

单增李斯特菌 RAA-exo 检测方法的建立和应用

李俊峰^{1#}, 王佳慧^{1#}, 项瑞生¹, 雷晨曦¹, 余可心¹, 付玉和², 宋厚辉¹,
程昌勇^{1*}, 吴芹^{1*}

- 1 浙江农林大学 动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心, 浙江省动物医学与健康管理国际科技合作基地, 同一健康和食品安全一带一路国际联合实验室, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州
- 2 浙江领与生物科技有限公司, 浙江 杭州

李俊峰, 王佳慧, 项瑞生, 雷晨曦, 余可心, 付玉和, 宋厚辉, 程昌勇, 吴芹. 单增李斯特菌 RAA-exo 检测方法的建立和应用[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2521-2534.

LI Junfeng, WANG Jiahui, XIANG Ruisheng, LEI Chenxi, YU Kexin, FU Yuhe, SONG Houhui, CHENG Changyong, WU Qin. Development and application of a recombinase-aided amplification-exonuclease assay for detecting *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2521-2534.

摘要: 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是引起食源性疾病暴发的主要病原之一, 严重威胁食品安全和公共卫生安全。在食源性致病菌污染呈现多元化特征的环境下, 特异性检测单增李斯特菌并开展预防工作极为重要。**【目的】** 建立一种新的单增李斯特菌重组酶辅助扩增-外切酶(recombinase aided amplification-exonuclease, RAA-exo)检测方法。**【方法】** 针对单增李斯特菌的 *hly* 基因设计多对 RAA 引物和探针, 筛选核酸扩增效率最高的引物。利用最佳 RAA 引物系统对反应体系进行优化, 包括 A buffer、B buffer、RAA 引物和探针的使用量。基于优化后的反应体系, 对该方法的灵敏度、特异性和实际应用能力进行评估。**【结果】** 本方法检测重组质粒的最低检测限为 0.5 copies/ μ L, 检测单增李斯特菌液的最低检测限为 10 CFU/mL。该方法仅对靶细菌单增李斯特菌敏感, 对沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌等几种常见食源性病原菌均无法检出, 对绵羊李斯特菌、西尔李斯特菌、英诺克李斯特菌等几种李斯特菌同样无法检出。对 44 份猪肉样本的应用结果表明, 本方法的检测结果与行业标准 SN/T 5224—2019 推荐的实时荧光 PCR 内标法结果一致。**【结论】** 本研究建立的 RAA-exo 技术具有灵敏度高、特异性强、操作简便等优点, 在 37 °C 条件下 20 min 内即可完成检测, 适用于基层现场快速检测, 为单增李斯特菌的快速检测提供了高效、便捷的技术支持, 具有广阔的应用前景。

关键词: 单增李斯特菌; 核酸检测; RAA-exo

资助项目: 浙江省“尖兵领雁+X”国际科技合作项目(2025C04009); 浙江农林大学学校科技发展基金(2021LFR044)
This work was supported by the Key Research and Development International Cooperation Program of Zhejiang Province (2025C04009) and the Zhejiang A&F University Talents Starting Program (2021LFR044).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: WU Qin, wuqin@zafu.edu.cn; CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn

Received: 2025-11-03; Accepted: 2026-01-05; Published online: 2026-01-16

Development and application of a recombinase-aided amplification-exonuclease assay for detecting *Listeria monocytogenes*

LI Junfeng^{1#}, WANG Jiahui^{1#}, XIANG Ruisheng¹, LEI Chenxi¹, YU Kexin¹, FU Yuhe², SONG Houhui¹, CHENG Changyong^{1*}, WU Qin^{1*}

1 Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, the Belt and Road International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Veterinary Medicine of Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

2 Zhejiang Ling Yu Bio-Sci&Tech Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China

Abstract: *Listeria monocytogenes*, as a major causative agent of foodborne illness outbreaks, poses a serious threat to food safety and public health. In complex foodborne pathogen environments, the specific and effective detection methods for *L. monocytogenes* are crucial. **[Objective]** To develop a novel recombinase-aided amplification-exonuclease (RAA-exo) assay for detecting *L. monocytogenes*. **[Methods]** Multiple RAA primer and probe sets targeting *hly* were designed, and the optimal primer set was selected based on nucleic acid amplification efficiency. The reaction system was rigorously optimized, focusing on the concentrations of A buffer, B buffer, and RAA primers and probe. **[Results]** The optimized RAA-exo assay showed a limit of detection (LOD) of 0.5 copies/ μ L for recombinant plasmids and 10 CFU/mL for *L. monocytogenes* suspensions. The assay demonstrated high specificity, selectively detecting *L. monocytogenes* without cross-reactivity to other common foodborne pathogens, including *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, or other *Listeria* species (*L. ovinae*, *L. seeligeri*, and *L. innocua*). In a validation study using 44 pork samples, the RAA-exo assay results were in complete agreement with those of the real-time fluorescence PCR internal standard method outlined in the industry standard SN/T 5224—2019. **[Conclusion]** The developed RAA-exo assay exhibits high sensitivity and specificity, requires minimal hands-on time, and achieves detection within 20 min at 37 °C. Therefore, the assay is suitable for rapid, on-site testing, serving as an efficient and convenient tool for *L. monocytogenes* detection, with promising applications in food safety monitoring.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; nucleic acid testing; RAA-exo

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)隶属于芽孢杆菌目李斯特菌属,是一种呈杆状、无囊膜、无芽孢、有鞭毛的兼性厌氧革兰氏阳性细菌。由于其生长抗逆能力强,生存温度范

围广,即便在低温酸性环境中也能存活,因此广泛分布于各类食物中^[1]。它被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为四大食源性致病菌(大肠杆菌、肉毒杆菌、嗜水气单胞菌

和单增李斯特菌)之一^[2]。单增李斯特菌病是一种重要的人畜共患病,可引发人或动物流产、败血症、脑膜炎等严重疾病。该病原菌尤其对新生儿、老年人、孕妇以及免疫缺陷者构成严重威胁,临床死亡率高达 20%–30%^[3-4]。目前,全球各地仍有单增李斯特菌感染病例的报道,这不仅给畜牧养殖业造成严重经济损失,更严重威胁人类健康和公共卫生安全。因此,为加强对 LM 污染的检测和监控,亟需针对 LM 建立一种精准便捷的快速检测方法,以推动源头防控体系的完善与高效运行。

针对 LM 的检测方法多样,包括传统细菌培养方法^[5]、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)^[6]、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[7]、环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[8]、重组聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)^[9]、重组酶介导扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)等快速检测技术。其中,RPA 和 RAA 技术凭借其独特优势在众多快速检测技术中脱颖而出,被视为实现便携式快速核酸检测的重要手段。二者工作原理相同,均在 37–42 °C 恒温条件下工作,通过重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的协同作用,快速扩增核酸(30 min 内完成)。它们灵敏度高(可检测单拷贝核酸),无需热循环仪,适合基层或现场检测。RAA 和 RPA 的核心组分、反应条件和应用几乎一致,主要区别在于酶的来源不同,而且 RPA 技术所有权在国外,成本较高且供货周期长,而 RAA 则相对更易获取。与传统的细菌培养方法相比,RPA 和 RAA 技术的检测流程更为简单,检测时间从数日缩短至 30 min 内;与 ELISA 技术相比,操作流程简便,无需预先制备单克隆抗体;与 PCR 技术相比,无需昂贵仪器,也无需复杂的热循环程序(变性、退火和延伸),在常温下即可完成扩增反应,检测时长也大大缩短,30 min 内就能完成检测;与 LAMP 技术相比,只需一对引物,

节省了高昂的生物标记成本,且等温扩增温度更低。总之,它们的发展有效弥补了传统细菌检测方法和 PCR 技术的不足,对基础设施落后地区的现场快速检测更为友好^[10]。随着研究的深入,有研究者将 RPA/RAA 技术与 CRISPR/Cas 反式剪切技术^[11]、侧向层析试纸条(lateral flow assay, LFA)^[12]和荧光法^[13]相结合,进一步提升了 RPA/RAA 技术的发展潜力。其中荧光法对设备要求不高,在保持便捷操作的同时兼具高敏感度和高特异性优势,且较 CRISPR/Cas 反式剪切技术和试纸条检测成本低,具有更广的普适性。基于此,本研究旨在建立一种新的单增李斯特菌 RAA-外切酶(RAA-exonuclease, RAA-exo)荧光法,为基层人员开展食源性致病菌现场快速检测提供更为高效、便捷的技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) EGD-e、绵羊李斯特菌(*Listeria ivanii*)、西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)、沙门氏菌(*Salmonella*) CVCC541、大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、蜡样杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC 11778 均保存于浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室。

1.2 主要试剂和仪器

ZC-RAA[®] Basic Kits、ZC-RAA[®] exo Kits, 杭州众测生物科技有限公司;核酸抽提液,北京索莱宝科技有限公司;1×TE 缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司;核酸裂解液,博迪泰(厦门)生物科技有限公司;高纯度质粒小量快速提取试剂盒,上海惠凌生物技术有限公司。

超微量分光光度计,赛默飞世尔科技公司;荧光定量 PCR 仪,安捷伦科技(中国)有限公司;PCR 仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;核

酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 核酸胶曝光仪, 上海硕盟生物科技有限公司。

1.3 引物和探针的设计与合成

利用 Primer 6.0 软件针对靶序列 *hly* 基因设计一套可特异性检测单增李斯特菌的 RAA 引物与 *exo* 探针, 所有探针均委托杭州有康生物科技有限公司合成, 具体引物和探针序列如表 1 所示。

1.4 RAA 引物筛选

基于阳性质粒参考品(5×10^3 copies/ μL), 将上述 RAA 引物进行不同组合展开基础 RAA 扩增反应(a1F/a1R、a1F/a2R、a1F/a3R、a2F/a1R、a2F/a2R、a2F/a3R、a3F/a1R、a3F/a2R、a3F/a3R、a4F/a1R、a4F/a2R、a4F/a3R、a5F/a1R、a5F/a2R、a5F/a3R、b1F/b1R、b1F/b2R、b1F/b3R、b1F/b4R、b2F/b1R、b2F/b2R、b2F/b3R、b2F/b4R、b3F/b1R、b3F/b2R、b3F/b3R、

b3F/b4R、b4F/b1R、b4F/b2R、b4F/b3R、b4F/b4R), 选取扩增效率较高的引物组合进行荧光 RAA 扩增反应, 以扩增效率为依据筛选出最佳配对方案。基础 RAA 反应和荧光 RAA 反应分别按照 ZC-RAA[®] Basic Kits、ZC-RAA[®] *exo* Kits 说明书操作。

1.5 RAA-*exo* 反应体系的优化

基于筛选出的最佳 RAA 引物, 优化 RAA-*exo* 反应体系, 分别对 A buffer (10%)、B buffer (280 nmol/L)、RAA 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的用量进行优化。以 5×10^3 copies/ μL 质粒为扩增模板进行荧光 RAA 反应, 将荧光 RAA 扩增效率最高的组分确定为最优反应体系。其中 A buffer 的用量分别为 20.0、22.5、25.0、27.5、30.0 μL ; B buffer 的用量分别为 2.00、2.25、2.50、2.75、3.00 μL ; RAA 引物的用量分别为 1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6 μL ; 探针的用量分别为 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μL 。

表1 本研究所用的RAA引物和探针序列

Table 1 Sequence of primers and probes used in this study

Sequence names	Sequences (5'→3')
LM-Probe-1	ACAACCTGAATGTCTGCATTATTTTGAT[FAM-dT]G[THF][BHQ1-dT]GGATTCTTCTTT-C3
LM- <i>hly</i> -F1-a	TTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCT
LM- <i>hly</i> -F2-a	CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAA
LM- <i>hly</i> -F3-a	GTCCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGA
LM- <i>hly</i> -F4-a	TGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTA
LM- <i>hly</i> -F5-a	TATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGC
LM- <i>hly</i> -R1-a	AGAGCACCTGGATAGGTTAGGCTCGAAATTGCAT
LM- <i>hly</i> -R2-a	CTAATTCGAATTCGCTTTTACGAGAGCACCT
LM- <i>hly</i> -R3-a	TTAATGAATCACGTTTTACAGGGAGAACATCTGG
LM- <i>hly</i> -F1-b	AACAACGCAGTAAATACATTAGTGGAAGATG
LM- <i>hly</i> -F2-b	TTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGA
LM- <i>hly</i> -F3-b	ATGGCTTACAGTGAATCACAAATTAATTGCGAAA
LM- <i>hly</i> -F4-b	AGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATG
LM- <i>hly</i> -R1-b	AGGTCTTGTAGGTTTCATTAACATTCACGTTA
LM- <i>hly</i> -R2-b	ACTGCTCTTTAGTAACAGCTTTGCCGAA
LM- <i>hly</i> -R3-b	CAAGCGCTTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGC
LM- <i>hly</i> -R4-b	ACGCCACACTTGAGATATATGCAGGAGGA

1.6 灵敏度实验

将质粒梯度稀释成 9 个稀释度, 分别为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、5、2.5、1、0.5、0.25 copies/ μL , 并设置 ddH₂O 作为阴性对照, 将出现阳性结果的最低质粒质量浓度作为检测限。将单增李斯特菌梯度稀释成 8 个稀释度, 分别为 10^4 、 2×10^3 、 10^3 、 2×10^2 、 10^2 、 2×10^1 、 10^1 、5 CFU/mL, 将出现阳性结果的最低浓度单增李斯特菌作为检测限。

1.7 特异性实验

选择单增李斯特菌 EGD-e、绵羊李斯特菌、西尔李斯特菌、英诺克李斯特菌、沙门氏菌 CVCC541、大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778 进行特异性实验, 对所有细菌培养物进行核酸提取并检测, 并设置 ddH₂O 作为阴性对照。

1.8 重现性实验

采用空白样品添加法制备检测样品, 单增李斯特菌在猪肉样品中的添加浓度为 LOD。经样品处理后, 用 3 批不同试剂进行检测, 每个批次单独进行 5 次试验。根据每批测定的结果, 判断不同批次试剂对方法灵敏度的影响。

1.9 实际样品检测

人工制备单增李斯特菌污染的猪肉样品 44 份, 取 10 g 猪肉样品切碎后与 90 mL LB 肉汤混合, 中速均质 15 min。往 0.9 mL 匀浆中分别加入不同浓度的单增李斯特菌, 振荡混匀。然后将 40 份猪肉样品顺序打乱, 重新排序制备成盲样。将加标样品以 500 r/min 低速离心 30 s 以去除大颗粒猪肉颗粒, 取 50 μL 上清液与 50 μL 核酸裂解液 (含 2% Triton X-100、10 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、5% Chelex-100、0.2 mol/L 海藻糖, pH 8.0) 涡旋振荡 2 min, 然后 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清进行核酸检测。将 44 份猪肉样品经裂解液提取核酸后, 分别用 RAA-exo、行业标准 SN/T 5224—2019^[14]推荐的实时荧光 PCR 内标法同时进行检测。根据 2 种

方法的检测结果, 评估 RAA-exo 与行业标准 SN/T 5224—2019 的符合度。SN/T 5224—2019 是海关总署发布的出入境检验检疫行业标准, 全称为《出口食品中单核细胞增生李斯特菌检验方法-实时荧光 PCR 内标法》, 其核心是为出口食品中单核细胞增生李斯特菌提供精准且能监控假阴性的快速检测方案。

2 结果与分析

2.1 最佳 RAA 引物的确定

将现有的上、下游引物两两配对组合, 并进行基础 RAA 扩增。结果见图 1A、1B, a1F/a5F/a1R/a3R 引物组合的扩增效率明显高于 b1F/b4F/b1R/b4R 引物组合, 因此选取 a1F/a5F/a1R/a3R 引物组合进行进一步筛选。采用荧光型 RAA 评价 a1F/a5F/a1R/a3R 引物组合的核酸扩增效率, 结果如图 1C 所示: 所有引物组合均出现特异性扩增曲线。结果显示 a5F/a1R 组合的出峰时间为 3 min, 比其他引物组合的出峰时间都早, 而且 a5F/a1R 组合的荧光强度峰值最高, 说明 a5F/a1R 组合具有最高的扩增效率, 因此选取 a5F/a1R 组合作为该单增李斯特菌 RAA-exo 方法的扩增引物。

2.2 RAA-exo 反应体系的确定

RAA-exo 反应体系的优化结果见图 2, 当 A buffer 使用量从 20.0 μL 增加至 25.0 μL 时扩增效率逐渐提高, 而继续增加 A buffer 的用量扩增效率反而下降, 因此 A buffer 的最佳使用量为 25.0 μL 。如图 2B 所示, 当 B buffer 的使用量从 2.00 μL 增加至 2.25 μL 时, 扩增效率逐渐提高, 而继续增加 B buffer 的用量扩增效率反而下降, 因此 B buffer 最佳使用量为 2.25 μL 。如图 2C 所示, 当引物的使用量从 1.6 μL 增加至 1.8 μL 时, 扩增效率逐渐提高, 而继续增加引物的用量扩增效率不再有明显的提高, 因此引物最佳使用量为 1.8 μL 。如图 2D 所示, 当探针的使用量从 0.4 μL 增加至 0.7 μL , 扩增效率逐渐提高, 而继

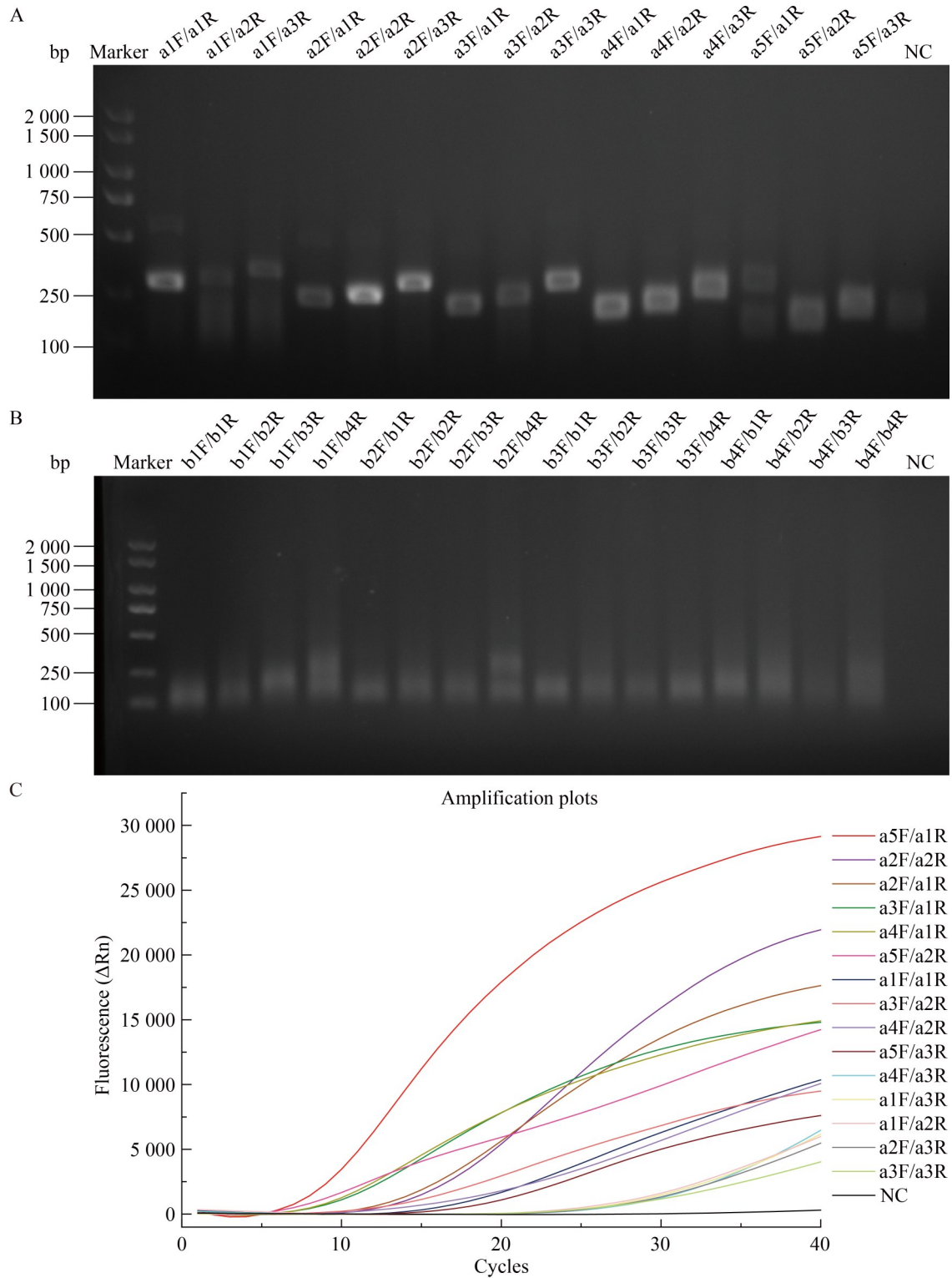


图1 RAA引物筛选结果

Figure 1 RAA primer screening results. A: Primer screening result 1 by nucleic acid electrophoresis; B: Primer screening result 2 by nucleic acid electrophoresis; C: Primer screening result by fluorescence method.

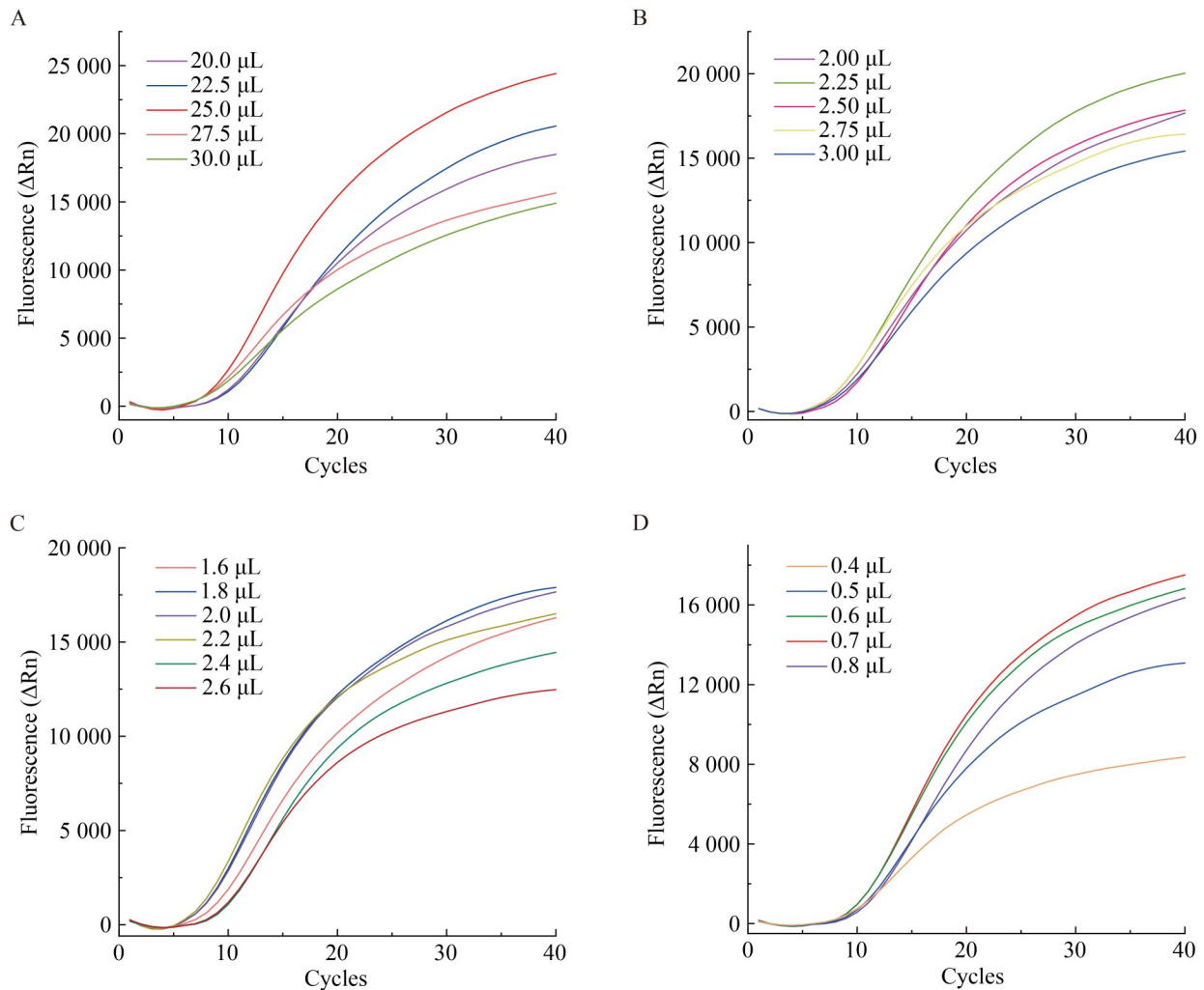


图2 RAA-exo反应体系的优化结果

Figure 2 Optimization results of the RAA-exo reaction system. A: A buffer; B: B buffer; C: RAA primers; D: Probe.

续增加探针的用量扩增效率反而下降, 因此探针最佳使用量为 0.7 μL 。因此, 选取 A buffer 25.0 μL 、B buffer 2.25 μL 、上下游引物各 1.8 μL 、探针 0.7 μL 作为最优反应体系进行后续反应。

2.3 灵敏度评估

菌液灵敏度结果如图 3A 所示, 荧光浓度随着质粒质量浓度的降低而对应降低, 当质粒质量浓度低至 0.5 copies/ μL 时该方法仍然出现明显的荧光信号, 但当质粒质量浓度继续降低将

检测不到荧光信号, 因此该方法检测质粒的最低检测限为 0.5 copies/ μL 。菌液灵敏度结果如图 3B 所示, 当细菌浓度低至 10 CFU/mL 时该方法仍然出现明显的荧光信号, 但当细菌浓度继续降低则检测不到荧光信号, 因此该方法检测细菌的最低检测限为 10 CFU/mL。

2.4 特异性评估

特异性评估结果如图 3C 所示, 只有检测单增李斯特菌 EGD-e 时出现明显的 S 型扩增曲线, 检测绵羊李斯特菌、西尔李斯特菌、英诺克李

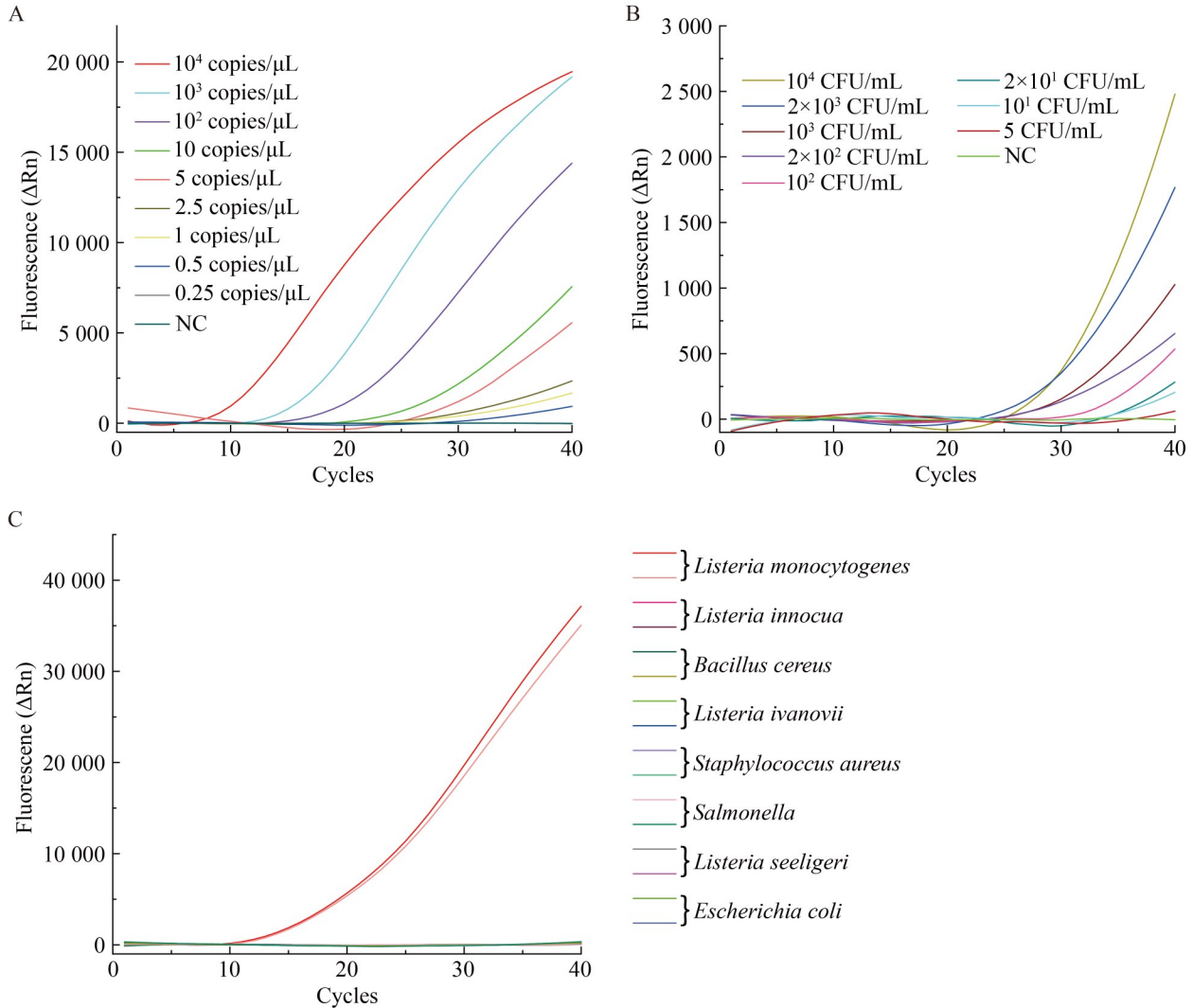


图3 方法性能评估结果

Figure 3 Evaluation results of the method's performances. A: Sensitivity of plasmid; B: Sensitivity of bacterial liquid; C: Specificity.

斯特菌、沙门氏菌 CVCC541、大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778 这 7 种细菌时均未出现明显的扩增曲线，说明该方法仅能检测单增李斯特菌，对其他 7 种细菌均无交叉反应，特异性高。

2.5 重现性结果

本方法应用于猪肉中单增李斯特菌检测的批间重现性结果表明，所有 3 批不同批次的试剂阳性率均为 100%，重现性良好。

2.6 实际样本应用结果

本研究人工制备了 44 份单增李斯特菌污染的猪肉样品，随后采用核酸裂解液进行核酸提取。核酸裂解液对猪肉的耐受性结果如图 4E 所示，结果显示在猪肉存在的情况下，核酸裂解液对单增李斯特菌的提取效果与无猪肉存在时相近，说明本研究使用的核酸裂解液提取效果良好，可用于实际样品中单增李斯特菌的核酸提取。RAA-exo 和行业标准 SN/T 5224—2019 对 44 份猪肉样品的检测结果如图 4 所示，

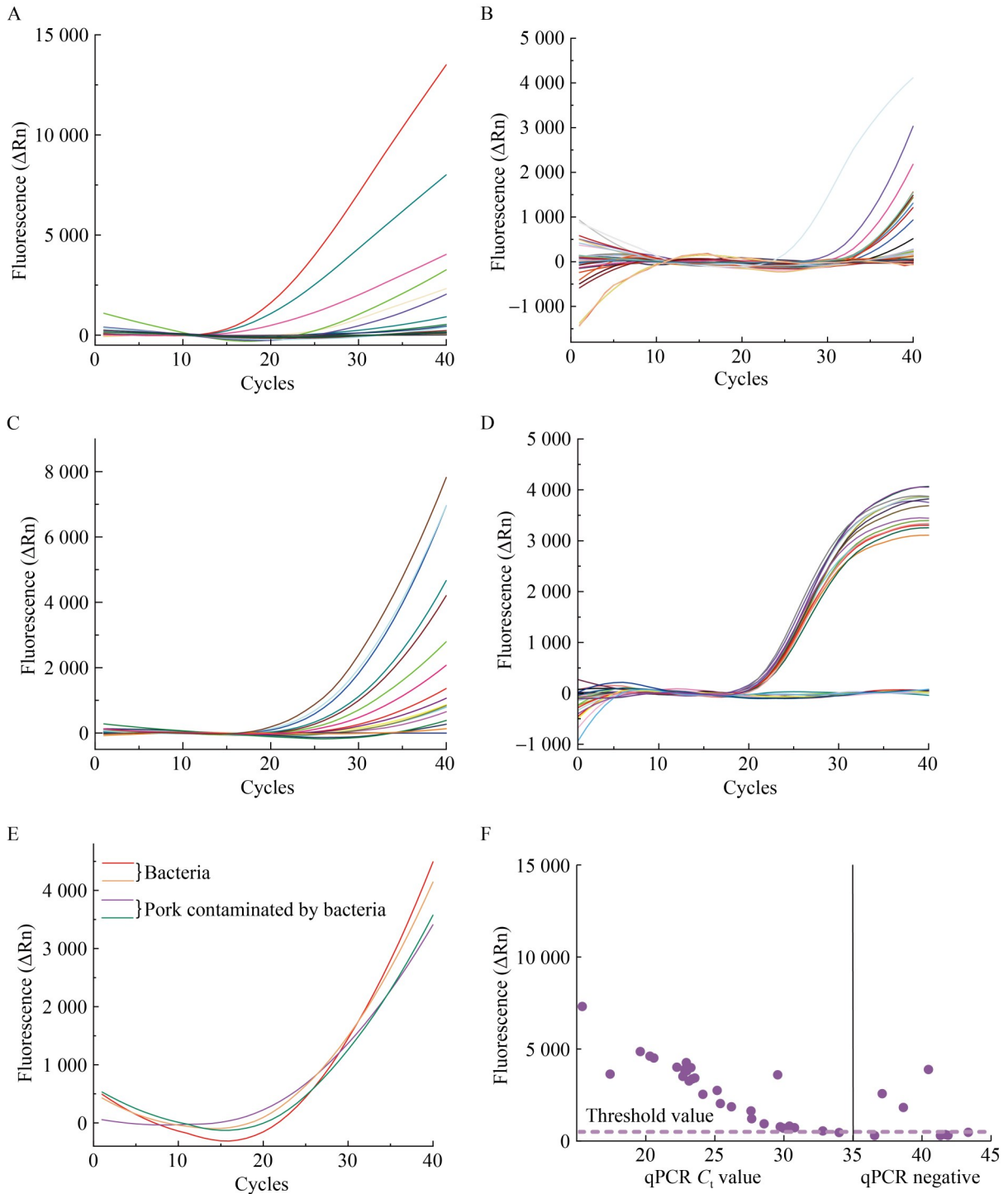


图4 实际样品检测结果

Figure 4 Detection results of actual samples. A: RAA-exo detection results for samples 1 to 26; B: RAA-exo detection results for samples 27 to 44; C: SN/T 5224—2019 detection results for samples 1 to 26; D: SN/T 5224—2019 detection results for samples 27 to 44; E: Detection of the tolerance of nucleic acid lysis solution to pork; F: Analysis chart for detection results of RAA-exo and SN/T 5224—2019.

RAA-exo 的检测结果见图 4A 和 4B, 行业标准 SN/T 5224—2019 的检测结果见图 4C 和 4D。根据 2 个方法的检测结果和方法结果的判定标准制备散点图, 见图 4F。图 4F 是基于 RAA-exo 和 SN/T 5224—2019 实验数据制作的: 首先 X 轴指的是 SN/T 5224—2019 的 C_t 值, 以 35 为分界, C_t 值小于 35 的为阳性样本, 超过 35 的为阴性样本; Y 轴是 RAA-exo 导出的实际样品的荧光强度值, 图中的“Threshold value”是 RAA-exo 的阈值, 在阈值线以上的是阳性样本, 低于阈值线的是阴性样本。根据 2 种方法各自的判定标准对检测样品进行判定, 结果表明 RAA-exo 检出阳性样本 22 个, 阴性样本 22 个(图 4A、4B); 行业标准 SN/T 5224—2019 检出阳性样本 16 个, 阴性样本 28 个(图 4C、4D), 而且行业标准 SN/T 5224—2019 和平板涂布法检出的阳性样本在 RAA-exo 检测中均被检出。对于差异样本(在 RAA-exo 中检出, 而在行业标准 SN/T 5224—2019 中未检出)进行了平板计数法验证, 结果表明 RAA-exo 的检测方法与平板计数法一致, 表明本方法 RAA-exo 的检测结果对实际样本的检测结果是可靠的。

3 讨论与结论

单增李斯特菌对低温、酸性、高渗透环境具有强抵抗力, 极易在生产和储存过程中污染食品, 奶制品、蔬菜、海鲜等重要食物来源均检测出该菌的存在^[15], 造成广泛的食物污染。据统计, 病例患者多为孕妇、新生儿、老年人以及免疫系统虚弱者^[16], 患病原因多与食用被 LM 污染的生食或冷冻食品有关。近年来, 中国单增李斯特菌病的发生率显著增长, 尤其集中于经济较为发达的城市区域^[17-18]。该病原菌对孕妇群体构成严重威胁, 非围产期孕妇的病死率高达 3.78%, 围产期孕妇流产及新生儿死亡比例高达 32.68%^[19]。单增李斯特菌是一种人畜共患病原菌, 动物李斯特菌病也在持续被报道,

患病动物大部分集中在牛、羊、鸡这 3 个养殖品种, 病死率最高达 100%^[20], 给养殖业造成严重的经济损失。这一系列数据凸显了 LM 给公共卫生领域带来的巨大挑战, 因此需从源头加强防控, 建立高效灵敏的检测方法以实现病原的早期识别, 保障食品安全与人类健康。

近些年来, 针对 LM 已建立多种快速检测技术。Etty 等^[21]利用新型载体建立了一种能特异性检测 P60 蛋白的夹心 ELISA 方法, 提升了检测效率。张海洋等^[22]优化了检测抗体与捕获抗体的种类及最佳稀释度, 建立双抗体夹心 ELISA 方法, 检测限达 10^3 CFU/mL。赵梦迪^[23]制造出 ActA 单抗竞争 ELISA 试剂盒, 将检测时限缩短至 2 h, 灵敏度和特异性分别为 100% 和 93.3%。尽管 ELISA 方法试验设备简单、对操作要求不高, 但其灵敏度相较于分子诊断技术表现较差, 且需要预先进行前增菌和单克隆抗体制备, 过程繁琐且成本较高。分子生物学诊断技术的出现解决了检测时间过长、灵敏度和特异性不高的问题, 现有常见核酸检测方法的具体详情和比较见表 2。多重 PCR 可通过设计多个特异性引物实现多病原菌的同时检测, 如 Boukharouba 等^[24]建立了一种可同时检测致病性大肠杆菌、单增李斯特菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 方法, 检测限达 10 pg/ μ L。实时荧光 PCR 通过对荧光染料的扫描可实现定量检测, 如张俊彦等^[25]基于叠氮溴化乙锭建立可区分死菌与活菌的实时荧光 PCR 技术, 检测限达每个反应 55 CFU。数字 PCR 技术大大缩短了前增菌耗时, 通过荧光信号大小即可对目标物质进行定性和绝对定量分析, 如徐佳微等^[26]以细胞壁水解酶基为靶基因建立了单增李斯特菌微滴式数字 PCR 检测方法, 最低检测限为 6.65 copies/ μ L。尽管 PCR 技术在 LM 检测领域表现出良好的应用优势, 然而它需要较为昂贵的仪器、试剂和复杂的热循环程序, 限制了其普及与推广。基于此, 等温核酸扩增技术

表2 常见核酸检测方法的比较

Table 2 Comparison of common nucleic acid detection methods

Methods	Detection temperature	Reaction time	Main materials	Cost of single reaction
PCR	Transformation: 95 °C Annealing: 55 °C Extrusion: 72 °C	1–2 h	Primers, probes, hot-start polymerase	Three yuan
LAMP	65 °C constant temperature	60 min	BST polymerase, lock-type probes, primers	Three yuan and sixty fen
RPA fluorescence method RAA fluorescence method	37 °C constant temperature	15–30 min	RAA reaction proteinase, primers, probes and RAA reaction buffer	Five yuan and twenty fen
RPA test strip RAA test strip	37 °C constant temperature	25–40 min	RAA reaction protease, primers, probes and RAA reaction buffer, lateral flow chromatography test strip	Eleven yuan and twenty fen
RPA-CRISPR/Cas and RAA-CRISPR/Cas	37 °C constant temperature	40–60 min	RAA reaction protease, RAA reaction buffer, Cas protein, primers, CrRNA, probe	Nine yuan and forty fen

应运而生。陈平亚等^[27]针对 LM 的保守基因 *actA* 建立 LAMP 检测方法, 灵敏度达 64 copies/μL。陈清莹等^[28]基于淬灭基团释放建立了可同时检测单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌的环介导等温扩增技术(DRQ-LAMP), 针对 LM 的检测限为 7.3×10^2 copies/g。岳慧敏等^[29]优化增菌条件后, LAMP 检测速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的检出限从 6.4×10^4 CFU/g (未增菌)降低至 6.4×10^1 CFU/g, 结合 6 h 前增菌将总时间控制在 8 h 内。虽然 LAMP 避免了复杂的热循环程序, 但其扩增原理复杂, 需要同时使用 4–6 个特异性引物进行反应, 生物标记成本提高, 同时检测温度高达 60 °C, 并非实现现场快速检测的最优解。RPA 和 RAA 技术凭借其独特优势在多种快速检测技术中脱颖而出, 可在 37–42 °C 恒温下工作, 检测速度快(30 min 内完成), 灵敏度高。研究者还将 RPA/RAA 技术与荧光法、试纸条法和 CRISPR/Cas 联合使用, 进一步提高 RPA/RAA 技术的灵敏度、特异性, 以及扩大方法的应用范围。郭瑞等^[30]基于 *hlyA* 基因开发荧光型 RAA 快速检测技术, 质粒最低检测限为

1 copy/μL, 菌液核酸最低检测限为 10^3 CFU/mL。Garrido-Maestu 等^[31]研究开发了荧光型 RPA, 应用于检测熏三文鱼样本中 LM, 其 LOD₅₀ 为 6.3 CFU/25 g。Chen 等^[32]在 LFA 中使用钨纳米颗粒作为荧光探针以提高灵敏度, 开发了一种 RPA-LFA, 可在 37 °C 下、30 min 内同时检测 3 种食源性病原体, 其中 LM 的检测限为 9 CFU/mL。Yang 等^[33]建立了 LM 的 RAA-CRISPR Cas12a 检测方法, 菌液最低检测限为 350 CFU/mL, 质粒最低检测限为 5.4×10^3 ng/μL。Xiao 等^[34]的研究开发了一种 LM 的 RAA-CRISPR/Cas12a 检测方法, 其检测限为 4.4 CFU/g。其中, 荧光法对设备要求不高, 在保持便捷操作的同时兼具高敏感度和高特异性优势, 较 CRISPR/Cas 反式剪切技术和试纸条检测成本低, 具有更广的普适性。

为进一步提升荧光型 RAA 的灵敏度, 本研究优化了各项反应条件, 建立一项新的单增李斯特菌 RAA-exo 检测方法。本研究基于靶基因 *hly* 设计出一系列 RAA 引物, 分析不同组合对扩增效率的影响, 确定最佳引物组合为

a5F/a1R。基于最佳的引物，系统优化反应体系，包括 A buffer、B buffer、RAA 引物和探针的使用量，显著提升了方法的灵敏度、特异性和准确度。根据性能评估结果得知，该单增李斯特菌 RAA-exo 检测方法表现出卓越的灵敏度，最低检测限达 0.5 copies/ μL 。同时其特异性高度集中于单增李斯特菌，对绵羊李斯特菌、西尔李斯特菌、英诺克李斯特菌等其他李斯特菌无交叉反应，对沙门氏菌 CVCC541、大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778 等几种食源性致病菌也无交叉反应。在实际样品检测阶段，44 份猪肉样本的检测结果准确率高于 SN/T 5224—2019 行标法，验证了其检测结果的可靠性。此外，该检测方法操作温度低(37 $^{\circ}\text{C}$)，无复杂的热循环程序，检测周期短(20 min)，只需裂解液来提取核酸，较核酸提取设备和试剂盒操作简便，普适性更高，在食品样本中单增李斯特菌即时检测领域具有广阔的市场应用潜力。

作者贡献声明

李俊峰：执行调研，数据收集与监管，撰写文章；王佳慧：数据分析，验证；项瑞生：数据收集与监管；雷晨曦：修改文章；余可心：方法论；付玉和：软件程序；宋厚辉：监督管理，提供资源；程昌勇：提供资源，获取基金，项目管理；吴芹：提出概念，获取基金，撰写文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本研究所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Shamloo E, Hosseini H, Abdi Moghadam Z, Halberg Larsen M, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance[J]. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2019, 20(4): 241-254.
- [2] Chen JQ, Regan P, Laksanalamai P, Healey S, Hu ZL. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2017, 6(3): 97-120.
- [3] Bongiovanni M, Cavallo C, Barda B, Strulak L, Bernasconi E, Cardia A. Clinical findings of *Listeria monocytogenes* infections with a special focus on bone localizations[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(1): 178.
- [4] Sun QF, Cheng JH, Lin RQ, Li JY, Zhang Y, Liang XW, Su Y, Pang R, Xue L, Zeng HY, Gu QH, Ding Y, Wu QP, Chen MT, Zhang JM. A novel multiplex PCR method for simultaneous identification of hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complex 87 and CC88 strains in China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 366: 109558.
- [5] Dalmasso M, Bolocan AS, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Muhterem M, Nicolau AI, Rovira J, Skandamis PN, Stessl B, Wagner M, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D. Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98: 8-14.
- [6] Cao Q, Shi WJ, Wei YQ, Wang JY, Wang ZL, Chong Q, Guo QQ, Zhang KZ, Gai WY, Gou HT, Xue HW. Development of an internalin-based double-antibody sandwich quantitative ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* in slaughterhouse environments[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025, 12: 1517845.
- [7] Lee Y, Yoon Y, Seo Y, Kim S, Ha J, Lee J, Choi Y, Oh H, Kim Y, Kang J, Park E, Kim WI, Lee S. Combined enrichment and quantitative polymerase chain reaction to improve sensitivity and reduce time of detection of *Listeria monocytogenes* in mushrooms[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(4): 276-283.
- [8] Fiore A, Treglia I, Ciccaglioni G, Ortoffi MF, Gattuso A. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in cooked ham[J]. *Foods*, 2023, 12(1): 193.
- [9] Du XJ, Zang YX, Liu HB, Li P, Wang S. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for *Listeria monocytogenes* detection in food[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(4): 1041-1047.
- [10] James A, Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2015, 15(11): 1475-1489.
- [11] 李焱笑. 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 (in Chinese).
- [12] Zhang TM, Liu X, Yang XH, Liu FX, Yang HT, Li XQ, Feng HM, Wu XY, Jiang G, Shen H, Dong JQ. 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.
- [13] Daddy Gaoh S, Kweon O, Ahn Y. Propidium monoazide (PMAxx) -recombinase polymerase amplification exo (RPA exo) assay for rapid detection of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate (CHX) and benzalkonium chloride (BZK) solutions[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1401.
- [14] 中华人民共和国海关总署. 出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法 实时荧光PCR内标法: SN/T 5224—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- The General Administration of Customs of the People's Republic of China. Testing methods for *Listeria monocytogenes* in exported foods real-time fluorescence PCR internal standard method: SN/T 5224—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019 (in Chinese).
- [15] 张智芳, 刘雪杰, 吴生根, 李曲文, 陈伟伟, 邓艳琴. 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, Li QW, Chen WW, Deng YQ. 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 (in Chinese).
- [16] Palacios A, Otto M, Flaherty E, Boyle MM, Malec L, Holloman K, Low M, Wellman A, Newhart C, Gollarza L, Weeks T, Muyombwe A, Lozinak K, Kafka E, O'Halloran D, Rozza T, Nicholas D, Ivory S, Kreil K, Huffman J, 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.
- [17] Wang H, Luo LJ, Zhang ZD, Deng JP, Wang Y, Miao YM, Zhang L, Chen X, Liu X, Sun SS, Xiao B, Li Q, Ye CY. 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.
- [18] Li WW, Bai L, Fu P, Han HH, Liu JK, Guo YC. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(8): 459-466.
- [19] Fan ZL, Xie J, Li Y, Wang HL. Listeriosis in China's mainland: a systematic review[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, 81: 17-24.
- [20] 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 (in Chinese).
- [21] Etty MC, D'Auria S, Shankar S, Salmieri S, Coutu JL, Baraketi A, Jamshidan M, Fraschini C, Lacroix M. 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.
- [22] 张海洋, 刘爽, 戚雪芹, 王权, 陈兆国, 韩先干, 蒋蔚. 单核细胞增生李斯特菌的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, Wang Q, Chen ZG, Han XG, Jiang W. 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 (in Chinese).
- [23] 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 monocytogenes* cELISA kit based on ActA monoclonal antibody[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022 (in Chinese).
- [24] Boukharouba A, González A, García-Ferrús M, Ferrús MA, Botella S. Simultaneous detection of four main foodborne pathogens in ready-to-eat food by using a simple and rapid multiplex PCR (mPCR) assay[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(3): 1031.
- [25] 张俊彦, 梅玲玲, 徐昌平, 占利, 陈鸿鹤, 张云怡, 陈建才, 张政, 杨勇. EMA实时荧光PCR技术检测食品中单核增生李斯特活菌方法研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(11): 1007-1012.
- Zhang JY, Mei LL, Xu CP, Zhan L, Chen HH, Zhang YY, Chen JC, Zhang Z, Yang Y. New EMA real-time fluorescence PCR method for detection of alive *Listeria monocytogenes* in foods[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2017, 33(11): 1007-1012 (in Chinese).
- [26] 徐佳微, 辛长卫, 李铁山, 赵格, 曲志娜, 赵建梅, 高玉斌, 张喜悦, 王君玮. 单增李斯特菌微滴式数字PCR检测方法的建立及在标准物质研制方面的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(10): 2413-2423.
- Xu JW, Xin CW, Li TS, Zhao G, Qu ZN, Zhao JM, Gao YB, Zhang XY, Wang JW. Establishment of droplet digital PCR method for detection of *Listeria monocytogenes* and its application in the development of reference materials[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(10): 2413-2423 (in Chinese).
- [27] 陈平亚, 何翠华, 张亮亮, 吴少荣, 王绥家, 赵光远. 单核细胞增生李斯特菌LAMP检测方法的建立及应用[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(10): 74-78.
- Chen PY, He CH, Zhang LL, Wu SR, Wang SJ, Zhao GY. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, 51(10): 74-78 (in Chinese).
- [28] 陈清莹, 刘丹, 张杏果, 韦锦源, 钟青萍. 基于双重DARQ-LAMP方法同时检测单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(22): 279-286.

- Chen QY, Liu D, Zhang XG, Wei JY, Zhong QP. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* based on dual DARQ-LAMP method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(22): 279-286 (in Chinese).
- [29] 岳慧敏, 李海鑫, 罗瑞平, 赵亮. 基于 LAMP 技术检测速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的增菌方法研究及应用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(24): 128-135.
Yue HM, Li HX, Luo RP, Zhao L. Study on the enrichment methods and application of LAMP technology for detection of *Listeria monocytogenes* in frozen meat products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(24): 128-135 (in Chinese).
- [30] 郭瑞, 赵林萍, 韩小改, 郭毅, 任宝红. 基于荧光探针重组酶介导等温扩增技术快速检测食源性单增李斯特菌方法的建立[J]. *食品安全导刊*, 2023(32): 101-104, 108.
Guo R, Zhao LP, Han XG, Guo Y, Ren BH. Establishment of a rapid detection method for foodborne *Listeria monocytogenes* using fluorescence probe recombinant enzyme mediated isothermal amplification technology[J]. *China Food Safety Magazine*, 2023(32): 101-104, 108 (in Chinese).
- [31] Garrido-Maestu A, Azinheiro S, Carvalho J, Prado M. Combination of immunomagnetic separation and real-time recombinase polymerase amplification (IMS-qRPA) for specific detection of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon samples[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(7): 1881-1887.
- [32] Chen K, Ma B, Li JL, Chen EJ, Xu Y, Yu XP, Sun CX, Zhang MZ. 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.
- [33] Yang YJ, Kong XX, Yang JL, Xue JX, Niu B, Chen Q. Rapid nucleic acid detection of *Listeria monocytogenes* based on RAA-CRISPR Cas12a system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(6): 3477.
- [34] Xiao YR, Ren HL, Wang H, Zou DY, Liu YX, Li HS, Hu P, Li YS, Liu ZS, Lu SY. A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas12a system[J]. *Talanta*, 2023, 259: 124558.