has several advantages, including low instrument dependency, simple operation, high sensitivity, good specificity and direct visual readout. It provides a new approach for the rapid on-site detection and screening diagnosis of this pathogen.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenesi*; recombinase polymerase amplification technology; lateral flow; rapid detection

0　引　言

单核细胞增生李斯特菌是一种耐低温、耐酸碱的革兰阳性无芽孢, 需氧兼性厌氧, 对人和其他动物致病的杆菌, 广泛存在于环境中, 包括土壤、腐烂植被和动物肠道[1–4]。它能污染多种食物, 特别是即食食品如软奶酪、冷切肉、烟熏海鲜和未充分清洗的生鲜果蔬[5–6]。通过污染食物如冷藏食品、未消毒乳制品进入人体, 健康人群感染后通常只表现为轻微的胃肠炎症状, 但对于孕妇、老年人和免疫抑制者, 情况则完全不同, 可能导致侵袭性感染, 引发败血症和中枢神经系统感染的神经李斯特菌病, 并伴随极高死亡率和长期后遗症风险[3,7]。孕妇感染尤其危险, 可导致流产、死胎或新生儿感染, 是围产期死亡的重要原因之一。对老年人而言, 神经性李斯特氏菌病的死亡率可高达30%[7]。因此, 建立针对该致病菌的快速、高效的检测方法, 对于保障乳制品等食品安全、预防和控制李斯特菌病的暴发与传播, 具有重要的公共卫生学意义。

目前, 传统微生物分离培养法是该菌检测方法的金标准, 其检测结果真实可靠。然而该方法对检验员的操作要求高, 且完整的检测周期大致需要 4~7 d, 耗时较长, 很难满足乳制品生产、流通及现场筛查等某些特定情况下快速检测的要求。根据李斯特氏菌特异性基因保守序列设计鉴定引物, 建立聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等相关的分子生物学检测技术, 成为该菌检测的重要方法[8]。但是, 由于 PCR 检测方法对仪器设备(如热循环仪)要求较高、操作步骤烦琐、相关试剂价格昂贵且安全性低, 很大程度上限制了该检测方法在现场和基层实验室的推广和应用[9]。因此, 克服传统培养法和 PCR 技术的局限性, 开发一种不依赖复杂仪器、操作简便、快速且灵敏度高的现场检测技术显得尤为迫切。

作为一种新型恒温核酸扩增技术, 重组酶聚合酶核酸扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)反应模式与 PCR 相似, 被誉为 DNA 诊断领域的革命性创新, 也是目前认为唯一可替代 PCR 技术的新型恒温扩增技术[10–11]。不同的是 RPA 不需要初始的高温加热模板变性步骤, 而是利用重组酶与引物形成引物复合物进行特异性位点的识别, 与同源位点互换形成稳定的 D-Loop 结构引物复合物[9]。RPA 反应所需要的三大关键因子是能结合单链核酸(寡核苷酸引物)的重组酶、DNA 单链结合蛋白(single strand binding protein, SSB)和链置换 DNA 聚合酶[12–13]。反应可在 25~45 ℃区间内任一恒定温度条件下, 最短 15 min 便可完成目的片段的特异性指数倍扩增。其扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳、实时荧光定量测定或侧流层析试纸条(lateral flow, LF)等方法进行分析检测[14]。与环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等其他恒温扩增技术相比, RPA 反应时间更短、操作更加简便, 更加适用于现场快速诊断[15]。近年来, 已有研究将 RPA 与侧流层析(lateral flow, LF)试纸条结合, 越来越多地应用于医学诊断和动植物疫病防御方面, 随着研究的深入也逐步延伸至食源性致病菌检测方面[16–19]。然而, 针对单核细胞增生李斯特氏菌, 特别是应用于乳制品基质的高灵敏度、高特异性 RPA-LF 检测方法仍有待优化和完善。

本研究针对单核细胞增生李斯特氏菌, 以 16S rRNA 基因和溶血素编码基因 *hly* 为靶标, 旨在建立一种适用于乳制品检测的 RPA-LF 方法。该方法将恒温扩增的快速性与侧流层析的可视化、便捷性结合, 以期实现对单核细胞

增生李斯特氏菌的仪器依赖性低、操作简便、快速直观的现场检测。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 实验菌株

如表 1, 本研究所涉及的单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、格氏李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、奇异变形菌、阪崎肠杆菌、志贺氏菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌及大肠埃希氏菌均保存于本实验室, 菌株编号及菌种名称等信息见表 1。

1.1.2 试剂与耗材

RPA 恒温荧光检测试剂盒(221005E502E, 安普未来生物科技有限公司); RPA nfo 核酸扩增检测试剂盒(20241126-R, 杭州众测生物科技有限公司): 一次性核酸检测试纸条(240906-S, 杭州众测生物科技有限公司); 细菌基因组提取试剂盒(DP302-02, 天根生化科技有限公司); 营养琼脂、脑心浸出液营养肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂、Luria-Bertani Broth 培养基、李斯特显色琼脂培养基、PALCAM 琼脂培养基(北京陆桥技术有限责任公司); 以上试剂在有效期内使用。

1.1.3 实验样品

本实验所用样品来源于国家/省级食品安全监督抽检计划, 均为市场上随机抽取的流通领域/生产领域的样品。

1.2 仪器与设备

HVA-85 高压灭菌锅(日本平山 Hirayama 公司); MIR-254 培养箱(日本三洋电机株式会社); CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪(美国伯乐 Bio-Rad 公司); Infinite 200 蛋白核酸测定仪(瑞士 TECAN 公司); YCD-EL260 低温冷藏冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 引物的设计与合成

以单核细胞增生李斯特氏菌 16S rRNA 和外膜蛋白溶血素编码特异性基因 *hly* 为目标, 参考 GenBank 中公布的序列并进行比对, 利用软件根据相关原则设计 RPA 特异性引物和探针[20], 设计的引物探针由生工生物工程上海股份有限公司合成。引物序列和修饰方法见表 2。

表 1 本研究所使用的菌株信息

Table 1 Strain information used in this research

菌种编号	菌种名称	拉丁名
ATCC19111	单核细胞增生李斯特氏菌	*Monocytogenes listeria*
ATCC33090	英诺克李斯特氏菌	*Inocua listeria*
ATCC25401	格氏李斯特氏菌	*Grayi listeria*
ATCC25923	金黄色葡萄球菌	*Aureus staphylococcus*
ATCC13076	肠炎沙门氏菌	*Enteritidis salmonella*
ATCC150721	奇异变形菌	*Denitrificans pseudomonas*
ATCC21560	阪崎肠杆菌	*Sakazakii enterobacter*
ATCC12022	福氏志贺氏菌	*Flexneri shigella*
ATCC27853	铜绿假单胞菌	*Aeruginosa pseudomonas*
ATCC21606	粪肠球菌	*Faecalis enterococcus*
ATCC35150	大肠埃希氏菌	*Escherichia coli*
HNZJ250816	单核细胞增生李斯特氏菌	*Monocytogenes listeria*

表 2 本研究中所用的引物及探针

Table 2 Primer pairs and probe used in this study

引物/探针名称	引物/探针序列(5′→3′)	产物长度/bp
RPA-191-F	Biotin-GATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGG	191
1-RPA-191-R	GAATTCGCTTTTACGAGAGCACCTGGATAGG	
RPA-191-P	FAM-CAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGAT-GGAAATGAATATATTGTT	
2-RPA-204-F	Biotin-TAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCAGT	204
2-RPA-204-R	TATGCCACACTTGAGATATATGCAGGAGGAT	
2-RPA-204-P	FAM-CGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAA-GCGCTTGGAGTGAATGCAG	
3-RPA-173-F	Biotin-TTCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACACT	173
3-RPA-173-R	CACTGTAAGCCATTTCGTCATCATAATCAAT	
3-RPA-173-P	FAM-AAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCA-GTAAATACATTAGTGGAAA	
4-RPA-154-F	Biotin-ACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAATGCA	154
4-RPA-154-R	ATATGCCACACTTGAGATATATGCAGGAGGA	
4-RPA-154-P	FAM-GGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAG-CGCTTGGAGTGAATGCAGA	

1.3.2　细菌培养与计数

根据不同细菌的生长特性, 用脑心浸出液肉汤培养基培养阪崎肠杆菌、肠炎沙门氏菌、奇异变型杆菌、粪肠球菌、福氏志贺氏菌, 用胰蛋白胨大豆肉汤培养基培养金黄色葡萄球菌, 用 Luria-Bertani Broth 培养基培养单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、格氏李斯特氏菌, 分别于 37 ℃ 180 r/min 摇床进行培养。分别对培养的菌悬液进行系列稀释, 选取适宜稀释倍数的菌悬液倾注 3 块胰蛋白胨大豆琼脂培养基进行计数, 根据平板上菌落平均值确定各菌悬液的菌浓度。

1.3.3　细菌基因组 DNA 的提取

按照细菌基因组提取试剂盒操作步骤分别提取 1.3.2 中细菌基因组, 提取获得的所有基因组用核酸蛋白分析仪测定其浓度, 置–20 ℃冰箱中保存备用。

1.3.4　RPA 基础试剂盒筛选最佳引物

本研究用单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 基因组模板进行条件摸索, 根据 RPA 实时荧光检测试剂盒的说明书进行实验操作。RPA 扩增体系: 在反应干粉离心管中加入 A 缓冲液 25 μL, 上下游引物各 2 μL, 探针 1 μL, 双蒸水 16.5 μL, DNA 模板 1 μL, 共计 47.5 μL。向检测单元管盖中加入 2.5 μL 醋酸镁溶液, 盖紧管盖上下颠倒混匀, 低速离心 10 s 至反应液于管底。荧光检测程序为: 恒温 37 ℃, 每 30 s 采集一次 FAM (荧光素亚磷酰胺, fluorescein amidite) 通道荧光值, 共 40 个循环。

1.3.5　RPA-LF 实验步骤

按照 RPA nfo 核酸扩增试剂盒和一次性核酸检测试纸条的说明书进行实验。RPA nfo 扩增体系如下: A 缓冲液 25 μL, 上游引物 Bio-3-RPA-173-F 和下游引物 3-RPA-173-R 2 μL, 探针 1 μL, 双蒸水 16.5 μL, DNA 模板 1 μL, 共计 47.5 μL。向检测单元管盖中加入 2.5 μL 醋酸镁溶液, 盖紧管盖上下颠倒混匀后低速离心 10 s。将反应管置于恒温 37 ℃水浴锅中孵育 30 min 后, 取出置于冰盒上。吸取吸收 20 μL 扩增反应液加入到 180 μL 缓冲液的离心管中, 涡旋混匀, 之后将层析试纸条的样品垫端插入试液中, 30 min 内观察试纸条条带的变化。

1.3.6　最佳反应时间和温度的筛选

同一引物和探针组合, 在不同反应时间和反应温度组合条件下, 扩增结果有着明显的差异。本研究以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 基因组为模板, 质量浓度用双蒸水调至 1 ng/μL, 按照 1.3.5 实验步骤进行实验。根据预实验结果选择 37 ℃为反应温度, 梯度设置反应时间: 5、10、15、20、25 min, 按照上述实验步骤选择最佳反应时间。

同样, 在最优反应时间条件下梯度设置反应温度: 30、32、35、37、39、42、45 ℃。其余步骤同上, 以此确定最佳反应温度。

1.3.7　RPA-LF 检测方法特异性的测定

在最佳反应条件下, 选择单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 作为阳性对照, 同时提取金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、阪崎肠杆菌、奇异变形菌、铜绿假单胞菌、志贺氏菌、粪肠球菌及大肠埃希氏菌等 8 种常见的食源性致病微生物基因组, 按照 1.3.5 检测方法分别扩增检测, 确定 RPA-LF 的特异性。

1.3.8　RPA-LF 检测李斯特氏菌属细菌

分别提取与单核细胞增生李斯特氏菌同属的英诺克李斯特氏菌 ATCC33090、格氏李斯特氏菌 ATCC25401 的基因组 DNA, 选择单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 作为阳性对照, 统一调整基因组 DNA 的质量浓度为 1 ng/μL, 按照上 1.3.5 检测方法分别扩增检测, 判断 RPA-LF 的同属菌特异性反应。

1.3.9　RPA-LF 检测方法灵敏度

将经过过夜培养的单核细胞增生李斯特氏菌菌悬液调节至吸光度 600 nm (OD_{600})时为 1.0 时, 吸取 1 mL 倍比稀释进行显色平板计数, 同时另取 1 mL 菌液按 1.3.3 提取基因组, 最后核酸蛋白分析仪测量基因组浓度。重复检测 4 次, 根据数据确定菌悬液细菌量与试剂盒提取基因组量的对应关系, 进而确定 RPA-LF 的最低检出限。

1.3.10　实际样品检测

本研究通过人工制备单增李斯特菌污染巴氏灭菌乳、调制乳、发酵乳、奶粉、冰淇淋、乳清蛋白等 6 种不同类别的空白乳制品, 充分混匀后后提取基因组 DNA, 并调整基因组 DNA 的质量浓度为 1 ng/μL, 以单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 基因组为阳性对照, 在最佳反应条件下, 进行 RPA-LF 扩增反应。同时采用传统微生物检测方法进行对照, 评估该方法检测实际样本的准确度。

1.4　数据处理

本研究中的所有关键实验, 包括引物筛选、特异性、灵敏度及实际样品检测, 均设置 3 次及以上独立重复实验以确保结果的可靠性。相关实验数据采用 Microsoft Excel 2021 软件进行整理、计算, 并计算平均值。实际样品检测结果与传统微生物学方法的结果进行符合性比对, 以评估所建立方法的准确性。

2　结果与分析

2.1　RPA 最佳引物的选择

单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 DNA 为模板, 分别运用表 2 中 4 对引物进行实时荧光 RPA 扩增反应。如图 1 所示, 引物对 3-RPA-173-F/R/P 进行 RPA 反应, 可获得特异性的单一扩增曲线(图 1)。重复检测 3 次均取得一致性结果, 表明该对引物对的扩增效率较高、特异性均较好。因此, 选择该引物对和探针进行后续 RPA-LF 实验。

2.2　RPA-LF 检测方法的建立

结合 RPA-LF 反应体系, 采用引物对 3-RPA-173-F/R/P

对单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 基因组进行扩增反应，反应产物通过层流侧吸试纸条进行检测，T线可出现清晰的条带，其中模板的菌液浓度为 1.8×10^8 CFU/mL，重复检测 3 次均取得一致性结果，结果表明该方法可以特异地检测单核细胞增生李斯特氏菌[9](图 2)。

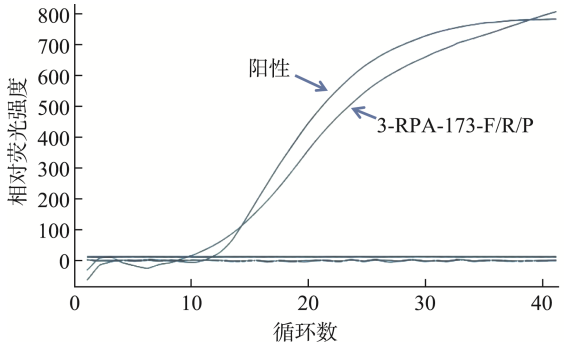
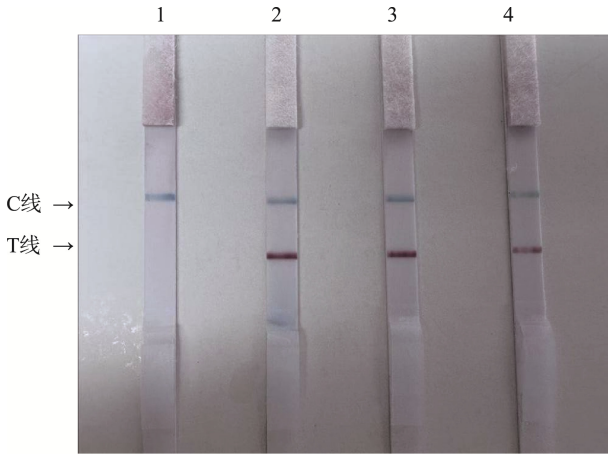


图 1 不同引物的 RPA-LF 扩增结果

Fig.1 Amplification results of RPA-LF with different primers



注: 1. 空白对照; 2. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111; 3. HNZJ250816 单核细胞增生李斯特氏菌; 4. 阳性对照。

图 2 单核细胞增生李斯特氏菌 RPA-LF 检测方法的建立

Fig.2 Establishment of RPA-LF detection method for *Listeria monocytogenes*

2.3 RPA-LF 最佳反应时间的选择

根据预实验结果选择 37 ℃为反应温度，分别选择 5、10、15、20、25 min 共 5 个梯度反应时间进行 RPA-LF 扩增反应。结果见图 3，当反应时间为 15 min 时，侧流层析试纸条上可观察到清晰的 T 线，延长反应时间 T 线并没有发生显著的变化，重复检测 3 次均取得一致性结果。因此，选择 15 min 为最佳反应时间进行后续的实验。

2.4 RPA-LF 最佳反应温度的选择

最佳反应温度的筛选结果见图 4 显示，反应时间为 15 min 时，选择在 30 ℃到 45 ℃之间进行反应，试纸条均可观察到清晰的 T 线，重复检测 3 次均取得一致性结果。整体分析随温度梯度变化观察到条带的现象和现场检测的需求，选择 37 ℃为最佳反应温度。

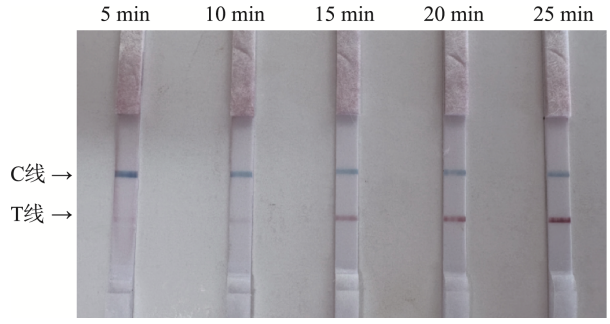


图 3 RPA-LF 最佳反应时间的筛选

Fig.3 Screening of the optimal response time for RPA-LF

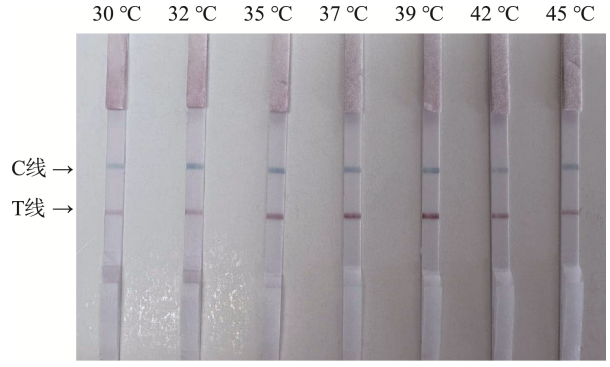
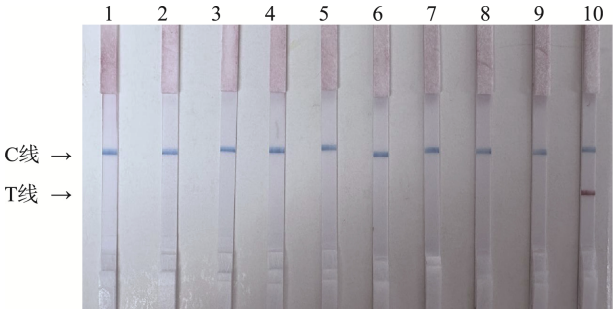


图 4 RPA-LF 最佳反应温度的筛选

Fig.4 Screening of the optimal reaction temperature for RPA-LF

2.5 RPA-LF 特异性的测定

最佳反应条件下，分别选取双蒸水为阴性对照和单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 作为阴、阳性对照，提取金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、阪崎肠杆菌、奇异变形菌、铜绿假单胞菌、志贺氏菌、粪肠球菌及大肠埃希氏菌等常见的 8 种食源性致病微生物基因组，统一调整其基因组质量浓度为 1 ng/μL 进行 RPA-LF 特异性实验[8,19]。实验结果见图 5 显示，除阳性对照出现明显的 T 线，阴性对照和其他反应均为观察到明显 T 线，重复检测 3 次均取得一致性结果。结果表明该 RPA-LF 检测方法具有较好的特异性。



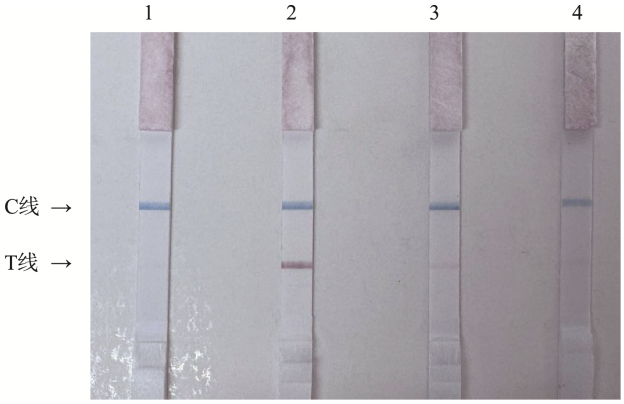
注: 1. 无菌水; 2~10 分别为金黄色葡萄球菌 ATCC25923、沙门氏菌 ATCC13076、奇异变形菌 ATCC150721、阪崎肠杆菌 ATCC22560、福氏志贺氏菌 ATCC12022、铜绿假单胞菌 ATCC27853、粪肠球菌 ATCC21606、大肠埃希氏菌 ATCC35150、单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19111 基因组的 RPA-LF 结果。

图 5 RPA-LF 的特异性实验

Fig.5 Specificity experiment of RPA-LF

2.6　RPA-LF 与同属其他菌交叉反应的测定

图 6 结果为以单核细胞增生李斯特氏菌同属菌包括英诺克李斯特氏菌、格氏李斯特氏菌的基因组 DNA 为模板时, 本研究中所建立的 RPA-LF 方法仅阳性对照的试纸条有明显的 T 线出现, 其余试纸条皆未有 T 线出现, 重复检测 3 次均取得一致性结果。以上结果表明, 所建立的 RPA-LF 方法对李斯特氏菌同属菌均具有良好的特异性。



注: 1. 阴性对照; 2. 单核细胞增生李斯特氏菌; 3. 英诺克李斯特氏菌; 4. 格氏李斯特氏菌。

图 6　RPA-LF 的抗干扰性测定结果

Fig.6　Determination results of the anti-interference ability of RPA-LF

2.7　RPA-LF 灵敏度的测定

吸取 OD_{600} 为 1.0 单核细胞增生李斯特氏菌菌悬液 1 mL 提取基因组, 用双蒸水梯度稀释后, 在最佳反应温度 37 ℃、最佳反应时间 15 min 条件下进行 RPA-LF 的敏感性实验, 结果(图 7)显示。根据 1.3.2 的数据结果, 单核细胞增生李斯特氏菌液浓度 OD_{600} 为 1.0 时, 细菌浓度为 1.8×10^8 CFU/ mL, 提取到的基因组经核酸蛋白仪检测, 质量浓度分别为 82.7、81.4、81.9、82.8 ng/uL。当基因组稀释至浓度为 8.2×10^1 pg 时, 可观察到明显的 T 线, 而继续稀释便无法观察到明显的条带, 重复检测 3 次均取得一致性结果, 表明本研究中建立的 RPA-LF 对基因组的灵敏度可低至 8.2×10^1 pg。细菌量与试剂盒提取基因组量的对应关系[21], 计算得到 8.2×10^1 pg 基因组对应的单核细胞增生李斯特氏菌量约 1.8×10^2 CFU。

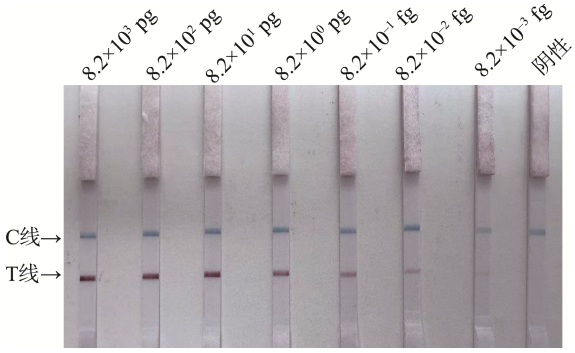
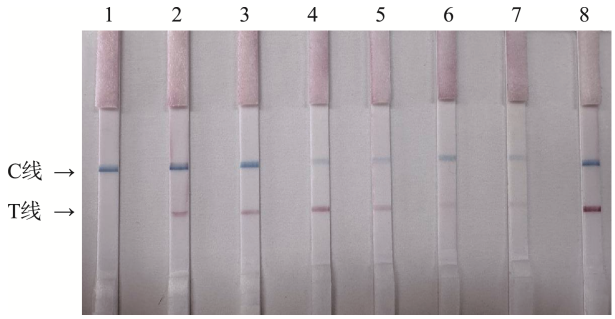


图 7　RPA-LF 灵敏度实验

Fig.7　Sensitivity experiment of RPA-LF

2.8　实际样本应用结果

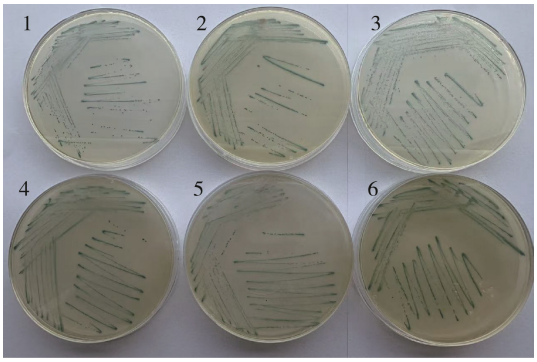
结果显示, 在不同乳制品样品基质存在的情况下, 建立的 RPA-LF 对单增李斯特菌的检测结果(图 8~10)与传统微生物方法是一致的, 表明本方法 RPA-LF 的检测结果对实际样本的检测结果是可靠的。



注: 1. 阴性对照; 2. 巴氏灭菌乳; 3. 调制乳; 4. 发酵乳; 5. 奶粉; 6. 冰淇淋; 7. 乳清蛋白; 8. 阳性对照。

图 8　RPA-LF 检测模拟样本

Fig.8　Analogy samples test of RPA-LF



注: 1. 巴氏灭菌乳; 2. 调制乳; 3. 发酵乳; 4. 奶粉; 5. 冰淇淋; 6. 乳清蛋白, 下同。

图 9　实际样本在李斯特显色平板上的现象

Fig.9　Phenomenon of the actual sample on the Liszt chromogenic plate

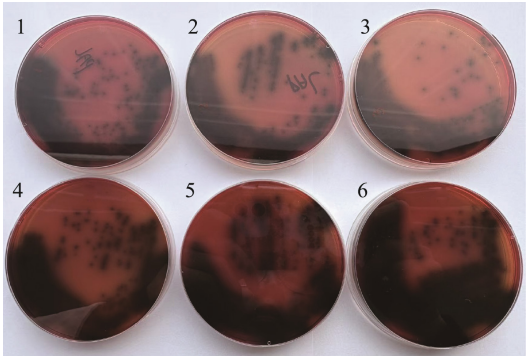


图 10　模拟样品在 PALCAM 平板上的现象

Fig.10　Phenomenon of the simulate sample on the PALCAM plate

3 讨论与结论

单核细胞增生李斯特氏菌是威胁食品安全，特别是冷藏乳制品安全的重要病原体之一[22]。传统的分离培养法虽准确，但周期过长(4~7 d)，难以满足现场快速筛查的需求。以 PCR 为代表的分子生物学技术虽缩短了检测时间，但其对精密仪器、专业操作和实验室环境的依赖，限制了其在基层和现场的应用[23]。因此，开发一种快速、简便、不依赖复杂设备的现场检测方法具有重要的实际意义。

本研究以 16S rRNA 基因和溶血素(*hly*)基因为靶点的特异性引物与探针，将 RPA 的恒温、快速扩增优势与 LF 的直观可视化检测相结合，建立了一种适用于乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌的 RPA-LF 检测方法。本方法在 30~45 °C 的宽泛温度范围内(最优为 37 °C)均能有效工作，总反应时间仅需 20 min(含 15 min 扩增与 5 min 层析检测)，通过肉眼观察获得结果，极大地降低了对仪器设备的依赖和操作复杂度[10–12]。与 8 种常见食源性致病菌(包括金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠埃希氏菌等)无交叉反应，并且能够有效区分同属的李斯特菌(如英诺克李斯特氏菌、格氏李斯特氏菌)，该方法具有很好的特异性[16–17]。在灵敏度方面，本方法对基因组 DNA 的检出限可达 8.2×10^{1} pg fg/μL，对应菌液浓度约为 1.8×10^{2} CFU/mL。此灵敏度与 DU 等[17]报道的 RPA-LF 方法相当。值得注意的是，本研究建立的检测方法在复杂乳制品基质中表现出良好的稳定性，这与近期基于侧流层析试纸条技术在水产品病害检测中的应用策略具有相似性，均体现了 RPA-LF 技术在现场快速检测中的基质适应性优势[24]。本研究还进一步在利用乳制品基质中进行了模拟样品验证，在模拟污染的实际乳制品样本(包括巴氏灭菌乳、调制乳、发酵乳、奶粉等)检测中，本方法的检测结果与传统微生物培养法的结果一致，证明了其在复杂食品基质中检测的可靠性与准确性[25–27]。

近年来我国及国际李斯特菌病流行病学及乳制品污染状况研究显示，中美两国近年来的监测数据均表明，软质奶酪等乳制品是李斯特菌病暴发的重要溯源对象，这对我国冷链乳制品的风险管控具有重要启示意义[28]。我国部分地区的流行病学调查也显示，该菌在即食食品及生鲜乳中存在一定污染水平[28–30]，本方法的建立，有效弥补了传统培养法耗时长、PCR 法设备要求高的缺陷。与另一种常见的恒温扩增技术 LAMP 相比，RPA 的反应体系更简单、时间更短，且探针设计使其特异性更容易控制。该方法不依赖昂贵复杂的实验室相关仪器设备，操作简便、反应迅速，结果直观。RPA-LF 技术为乳制品生产源头、流通环节及基层监管部门的现场快速筛查单核细胞增生李斯特氏菌的提供了一种全新的、切实可行、强有力的技术参考，并为后续开发商业化快检试剂盒奠定了坚实的理论基础[31]。

参考文献

[1] BREHM-STECHER BF, HYLDIG-NIELSEN JJ, JOHNSON EA. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus *Listeria* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5451–5457.

[2] VAZQUEZ-BOLAND JA, KUHN M, BERCHE P, *et al*. *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584–640.

[3] KUHN M, GOEBEL W. Internalization of *Listeria monocytogenes* by nonprofessional and professional phagocytes [J]. Sub-cellular Biochemistry, 2000, 33: 411–436.

[4] COSSART P, VICENTE MF, MENGAUD J, *et al*. *Listeriolysin* O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation [J]. Infection and Immunity, 1989, 57(11): 3629–3636.

[5] PALACIOS A, OTTO M, FLAHERTY E, *et al*. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to fresh, soft hispanic-style cheese: United States, 2021 [J]. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2022, 71(21): 709–712.

[6] WANG H, LUO L, ZHANG ZD, *et al*. Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases [J]. Frontiers of Medicine, 2018, 12(1): 104–112.

[7] FAN ZL, XIE J, LI Y, *et al*. *Listeriosis* in China's mainland: A systematic review [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2019, 81: 17–24.

[8] NAIR MM, VENKITANATAYANAN KS. Cloning and sequencing of the ompAgene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2539–2546.

[9] XIAO YR, REN HL, WANG H, *et al*. A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas12a system [J]. Talanta, 2023, 259: 124558.

[10] DAHER RK, GALE S, MAURICE B, *et al*. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7): 947–958.

[11] LI J, MACDONALD J, VONSTETTEN F. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. The Analyst, 2018, 144(1): 31–67.

[12] 孙魁, 邢微微, 徐东刚. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 军事医学, 2015, 39(10): 802–804.
SUN K, XING WW, XU DG. Research progress of recombinase polymerase amplification technology [J]. Military Medicine, 2015, 39(10): 802–804.

[13] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 6: 627–634.
GAO WF, ZHU P, HUANG HL. Recombinase polymerase amplification technology: A new nucleic acid amplification strategy [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 6: 627–634.

[14] POSTHUMA-TRUMPIE GA, KORF J, AMERONGEN AV. Lateral flow (immuno) assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(2):

569–582.

[15] KROLOV K, FROLOVA J, TUDORAN O, *et al*. Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatisby* recombinase polymerase amplification directly from urine samples [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2014, 16(1): 127–135.

[16] CHEN J, WANG YY, LU XQ, *et al*. Development of propidium monoazide-recombinase polymerase amplification PMA-RPA assay for rapid detection of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* [J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 41: 32–38.

[17] DU XJ, ZANG YX, LU HB, *et al*. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for *Listeria monocytogenes* detection in food [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(4): 1041–1047.

[18] JAROENRAM W, KIATPATHOMCHAI W, FLEGEL TW. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. Molecular & Cellular Probes, 2009, 232: 65–70.

[19] CHEN K, MA B, LI JL, *et al*. A rapid and sensitive europium nanoparticle-based lateral flow immunoassay combined with recombinase polymerase amplification for simultaneous detection of three food-borne pathogens [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(9): 4574.

[20] HEALY B, COONEY S, O'BRIEN S, *et al*. Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7(4): 339–350.

[21] GAOH SD, KWEON O, AHN Y. Propidium monoazide (PMAxx) -recombinase polymerase amplification exo (RPA exo) assay for rapid detection of *Burkholderia* cepacian complex in chlorhexidine gluconate (CHX) and benzalkonium chloride (BZK) solutions [J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1401.

[22] WU WW, BAI L, FU P, *et al*. The epidemiology of *Listeria monocytogenesin* China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(8): 459–466.

[23] YANG YJ, KONG XX, YANG JL, *et al*. Rapid nucleic acid detection of *Listeria monocytogenes* based on RAA-CRISPR Cas12a system [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(6): 3477.

[24] ZHANG TM, LIU X, YANG XH, *et al*. Rapid on-site detection method for white spot syndrome virus using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow test strip technology [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 889775.

[25] 张海洋, 刘爽, 戚雪芹, 等. 单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(8): 962–969.
ZHANG HY, LIU S, QI XQ, *et al*. Preparation of monoclonal antibodies against *Listeria monocytogenes* and establishment of a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *L. monocytogenes* [J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(8): 962–969.

[26] ETTY MC, D'AURIA S, SHANKAR S, *et al*. New immobilization method of anti-*PepD* monoclonal antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* p60 protein-Part A: Optimization of a crosslinked film support based on chitosan and cellulose nanocrystals (CNC) [J]. Reactive and Functional Polymers, 2020, 146: 104313.

[27] CHURCHILL RL, LEE H, HALL JC. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(2): 141–170.

[28] 张智芳, 刘雪杰, 吴生根, 等. 中美李斯特菌病流行特点和食品溯源及对我国的启示[J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(7): 636–643.
ZHANG ZF, LIU XJ, WU SG, *et al*. Epidemic characteristics and food traceability of listeriosis in China, and the United States, and implications for China [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2024, 40(7): 636–643.

[29] 赵梦迪. 单核细胞增生李斯特菌*ActA*单抗竞争ELISA试剂盒的研制及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
ZHAO MD. Development and preliminary application of the *Listeria monocytogenesc* ELISA kit based on *ActA* monoclonal antibody [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022.

[30] 李焙笑. 基于CRISPR/Cas13a及RPA单增李斯特菌检测方法的建立和应用[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
LI HX. Development and application of the CRISPR/Cas13a and RPA-based methods for detection of *Listeria monocytogenes* [D]. Changchun: Jilin University, 2021.

[31] 亢春雨. 食源性单核增生性李斯特氏菌的分布、遗传多态性及其毒理机制研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
KANG CY. Distribution, genetic diversity and toxicological mechanism of foodborne *Listeria monocytogenes* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015.

(责任编辑: 曹岱琳　安香玉)