

## 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

岳慧敏, 李海鑫, 罗瑞平, 赵 亮

### Study on the Enrichment Methods and Application of LAMP Technology for Detection of *Listeria monocytogenes* in Frozen Meat Products

YUE Huimin, LI Haixin, LUO Ruiping, and ZHAO Liang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050043>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光SPIA方法的建立

Establishment of real time fluorescence single primer isothermal amplification for *Listeria monocytogenes*

食品工业科技. 2017(16): 275-279

#### 食品中单核细胞增生李斯特氏菌两种定量检测方法的比较

Comparison of two methods for detection of *Listeria monocytogenes* in foods

食品工业科技. 2018, 39(7): 263-267

#### 即食食品中单增李斯特氏菌快速检测技术的研究进展

Research Progress of Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Food

食品工业科技. 2020, 41(10): 358-362

#### 胡椒油中萜类化合物对单增李斯特菌抑菌机理及在冷鲜肉中的应用

Antibacterial Mechanism of Terpenoids in Pepper Oil against *Listeria monocytogenes* and Its Application in Cold Meat

食品工业科技. 2019, 40(19): 89-93

#### 胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌抑菌机理的研究

Study on the Antimicrobial Mechanism of *Listeria monocytogenes* from Pepper Monoterpenoids

食品工业科技. 2018, 39(23): 154-158

#### 海产品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单增李斯特菌三重荧光定量PCR检测方法的建立

Establishment of triple real-time PCR detection method for *Vibrio cholera*, *Vibrio Parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in marine food products

食品工业科技. 2017(04): 81-86



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

岳慧敏, 李海鑫, 罗瑞平, 等. 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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050043

YUE Huimin, LI Haixin, LUO Ruiping, et al. 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 with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050043

# 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

岳慧敏<sup>1,2</sup>, 李海鑫<sup>3</sup>, 罗瑞平<sup>3</sup>, 赵亮<sup>1,2,4,\*</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中国农业大学(兴化)健康食品产业研究院, 江苏兴化 225700;

3. 泰州安井食品有限公司, 江苏兴化 225700;

4. 食品质量安全北京实验室, 食品科学与营养工程学院, 中国农业大学, 北京 100083)

**摘要:** 本研究比较四种增菌培养基 (Fraser、Half Fraser、LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>) 对速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的增殖效果, 评价其对速冻肉糜类制品中单增李斯特菌 LAMP 检测检出限的影响, 并将优化后的增菌条件结合 LAMP 技术应用于人工污染样本和实际生产线样本检测。结果显示, 四种增菌培养基中 Half Fraser 的增菌效果最好, 在 6 h 内实现单增李斯特菌活菌数从  $6.4 \times 10^1$  CFU/mL 增至  $9.4 \times 10^4$  CFU/mL。结合优化增菌条件后, LAMP 检测速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的检出限从  $6.4 \times 10^4$  CFU/g (未增菌) 降低至  $6.4 \times 10^1$  CFU/g。利用人工污染单盲样本以及生产线实际样本验证方法的可靠性, 结果显示增菌结合 LAMP 方法与国标法结果一致, 准确度 100%。该方法样本处理、检测、结果判定总时间控制在 8 h 内, 能够满足企业现场检测需要。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特氏菌, 速冻肉糜类制品, 增菌培养, 环介导等温扩增 (LAMP)

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)24-0128-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050043

本文网刊:



## Study on the Enrichment Methods and Application of LAMP Technology for Detection of *Listeria monocytogenes* in Frozen Meat Products

YUE Huimin<sup>1,2</sup>, LI Haixin<sup>3</sup>, LUO Ruiping<sup>3</sup>, ZHAO Liang<sup>1,2,4,\*</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Xinghua Industrial Research Centre for Food Science and Human Health,

China Agricultural University, Xinghua 225700, China;

3. Taizhou Anjoy Foods Co., Ltd., Xinghua 225700, China;

4. Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In this study efficiency of four enrichment media (Fraser, Half Fraser, LB<sub>1</sub>, LB<sub>2</sub>) were evaluated for *Listeria monocytogenes* in frozen meat products, and their effects on the detection limit of *Listeria monocytogenes* by LAMP were assessed in frozen meat products. Combined with LAMP technology, the optimized method was applied to the detection of artificial contamination samples and samples from production line. The results showed that Half Fraser represented the best enrichment among the four media, which could increase the number of live *Listeria monocytogenes* from  $6.4 \times 10^1$  CFU/mL to  $9.4 \times 10^4$  CFU/mL within 6 h. The detection limit of *Listeria monocytogenes* in frozen meat products reduced from  $6.4 \times 10^4$  CFU/g (without enrichment) to  $6.4 \times 10^1$  CFU/g by LAMP with Half Fraser-enrichment. The reliability of the

收稿日期: 2021-05-10

基金项目: 国家自然科学基金 (32072196, 31901625); 生猪产业技术体系北京市创新团队 (BAIC-2020)。

作者简介: 岳慧敏 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品安全, E-mail: 18131378325@163.com。

\* 通信作者: 赵亮 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lzhaol@cau.edu.cn。

method was verified by using artificial contamination samples and actual samples from production line of the plant. The results obtained from Half Fraser-LAMP were consistent with the results from national standard method with an accuracy of 100%. The whole procedure of sample processing and testing was within 8 h, which could meet the on-site testing requirements of enterprises.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; frozen meat products; enrichment culture; loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

速冻肉糜类制品即我们熟知的“火锅料制品”,是速冻调制食品中的一大类别,其主要原料为畜禽肉、水产品及其制品<sup>[1-3]</sup>。我国是速冻肉糜类制品产销大国,其市场销售规模由 2010 年 160 亿元提升至 2017 年近 273 亿元,复合年均增长率为 8%<sup>[4]</sup>。随着食物结构和食物消费的变化,速冻肉糜类制品市场规模还将不断扩大<sup>[5]</sup>。然而速冻肉糜类制品在加工过程热处理强度低且储运过程需要冷链支持,具有较高的微生物污染风险<sup>[6-7]</sup>。研究发现,单核细胞增生李斯特氏菌是速冻肉糜类制品中的主要食源性致病菌,据调查显示,此类产品的原料污染率高,生肉中单增李斯特菌检出率为 19.1%<sup>[8]</sup>,海产品中检出率为 31%<sup>[9]</sup>。在生产、食用过程中加热不足则易存活,引发食物中毒<sup>[10-12]</sup>。因此开展单增李斯特菌的检测对速冻肉糜类制品安全保障具有重要意义<sup>[13-15]</sup>。

目前我国常用的检验方法是传统培养检测法,该方法准确度高,但其操作复杂,检测时间长,检测结果滞后性不能满足食品中,尤其是加工环节样本的单增李斯特菌的快速检测和追溯<sup>[15-16]</sup>。因此需要建立一种速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的快速检测方法。检测食品中单增李斯特菌的快速检测方法有聚合酶链式反应(PCR)、环介导等温扩增技术(LAMP)、酶联免疫吸附法(ELISA)及相关改良方法等。其中,环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification),简称 LAMP,具有快速简便、成本低、特异性强等优点<sup>[17-19]</sup>,已在食源性致病菌的快速检测中得到广泛应用<sup>[20-25]</sup>。对于食品中单增李斯特菌的 LAMP 检测,在乳制品<sup>[26]</sup>、生鸡肉样品中<sup>[27]</sup>已有报道,然而针对速冻肉糜类制品的研究甚少。作为一种速冻调理肉制品,其中复杂成分对增菌、DNA 提取、后续 LAMP 反应的影响尚不明确。本研究基于已建立的速冻肉糜类制品单增李斯特菌 LAMP 检测技术基础上,通过四种增菌培养基的比较,筛选出一种增殖效果最佳的增菌培养基,以降低 LAMP 方法的检出限,并实现单增李斯特菌 LAMP 检测方法在速冻肉糜类制品中的应用,预期一个工作日完成检测,以期为企业快速检测速冻肉糜类制品中单增李斯特菌提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, FSCC 178006/ATCC 19115) 广东环凯微生物

科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、SYBR Green I (10000×)、6×DNA 电泳 Loading Buffer 北京天根生化科技有限公司;含 0.6% 酵母膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)、李氏菌增菌肉汤(LB<sub>1</sub>, LB<sub>2</sub>)基础、Half-Fraser 培养基、Fraser 培养基 青岛海博生物技术有限公司;Bst 2.0 DNA Polymerase(8000 U/mL)、dNTP Mixture、Gelred 核酸染料、DEPC 水 北京言必信科技有限公司;鸡小胸原料、亲亲肠(速冻机入口处)、亲亲肠(速冻机出口处)、包心鱼丸(速冻机入口处)、包心鱼丸(速冻机出口处) 样本采集自速冻肉糜类制品工厂生产线;速冻肉糜类样品 具体采样信息如表 1 所示。

表 1 样本种类及数量  
Table 1 Type and number of samples

样本种类	样本数量			合计
	超市 A	超市 B	超市 C	
速冻肉丸	3	4	3	10
速冻鱼丸	4	2	4	10
速冻香肠制品	3	2	5	10
合计	10	8	12	30

1300 SERIES A2 生物安全柜 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ZDX35BI 自动高压蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;THZ-C 恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂;DNP-9082 电热恒温培养箱、DK-S24 电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;Infinite® M200 Pro 多功能酶标仪 瑞士 TECAN 公司;SILVER 拍击式均质机 西班牙 IUL 公司;165-8001 电泳仪、Sub-Cell® GT 水平电泳槽 美国 Bio-rad 公司;ChampGel 5000 全自动凝胶成像仪 北京赛智创业科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养 将-80℃保藏的甘油菌种用 TSB-YE 液体培养基活化,于恒温振荡器中 37℃,220 r/min 培养 8 h,连续活化至第三代作为实验用培养液。

1.2.2 人工污染不同浓度菌液样品的制备 用于人工污染的速冻肉糜类样品经 GB 4789.30-2016 检测证实不含有单增李斯特菌。在生物安全柜中无菌操作,取速冻肉糜类样品 25 g 加入到含 225 mL 的 TSB-YE 液体培养基的均质袋中,在拍击式均质机上连续均质 2 min,此溶液即为速冻肉糜类样品均质液。



依据国标和 ISO 标准<sup>[28]</sup>, 本实验选用 LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>、Fraser 和 Half-Fraser 四种增菌培养基作为筛选对象, 将已知浓度的初始菌液( $6.4 \times 10^9$  CFU/mL)通过 10 倍梯度稀释, 首先制备浓度分别为  $6.4 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^2$  CFU/mL 的菌液。

然后取上述不同浓度的初始菌液 1 mL 分别加入到 9 mL 速冻肉糜类样品均质液中, 混合均匀后分别接种到 90 mL 四种增菌培养基中, 使增菌培养基中的菌液终浓度分别大于  $10^2$  CFU/mL ( $640$  CFU/mL)、 $10^1$  CFU/mL ( $64$  CFU/mL)、小于  $10$  CFU/mL ( $6.4$  CFU/mL), 于恒温振荡器中  $37^\circ\text{C}$  培养。

以 OD<sub>600 nm</sub> 值和平板计数活菌数为检测指标, 在 2、4、6、8 h 监测目标菌的生长情况。

**1.2.3 基因组 DNA 提取** 使用细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN)提取 DNA, 按照说明书进行操作。

**1.2.4 LAMP 反应操作程序** LAMP 反应体系: 外引物: 内引物浓度比 1:4, Mg<sup>2+</sup>浓度为 6 mmol/L, dNTPs 浓度 1.4 mmol/L, Bst DNA 聚合酶浓度为 800 U/mL, DNA 模板, 无酶无菌水, 体系 25  $\mu\text{L}$ 。选择 *hly A* 基因作为靶基因<sup>[29]</sup>, 引物序列如表 2 所示。

表 2 LAMP 引物序列<sup>[29]</sup>  
Table 2 Sequences of LAMP primers<sup>[29]</sup>

引物名称	引物序列 (5'-3')
F3	TTGCGCAACAACTGAAGC
B3	GCTTTTACGAGAGCACCTGG
FIP	CGTGTTCCTTTTCGATTGGCGTCTTTT TTCATCCATGGCACCACC
BIP	CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTTT TGGATTCTTCTTTTCTCCACAAC

加入各反应物于 200  $\mu\text{L}$  离心管中, 混合均匀, 在  $61^\circ\text{C}$  恒温水浴锅中反应 40 min。取产物 5  $\mu\text{L}$  与 1  $\mu\text{L}$  Loading Buffer 混合均匀, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察特征性电泳图谱, 同时在产物中加入 1  $\mu\text{L}$  SYBR Green I 荧光染料<sup>[30]</sup>, 观察颜色变化。

**1.2.5 增菌时间的确定** 当接种量为 64 CFU/mL 时, 在 Half Fraser 培养基增菌过程中, 分别取 0、2、4、6、8 h 的菌液, 提取 DNA 模板后, LAMP 方法检测, 以电泳检测出现梯形条带及 SYBR Green I 荧光染料呈现阳性绿色为检测指标, 确定该方法的最短增菌时间。

**1.2.6 增菌优化前 LAMP 检出限评价** 将已知浓度的初始菌量( $6.4 \times 10^9$  CFU/mL)通过 10 倍梯度稀释, 使菌液浓度分别为  $6.4 \times 10^9 \sim 6.4 \times 10^1$  CFU/mL, 分别污染到速冻肉糜类样品中, 模拟食物中的初始菌量分别为  $6.4 \times 10^9 \sim 6.4 \times 10^1$  CFU/g, 分别提取其基因组 DNA, 进行 LAMP 扩增。将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察是否产生梯形条带, 同时进行 SYBR Green I 颜色反应, 探究增菌优化前 LAMP 方法的检出限。

**1.2.7 增菌优化后 LAMP 检出限评价** 将已知浓度

的初始菌量( $6.4 \times 10^9$  CFU/mL)通过 10 倍梯度稀释, 使菌液浓度分别为  $6.4 \times 10^8 \sim 6.4 \times 10^0$  CFU/mL, 分别污染到速冻肉糜类样品中, 模拟食物中的初始菌量分别为  $6.4 \times 10^8 \sim 6.4 \times 10^0$  CFU/g。再分别接种于增菌培养基中(依据国标, 样品与增菌培养基比例按 1:9 添加), 均质后于  $37^\circ\text{C}$  增菌 6 h, 分别提取其基因组 DNA, 进行 LAMP 扩增。将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察是否产生梯形条带, 同时进行 SYBR Green I 颜色反应, 探究增菌优化后 LAMP 方法的检出限。

**1.2.8 人工污染速冻肉糜类盲样检测** 从市场随机采样, 购买速冻肉丸 10 份, 速冻鱼丸 10 份, 速冻香肠制品 10 份, 共计 30 份。“火锅料制品”种类繁多, 包括牛肉丸、香菇贡丸、包心鱼丸、亲亲肠等, 按产品主要原料及加工工艺将其主要分为三类, 即速冻肉丸、速冻鱼丸、速冻香肠制品。30 份样品经 GB 4789.30-2016 检测, 均不含单增李斯特菌, 为了验证本实验建立的 LAMP 方法的准确度, 人工污染 10 份样品(污染浓度和数量分别为:  $6.4 \times 10^1$  CFU/g 三份样品,  $6.4 \times 10^2$  CFU/g 三份样品,  $6.4 \times 10^3$  CFU/g 四份样品)后随机混合制成盲样, 分别用传统培养方法和 LAMP 方法重新检测这 30 份样品。

传统培养方法按照 GB 4789.30-2016<sup>[15]</sup> 进行操作。LAMP 方法检测按照无菌操作, 取速冻肉糜类样品 25 g, 放入无菌均质袋, 加入 225 mL Half-Fraser 增菌液, 在拍击式均质器上连续均质 2 min, 于恒温振荡器中  $37^\circ\text{C}$  增菌 6 h, 用试剂盒提取 DNA 模板。LAMP 反应体系按照 1.2.4 操作。

**1.2.9 企业生产线样本检测** 某食品企业提供生产线样本 30 份, 包括鸡小胸原料、亲亲肠(速冻机入口处)、亲亲肠(速冻机出口处)、包心鱼丸(速冻机入口处)、包心鱼丸(速冻机出口处)。分别用传统培养方法和 LAMP 方法进行检测。

## 1.3 数据处理

实验数据使用 SPSS 17.0 进行统计分析, 结果以平均数 $\pm$ 标准差表示。使用单因素方差分析(one way ANOVA)伴随 LSD 多重比较, 当  $P < 0.05$  时, 认为组间具有显著性差异。之后使用 Origin Pro 软件绘制柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 增菌培养基的选择

**2.1.1 不同接种量的菌在 Half Fraser 中的增菌情况** 如图 1 所示, 单增李斯特菌的增菌效果与初始菌量有关系, 初始菌量越大, 生长速度越快。使用 SPSS 17.0 对实验数据进行单因素方差分析(one way ANOVA)分析, 当接种量为 640 CFU/mL 时, 生长至 4 h, 其 OD 值为 0.49, 与初始菌量有显著性差异( $P < 0.05$ ); 当接种量为 64 CFU/mL 时, 生长至 4 h, 其 OD 值为 0.38, 与初始菌量差异不显著( $P > 0.05$ ), 增菌至 6 h, 其 OD 值为 0.58, 差异显著( $P < 0.05$ ); 当接种量为 6.4 CFU/mL 时, 与 64 CFU/mL 增殖情况

类似,生长至 6 h,其 OD 值为 0.45,此时与初始菌量有显著性差异( $P<0.05$ )。

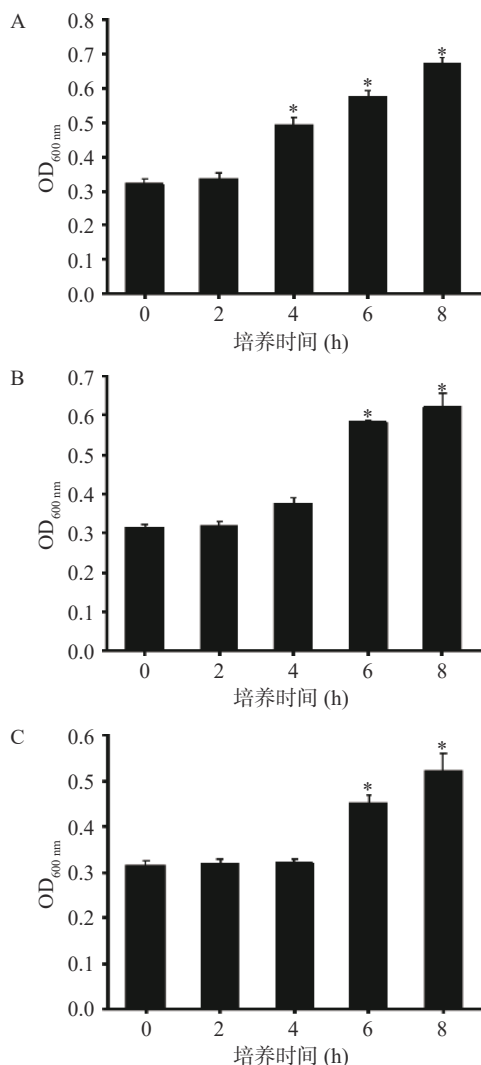


图 1 不同接种量的菌在 Half Fraser 中的增菌情况

Fig.1 Bacteria increase with different inoculation amounts in Half Fraser

注: A: 接种量 $>10^2$  (640 CFU/mL); B: 接种量 $10^1$  (64 CFU/mL); C: 接种量 $<10$  (6.4 CFU/mL); \*表示与 0 h 时相比差异显著,  $P<0.05$ 。图 2~图 4 同。

**2.1.2 不同接种量的菌在 Fraser 中的增菌情况** 如图 2 所示,与 Half Fraser 对比发现,当接种量为 640 CFU/mL 时,生长至 6 h,其 OD 值为 0.47,此时与初始菌量有显著性差异( $P<0.05$ );当接种量为 64 CFU/mL 时,增菌至 6 h,其 OD 值为 0.43,差异显著( $P<0.05$ );当接种量为 6.40 CFU/mL 时,需增菌至 8 h,目标菌才会有显著性的生长情况( $P<0.05$ ),此时 OD 值为 0.48,初步判定 Half Fraser 增菌效果更好。通过对比两种增菌液培养基成分发现,Half Fraser 和 Fraser 基本成分一致,后者的抑菌剂是前者的两倍,高浓度的抑菌剂使目标菌生长速度变慢。

**2.1.3 不同接种量的菌在 LB<sub>1</sub> 中的增菌情况** 如图 3 所示,当接种量小于等于 640 CFU/mL 时,其 OD 值与初始菌量均无显著性差异( $P>0.05$ ),这表明单增李

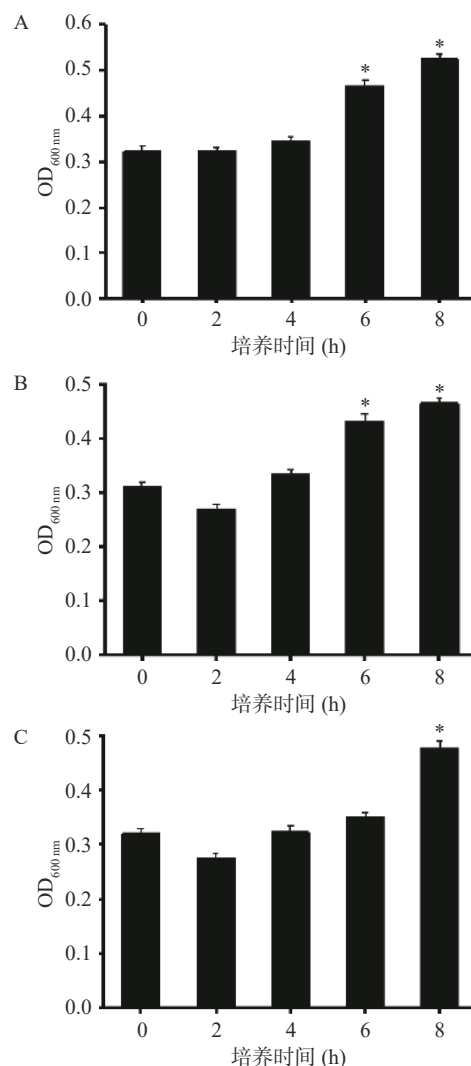


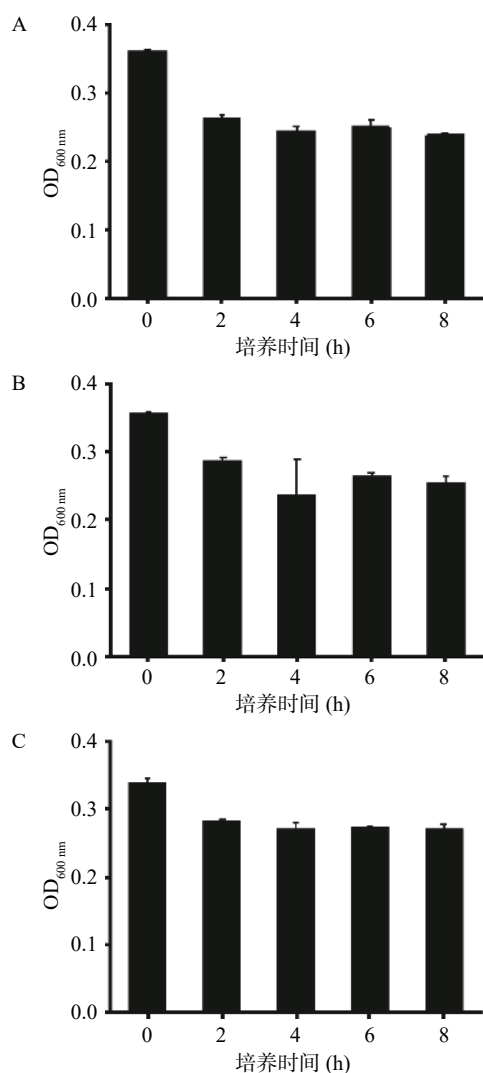
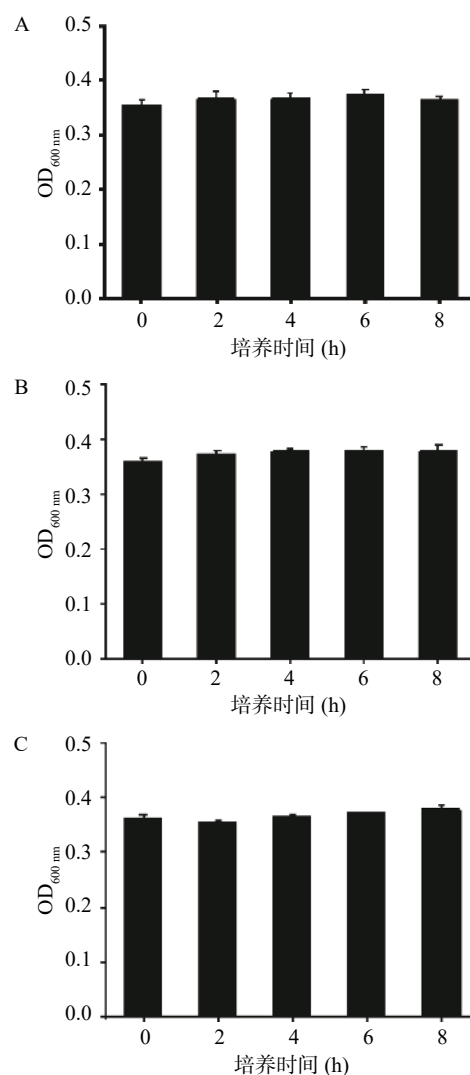
图 2 不同接种量的菌在 Fraser 中的增菌情况

Fig.2 Bacteria increase with different inoculation amounts in Fraser

斯特菌 8 h 内在 LB<sub>1</sub> 中增菌效果不佳,这可能与培养基中添加的抑菌剂有关,与 Half Fraser 和 Fraser 相比, LB<sub>1</sub> 中添加的抑菌剂吡啶黄素和萘啶酮酸浓度较高,抑制杂菌效果好,但却造成了单增李斯特菌生长速度较慢,如果要达到较好的增菌效果,可能需要更长的增菌时间。GB 4789.30-2016 检测中一般增菌(24±2) h,本实验预筛选一种增菌速度快的增菌培养基(一个工作日即可完成检测),因此 LB<sub>1</sub> 可能不适合作为本实验的前增菌培养基。

**2.1.4 不同接种量的菌在 LB<sub>2</sub> 中的增菌情况** 如图 4 所示,当接种量小于等于 640 CFU/mL 时,其 OD 值与初始菌量均无显著性差异( $P>0.05$ ),单增李斯特菌 8 h 内在 LB<sub>2</sub> 增菌液中生长受到了抑制。与 LB<sub>1</sub> 相比, LB<sub>2</sub> 中添加的抑菌剂吡啶黄素和萘啶酮酸浓度不同,但与 Half Fraser 和 Fraser 相比,抑菌剂浓度仍然较高,这可能是造成 8 h 内 Half Fraser 肉汤对单增李斯特菌的增菌效果优于 LB 肉汤的主要原因,因此 Half Fraser 肉汤更适合作为本实验的增菌培养基。

**2.1.5 不同接种量的菌在四种培养基中的活菌数**

图3 不同接种量的菌在 LB<sub>1</sub> 中的增菌情况Fig.3 Bacteria increase with different inoculation amounts in LB<sub>1</sub>图4 不同接种量的菌在 LB<sub>2</sub> 中的增菌情况Fig.4 Bacteria increase with different inoculation amounts in LB<sub>2</sub>

当菌液浓度低于  $6.4 \times 10^4$  CFU/mL, 使用细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN)提取 DNA, 核酸提取浓度不能满足 LAMP 检测, 因此需增菌至  $6.4 \times 10^4$  CFU/mL 以上。结果如表 3、表 4 所示, 单增李斯特菌在四种增菌液中的平板计数结果与 OD<sub>600nm</sub> 值结果趋势一致。单增李斯特菌的增菌效果与初始菌量有关系, 初始菌量越大, 生长速度越快。可以看到, 四种增菌培养基中, Half Fraser 的增菌效果最好, 当接种量为 640 CFU/mL 时, 增菌 4 h, 菌液浓度可达到  $1.2 \times$

$10^4$  CFU/mL; 当接种量为 64 CFU/mL 时, 增菌 6 h, 菌液浓度可达到  $9.4 \times 10^4$  CFU/mL; 当接种量为 6.4 CFU/mL 时, 8 h 内菌液浓度与 0 h 无显著性差异。综上所述, 选取 Half Fraser 为本实验的增菌培养基, 检出限最低降至 64 CFU/mL。

## 2.2 增菌时间的确定

结果如图 5 所示, 至少增菌 6 h 才可满足后续 DNA 的提取, 琼脂糖凝胶电泳可检测出梯形条带, 核酸荧光染料的染色结果呈阳性绿色。因此, 确定该方

表 3 接种量 640 CFU/mL 时单增李斯特菌在四种增菌液中生长差异性比较

Table 3 Comparison of growth situation of *Listeria monocytogenes* in four kinds of culture medium at 640 CFU/mL

培养基	单增李斯特菌浓度(lg CFU/mL)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Half Fraser	2.806±0.002	2.864±0.036	4.064±0.042*	5.960±0.030*	6.908±0.035*
Fraser	2.806±0.002	2.822±0.003	2.886±0.009	4.004±0.009*	5.851±0.050*
LB <sub>1</sub>	2.806±0.002	2.726±0.020	2.708±0.013	2.719±0.018	2.710±0.011
LB <sub>2</sub>	2.806±0.002	2.796±0.011	2.808±0.012	2.808±0.010	2.827±0.014

注: \*表示与 0 h 时相比, 差异显著,  $P < 0.05$ 。当接种量  $< 10$  CFU/mL (6.4 CFU/mL), 8 h 内其生长情况在四种培养基中与 0 h 均无显著性差异。表 4 同。

表 4 接种量 64 CFU/mL 时单增李斯特菌在四种增菌液中生长差异性比较

Table 4 Comparison of growth situation of *Listeria monocytogenes* in four kinds of culture medium at 64 CFU/mL

培养基	单增李斯特菌浓度(lg CFU/mL)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Half Fraser	1.817±0.011	1.924±0.025	2.149±0.042	4.973±0.020*	5.919±0.016*
Fraser	1.817±0.011	1.710±0.021	1.907±0.035	2.960±0.020	4.914±0.017*
LB <sub>1</sub>	1.817±0.011	1.687±0.022	1.630±0.027	1.675±0.024	1.678±0.028
LB <sub>2</sub>	1.817±0.011	1.869±0.005	1.877±0.027	1.892±0.005	1.910±0.014

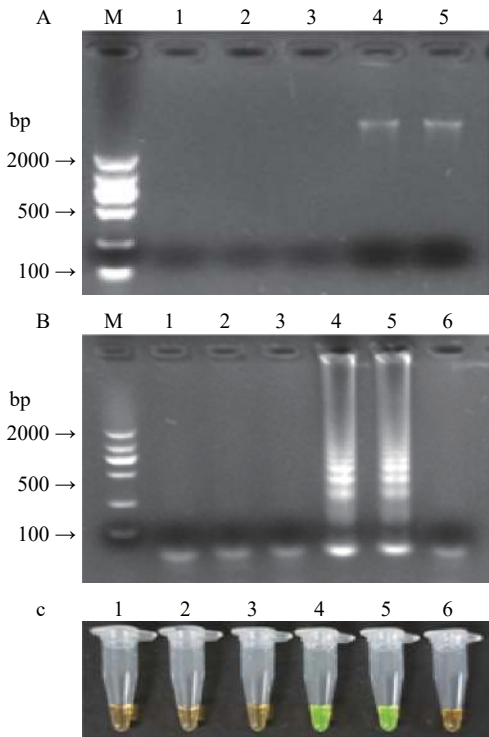


图 5 增菌优化反应时间的确定

Fig.5 Determination of reaction time for enrichment

注: A: 不同时间点提取的 DNA 电泳图, B: LAMP 产物电泳图, C: LAMP 产物染色结果; M: D2000 Marker, 泳道 1: 0 h, 泳道 2: 2 h, 泳道 3: 4 h, 泳道 4: 6 h, 泳道 5: 8 h, 泳道 6: 阴性对照。

法的最短增菌时间为 6 h。

2.3 增菌优化前 LAMP 方法的检出限

结果如图 6 所示,当菌液浓度为  $6.4\times10^4$  CFU/mL 时, LAMP 反应后可检测到梯形条带, SYBR Green I 染色结果为绿色, 证明发生了特异性扩增, 检测结果呈阳性; 而当菌液浓度为  $6.4\times10^3$  CFU/mL 时, LAMP 扩增后未检测到梯形条带, SYBR Green I 染色结果为橙色, 检测结果呈阴性, 因此, 增菌优化前, LAMP 检测人工污染速冻肉糜类制品单增李斯特菌的检出限为  $6.4\times10^4$  CFU/g。

2.4 增菌优化后 LAMP 方法的检出限

结果如图 7 所示,当菌液浓度为  $6.4\times10^1$  CFU/mL 时, 通过 6 h 的前增菌, LAMP 反应后可检测到梯形条带, SYBR Green I 染色结果为绿色, 表明发生了特异性扩增, 即结果呈阳性。当菌液浓度为 6.4 CFU/mL 时, 电泳未检测到梯形条带, SYBR Green I 染色结果为橙色, 即结果呈阴性, 表明此菌液浓度下, 没有发

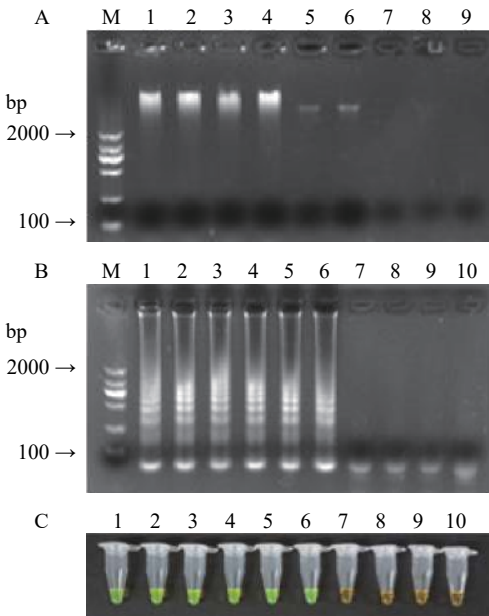


图 6 增菌优化前 LAMP 方法检出限

Fig.6 Detection limit of LAMP before enrichment

注: A: DNA 电泳图, B: LAMP 产物电泳图, C: LAMP 产物染色结果; 泳道 M: D2000 Marker, 泳道 1:  $6.4\times10^9$  CFU/g, 泳道 2:  $6.4\times10^8$  CFU/g, 泳道 3:  $6.4\times10^7$  CFU/g, 泳道 4:  $6.4\times10^6$  CFU/g, 泳道 5:  $6.4\times10^5$  CFU/g, 泳道 6:  $6.4\times10^4$  CFU/g, 泳道 7:  $6.4\times10^3$  CFU/g, 泳道 8:  $6.4\times10^2$  CFU/g, 泳道 9:  $6.4\times10^1$  CFU/g, 泳道 10: 阴性对照。

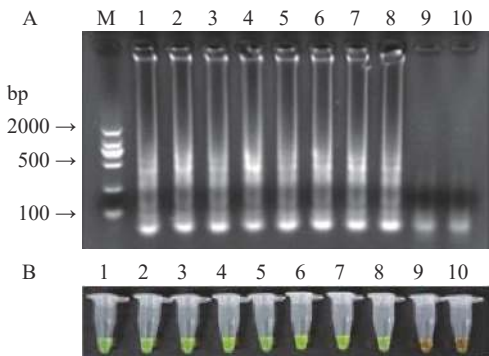


图 7 增菌优化后 LAMP 方法检出限

Fig.7 Detection limit of LAMP after enrichment

注: A: LAMP 产物电泳图, B: LAMP 产物染色结果; 泳道 M: D2000 Marker, 泳道 1:  $6.4\times10^8$  CFU/g, 泳道 2:  $6.4\times10^7$  CFU/g, 泳道 3:  $6.4\times10^6$  CFU/g, 泳道 4:  $6.4\times10^5$  CFU/g, 泳道 5:  $6.4\times10^4$  CFU/g, 泳道 6:  $6.4\times10^3$  CFU/g, 泳道 7:  $6.4\times10^2$  CFU/g, 泳道 8:  $6.4\times10^1$  CFU/g, 泳道 9:  $6.4\times10^0$  CFU/g, 泳道 10: 阴性对照。

生 LAMP 扩增。因此, 通过 6 h 的前增菌, 本实验检测人工污染速冻肉糜类制品单增李斯特菌的检出限



表 5 人工污染样品检测结果统计

Table 5 Detection results of artificially contaminated samples

样品种类	GB 4789.30-2016检测结果		LAMP 方法检测结果		实际人工污染情况	
	阳性样品(份)	阴性样品(份)	阳性样品(份)	阴性样品(份)	阳性样品(份)	阴性样品(份)
肉丸	3	7	3	7	3	7
鱼丸	3	7	3	7	3	7
香肠	4	6	4	6	4	6
合计	10	20	10	20	10	20

为  $6.4 \times 10^1$  CFU/g, 比增菌前降低了三个数量级。

## 2.5 人工污染速冻肉糜类盲样检测结果

检测结果如表 5 所示。国标的检测结果中有 10 份阳性样品, 20 份阴性样品。以国标为标准, LAMP 方法检测结果与其一致, 无假阳性, 无漏检情况, 准确度为 100%。

## 2.6 企业生产线样本检测结果

检测结果如表 6 所示。25 份样品同时用国标法和 LAMP 方法检测, 两种方法的检测结果相一致。企业生产线质量监管较为严格, 此次采集样本检测结果均为阴性。据文献报道, 速冻肉糜类制品在加工过程中交叉污染可能更为常见<sup>[31-32]</sup>。

表 6 生产线样本单增李斯特菌检出情况

Table 6 *Listeria monocytogenes* detection in production line samples

样本种类	样本数量	GB 4789.30-2016 检测结果	LAMP 检测结果
鸡小胸(原料)	5	—	—
亲亲肠(速冻机入口处)	5	—	—
亲亲肠(速冻机出口处)	5	—	—
包心鱼丸(速冻机入口处)	5	—	—
包心鱼丸(速冻机出口处)	5	—	—

注: “—”表示检测结果阴性。

## 3 结论

本研究比较了四种增菌培养基对单增李斯特菌的增菌效果。以  $OD_{600\text{ nm}}$  和平板计数活菌数为指标, 结果显示 Half Fraser 的增菌效果最好, 从  $6.4 \times 10^1$  CFU/mL 增菌至  $9.4 \times 10^4$  CFU/mL, 用时 6 h。增菌优化后, LAMP 检测速冻肉糜类制品中单增李斯特菌的检出限为  $6.4 \times 10^1$  CFU/g, 比增菌前降低了三个数量级。将 LAMP 方法应用于人工污染速冻肉糜类盲样样品和企业生产线样本检测, 同时与国标法对比, 本方法与国标法检测结果一致。

本研究基于 LAMP 方法, 结合 6 h 的前增菌, 可将检测时间缩短至 8 h, 无需专业设备, 根据颜色的变化即可判断检测结果, 直观简便, 适合基层对食品中单增李斯特菌的现场快速检测。目前由于技术本身的限制, LAMP 方法的检出限略高于实时荧光定量 PCR 技术, 为了更好的检测样品中可能存在的少量细菌, 在实际样品处理时, 可以延长增菌时间以降低 LAMP 方法的检出限。总之, LAMP 技术将有望成为食源性致病菌检测的有效方法, 为产品检测及安

全追溯提供依据。

## 参考文献

- [1] Q/SHAD 0001S-2017, 肉糜制品 艾狄士食品(上海)有限公司企业标准 [Q]. 艾狄士食品(上海)有限公司, 2017.
- [2] Q/SHAD 0001S-2017, Enterprise standard of addis food (Shanghai) Co., Ltd.: Meat products [Q]. Addis Food (Shanghai) Co., Ltd., 2017.
- [3] SB/T 10379-2012, 速冻调制食品 中华人民共和国国内贸易行业标准 [S]. 中华人民共和国商务部, 2013. [SB/T 10379-2012, Domestic trade industry standard of the People's Republic of China: Quick-frozen prepared food [S]. Ministry of Commerce, PRC, 2013.]
- [4] Q/FJGX 0002S-2019, 速冻肉糜类制品 福建冠先食品有限公司企业标准 [Q]. 福建冠先食品有限公司, 2019. [Q/FJGX 0002S-2019, Enterprise standard of Fujian Guanxian Food Co., Ltd.: Quick-frozen meat products [Q]. Fujian Guanxian Food Co., Ltd., 2019.]
- [5] 北京智研科信咨询有限公司. 2020-2026 年中国火锅料制品市场分析与产业竞争格局报告 [EB/OL]. [2020-08]. <http://www.abagao.com/b/qitashipin/114382VMUM.html>. [Beijing Zhiyan Kexin Consulting Co., Ltd.. Market analysis and industry competition pattern report of China hotpot material products in 2020-2026 [EB/OL]. [2020-08]. <http://www.abagao.com/b/qitashipin/114382VMUM.html>.]
- [6] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 83-95.
- [7] 孙艳波, 张灵洁. 速冻过程中的危险因子评估 [J]. 食品安全导刊, 2020(24): 84-85. [SUN Y B, ZHANG L J. Evaluation of risk factors in quick-freezing process [J]. Food Safety Guide, 2020(24): 84-85.]
- [8] 李成忠. 速冻食品的安全与质量控制探讨 [J]. 现代食品, 2020(11): 52-54. [LI C Z. Discussion on the safety and quality control of quick-frozen food [J]. Modern Food, 2020(11): 52-54.]
- [9] 崔京辉, 李达, 王永全, 等. 2004~2005 年北京市食品中单核细胞增生性李斯特菌的污染状况调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (12): 1508-1509. [CUI J H, LI D, WANG Y Q, et al. Investigation on contamination of *Listeria monocytogenes* in food in Beijing from 2004 to 2005 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16 (12): 1508-1509.]
- [10] 靳晓燕, 韩军, 于宏伟, 等. 食品中单核增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 污染状况研究 [J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 226-231. [JIN X Y, HAN J, YU H W, et al. The survey on the contamination situation of *Listeria monocytogenes* in foods [J].



- Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(1): 226–231. ]
- [ 10 ] DUSSAULT D, VU K D, LACROIX M. Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system[J]. Food Microbiology, 2016, 53(PtB): 115–121.
- [ 11 ] YIN Y L, TAN W J, WANG G L, et al. Geographical and longitudinal analysis of *Listeria monocytogenes* genetic diversity reveals its correlation with virulence and unique evolution[J]. Microbiological Research, 2015, 175: 84–92.
- [ 12 ] BAKKER H D, FORTES E D, WIEDMANN M. Multilocus sequence typing of outbreak associated *Listeria monocytogenes* isolates to identify epidemic clones[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010; 7257–7265.
- [ 13 ] DESAI A N, ANYOHA A, MADOFF L C, et al. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of promed reports from 1996–2018[J]. International Journal of Infectious Diseases:IJID:Official Publication of the International Society for Infectious Diseases, 2019, 6(25): 48–53.
- [ 14 ] NICHOLS M, CONRAD A, WHITLOCK L, et al. Short communication: Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections retrospectively linked to unpasteurized milk using whole-genome sequencing[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(1): 176–178.
- [ 15 ] OLANYA O M, HOSHIDE A K, LJABADENIYI O A, et al. Cost estimation of listeriosis(*Listeria monocytogenes*) occurrence in South Africa in 2017 and its food safety implications[J]. Food Control, 2019, 102: 231–239.
- [ 16 ] GB 4789.30-2016. 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验 中华人民共和国国家标准 [S]. 中华人民共和国卫生部, 2016. [ GB 4789.30-2016. The national standard for detection of *Listeria monocytogenes* in food microbiology[S]. Ministry of Health, PRC, 2016. ]
- [ 17 ] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [ 18 ] THAI H T, LE M Q, VOUNG C D, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(5): 1956–1961.
- [ 19 ] SHANG Y T, YE Q H, CAI S Z, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 142(11): 110999.
- [ 20 ] WACHIRALURPAN S, SRIYAPAI T, AREEKIT S, et al. Rapid colorimetric assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food samples using LAMP formation of DNA concatemers and gold nanoparticle-DNA probe complex[J]. Frontiers in Chemistry, 2018; 6.
- [ 21 ] LEDLOD S, BUNRODDITH K, AREEKIT S, et al. Development of a duplex lateral flow dipstick test for the detection and differentiation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat products based on loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Chromatography B-analytical Thchnologies in the Biomedical and Life Sciences, 2020; 1139.
- [ 22 ] CHEN J Q, REGAN P, LAKSANALAMAI P, et al. 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.
- [ 23 ] SHAO Y C, ZHU S M, JIN C C, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 75–79.
- [ 24 ] JAROENRAM W, CECERE P, POMPA P P. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 156: 9–14.
- [ 25 ] WANG L, SHI L, ALAM M J, et al. Special and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method[J]. Food Research International, 2008, 41(1): 69–74.
- [ 26 ] ROUMANI F, AZINHRIRO S, CARVALHO J, et al. 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.
- [ 27 ] YANG Q, XU H, ZHANG Y Z, et al. Single primer isothermal amplification coupled with SYBR Green II: Real-time and rapid visual method for detection of *Listeria monocytogenes* in raw chicken - ScienceDirect[J]. LWT, 2020, 128: 53–56.
- [ 28 ] EN ISO 11290-1. Microbiology of the food chain-horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -Part 1: Detection method[S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2017.
- [ 29 ] TANG M J, ZHOU S, ZHANG X Y, et al. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification[J]. Curr Microbiol, 2011, 63: 511–516.
- [ 30 ] 田长冬. 环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测贝类中副溶血弧菌的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011. [ TIAN C D. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2011. ]
- [ 31 ] 李志成, 梁棚煜, 潘振辉, 等. 速冻食品行业研究现状及发展趋势[J]. 现代食品, 2020(3): 15–18,21. [ LI Z C, LIANG X Y, PAN Z H, et al. Research status and development trend of quick-frozen food industry[J]. Modern Food, 2020(3): 15–18,21. ]
- [ 32 ] 李可维, 刘思洁, 赵薇, 等. 9274 份肉及肉制品食源性致病菌监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(23): 9033–9038. [ LI K W, LIU S J, ZHAO W, et al. Analysis of surveillance results of 9274 meat and meat products foodborne pathogens[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(23): 9033–9038. ]