周宝青, 毛旭东, 聂翔, 等. 基于新型分子靶标的 LAMP 可视化技术检测新鲜鱼肉中的黄杆菌 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 357−366. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040276

ZHOU Baoqing, MAO Xudong, NIE Xiang, et al. Detection of *Flavobacterium* spp. in Fresh Fish Meat Using a LAMP Visualization Technique Based on Novel Molecular Targets[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 357−366. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040276

· 分析检测 ·

基于新型分子靶标的 LAMP 可视化技术检测新鲜鱼肉中的黄杆菌

周宝青[1,2,3], 毛旭东[1,+], 聂　翔[1], 朱应飞[1], 范宏伟[1], 熊文启[4], 吴　鑫[1,*], 马冰峰[1,*]

（1.江西省检验检测认证总院, 江西南昌 330052;
2.南昌大学食品学院, 江西南昌 330047;
3.南昌市食品快速检测重点实验室, 江西南昌 330200;
4.香港都会大学科技学院, 香港 999077）

摘　要: 本研究致力于开发一种基于新型分子靶标的环介导等温扩增（Loop-mediated Isothermal Amplification，LAMP）可视化技术，旨在实现新鲜鱼肉中黄杆菌的同时、快速、灵敏检测。利用全基因测序和泛基因组分析技术系统挖掘黄杆菌属候选分子靶标，通过 5 株黄杆菌和 44 株非黄杆菌对候选靶标进行特异性验证。基于靶标序列设计 LAMP 引物，优化 LAMP 扩增体系，并对新型 LAMP 及 LAMP 横向流动试纸条（Lateral Flow Dipstick，LFD）可视化方法进行特异性、灵敏度评价，最后测定其抗干扰能力及在实际样本检测中的准确性。结果显示本研究挖掘的 *menB* 靶标具有良好的特异性，在最佳条件下，LAMP 方法针对 12 株非目标菌无交叉反应，在黄杆菌纯培养物和混合加标鱼肉中的检测限分别为 3.3×10^2 CFU/mL 和 3.3×10^3 CFU/g。同时，LAMP 可视化技术在纯培养物和混合加标鱼肉样本中检测灵敏度和特异性与传统 LAMP 方法相当，且在高浓度杂菌和腐败鱼肉样本干扰下，仍保持优异的检测性能。对 24 份实际样品检测，LAMP-LFD 可视化方法检测结果与传统培养法一致。本研究建立的新型 LAMP 可视化检测技术，为食品中黄杆菌污染防控提供了一种高效、可靠的检测手段，具有重要的应用价值和推广前景。

关键词: 黄杆菌, 分子靶标, 环介导等温扩增（LAMP）, 横向流动试纸条（LFD）, 快速检测

中图分类号: TS207.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0357−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040276　　本文网刊:

Detection of *Flavobacterium* spp. in Fresh Fish Meat Using a LAMP Visualization Technique Based on Novel Molecular Targets

ZHOU Baoqing[1,2,3], MAO Xudong[1,+], NIE Xiang[1], ZHU Yingfei[1], FAN Hongwei[1], XIONG Wenqi[4], WU Xin[1,*], MA Bingfeng[1,*]

（1.Jiangxi Provincial General Institute of Testing and Certification, Nanchang 330052, China;
2.School of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
3.Nanchang Key Laboratory of Food Rapid Testing, Nanchang 330200, China;
4.School of Science and Technology, Hong Kong Metropolitan University, Hong Kong 999077, China）

Abstract: This study was dedicated to developing a visualization technique based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with novel molecular targets, aiming to simultaneously, rapidly, and sensitively detect *Flavobacterium* spp. in fresh fish meat. The whole-genome sequencing and pan-genome analysis techniques were employed

收稿日期: 2025−04−22　　+并列第一作者

基金项目: 江西省自然科学基金（20242BAB20333）; 江西省市场监督管理局科研项目（GSJK202401）; 江西省检验检测认证总院项目（ZYK202403）。

作者简介: 周宝青（1992−）, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: bqnxzhou@163.com。
毛旭东（1997−）, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 环境科学与质量安全, E-mail: maoxudong_ustb@163.com。

*** 通信作者:** 吴鑫（1981−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 33391197@qq.com。
马冰峰（1968−）, 女, 硕士, 正高级工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 569211446@qq.com。

to systematically mine the candidate target of the *Flavobacterium* genus. Five *Flavobacterium* strains and forty-four non-*Flavobacterium* strains were prepared for specificity verification of candidate target. LAMP primers were designed based on the target sequence and then the amplification system was optimized. The specificity and sensitivity of novel LAMP assay and LAMP based lateral flow dipstick (LFD) visualization method were evaluated. Finally, the anti-interference capability and the accuracy in detecting actual samples were determined. These results showed that the *menB* target mined in this study exhibited good specificity, and the newly established LAMP method had no cross-reactivity against 12 non-target bacteria trains in optimal conditions. The detection limits for *Flavobacterium* in pure cultures and mixed spiked fish meat samples were 3.3×10^2 CFU/mL and 3.3×10^3 CFU/g, respectively. Meanwhile, the detection sensitivity and specificity of LAMP-based visualization technique in pure cultures and mixed spiked fish meat samples were comparable to those of the traditional LAMP method. Moreover, it maintained excellent detection performance even under the interference of high concentrations of contaminant bacteria and spoiled fish sample. The detection results of the LAMP-LFD visualization methods for 24 actual samples were consistent with those of the traditional culture method. The novel LAMP visualization technology established in this study provides an efficient and reliable detection method for the prevention and control of *Flavobacterium* contamination in food, which has important application value and promotion prospects.

Key words: *Flavobacterium*; molecular target; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); lateral flow dipstick (LFD); rapid detection

黄杆菌（*Flavobacterium*）隶属于黄杆菌科（Flavobacteriaceae），是一类革兰氏阴性杆菌，菌体呈长弯状、无动力、无芽孢、无荚膜[1−2]，常见黄杆菌有柱状黄杆菌（*Flavobacterium columnare*）、嗜冷黄杆菌（*Flavobacterium psychrophilum*）、水生黄杆菌（*Flavobacterium hydatis*）、嗜盐黄杆菌（*Flavobacterium halmephilum*）等[3−4]。黄杆菌在自然环境如水体、土壤、食品等中广泛分布，作为食品中腐败优势菌群，嗜盐黄杆菌、嗜冷黄杆菌等在低温和高盐环境中仍具备较强生存能力，可在鱼肉表面或内部快速繁殖，通过分泌蛋白酶、脂肪酶等代谢酶类降解鱼肉中的蛋白质与脂肪，产生胺类、硫化物等异味物质，引发鱼肉腐败现象，对新鲜鱼肉及其制品等造成显著污染[5−9]。据统计，我国的肉类和水产品腐败率高达 10%~15%，给社会经济造成巨大损失[10]。在水环境中，嗜冷黄杆菌、柱状黄杆菌是鱼类主要致病菌，感染后会导致鱼类体表脓肿或肌肉溃疡、烂鳃等，严重时可造成急性死亡[11]。有研究表明，脑膜脓毒性黄杆菌等可引发人类感染，导致呕吐、腹胀甚至脑膜炎、败血症等[12−13]，耐药实验发现，分离出的黄杆菌表现出多重耐药性[14−16]。黄杆菌引发的危害通常并非单一菌种单独作用所致，而是多种黄杆菌协同作用的结果[17−18]。因此，从属水平对多种黄杆菌进行精准检测，防范其潜在污染风险至关重要。

传统分离培养法作为微生物检测的经典方法，虽被视为“金标准”，但存在检测周期长、操作流程复杂、劳动强度大等显著局限性[19]。随着分子生物学的发展，以聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）为主的分子检测方法凭借快速、准确、操作简便等优势，逐步成为主流检测方法[20]。然而，PCR 方法依赖专业的热循环扩增仪，检测门槛较高，难以满足基层检测需求[21]。环介导等温扩增技术（Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP），是一种对专业设备依赖程度低、高灵敏度的核酸扩增方法，可在短时间（60 min 内）、恒温（60 ℃）条件下实现 10^9~10^{10} 倍的扩增[22−23]。普通 LAMP 方法通过开盖和凝胶电泳进行分析，易造成实验环境的气溶胶污染。为降低实验过程交叉污染风险，陈雨珊等[24]建立了 LAMP 荧光可视化方法快速检测肺炎克雷伯菌，大大减少了分析过程中的交叉污染，在不富集的条件下灵敏度达到 1.5 ng/μL。为了进一步提高 LAMP 方法准确性和适应性，Wachiralurpan 等[25]设计了 biotin 和 FITC 标记引物，成功建立了一种 LAMP 试纸条（Lateral Flow Dipstick, LFD）平台，该方法在纯培养中检测限为 2.82 CFU/mL。基于 LAMP 和试纸条平台的检测方法，在黄杆菌快速、灵敏、精准鉴定中展现出显著的应用潜力。高特异性检测靶标的选择直接决定了分子检测方法的灵敏度和准确性。然而，现有靶标筛选大多通过特定毒力基因序列的比对获取，如针对嗜冷黄杆菌的相关毒力基因 *parE*、*rpoc*[26−27]、针对柱状黄杆菌的毒力基因 *cacL*[28] 等，这种比对方式存在比对效率和准确性较低的问题，并且由于基因突变或基因表达缺失，不含毒力基因的阳性细菌易造成漏检。其次，现有靶标仅可在种水平上检测少数种黄杆菌，难以实现属水平上的同时检测。随着黄杆菌新种不断被鉴定，基于现有特异性靶标难以满足精准检测的需求。因此，挖掘新型特异性靶标，并构建低门槛分析检测技术用于黄杆菌属快速、精确定量具有重要意义。

本研究应用全基因测序和泛基因组分析技术系统挖掘黄杆菌属特异性分子检测靶标，并建立 LAMP-LFD 可视化检测体系，旨在实现食品中黄杆菌属的快速、精准检测，为食品中黄杆菌污染防控提供新技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

营养肉汤、R2A 培养基　广东环凯微生物科技有限公司；Bst2.0 WarmStart® DNA 聚合酶　新西

兰 Biolabs 公司; 上样缓冲液、2×PCR mix、硫酸镁溶液、等温扩增缓冲液、甜菜碱、琼脂糖、核酸染料、DNA 提取试剂盒　北京索莱宝公司; 氯化钠、无水乙醇　分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 抗 FITC 抗体、抗生物素抗体、羊抗鼠 IgG 抗体　北京博奥森生物技术有限公司; NC 膜、样品垫、结合垫、吸水纸、底板　上海杰一生物技术有限公司; 新鲜鱼肉　当地水产市场; 实验所用菌株信息详见表 1。

Biometra TOne 96G 热循环仪　德国耶拿分析仪器股份公司; Tanon-2500 凝胶成像系统　上海天

表 1　实验用菌株信息

Table 1　Bacterial strains for experiment

序号	菌株名称	拉丁学名	菌株编号	来源
1	沙上黄杆菌	*Flavobacterium sasangense*	A4-1	实验室分离株
2	柱状黄杆菌	*Flavobacterium columnare*	ATCC 23463	美国菌种保藏中心
3	约氏黄杆菌	*Flavobacteriumjohnsoniae*	ATCC 17061	美国菌种保藏中心
4	水生黄杆菌	*Flavobacterium hydatis*	ATCC 29551	美国菌种保藏中心
5	水栖黄杆菌	*Flavobacterium aquatile*	ATCC 11947	美国菌种保藏中心
6	卡氏变形杆菌	*Proteus cibarius*	/	实验室分离株
7	卡氏变形杆菌	*Proteus cibarius*	/	实验室分离株
8	彭氏变形杆菌	*Proteus penneri*	/	实验室分离株
9	宋内氏志贺氏菌	*Shigella sonnei*	/	实验室分离株
10	奇异变形杆菌	*Proteus mirabilis*	/	实验室分离株
11	普通变形杆菌	*Proteus vulgaris*	/	实验室分离株
12	铜绿假单胞菌	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 27853	美国菌种保藏中心
13	铜绿假单胞菌	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 10104	美国菌种保藏中心
14	大肠杆菌	*Escherichia coli*	CMCC 44103	中国医学菌种保藏中心
15	奇异变形杆菌	*Proteus mirabilis*	CMCC 49005	中国医学菌种保藏中心
16	普通变形杆菌	*Proteus vulgaris*	CMCC 49027	中国医学菌种保藏中心
17	单核细胞增生李斯特氏菌	*Listeria monocytogenes*	ATCC 19114	美国菌种保藏中心
18	副溶血性弧菌	*Vibrio parahemolyticus*	ATCC 33847	美国菌种保藏中心
19	铜绿假单胞菌	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 15442	美国菌种保藏中心
20	大肠杆菌	*Escherichia coli*	ATCC 8739	美国菌种保藏中心
21	肠炎沙门氏菌	*Salmonella enteritidis*	CMCC 50335	中国医学菌种保藏中心
22	蜡样芽胞杆菌	*Bacillus cereus*	ATCC 14579	美国菌种保藏中心
23	空肠弯曲菌	*Campylobacter jejuni*	ATCC 6633	美国菌种保藏中心
24	金黄色葡萄球菌	*Staphylococcus aureus*	ATCC 25923	美国菌种保藏中心
25	气囊水栖菌	*Enhydrobacter aerosaccus*	/	实验室分离株
26	水生鞘氨醇单胞菌	*Sphingomonas aquatilis*	/	实验室分离株
27	小肠结肠炎耶尔森氏菌	*Yersinia enterocolitica*	CMCC 52204	中国医学菌种保藏中心
28	阪崎克罗诺杆菌	*Cronobacter sakazakii*	ATCC 29544	美国菌种保藏中心
29	枯草芽孢杆菌	*Bacillus subtilis*	/	实验室分离株
30	苏云金芽孢杆菌	*Bacillus thuringiensis*	/	实验室分离株
31	黄奈瑟菌	*Neisseria flava*	/	实验室分离株
32	黏质沙雷菌	*Serratia marcescens*	/	实验室分离株
33	鲁氏不动杆菌	*Acinetobacter lwoffii*	/	实验室分离株
34	桂林不动杆菌	*Acinetobacter guillouiae*	/	实验室分离株
35	约氏不动杆菌	*Acinetobacter johnsonii*	/	实验室分离株
36	放线杆菌	*Actinobacteria bacterium*	/	实验室分离株
37	空气芽孢杆菌	*Bacillus aerius*	/	实验室分离株
38	黄海芽孢杆菌	*Bacillus marisflavi*	/	实验室分离株
39	新疆奇异球菌	*Deinococcus xinjiangensis*	/	实验室分离株
40	希氏肠球菌	*Enterococcus hirae*	/	实验室分离株
41	印度外生杆菌	*Exiguobacterium indicum*	/	实验室分离株
42	奇异假芽孢杆菌	*Fictibacillus barbaricus*	/	实验室分离株
43	产酸克雷伯菌	*Klebsiella oxytoca*	/	实验室分离株
44	肺炎克雷伯氏菌	*Klebsiella pneumoniae*	/	实验室分离株
45	地衣雷氏菌	*Leifsonia lichenia*	/	实验室分离株
46	弗氏志贺菌	*Shigella flexneri 2a*	/	实验室分离株
47	印度温泉杆菌	*Calidifontibacter indicus*	/	实验室分离株
48	溶酪大球菌	*Macrococcus caseolyticus*	/	实验室分离株
49	水生鞘氨醇单胞菌	*Sphingomonas aquatilis*	/	实验室分离株

能科技有限公司；PowerPac Basic 电泳仪　美国 Bio-Rad 公司；HK-C2S 垂直洁净工作台、WBK-4B 电热恒温水浴锅、SHP-250 生化培养箱　广东环凯微生物科技有限公司；Milli-Q 超纯水系统　美国 Milli pore 公司；Pulsifier II 脉冲式均质器　英国 Microgen 公司；ES-215 高压灭菌器　日本 Tomy Digital Biology 公司；FICI-S1 比色读取仪　杭州丰航生物科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　黄杆菌属分子靶标挖掘及引物设计　从 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome）官网下载 271 株黄杆菌（包含 43 个黄杆菌种）和 40 株其他常见食源性病原菌（包括：金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌、铜绿假单胞菌等）的全基因组数据，利用泛基因组分析筛选分子检测靶标。如图 1A，基本流程包括：使用 Prokka v1.11 对所有基因组序列进行批量注释，构建泛基因组分析数据库，然后利用 Roary v3.11.2 进行基因序列比对筛选出候选靶标，最后基于 NCBI 数据库中的 BLAST 工具再次对候选序列进行比对，筛除相似序列，最终得到特异性分子靶标。基于挖掘到的特异性分子靶标，使用 Oligo 软件和 http://primerexplorer.jp/e/中在线软件 Primer Explorer 6 分别进行 PCR 和 LAMP 引物设计。引物交由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物详细信息如下表 2。

1.2.2　实验菌株 DNA 提取　如表 1，本研究所用菌株来自实验室保存的菌株。黄杆菌经过活化后接种于 5 mL 的 R2A 培养基中，25 ℃、150 r/min 培养 24 h。其他非目标菌株接种于 5 mL 的营养肉汤中，37 ℃、180 r/min 培养过夜，分别取 1 mL 新鲜菌液于 2 mL 离心管中，在 10000 r/min 高速离心 5 min，保留沉淀，使用灭菌水洗涤三次后用 100 μL 无菌水重悬，按照 DNA 提取试剂盒操作说明进行。所制备的 DNA 使用酶标仪测定浓度和纯度（纯度：$OD_{260/280}$=1.8~2.0，$OD_{260/230}$≥2.0，浓度≥50 ng/μL），最后保存于−20 ℃ 备用。

1.2.3　分子靶标特异性验证　为了评价新黄杆菌分子靶标特异性，提取表 1 中 49 株实验菌基因组 DNA 为分子扩增模板，利用普通 PCR 反应验证。反应总体积 10 μL，包括 2×PCR mix 5 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL，基因组 DNA 2 μL，无菌水 1 μL，使用 Biometra TOne 96G 热循环仪进行扩增

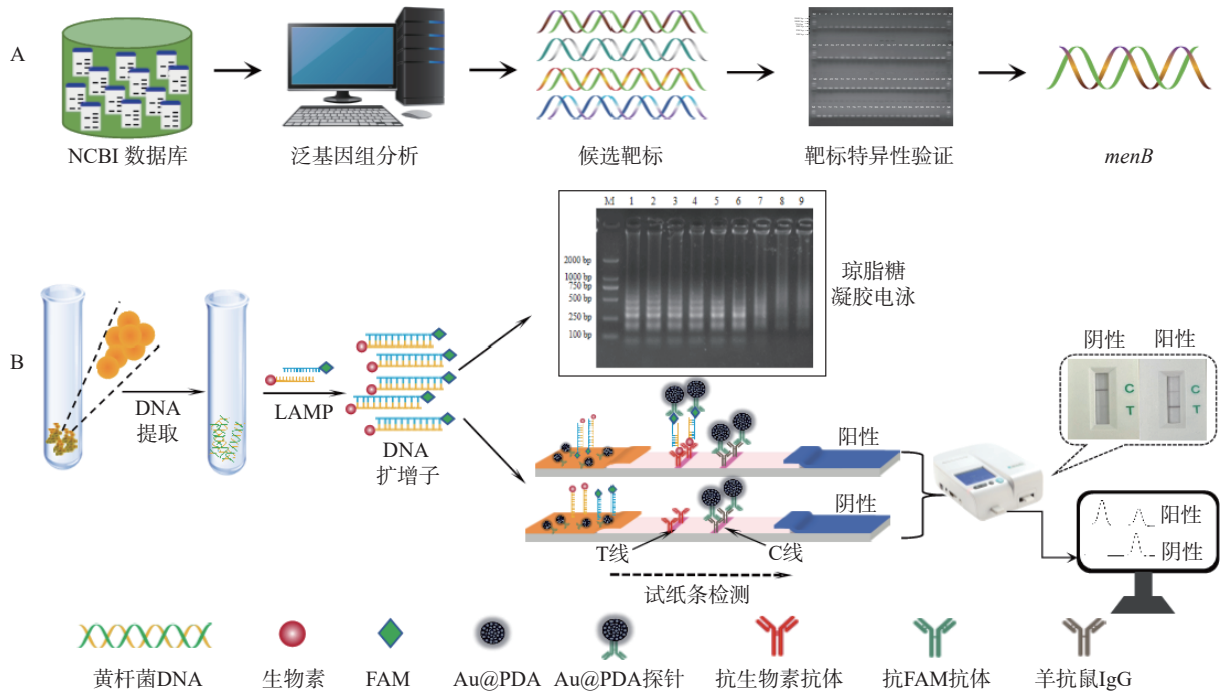


图 1　实验原理图

Fig.1　Schematic diagram of experiment

表 2　扩增引物信息

Table 2　Primer information for amplification

引物类型	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度
PCR	F	AAATAATGAAGCAAGCCAAAGG	142 bp
	R	TGAATCCATAAAGCACGGAAA	
LAMP	F3	CAGTTGCTAAAAGAGCAAGAA	/
	B3	TCTAGCTCCAGCGTTGAT	
	FIP1	Biotin-CTTAGCAACTGTCCAAACGTTTTTAGAAAAAAAATAATGAAGCAAGCC	
	BIP1	FAM-AATGCGGTAGAGAAAGCGATGAGTTGAATCCATAAAGCACGG	

反应，设置程序如下：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 40 s，55 ℃ 50 s，72 ℃ 30 s，30 个循环；72 ℃ 延伸 5 min。最后取 3 μL 扩增产物，使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。靶标特异性好的判断标准：目标菌 DNA 扩增出单一目标条带，非目标菌 DNA 无扩增条带。

1.2.4　新型 LAMP 反应体系的建立及条件优化　根据新挖掘黄杆菌靶标序列构建新型 LAMP 反应体系，反应总体积 25 μL，包括：外引物 F3/B3 各 0.5 μL，内引物 FIP/BIP 各 1 μL，10×Isothermal Amplication Buffer 2.5 μL，Bst2.0 WarmStart® DNA 聚合酶 0.5 μL，dNTPs 1 μL，甜菜碱 3 μL，$MgSO_4$ 1 μL，DNA 模板 1 μL，无菌水补足体系。在 60 ℃ 下反应一段时间后，85 ℃ 灭活 10 min。产物通过 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。对关键反应参数进行优化，包括内外引物浓度比（F3/B3∶FIP/BIP=1∶1、1∶2、1∶4、1∶8、1∶10、1∶12，其中 1=0.25 μmol/L），dNTPs 浓度（0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L），Mg^{2+}浓度（2、4、6、8、10、12、14、16 mmol/L），扩增温度（58、59、60、61、62、63、64、65 ℃），反应时间（5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80 min），优化单一因素时，其它因素的浓度采用 Bst2.0 WarmStart® DNA 聚合酶说明书的建议浓度以及已经优化后的浓度。根据电泳条带有无和清晰度来确定最佳工作浓度。

1.2.5　LAMP 扩增方法特异性及灵敏度评价　为了评价 LAMP 方法特异性，使用试剂盒提取 5 株黄杆菌和 12 株非黄杆菌 DNA，无菌水为阴性对照，按照上述优化条件配制 LAMP 反应体系，LAMP 反应后，产物通过 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。LAMP 方法特异性好的判断标准：目标菌 DNA 存在时扩增出清晰的阶梯形条带，非目标菌 DNA 无扩增条带。为进一步验证 LAMP 方法灵敏度，接种柱状黄杆菌 ATCC23463 于 R2A 培养基中，25 ℃、150 r/min 培养 24 h 至菌落数约 10^8 CFU/mL，按照国标（GB 4789.2-2022）方法进行菌落计数[29]。使用无菌水对初始菌液进行 10 倍稀释，得到 10^1~10^8 CFU/mL 纯培养液，提取所有梯度纯培养液 DNA 进行 LAMP 扩增反应。为了进一步分析 LAMP 方法在人工加标样本中的灵敏度，新鲜鱼肉样本于当地水产市场购买，按照国标（GB4789.20-2024）方法进行[30]。在实验室无菌环境中，用 75% 乙醇洗涤新鲜鱼肉表面，用无菌刀片切除表面，重复 3 次，以最大程度降低初始微生物污染。分别取处理好鱼肉的腮腺、体表、肌肉、胃肠消化道 10 g 放入无菌平皿中，通过 R2A 培养基铺板检测新鲜鱼肉中是否存在微生物。结果显示未出现微生物后，用无菌剪刀剪取 25 g 的腮腺、体表、肌肉、胃肠消化道混合样放入装有 225 mL 无菌生理盐水的无菌均质袋中，并加入 5 株不同黄杆菌纯培养物的混合液，均质 2 min 后进行菌落计数。用无菌生理盐水对均质液 10 倍梯度稀释，制备 10^1~10^8 CFU/mL 的人工污染模拟样品。每个稀释度样品取 1 mL，800 r/min 离心 2 min 去除鱼肉组织沉淀，将上清液转移至新的无菌离心管，10000 r/min 离心 5 min 去上清，用 100 μL 无菌水重悬沉淀，提取所有样本 DNA 进行 LAMP 扩增反应。每个样本重复检测 3 次。

1.2.6　LAMP 可视化方法建立　如图 1B，在本研究建立的 LAMP 扩增体系基础上，将 LAMP 扩增产物用无菌水稀释 10 倍，取 80 μL 稀释液和 2 μL 1 mg/mL 的纳米金修饰的聚多巴胺（Au@PDA）探针充分混匀后滴于预先准备好的试纸条样品垫中，室温反应 15 min，通过裸眼判读 T、C 线条带并记录检测结果。如图 1 所示，试纸条为实验室自研，主要由样品垫、吸收垫、NC 膜三部分组成，其中 T 线上标记物为 Anti-Biotin 抗体，C 线上标记物为 Goat anti-mouse IgG 抗体。

1.2.7　LAMP 可视化方法特异性评价　为了评估 LAMP 可视化方法检测能力，按照 1.2.5 中操作步骤准备对应的测试样本，样本提取 DNA 后，采用新建立的 LAMP 可视化方法进行裸眼检测，每个样本重复检测 3 次。

1.2.8　LAMP 可视化方法抗干扰能力评价　为保证黄杆菌 LAMP 可视化方法在复杂环境中的抗干扰能力，分别探究其在杂菌和腐败鱼肉样本中检测目标菌的准确性。将新培养至浓度为 10^8 CFU/mL 的柱状黄杆菌 ATCC23463 和 10^9 CFU/mL 铜绿假单胞菌 ATCC27853 按照一定比例混合，得到柱状黄杆菌与铜绿假单胞菌最终浓度比分别为 1∶0、1∶1、1∶2、1∶4、1∶5、1∶8、1∶10 的混合菌液样本。其次，将不同浓度柱状黄杆菌分别添加到腐败鱼肉中，得到目标菌浓度为 10^2~10^8 CFU/g 的混合样本。所有样本按照 1.2.2操作提取 DNA 模板，采用新建立的 LAMP 可视化方法进行检测，每个样本重复检测 3 次。

1.2.9　实际样本检测　从当地水产市场购买草鱼、鲈鱼、金鲳鱼、鲟鱼、石斑鱼 5 种 24 份样本，1 份加标草鱼阳性样本，共 25 份样本。按照国标（GB 4789.20-2024）方法制备样本均质液，按照 1.2.2 中方法提取所有均质液 DNA，分别用本研究建立的新型 LAMP 方法和 LAMP 可视化方法进行检测，每个样本重复检测 3 次。为了保证检测结果准确性，采用国标（GB 4789.2-2022）[29] 方法结合黄杆菌选择性培养基对样本进行检测，对检测结果进行比较。

1.3　数据处理

所有实验均进行 3 次重复实验，使用 WPS Office 2023 及 SigmaPlot 12.5 软件进行分析及绘制图表。

2　结果与分析

2.1　黄杆菌属分子靶标挖掘

在细菌的遗传进化过程中，核心基因扮演着关键角色，其序列稳定性较高。在进化关系相近的细菌

之间, 核心基因通常会呈现出相似的突变情况。相较于全基因组序列比对, 以核心基因作为标记, 所需的计算量更少, 效率更高[31]。在本实验中, 311 株菌全基因组序列进行 Roary 分析(Identity 阈值设置为 85%), 其核心基因为超过 99% 的菌株中含有的基因, 最终获得 1 条黄杆菌属分子候选靶标 *menB*, 其中柱状黄杆菌 94-081 为参考菌株, 详细序列如表 3。通过生物学功能预测分析, *menB* 为编码 1,4-二羟基-2-萘甲酰辅酶 A 合成酶蛋白。文献调研发现, 该候选靶标之前从未报道过。为进一步评估候选靶标在实际应用中的特异性, 选择 5 株目标黄杆菌株和 44 株食品和水环境中常见病原菌进行 PCR 验证, 结果发现 5 株阳性菌均出现目标条带, 其他阴性菌和质控菌均未出现条带(图 2), 说明 *menB* 靶标具有良好的特异性, 可用于分子检测技术建立。

2.2 新型 LAMP 方法建立

为了实现黄杆菌属等温、低设备门槛快速检测, 本研究基于特异性分子靶标 *menB*, 设计对应的 LAMP 引物, 建立了新型 LAMP 扩增方法, 并对关键反应进行优化, 最佳优化条件通过阶梯条带的有无及清晰度来确定。如图 3a 所示, 随着 F3/B3∶FIP/BIP 浓度比逐渐增加扩增效率不断提高, 浓度比为 1∶8 时阶梯形条带数量及亮度趋于稳定, 扩增效率最高; 图 3b 中 dNTPs 浓度在 0.4~1.2 mmol/L 时扩增效率不断提高, 1.2 mmol/L 时达到最高, 更高浓度时扩增效率趋于稳定, 当浓度达到 1.8 mmol/L, 扩增效率出现显著抑制。图 3c 中随着 Mg^{2+}浓度的增加, LAMP 扩增效率增大, 4 mmol/L 时扩增效率最高, 当 Mg^{2+}浓度继续增加时, 扩增效率反而降低直到完全抑制。图 3d 中随着扩增温度的升高, LAMP 扩增效率先升高后降低, 在 62 ℃ 时扩增效率最高, 此时阶梯形条带数量最多、亮度最高。图 3e 中随着扩增时间的增加, LAMP 扩增效率不断提高, 在 50 min 时趋于稳定, 此时扩增效率最高。综上, LAMP 扩增体系最优反应条件为: F3/B3∶FIP/BIP=1∶8、Mg^{2+}浓度为 4 mmol/L、dNTPs 浓度为 1.2 mmol/L、扩增温度为 62 ℃、扩增时间为 50 min。

2.3 新型 LAMP 方法特异性

为系统评估新型 LAMP 方法在鱼肉制品中抗杂菌干扰下检测的准确性, 本实验选取 5 株黄杆菌和 12 株在水环境中及鱼肉制品中常见致病菌代表菌株用于验证 LAMP 方法的特异性。如图 4a 所示, 泳道 1~5 对应的 5 株黄杆菌均产生阶梯形扩增条带, 而 12 株非黄杆菌和空白对照均无扩增条带产生(图 4b 所示)。结果表明本研究建立的新型 LAMP 扩增方法具有良好的特异性。

2.4 新型 LAMP 方法灵敏度

R2A 计数平板结果显示黄杆菌新鲜菌液浓度为 3.3×10^8 CFU/mL, 通过 10 倍稀释法制备 3.3×10^1~3.3×10^8 CFU/mL 纯培养液样本, 分别提取基因组

表 3 黄杆菌特异分子靶标信息

Table 3 Molecular target information of *Flavobacterium* spp.

菌种	代表菌株	靶标基因	基因位置	编码蛋白	靶标序列
黄杆菌	柱状黄杆菌94-081	*menB*	1578547~1578891	1,4-二羟基-2-萘甲酰辅酶A合成酶蛋白	ATGCCAAGATCGGTAAATTCAGTTGCTAAAAGAGCAAGAAGAAAAAAAATAA TGAAGCAAGCCAAAGGTTTCTTTGGTAGACGTAAAAACGTTTGGACAGTTGCT AAGAATGCGGTAGAGAAAGCGATGAGCTACGCTTACCGTGACAGAAAACAGA ATAAAAGAAATTTCCGTGCTTTATGGATTCAACGTATCAACGCTGGAGCTAGA TTAGAAGGAATGTCTTATTCTCAATTCATGGGGAAAGTAAAAGCTAACGGAAT CGAATTGAACCGTAAAGTTCTTGCAGATTTAGCGATGAACCACCCTGAAGCTTT CAAAGCAATACTTAATAAAGTAAAATAA

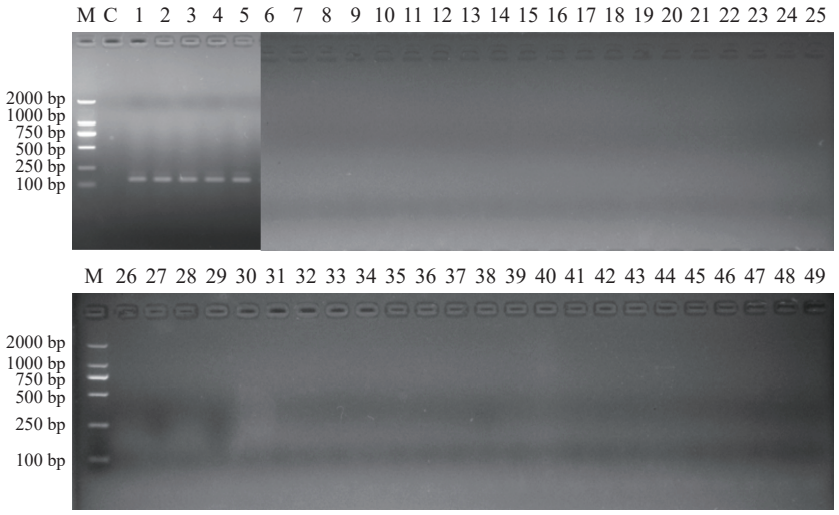


图 2 黄杆菌属靶标特异性验证结果

Fig.2 Verification results of the genus target specificity of *Flavobacterium* spp.

注: M 为 DNA marker; C 为空白对照; 1~5 泳道代表 5 株黄杆菌; 6~49 泳道代表 44 株非黄杆菌。

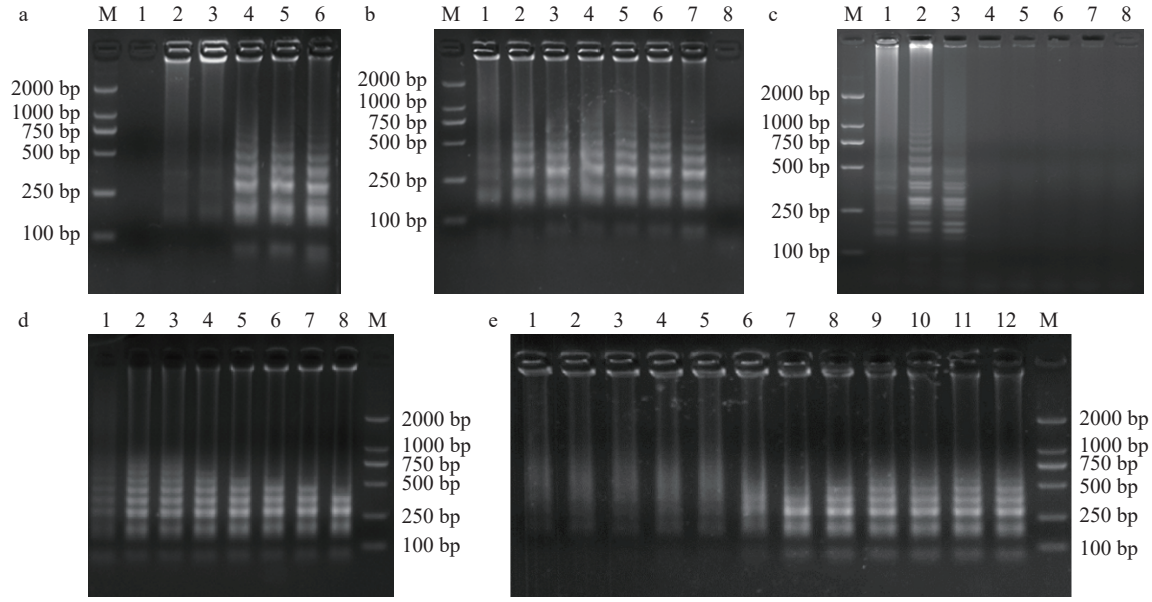


图 3　LAMP 反应体系条件优化

Fig.3　Optimization of the reaction system conditions for LAMP

注: M 为 DNA marker; (a)1~6 泳道分别代表 F3/B3∶FIP/BIP 浓度比为 1∶1、1∶2、1∶4、1∶8、1∶10、1∶12(1=0.25 μmol/L); (b)1~8 泳道分别代表 dNTPs 的浓度为 0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L; (c)1~8 泳道分别代表 Mg^{2+}的浓度为 2、4、6、8、10、12、14、16 mmol/L; (d)1~8 泳道分别代表扩增温度为 58、59、60、61、62、63、64、65 ℃; (e)1~12 泳道分别代表扩增时间为 5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80 min。

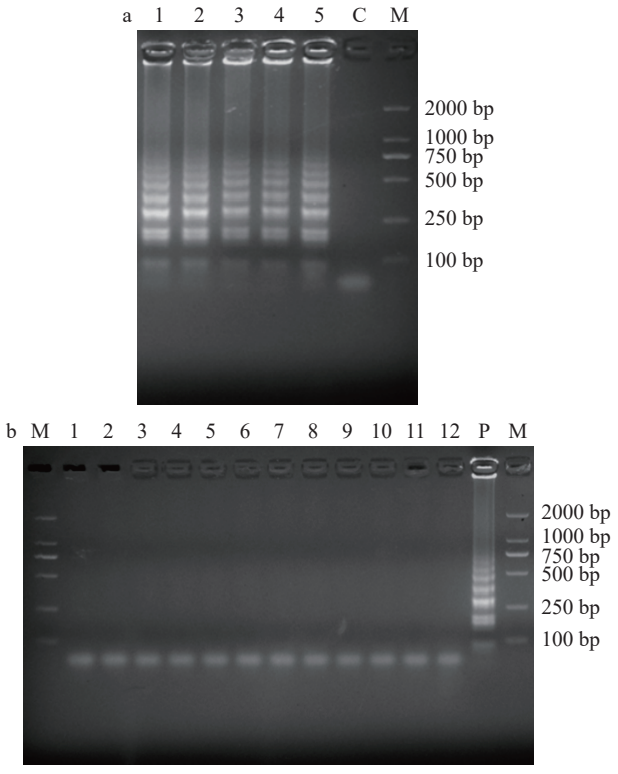


图 4　LAMP 方法特异性评价

Fig.4　Specificity evaluation of LAMP method

注: M 为 DNA marker; C 为空白对照; P 为阳性对照; (a)1~5 泳道为表 1 中 5 株黄杆菌株; (b)1~12 泳道为表 1 中编号 15~26 的非目标黄杆菌株。

DNA 进行 LAMP 方法灵敏度检测。检测结果如图 5a 所示, 泳道 7 产生微弱的梯形条带, 泳道 8 和空白对照未出现扩增条带, 因此新型 LAMP 方法的灵敏度为 3.3×10^2 CFU/mL。按照 1.2.5 方法制备

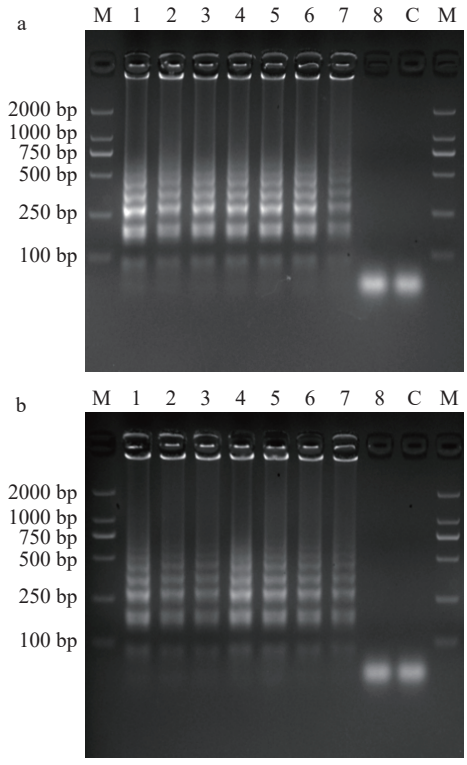


图 5　LAMP 方法灵敏度评价

Fig.5　Sensitivity evaluation of LAMP method

注: M 为 DNA marker; C 为空白对照; (a)1~8 泳道分别代表柱状黄杆菌 ATCC 23463 纯培养物浓度: 3.3×10^8、3.3×10^7、3.3×10^6、3.3×10^5、3.3×10^4、3.3×10^3、3.3×10^2、3.3×10^1 CFU/mL; (b)1~8 泳道分别代表 5 株不同黄杆菌共同加标样本浓度: 3.3×10^9、3.3×10^8、3.3×10^7、3.3×10^6、3.3×10^5、3.3×10^4、3.3×10^3、3.3×10^2 CFU/g。

包含 5 株不同黄杆菌液终浓度为 3.3×10^2~3.3×10^9 CFU/g 人工加标混合样本, 进一步分析 LAMP

方法在人工加标样本中的灵敏度。检测结果如图 5b 所示，泳道 7 产生微弱的梯形条带，泳道 8 和空白对照未出现扩增条带，因此新型 LAMP 方法在混合加标样本中灵敏度为 3.3×10^3 CFU/g。本实验结果显示 LAMP 方法在纯培养液和混合加标样本中检测灵敏度相当，证明所建立的 LAMP 方法在检测不同基质中的黄杆菌中具有较好的准确性，但由于食品基质的干扰，加标样本中扩增信号相比在纯培养液中均有所降低。

2.5 新型 LAMP 可视化方法灵敏度

为了实现黄杆菌低成本、现场即时检测，本研究将新型 LAMP 方法与试纸条平台结合，进一步拓宽其方法适用性。目标菌存在时，LAMP 扩增反应发生，此时扩增产物两端分别带有 FAM 和 Biotin 标记，与体系中 Anti-FAM 抗体标记的 Au@PDA 探针和 T 线上标记的 Anti-Biotin 抗体形成双抗“夹心”模式，产生灰色条带，同时 C 线标记 Goat anti-mouse IgG 抗体与抗体标记的显色探针结合产生灰色条带；反之，不存在目标菌时，不发生 LAMP 扩增反应，T 线无法形成双抗“夹心”模式，仅 C 线出现单一条带。如图 6a 所示，新型 LAMP 可视化方法在纯培养液中检测灵敏度为 3.3×10^2 CFU/mL。新型 LAMP 方法在混合加标样本中灵敏度为 3.3×10^3 CFU/g（图 6b）。上述结果证明本研究构建的新型 LAMP 可视化方法可通过裸眼准确检测不同基质中的黄杆菌。

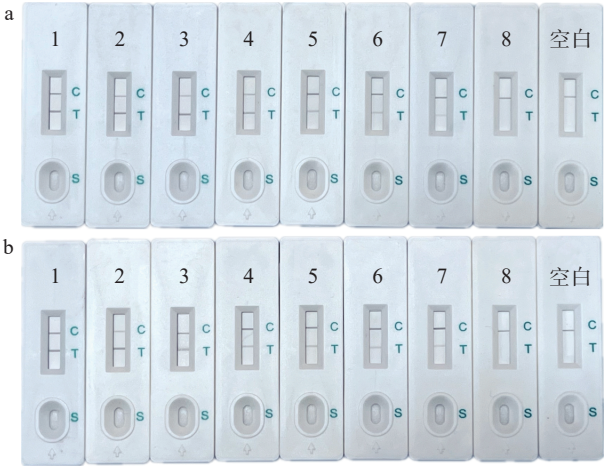


图 6 LAMP 可视化方法灵敏度评价

Fig.6 Sensitivity evaluation of LAMP visualization method

注：(a)编号 1~8 分别代表柱状黄杆菌 ATCC 23463 纯培养物浓度：3.3×10^8、3.3×10^7、3.3×10^6、3.3×10^5、3.3×10^4、3.3×10^3、3.3×10^2、3.3×10^1 CFU/mL；(b)编号 1~8 分别代表 5 株不同黄杆菌混合加标样本浓度：3.3×10^9、3.3×10^8、3.3×10^7、3.3×10^6、3.3×10^5、3.3×10^4、3.3×10^3、3.3×10^2 CFU/g。

2.6 新型 LAMP 可视化方法特异性

如图 7 所示，5 株黄杆菌对应的试纸条均出现两个明显的灰色条带，而 12 株非黄杆菌仅出现一个条带，表明本研究建立的新型 LAMP 可视化方法具有良好的特异性。

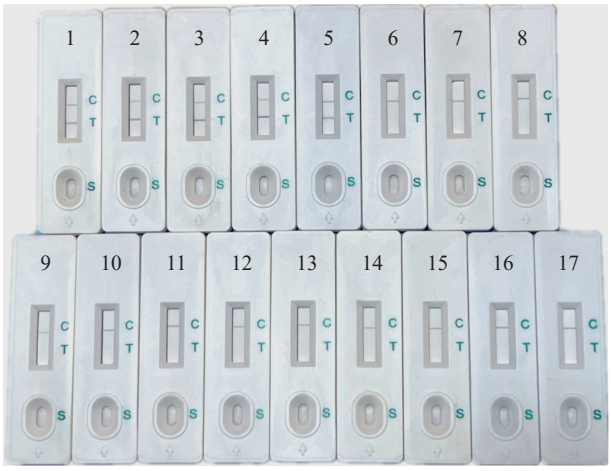


图 7 LAMP 可视化方法特异性评价

Fig.7 Specificity evaluation of LAMP visualization method

注：编号 1~5 为表 2 中 5 株黄杆菌株，编号 6~17 为表 2 中编号 15~26 对应的 12 株非目标黄杆菌株。

2.7 新型 LAMP 可视化方法抗干扰能力

如图 8a 所示，在新型 LAMP 可视化检测后，以柱状黄杆菌与铜绿假单胞菌混合比例 1∶0 为对照，除了 1∶10 外，其他 5 个比例下检测试纸条裸眼均可看到与对照组一致的两条清晰、灰度均一的条带。如图 8b 所示，针对不同浓度黄杆菌加标腐败鱼肉样本检测时，样本浓度为 10^3 CFU/g 时，试纸条上依然可以看到较弱的两条灰色带，此时本方法灵敏度依然能达到 10^3 CFU/g，与加标新鲜鱼肉样本保持一致。上述结果证明该 LAMP 可视化方法在高浓度非目标物和腐败鱼肉样本中，其检测信号受到一定的干扰，但可接受的是，该方法具有较强抗干扰能力和适应性。



图 8 LAMP 可视化方法抗干扰能力评价

Fig.8 Anti-interference ability of LAMP visualization method

注：(a)体系中柱状黄杆菌与铜绿假单胞菌最终混合比例分别为 1∶0、1∶1、1∶2、1∶4、1∶5、1∶8、1∶10；(b)编号 1~7 分别代表黄杆菌在腐败鱼肉样本中终浓度依次为 10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2 CFU/g。

2.8　真实样品检测

采用本方法对购自水产市场的 5 种共 24 个新鲜鱼肉样品分别进行检测，如图 9 所示，在阳性对照下，LAMP 可视化方法成功检出 1 个黄杆菌阳性样本，与传统培养法检测结果一致。

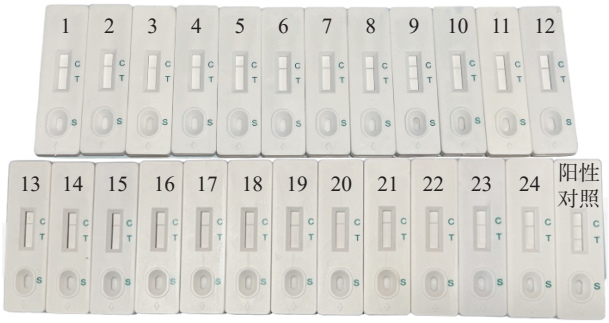


图 9　真实样本检测

Fig.9　Detection of real sample

注：编号 1~6 为鲈鱼样本，编号 7~16 为草鱼样本，编号 17~20 为金鲳鱼样本，编号 21~22 为鲟鱼样本，编号 23~24 为石斑鱼样本。

3　结论

本研究通过泛基因组分析技术和 PCR 验证实验成功挖掘了一个新型、高特异性的黄杆菌属分子靶标 *menB*，基于该靶标设计了对应的 LAMP 引物，成功构建了新型 LAMP 技术用于样本中黄杆菌属快速检测。该 LAMP 方法针对 5 株黄杆菌和 12 株非黄杆菌检测中，展现出良好的特异性。在未预增菌情况下，纯培养液和混合加标鱼肉样本中灵敏度分别为 3.3×10^2 CFU/mL 和 3.3×10^3 CFU/g，与现有 PCR 方法灵敏度相当。为降低实验过程中的交叉污染风险，本研究成功引入试纸条平台，实现了黄杆菌现场、可视化检测。该方法同样具有较好的特异性和灵敏度，在高浓度杂菌和腐败鱼肉样本干扰情况下，依然保持稳定、准确、特异的检测结果。针对 24 份新鲜鱼肉样品检测，成功检出 1 份黄杆菌阳性样本，与传统培养法检测结果一致。因此，本研究成功构建了一种新型的 LAMP 可视化方法，可实现不同样本中多种黄杆菌的快速、灵敏、特异性检测，为食品中的黄杆菌精准检测提供了新的方向，但是目前该方法只能用于半定量检测，后续研究中可在已挖掘的特异性分子靶标基础上，开发新型、灵敏检测探针或结合数字 PCR、微流控一体化技术平台，真正实现样本中快速、定量检测，为食品安全监测及临床精准治疗提供技术支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] TIEMBLO-MARTÍN M, PISTORIO V, SAAKE P, et al. Structure and properties of the exopolysaccharide isolated from *Flavobacterium* sp. Root935[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 343: 122433.

[2] RAN Qi, DU Xinran, HAN Lin, et al. Three novel species of the genus *Flavobacterium*, *Flavobacterium odoriferum* sp. nov., *Flavobacterium fragile* sp. nov. and *Flavobacterium luminosum* sp. nov., isolated from activated sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2024, 74(2). DOI:10.1099/ijsem.0.006258.

[3] MAGESH S, HURLEY A I, NEPPER J F, et al. Surface colonization by *Flavobacterium johnsoniae* promotes its survival in a model microbial community[J]. mBio, 2024, 15(3): e03428−e03423.

[4] LIN Qingxia, SUN Shiquan, YANG Jianbin, et al. Enhanced aerobic granular sludge by thermally-treated dredged sediment in wastewater treatment under low superficial gas velocity[J]. Journal of Environmental Management, 2024, 368: 122210.

[5] LEE B H, NICOLAS P, SATICIOGLU I B, et al. Investigation of the genus *Flavobacterium* as a reservoir for fish-pathogenic bacterial species: The case of *Flavobacterium collinsii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(4): e02162−e02122.

[6] SEQUINO G, VALENTINO V, TORRIERI E, et al. Specific microbial communities are selected in minimally-processed fruit and vegetables according to the type of product[J]. Foods, 2022, 11(14): 2164.

[7] LEE J L, YOUREK G, LEE J L, et al. The microbiome of catfish (*Ictalurus punctatus*) treated with natural preservatives during refrigerated storage[J]. Microorganisms, 2025, 13(2): 244.

[8] LUO Baolong, DONG Fujin, LIU Yuyang, et al. Insights into the microbiota of raw milk from seven breeds animals distributing in Xinjiang China[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1382286.

[9] CHAKRABORTY U, ROY S, CHAKRABORTY B. Microorganisms aiding existence and efficiency of plants in saline environment: What we know and what to expect[J]. Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions, 2019: 211−235.

[10] 王永锋. 生鲜产品在途配送质量控制及可追溯系统关键技术研究[D]. 重庆：重庆大学, 2012. [WANG Yongfeng. Research on key technologies about quality control of fresh product distribution in road and traceability system[D]. Chongqing: Chongqing University, 2012.]

[11] JANAMPA-SARMIENTO P C, COSTA H L, ROSA J C C, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Flavobacterium* spp. associated with aquaculture fish diseased from Brazil[J]. Pathogens, 2025, 14(3): 219.

[12] KNUPP C, SOTO E, LOCH T P. Varying *Flavobacterium psychrophilum* shedding dynamics in three bacterial coldwater disease-susceptible salmonid (Family Salmonidae) species[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(2): e03601−e03623.

[13] TAKEUCHI M, FUJIWARA-NAGATA E, KURODA K, et al. Fecal metagenomic and metabolomic analyses reveal non-invasive biomarkers of *Flavobacterium psychrophilum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. mSphere, 2024, 9(7): e00301−e00324.

[14] 金尾静, 谭稼荣. 新生儿多重耐药脑膜脓毒性黄杆菌感染 17 例耐药情况分析[J]. 中国乡村医药, 2020, 27(24): 39−40. [JIN Weijing, TAN Jiarong. Analysis of drug resistance of 17 cases of neonatal multidrug-resistant *Flavobacterium meningoencephalitis* infection[J]. Chinese Journal of Rural Medicine and Pharmacy, 2020, 27(24): 39−40.]

[15] OTUR Ç, OKAY S, KURT-KIZILDOĞAN A. Whole genome analysis of *Flavobacterium aziz-sancarii* sp. nov., isolated

from Ardley Island (*Antarctica*), revealed a rich resistome and bioremediation potential[J]. Chemosphere, 2023, 313: 137511.
[16] PAVLIN K, PAPIĆ B, ZDOVC I, et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium branchiophilum* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Slovenia[J]. Journal of Fish Diseases, 2025, 48(7): e14119.
[17] ZHANG Rong, DONG Ning, SHEN Zhangqi, et al. Epidemiological and phylogenetic analysis reveals Flavobacteriaceae as potential ancestral source of tigecycline resistance gene Tet(X)[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4648.
[18] NAN B Y, ZUSMAN D R. Novel mechanisms power bacterial gliding motility[J]. Molecular Microbiology, 2016, 101(2): 186−193.
[19] CASTILLO D, DONATI V L, JØRGENSEN J, et al. Comparative genomic analyses of *Flavobacterium psychrophilum* isolates reveals new putative genetic determinants of virulence traits[J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1658.
[20] PANWAR S, DUGGIRALA K S, YADAV P, et al. Advanced diagnostic methods for identification of bacterial foodborne pathogens: Contemporary and upcoming challenges[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(7): 982−1000.
[21] KREITMANN L, MIGLIETTA L, XU K, et al. Next-generation molecular diagnostics: Leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 160: 116963.
[22] CHAKRABORTY S. Democratizing nucleic acid-based molecular diagnostic tests for infectious diseases at resource-limited settings-from point of care to extreme point of care[J]. Sensors & Diagnostics, 2024, 3(4): 536−561.
[23] WONG Y P, OTHMAN S, LAU Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 626−643.
[24] 陈雨珊, 胡倩, 向琳, 等. 针对 *rcsA* 基因建立可视化 LAMP 方法快速检测肺炎克雷伯菌[J]. 中华医院感染学杂志, 2025, 35(10): 1450−1454. [CHEN Yushan, HU Qian, XIANG Lin, et al. Establishment of visualized LAMP assay targeting *rcsA* gene for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2025, 35(10): 1450−1454.]
[25] WACHIRALURPAN S, SRIYAPAI T, AREEKIT S, et al. Development of a rapid screening test for *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral flow dipstick (LFD)[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(11): 3763−3772.
[26] SATICIOGLU I B, DUMAN M, SMITH P, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Turkey[J]. Aquaculture, 2019, 512: 734293.
[27] STREPPARAVA N, WAHLI T, SEGNER H, et al. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 105.
[28] MABROK M, CHOKMANGMEEPISARN P, LaFRENTZ B R, et al. Development of a species-specific polymerase chain reaction for highly sensitive detection of *Flavobacterium columnare* targeting chondroitin AC lyase gene[J]. Aquaculture, 2020, 521: 734597.
[29] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.2-2022 National food safety standard: Microbiological examination of food: Determination of aerobic plate count[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.]
[30] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.20-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 水产品及其制品采样和检样处理[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.20-2024 National food safety standard: Microbiological examination of food: Sampling and sample processing of aquatic products and their products[S]. Beijing: China Standards Press, 2024.]
[31] ZHOU Baoqing, YE Qinghua, CHEN Moutong, et al. Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp.[J]. Food Control, 2022, 131: 108478.