

基于 *iap* 基因的 RT-LAMP 技术检测肉类食品中单核细胞增生李斯特菌的效果评价

陈 东¹, 杨 逍², 宋达峰²

(1. 杭州安旭生物科技股份有限公司, 浙江 杭州 310000; 2. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310000)

摘要: 本研究旨在探讨逆转录环介导等温扩增 (reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 技术在检测单核细胞增生李斯特菌感染的肉类食品中的效果和评价。根据 RT-LAMP 原理, 以 *iap* 基因为靶基因设计引物, 检测肉制品中的单核细胞增生李斯特菌, 并将该方法的特异性、灵敏度、死菌活菌鉴别效果与国标进行对比。实验获得的 RT-LAMP 体系最佳参数为 63 °C 扩增 60 min, 反应体系中引物的最佳浓度为外引物 0.4 μmol/L 和内引物 0.8 μmol/L, 以及 MgSO₄ 2.0 mmol/L、甜菜碱 1.0 mol/L、dNTPs 2.0 mmol/L、AMV 逆转录酶 10 U/μL、Bst DNA 聚合酶 320 U/mL。该试验的灵敏度为每管 7.3×10¹ CFU, 是 LAMP 的 2 倍。特异性实验显示该方法仅检测单增李斯特菌的靶基因, 无假阳性。用 RT-LAMP 和中国国家标准 GB 4789.30—2016 检测市售肉样品 (*n*=100) 中单核细胞增生李斯特菌的能力相似, 且 RT-LAMP 仅对活菌有扩增作用。死菌活菌鉴别实验显示该法可以排除肉样中死菌的干扰。经与国标方法做对比, 可知 RT-LAMP 可作为一种有效的检测手段。

关键词: 逆转录环介导等温扩增; 单核细胞增生李斯特氏菌; 快速检测; 肉类食品

中图分类号: R 155.5+5 文章编号: 1673-1689(2023)11-0081-07 DOI: 10.12441/spyswjs.20211229003

Detection and Evaluation of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by RT-LAMP Based on *iap* Gene

CHEN Dong¹, YANG Xiao², SONG Dafeng²

(1. Hangzhou Assure Technology Co., Ltd., Hangzhou 310000, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310000, China)

Abstract: This experiment aimed to investigate the effectiveness and evaluation of the reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) in detecting *Listeria monocytogenes* infection in meat products. The assay was designed to target the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* for detection of meat samples based on the principle of RT-LAMP. The specificity, sensitivity and differentiation between living and dead bacteria of this identification were compared to Chinese national standards. This experiment optimized the RT-LAMP conditions and obtained the

收稿日期: 2021-12-29 修回日期: 2022-03-20

基金项目: 浙江省领雁计划项目(2022C03091)。

* 通信作者: 宋达峰(1979—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物遗传学研究。E-mail: dfsong@zjsu.edu.cn

optimum amplification at 63 °C for 60 min, the optimal concentrations of the primers were 0.4 μmol/L outer primer and 0.8 μmol/L inner primer, 2.0 mmol/L MgSO₄, 1.0 mol/L betaine, 2.0 mmol/L dNTPs, 10 U/μL AMV reverse transcriptase, 320 U/mL Bst DNA polymerase. The assay has a sensitivity of 7.3×10¹ CFU/per reaction, which was twice as sensitive as LAMP. The specificity test demonstrated that only the target genes of *Listeria monocytogenes* were detected without false positives. The ability of RT-LAMP to detect *Listeria monocytogenes* in commercially available meat samples(*n*=100) was comparable to the Chinese National Standard GB 4789.30-2016, and RT-LAMP only amplified live microorganisms. Differentiation experiments between living and dead bacteria revealed that this method could eliminate the interference from dead bacteria in meat samples. In comparison with the method of national standards, RT-LAMP proves to be an effective detection method.

Keywords: reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, *Listeria monocytogenes*, rapid detection, meat products

核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)是一种人畜共患病原菌,也被称为高致病性兼容细胞有机体^[1],被其污染的食物可导致人类感染^[2]。在美国每年有 1 600 多人感染该病菌,200 多人死亡^[1]。20 世纪 90 年代,WHO 将单增李斯特菌列为食品四大病原菌之一。单核细胞增生李斯特菌可突破血脑屏障或是胎盘屏障,有极大的可能性会感染宿主中枢神经,这也是高死亡率(20%~30%)的主要原因^[3-5]。目前国标检测常用生化鉴定法,该方法步骤烦琐、检测周期长、特异性低,无法做到快速灵敏检测^[6],在市场检测中实用性差,酶联荧光分析法(ELISA)则不够准确高效。到目前为止,由于食品形态和成分的多样,单一配方的培养基无法适用于所有类型食物样品中单增李斯特菌的分离,需分门别类培养,操作非常不方便。而逆转录环介导等温扩增法

(RT-LAMP)则可以很好地解决以上问题,既保留了逆转录检测技术的高效精确,又结合了环介导等温扩增法(LAMP)的简便操作,该方法可同时检测多批样本,成本较低,结果判定简单。作者首次采用 RT-LAMP 技术对 8 株单增李斯特菌和 33 株非单增李斯特菌进行特异性试验,研究不同条件下对单增李斯特菌的*iap* 基因的检测结果,此外还探讨了死菌附着于样本对检测结果准确性的影响。本实验以国家标准检测法为对照,以确认 RT-LAMP 的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌种

分析了来自不同国家和来源的 39 种细菌菌株,见表 1。

表 1 RT-LAMP 实验菌株
Table 1 RT-LAMP experimental strains

类型	属名	种名	菌株
target <i>Listeria</i> spp	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ATCC 7648
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMJ4045
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMJ3215
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFM1723
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMHF550
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMJ0161
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMF2365
	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ZFMF8027
other <i>Listeria</i> spp	<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i>	CGMCC1.6731
	<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i>	ZFM51335

续表 1

类型	属名	种名	菌株
	<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	CGMCC 1.7730
	<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	CGMCC1.2990
	<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	ZFM33090
	<i>Listeria</i>	<i>grayi</i>	CGMCC1.6770
	<i>Listeria</i>	<i>grayi</i>	CGMCC 1.2989
	<i>Listeria</i>	<i>Ivanovii</i>	ZFM19119
NoD- <i>Listeria</i> spp	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	CGMCC1.193
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	CGMCC1.879
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	CGMCC 1.128
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC6538P
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	CGMCC 1.2386
	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	CGMCC1.551
	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	CGMCC1.511
	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	CGMCC1.556
	<i>Lactobacillus</i>	<i>lactis</i>	ATCC15577
	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	CGMCC 1.1627
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	CGMCC 1.125
	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	ZFMBM13
	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	CGMCC1.1868
	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	CGMCC1.647
	<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i>	ATCC9753
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	JM109
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	O104
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CGMCC1.1580
	<i>Salmonella</i>	<i>sp.</i>	CGMCC1.1552
	<i>Salmonella</i>	<i>sp.</i>	ZFM New port
	<i>Pseudomonas</i>	<i>pufida</i>	CGMCC1.645
	<i>Rhodotorula</i>	<i>rubra</i>	CGMCC2.1034
	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	CGMCC2.1643

CGMCC:中国普通微生物菌种保藏管理中心;ZFM:浙江省食品微生物技术研究重点实验室

1.2 主要试剂

AMV 逆转录试剂、细菌总 RNA 快速抽提试剂盒、LAMP 引物及 PCR 引物:上海生工生物工程科技有限公司;DNA 提取试剂盒: Axygen 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 在 GeneBank 中查找单核细胞增生李斯特菌的*iap* 基因的基因序列, 用 Primer Explorer V4(Eiken Chemical,Japan)设计了 4 个引物,包括 2 个外引物(LM-F3 和 LM-B3)和 2 个内引物(LM-FIP 和 LM-BIP),它们识别了*iap* 基因的 6 个区域,见图 1。



图 1 *iap* 基因引物在单核细胞增生李斯特菌中的位置和序列
Fig. 1 Location and sequence of *iap* gene primers in *Listeria monocytogenes*

1.3.2 DNA 和总 RNA 的提取 按照细菌总 RNA 快速抽提试剂盒(Sangon Biotech)和 DNA 提取试剂盒(Axygen)的操作说明分别提取 DNA 和总 RNA 保存备用。

1.3.3 优化 RT-LAMP 体系 根据裴灵芝的 RT-LAMP 研究^[7],进行微调后设定 RT-LAMP 初始的基本反应体系(25 μ L)为:缓冲液 1 \times ThermoPol[®], dNTPs 0.8 mmol/L, MgSO₄ 2.0 mmol/L, LM-FIP 0.8 μ mol/L, LM-BIP 0.8 μ mol/L, LM-F3 0.4 μ mol/L, LM-B3 0.4 μ mol/L, AMV 逆转录酶 10 U/ μ L, 甜菜碱 1.0 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 320 U/mL, RNA 2 μ L, 63 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。用控制单一变量的方法对甜菜碱(0、0.5、1.0、1.5 mol/L), MgSO₄ (1.0、2.0、3.0、4.0 mmol/L), dNTPs (1.2、1.6、2.0、2.4 mmol/L)和 *Bst* DNA 聚合酶(40、80、160、320 U/mL)和引物的孵育温度(59、61、63、65 $^{\circ}$ C)进行优化。

1.3.4 RT-LAMP 的特异性试验 用 8 株单核细胞增生李斯特菌和 31 株非单核细胞增生李斯特菌菌株按照试剂盒说明提取 RNA, 用最优的 RT-LAMP 体系进行实验, 观察凝胶电泳结果来判断 RT-LAMP 的特异性。

1.3.5 RT-LAMP 的灵敏度试验 用纯单核细胞增生李斯特菌培养物(J0161)测定 RT-LAMP 灵敏度。10 倍稀释法处理培养物, 从中提取 RNA, 并在最佳反应条件下进行 RT-LAMP。用上述方法按照试剂

盒说明提取 DNA 并测试 LAMP 的灵敏度, 将琼脂糖凝胶电泳结果与 RT-LAMP 进行比较。

1.3.6 用 RT-LAMP 和 LAMP 检测活菌和死菌 作者测试了当地市场购买的 50 个肉类样品, 以确定 RT-LAMP 是否能有效区分死细菌和活细菌。将每个肉类样品匀浆后, 用 10⁵ CFU/dL 的单增李斯特菌感染 40 个肉样品, 并将等浓度灭活菌液接种于剩余 10 个肉类样品。将每种培养物振荡培养后, 离心取上清液提取 DNA 和 RNA, 分别用 LAMP 和 RT-LAMP 进行实验并分析结果。

1.3.7 检测肉样中的单核细胞增生李斯特菌 将 RT-LAMP 检测法和中国国家标准 GB 4789.30—2016 法分别用于分析从中国当地市场获得的 100 个肉样品, 以确定 RT-LAMP 鉴定肉中单核细胞增生李斯特菌的能力。取每种肉类样品匀浆, 离心并从上清液中提取 RNA。采用国家标准 GB 4789.30—2016 检测每种肉类样品, 已证实了单核细胞增生李斯特菌菌落的存在。

2 结果与分析

2.1 引物设计

引物序列见表 2。设计了 4 个引物, 包括 2 个外引物(LM-F3 和 LM-B3)和 2 个内引物(LM-FIP 和 LM-BIP), 它们识别了 *iap* 基因的 6 个区域, 见表 2。

表 2 *iap* 基因的特异性引物序列

Table 2 Specific primer sequences of *iap* gene

引物	引物内容	引物序列	长度/bp
LM-F3	前外引物	ACACAAGAAGTGAAAAAAGAAAC	23
LM-B3	后外引物	ACATAATGTCTTGAACAGAAACA	23
LM-FIP	F1c 和 F2	TTAGGCGCAGGTGTAGTTGCTTGTG-GCAGAAACAAAACTGAA	44
LM-BIP	B1c 和 B2	GATCAAAATGCTACTACACACGCTCGTATTTTACGGATAAAGCCCA	48

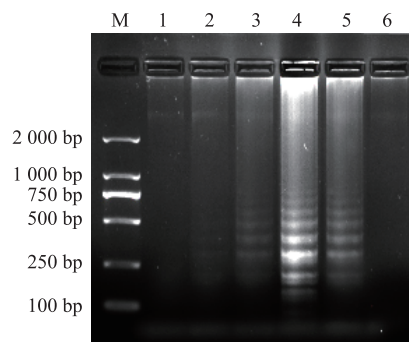
2.2 优化 RT-LAMP 体系

优化 RT-LAMP 实验结果见图 2。在 MgSO₄ 浓度为 2.0 mmol/L 时可以扩增 *iap*, 而在其他浓度下不产生扩增产物。随着 dNTPs 浓度的增加, 琼脂糖凝胶上的 RT-LAMP 产物条带强度增加, 在 dNTPs 浓度为 2.0 mmol/L 时观察到最佳条带。添加 1.0 mol/L 甜菜碱后, 条带检测更清晰, 但当甜菜碱浓度从 1.0 mol/L 增加到 1.5 mol/L 时没有观察到明显的差异; 随着反应体系中 *Bst* DNA 聚合酶浓度的增加, 扩增产物在 320 U/mL *Bst* DNA 聚合酶下观察

到最佳扩增。模板在 59~65 $^{\circ}$ C 成功扩增, 并且在 63 $^{\circ}$ C 产生最明显的条带。基于这些结果, RT-LAMP 测定条件为: MgSO₄ 2.0 mmol/L, dNTPs 2.0 mmol/L, 甜菜碱 1.0 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 320 U/mL, 扩增温度 63 $^{\circ}$ C。这些参数用作所有后续实验的标准条件。

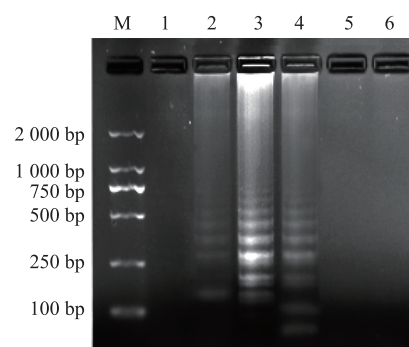
2.3 RT-LAMP 的特异性试验

设计的引物扩增了来自 8 个单增李斯特菌菌株的 *iap* 基因, 但没有扩增来自非单增李斯特菌的 *iap* 序列。因此, RT-LAMP 试验特异性地检测单增李斯特菌, 没有假阳性结果, 见图 3。



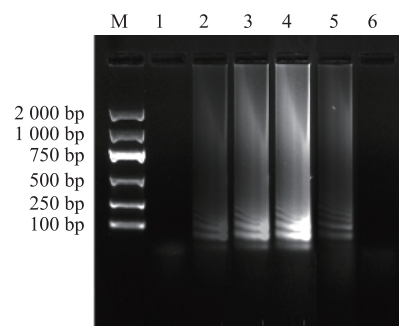
泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1: 阴性对照; 泳道2~6: Mg^{2+} 浓度分别为0.5、1.0、2.0、3.0 mmol/L。

(a) Mg^{2+} 浓度优化



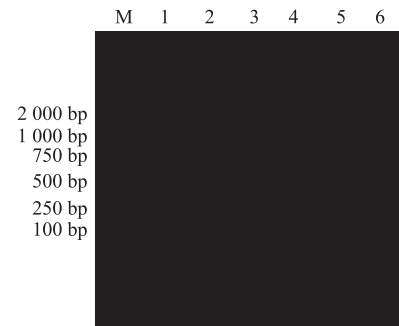
泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1~4: 温度分别为 59、61、63、65 °C; 泳道5: 阴性对照。

(b) 引物孵育温度优化



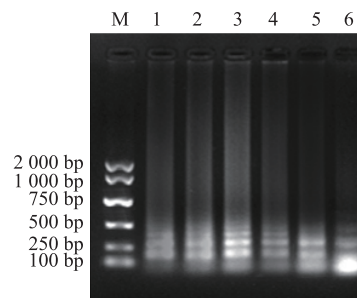
泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1~4: 甜菜碱浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5 mol/L; 泳道5: 阴性对照。

(c) 甜菜碱浓度优化



泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1: 阴性对照; 泳道2~5: dNTPs 浓度分别为1.2、1.6、2.0、2.4 mmol/L。

(d) dNTPs 浓度优化

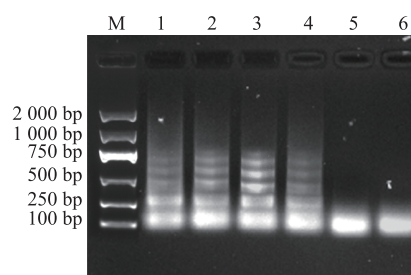


泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1: 阴性对照; 泳道2~5: *Bst* DNA 酶浓度分别为40、80、160、320 U/mL。

(e) *Bst* DNA 酶浓度优化

图 2 RT-LAMP 体系优化结果

Fig. 2 Optimization results of RT-LAMP system



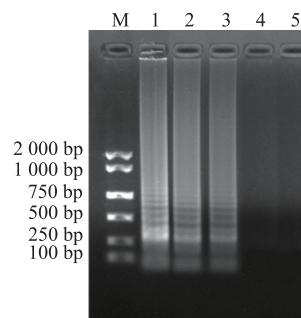
泳道 M: 2 000 bp Marker; 泳道 1~8: 单增李斯特菌 7648、J4045、J0161、J3215、1723、HF550、F2365、F8027; 泳道 9: 大肠杆菌 JM109。

图 3 RT-LAMP 特异性结果

Fig. 3 RT-LAMP specific results

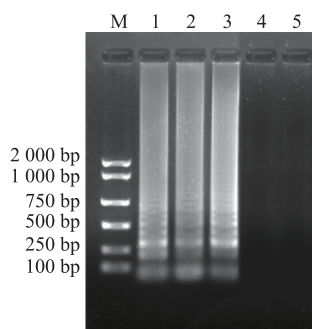
2.4 RT-LAMP 的灵敏度试验

从单核细胞增生李斯特菌纯培养物的 5 个连续稀释液中提取 RNA (稀释 10 倍), 在最佳反应条件下进行 RT-LAMP 检测。在 2 g/dL 琼脂糖凝胶上观察, 低于 7.3×10^1 CFU/mL 时没有明显的扩增产物, 见图 4(a)。比较 LAMP 和 RT-LAMP 的灵敏度, LAMP 的灵敏度为 1.4×10^2 CFU/mL, 低于 RT-LAMP, 见图 4(b)。



泳道M: 2 000 bp Marker; 泳道1~4: 培养物浓度分别为 7.3×10^3 、 7.3×10^2 、 7.3×10^1 、7.3 CFU/mL; 泳道 5: 阴性对照。

(a) RT-LAMP 灵敏度



泳道 M: 2 000 bp Marker; 泳道1~4: 培养物浓度分别为 1.4×10^4 、 1.4×10^3 、 1.4×10^2 、 1.4×10^1 CFU/mL; 泳道5: 阴性对照。

(b) LAMP灵敏度

图4 RT-LAMP 和 LAMP 灵敏度结果

Fig. 4 Sensitivity results of RT-LAMP and LAMP

2.5 活菌和死菌的 RT-LAMP 和 LAMP 检测

RT-LAMP 的测定结果见表3。在含有死单增李斯特菌的10个样品中结果为阴性,但在LAMP测试的所有10个样品中均为阳性,而活菌污染样本则均被检出阳性。

表3 RT-LAMP 和 LAMP 检测死菌和活菌

Table 3 Detection of dead and living bacteria using RT-LAMP and LAMP

样品	数量/个	RT-LAMP 检测出的阳性样本数量/个	LAMP 检测出的阳性样本数量/个
活菌污染样品	40	40	40
死菌污染样品	10	0	10

2.6 肉样中存活的单核细胞增生李斯特菌检测

100个肉样品 RT-LAMP 分析数据与国家标准 GB4789.30—2016 的数据比较结果见表4。RT-LAMP 和 GB 测定均鉴定出3种单核细胞增生李斯特菌阳性样品,证实了 RT-LAMP 测定的准确性。

表4 RT-LAMP 和 GB 法检测肉样中的单核细胞增生李斯特菌

Table 4 Detection of *Listeria monocytogenes* in meat samples using RT-LAMP and GB methods

样品	数量/个	RT-LAMP 测出的阳性样本/个	GB 4789.30—2016 测出的阳性样本/个
牛肉	25	2	2
猪肉	25	1	1
羊肉	25	0	0
兔肉	25	0	0

3 结语

作者首次用 RT-LAMP 以 *iap* 基因为靶基因设计引物检测肉样中单增李斯特菌,在传统的 LAMP 技术上作了延伸。此外,根据 RT-LAMP 原理对反应体系进行优化,对该方法性能进行评估,并与国标进行对比。试验结果表明,RT-LAMP 在 7.3×10^1 CFU/mL 培养物中即可检出单增李斯特菌,具有高灵敏度。且在特异性实验中没有出现假阳性结果,特异性强。采用 RT-LAMP 在 7.3×10^1 CFU/mL 的培养物中检测到单增李斯特菌,灵敏度是 LAMP 的2倍。在活菌和死菌的检测实验中,与 LAMP 技术相比,RT-LAMP 只对活菌进行扩增,可以区分活细菌和死细菌,避免假阳性结果,且鉴别能力较强,而 GB 方法难以做到。在随后的可行性实验中,RT-LAMP 检测结果与国家标准 GB 4789.30—2016 方法相同,但整体准确度更高,这表明它可以更快、更准确地检测单增李斯特菌,有望取代 GB 4789.30—2016。实验结果还显示, $MgSO_4$ 的浓度对引物结合和 *Bst* 活性的影响最大,镁离子的浓度不适合整个体系就不会得到扩增结果,这与之前的研究结果一致^[8]。同时甜菜碱在体系中的作用值得探讨,虽然其他人报道在 RT-LAMP 中加入甜菜碱只能适度提高反应性能^[9],但在本实验中观察到扩增产物明显增加(1.0 mol/L 甜菜碱是最佳)。这一现象可能与甜菜碱增强 RNA 对 *Bst* DNA 聚合酶的易接近能力有关^[10]。

综上所述,RT-LAMP 技术检测肉样中单增李斯特菌具有特异性和良好的灵敏度,相比 GB 方法对死菌活菌的辨别准确,避免了消毒灭菌后死菌残留或因其他原因出现死菌情况下对食品卫生程度的误判^[11-13]。相比于传统生化方法,此技术节省了菌落培养分离所需的时间,减少了工作量,并能做到即取即测。同时该技术延续了 LAMP 技术的优点,仪器成本低且操作便捷,为食源性致病菌的快速高效检测提供了新途径。

参考文献:

- [1] 申海鹏. 李斯特菌的危害[J]. 食品安全导刊, 2015(S1):37-39.
SHEN H P. The harm of *Listeria monocytogenes*[J]. **China Food Safety Magazine**, 2015(S1):37-39. (in Chinese)
- [2] LEE J E, CHO W K, NAM C H, et al. A case of meningoencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a healthy child[J]. **Korean Journal of Pediatrics**, 2010, 53(5):653-656.
- [3] ROCOURT J, BENEMBAREK P, TOYOFUKU H, et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach[J]. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2003, 35(3):263-267.
- [4] 蔡雪薛. 单核细胞增生李斯特菌毒力相关基因的筛选鉴定及其功能研究[D]. 扬州:扬州大学, 2017.
- [5] 王国梁, 殷月兰, 焦库华, 等. 绵羊李斯特菌病原诊断及其生物学特性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(7):639-645.
WANG G L, YIN Y L, JIAO K H, et al. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* NTSN[J]. **Chinese Journal of Zoonoses**, 2013, 29(7):639-645. (in Chinese)
- [6] YENI F, ACAR S, POLAT Ö G, et al. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce[J]. **Food Control**, 2014, 40:359-367.
- [7] 裴灵芝. 逆转录环介导等温扩增检测风疹病毒 RNA 方法的建立和应用[D]. 苏州:苏州大学, 2011.
- [8] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. **Science**, 1988, 239(4839):487-491.
- [9] ZHAO L M, LI G, GAO Y, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting tomato chlorosis virus[J]. **Journal of Virological Methods**, 2015, 213:93-97.
- [10] KRAMARENKO T, ROASTO M, KETO-TIMONEN R, et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level[J]. **Food Control**, 2016, 67:48-52.
- [11] 张文敏, 石育娇, 戚成, 等. 恒温实时荧光法快速检测不同样品中的单增李斯特菌[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5):44-50.
ZHANG W M, SHI Y J, QI C, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different samples by real time fluorescence isothermal amplification[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2019, 38(5):44-50. (in Chinese)
- [12] 吴潇, 吕贝贝, 蒋玮, 等. 环介导等温扩增技术在鸭源成分检测中的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(8):126-133.
WU X, LV B B, JIANG W, et al. Rapid detection technique of duck-derived components in beef and sheep products by LAMP[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2019, 38(8):126-133. (in Chinese)
- [13] 牛会敏, 蒋静, 户瀚文, 等. 恒温实时荧光法快速检测婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(10):94-99.
NIU H M, JIANG J, HU H W, et al. Study on rapid determination of carrot components in complementary foods for infant and young children by isothermal real-time fluorescence assay [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2023, 42(10):94-99. (in Chinese)