

实验技术与方法

食品中单核细胞增生李斯特菌的重组酶聚合酶扩增检测方法的建立

何洁,朱超,黄珊珊,吴巧维,孙萍,劳华均

(宁波海关技术中心,浙江宁波 315192)

摘要:目的 建立食品中单核细胞增生李斯特菌的重组酶聚合酶扩增(RPA)检测体系。方法 针对单核细胞增生李斯特菌的特异性基因 *hlyA*,筛选出一组特异性强且高效的引物,建立单核细胞增生李斯特菌的 RPA 检测体系,并进行特异性、灵敏度检测。结果 建立的 RPA 方法在 37 °C 恒温反应仅需 30 min,能够特异地检测单核细胞增生李斯特菌,最低模板浓度可低至 0.5 ng/μL。人工染菌试验显示,该 RPA 体系可以有效扩增出每 2.5 g 样品中人工染菌 10⁴ CFU 样品中的单核细胞增生李斯特菌。结论 RPA 等温扩增方法特异较强、灵敏度较高,具有操作简便、不需要昂贵仪器、常温进行扩增反应等优点,适用于现场检测以及在基层实验室推广应用。

关键词:单核细胞增生李斯特菌;重组酶聚合酶扩增技术(RPA);*hlyA*;检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0274-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.006

Development of recombinase polymerase amplification detection method for *Listeria monocytogenes* in food

HE Jie, ZHU Chao, HUANG Shanshan, WU Qiaowei, SUN Ping, LAO Huajun

(Technology Center of Ningbo Customs, Zhejiang Ningbo 315192, China)

Abstract: Objective To establish a recombinase polymerase amplification (RPA) method for the detection of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) in food. **Methods** Based on the *hlyA* gene of *L. monocytogenes*, a set of RPA primers was selected for constructing RPA test, and its specificity and sensitivity were then tested. **Results** The RPA assay could be finished in 30 min at 37 °C. The primers used in RPA were specific. Experiments confirmed a detection limit of DNA template as low as 0.5 ng/μL. *L. monocytogenes* in the artificially-contaminated meat could be detected at the limit of 10⁴ CFU/2.5 g. **Conclusion** The RPA method for detecting *L. monocytogenes* has strong specificity and high sensitivity, which is easy to operate, and can be performed under normal temperature without expensive equipment. It is suitable for field detection and application in the basic laboratory.

Key words: *Listeria monocytogenes*; recombinase polymerase amplification; *hlyA*; detection

李斯特菌属(*Listeria*)是一类胞内寄生革兰阳性短杆菌属,国际公认共有6种:单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)、威尔李斯特菌(*Listeria welshimeri*)、格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)和西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)^[1]。其中,单核细胞增生李斯特菌广泛分布于乳制品、水产

品、畜禽类产品等,是该属中致病力最强的食源性致病菌。人感染该病菌后,会出现败血症、脑膜炎、胃肠炎等临床症状^[2],妊娠期妇女、新生儿以及免疫功能低下的患者更易感染,死亡率达30%以上^[3]。传统的单核细胞增生李斯特菌检测方法需要经过菌种分离、生化鉴定、血清型实验等过程,操作繁琐,耗时长,检测灵敏度低,无法满足市场需求。而且由于6种李斯特菌表现型相似,通过传统的CAMP试验、糖发酵试验等方法不易用于种间区分。

近年来,重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)是PIEPENBURG等^[4]在2006年研发出的一种新兴核酸等温扩增技术,目前已在医疗诊断、生物安全、病原检测和食品安全等领域发挥重要作用^[5]。特别是RPA商业化

收稿日期:2020-06-30

基金项目:宁波中盛产品检测有限公司科研项目(2019ZS10)

作者简介:何洁 女 工程师 研究方向为食品微生物检测

E-mail:hejielovely@163.com

朱超 女 助理工程师 研究方向为食品微生物检测

E-mail:819080697@qq.com

通信作者:劳华均 男 高级工程师 研究方向为食品微生物检测

E-mail:lao178911@163.com

试剂盒的问世进一步推动了该技术的发展和应,相关研究论文呈现爆发式增长^[6]。目前,已有的恒温扩增技术多达十几种,包括环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、依赖核酸序列扩增(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、链置换扩增(Strand displacement amplification, SDA)、单链介导RNA扩增技术(Signal-mediated amplification of RNA technology, SMART)和RPA技术等。这些等温技术的原理和技术各不相同,如LAMP技术检测限低至几个拷贝,结果判读简单,但所需引物复杂,且操作过程极易发生污染导致假阳性结果^[7]。NASBA技术灵敏度与实时荧光聚合酶链式反应(PCR)技术相媲美,但该方法更适合RNA模板检测,且有效扩增片段长度仅为100~250 bp^[8]。此外SDA^[9]和SMART^[10]等技术需要在扩增前将温度升高至95℃,使DNA变性,增大了对检测设备的复杂性要求。RPA技术在37℃的恒温条件下,5~20 min即可完成反应,不仅适用于DNA模板,也可以通过在体系中加入RNA逆转录酶,实现对RNA的扩增^[11],其设备要求简单(如电子浴锅、水浴锅),具有快速、高灵敏性、易于开发便携设备、适合现场快速检测

(Point-of-care, POC)等优点,所以该技术被称为可以替代PCR的核酸技术。

基于RPA技术良好的应用前景,本文针对单核细胞增生李斯特菌溶血素编码基因*hlyA*^[12],利用TwistAmp Basic kits试剂盒对靶基因扩增,该方法操作简单、灵敏度较高、稳定性高,以期建立新型的单核细胞增生李斯特菌快速检测方法,解决现有检测方法存在的部分问题。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本实验通过购买、分离等途径,共收集菌株64株,分别为:李斯特菌属55株,其中单核细胞增生李斯特菌50株(标准菌株1株、分离菌株49株)、绵羊李斯特菌1株、英诺克李斯特菌1株、威尔李斯特菌1株、格氏李斯特菌1株、西尔李斯特菌1株;埃希菌属共3株;金黄色葡萄球菌3株;沙门氏菌共3株。对本实验分离的59株实验菌株进行了培养特征、镜检特征及VITEK2 COMPACT微生物鉴定仪生化鉴定实验,并且采用16S rDNA基因片段序列分析,确定了59株实验菌株分类地位准确可靠,可以用于后续研究。

表1 部分菌株来源情况统计表

Table 1 Statistical table of source of some strains

序号	菌株	拉丁名	菌株保存号	样品来源
1	绵羊李斯特菌	<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	购买于广东环凯公司
2	英诺克李斯特菌	<i>L. innocua</i>	ATCC 33060	购买于广东环凯公司
3	威尔李斯特菌	<i>L. welshimeri</i>	CCM 3971T	购买于广东环凯公司
4	格氏李斯特菌	<i>L. grayi</i>	CICC 21670	购买于中国工业微生物保藏中心
5	西尔李斯特菌	<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967	购买中国微生物菌种保藏中心
6	单核细胞增生李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115	购买于广东环凯公司
7	单核细胞增生李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	—	卤猪舌、冻煮鳕鱼肉、冷冻虾仁、原味香肠等
8	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	购买于广东环凯公司
9	大肠埃希氏菌	<i>E. coli</i>	—	海鲜、馒头
10	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	购买于青岛海博生物公司
11	金黄色葡萄球菌	<i>S. aureus</i>	—	豆干、土豆鸡块
12	乙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella. sp</i>	CMCC50094	购买于广东环凯公司
13	沙门氏菌	<i>Salmonella. sp</i>	—	餐包、红豆黄金包

1.2 主要仪器与试剂

NanoDrope 2000 微量紫外分光光度计(美国Thermo公司);96孔热循环仪(美国伯乐Bio-Rad公司)、Qsep100™全自动核酸蛋白分析仪(中国台湾Bioptic公司)。

TwistAmp Basic kits RPA 扩增试剂盒,购自Twist DX公司。

1.3 引物设计

参考GenBank中单核细胞增生李斯特菌的*hlyA*基因,共下载388条序列,使用MEGA 6.0比对,寻找保守区段,使用Primer 5.0设计特异性引

物,通过对引物对的比Rating、 T_m 值、产物片段大小等因素比较分析,筛选出2对引物(表2),由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.4 单核细胞增生李斯特菌RPA反应体系及条件

RPA扩增体系的各成分浓度及体系比例参照TwistAmp Basic kits试剂盒的使用说明,具体步骤如下:向含有冻干酶粉的0.2 mL TwistAmp反应管中加入再水化缓冲液29.5 μL、去离子水12.5 μL、终浓度均为0.4 μmol/L的上、下游引物各2 μL, DNA模板50 ng,最后再加入280 mmol/L的醋酸镁溶液2.5 μL。反应条件:37℃,30 min。

表2 单核细胞增生李斯特菌的 RAP 扩增候选引物
Table 2 Candidate primers for RAP amplification of *Listeria monocytogenes*

菌株	引物名称	碱基序列	扩增片段长度
单核细胞增生李斯特菌	<i>hlyA1-F</i>	5'-CTTTGACGCTGCCGTAAGTGGGAAATCTG-3'	216 bp
	<i>hlyA1-R</i>	5'-TTGTTGTATAGGCAATGGGAAGCTCTGGTG-3'	
	<i>hlyA2-F</i>	5'-AAGTGGGAAATCTGTCTCAGGTGATGTAG-3'	207 bp
	<i>hlyA2-R</i>	5'-AAGAAGTTTGTGTATAGGCAATGGGAAC-3'	

1.5 单核细胞增生李斯特菌 RPA 扩增引物的特异性检测

选用表 1 中单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*)、绵羊李斯特菌 (*L. ivanovii*)、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*)、威尔李斯特菌 (*L. welshimeri*)、格氏李斯特菌 (*L. grayi*) 和西尔李斯特菌 (*L. seeligeri*), 共 6 株标准菌株, 提取 DNA, 用 2 对候选引物对扩增, 测试引物特异性。

1.6 单核细胞增生李斯特菌 RPA 扩增引物的灵敏性检测

以单核细胞增生李斯特菌 DNA 为模板, 使用 NanoDrope 2000 仪器测定 DNA 原液浓度后, 进行梯度稀释, 分别为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} (对应的浓度分别为 50、5、0.5、0.05、0.005 ng/ μ L), 模板量均取 1 μ L。

1.7 人工污染食品样本检测

选用表 1 中单核细胞增生李斯特菌、李斯特菌属中的其他 5 种标准菌株以及大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌, 共 9 株标准菌株用于研究。将上述标准菌株过夜培养, 利用平板倾注法计数后, 用生理盐水梯度稀释。无菌操作分别称取 2.5 g 无菌猪肉样本于 16 mL 生理盐水中, 共取 6 份。将各个菌株的梯度稀释液分别取 1 mL 接种 5 份样本, 使接种菌的终浓度分别约每 2.5 g 样本 10^5 CFU、 10^4 CFU、 10^3 CFU、 10^2 CFU、 10^1 CFU, 1 份不染菌为背景对照值, 用均质器拍击混匀 (60 次/min 拍击 1 min)。分别吸取 0.5 mL 6 份均质后样本于 2.0 mL 离心管中, 采用本研究中细菌 DNA 提取方法对 6 份样本提取 DNA 并进行各样本的 RPA 检测。

1.8 PCR 反应结果检测

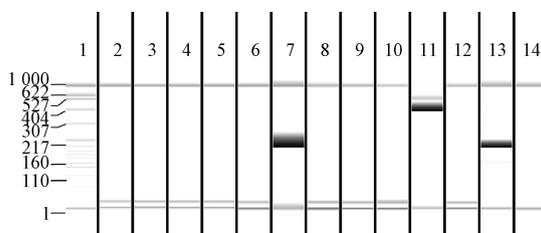
RPA 扩增反应结束后, 在 RPA 扩增产物中加入 50 μ L 由苯酚和氯仿按体积比 1:1 混合而成的溶液, 充分混匀后 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取 DNA 水相层, 使用 Qsep 100™ 全自动核酸蛋白分析仪检测, 使用软件 Q-Analyzer Basic 对扩增产物进行分析, 记录结果。

2 结果与分析

2.1 单核细胞增生李斯特菌 RPA 扩增引物的特异性检测结果

以李斯特菌属的 6 株标准菌株的 DNA 为模板,

选用 2 对候选引物进行扩增, 检测候选引物是否能扩增出单核细胞增生李斯特菌的 *hlyA* 基因目的片段, 且李斯特菌属的其他 5 种标准菌株均未扩增出目的片段。扩增结果显示 (图 1): 引物 *hlyA1-F/R* 扩增 6 株李斯特菌属菌株, 单核细胞增生李斯特菌扩增出 216 bp 的目的片段, 且其他 5 株菌没有目的片段扩增出来; 引物 *hlyA2-F/R* 扩增 6 株李斯特菌属菌株, 单核细胞增生李斯特菌扩增出大小 207 bp 的目的片段, 但格氏李斯特菌扩增出非特异性片段, 因此选用引物对 *hlyA1-F/R* 为单核细胞增生李斯特菌 RPA 扩增的特异性引物。



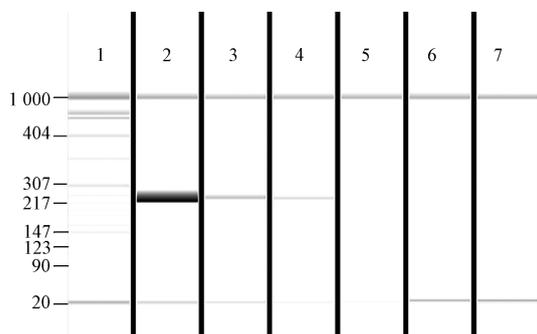
(注: 泳道 1: marker; 泳道 2、8: *L. ivanovii* ATCC 19119; 泳道 3、9: *L. innocua* ATCC 33060; 泳道 4、10: *L. welshimeri* CCM 3971T; 泳道 5、11: *L. grayi* CICC 21670; 泳道 6、12: *L. seeligeri* ATCC 35967; 泳道 7、13: *L. monocytogenes* ATCC 19115; 泳道 14: 阴性对照; 泳道 1~7: 引物 *hlyA1-F/R* 扩增; 泳道 8~13: 引物 *hlyA2-F/R* 扩增)

图 1 2 对候选引物扩增李斯特菌属菌株的 RPA 扩增产物的电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of RPA products of *Listeria* strains amplified by two pairs of candidate primers

2.2 单核细胞增生李斯特菌 RPA 扩增引物的灵敏度检测结果

梯度稀释, 分别为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} (对应的浓度分别为 50、5、0.5、0.05、0.005 ng/ μ L), 模板量均取 1 μ L, 采用引物 *hlyA1-F/R* 对单核细胞增生李斯特菌的各个浓度的 DNA 模板进行扩增, RPA 扩增结果如图 2 所示, 该引物可以稳定地对 DNA 模板进行特异性扩增, 稀释度 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 的 DNA 模板均扩增出单一清晰的目的片段; 随着 DNA 模板浓度降低, 目的片段的亮度降低; 稀释度 10^{-3} 的 DNA 模板未扩增出目的片段; 由此可见, 该引物灵敏度较高, 对单核细胞增生李斯特菌可以有效进行 RPA 扩增, 且模板浓度可低至 0.5 ng/ μ L, 较合适的模板浓度范围为 50~5 ng/ μ L。



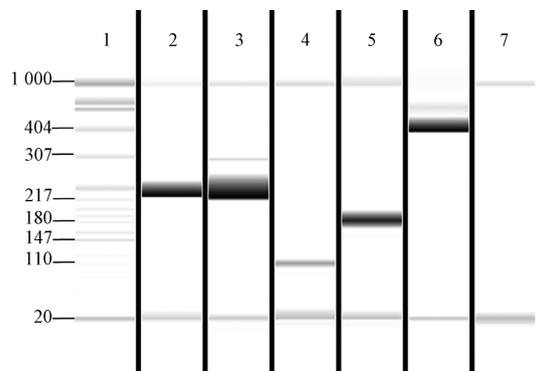
(注:泳道 1:marker;泳道 2~6:稀释度 10^0 、稀释度 10^{-1} 、稀释度 10^{-2} 、稀释度 10^{-3} 、稀释度 10^{-4} ;泳道 7:阴性对照。)

图 2 采用引物 *hlyA1-F/R* 对梯度稀释的单核细胞增生李斯特菌 DNA 进行 RPA 扩增的电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of RPA amplification of gradient diluted *L. monocytogenes* DNA by primer *hlyA1-F/R*

2.3 人工染菌食品样本检测结果

本研究共使用 9 株菌株,并进行梯度稀释后,9 株菌对应相同梯度的稀释液依次加入猪肉样品中,均质后,提取混合菌株的 DNA 进行 RPA 检测,结果如图 3 所示:5 个浓度梯度的混合 DNA 中, 10^5 、 10^4 CFU/2.5 g 的混合菌悬液扩增出 216 bp 目的片段,其他稀释度均未扩增出目的片段。相比较单一 DNA 扩增的凝胶电泳图(图 4),混合样 DNA 扩增的结果出现了非特异性条带。本研究中的 RPA 技术可以有效扩增出人工染菌样品中的单核细胞增生李斯特菌,但菌悬液浓度要达到每 2.5 g 样品中 10^4 CFU 的菌含量。



(注:泳道 1:marker;泳道 2~6:菌悬液浓度 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 ;泳道 7:阴性对照)

图 3 人工染菌样品 RPA 扩增的电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of RPA amplification in artificially infected samples

3 讨论

传统的食源性致病微生物检测主要依靠琼脂平板对微生物进行培养、分离、纯化,再进行相关生化鉴定来区分鉴别不同微生物,操作工程复杂,费时费力,一般需要 2~3 d 才能完成实验并出具

结果^[13]。

RPA 技术作为一种基于分子生物学技术快速发展起来的新兴微生物检测技术,还可以和其他分子手段如实时荧光定量^[14]、固相载体(如横向试纸)^[15]、微流控芯片^[16]和微阵列芯片^[17]等结合,建立更加快速、准确、简便地检测方法。但目前上述的方法在食源性致病菌检测工作中应用并不广泛^[18]。SANTIAGO-FELIPE 等^[19]采用 RPA 技术检测婴儿配方粉和脱脂乳中的沙门氏菌和阪崎肠杆菌,实验结果显示体系中的抑制剂对其影响较小,花费时间少,适合现场检测手段。KIM 等^[20]采用实时荧光定量和 RPA 技术同时检测了鸡蛋和鸡肉中的肠炎沙门氏菌,2 种检测方法结果表明,RPA 技术可在 10 min 内出具结果,灵敏度为 10 CFU/g。之后建立了多重实时荧光 RPA 方法,在 45 °C 下孵育 20 min 灵敏度即可达到 1 CFU/g 反应,并实现了定量检测,准确度不低于传统定量方法^[21]。CHOI 等^[22]采用 Direct-RPA 方法在 30 min 内检出牛奶中的沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7、副溶血弧菌。针对单核细胞增生李斯特菌的检测,EID^[23]提出了微流体芯片上等速电泳与 RPA 技术相结合检测,虽然 RPA 微体流集成度较高,但研发与使用成本高,制作与组装程序复杂、周期长,推广使用具有一定难度,不适用于食品中单核细胞增生李斯特菌的快检。

市场上已有 RPA 商业化试剂盒,但该试剂盒只有酶及反应缓冲液,且 RPA 技术的关键为引物和探针,其设计的原理与 PCR 技术不同,例如 RPA 设计的引物较长,一般为(30~35) bp,GC 含量在 30%~70%之间;在 5'端始端避免连续较长的鸟嘌呤,否则易形成二级结构,不利于重组酶和引物的结合;在 3'端尾端最好选择鸟嘌呤和胞嘧啶,为聚合酶提供稳定的结合区域等。此外,引物退火和聚合酶介导延伸没有温度驱动,因此对于 RPA 的引物和探针没有退火温度要求。目前还没有专门的设计软件可以对 RPA 引物进行设计,因此需要多次筛选之后确定最佳的引物组合。基于以上几点,本研究以单核细胞增生李斯特菌的特异性基因 *hlyA* 为检测靶标,依托于 NCBI 数据库,筛选出保守区,设计 RPA 扩增的引物,并对引物的特异性、灵敏度进行验证,筛选出引物 *hlyA1-F/R* 可以有效扩增出单核细胞增生李斯特菌目的片段。采用人工染菌样品对 RPA 技术进行检测验证,该 RPA 技术可以有效检出样品中单核细胞增生李斯特菌,但未经过增菌,检测阈值较高。闫琳等^[24]研究不增菌时,所有染菌量下都无扩增条带,增菌 8、12 h,PCR 的检测限分别为 1.3×10^4 和 1.3×10^3 CFU/25 g;二步增菌后,检测限

进一步提高,增菌 46 h,检测限达到 1.3 CFU/25 g。增菌培养有利于提高 PCR 方法检测灵敏度,随着培养时间的延长,检测敏感度逐渐提高,由于单核细胞增生李斯特菌生长较慢,需要二步增菌才能达到较高敏感性。在后续研究中,一方面可着眼于对该方法的体系、扩增条件以及扩增产物检测手段进行优化改进;另一方面可对取样量、增菌培养时间等进行深入研究,提高该 RPA 技术的灵敏度,以达到低浓度的检测限量,同时用所建立的方法和国家标准检测方法分别对实际样品进行检测,验证在食品中单核细胞增生李斯特菌检测中所建方法与国标方法的一致性。建立成熟稳定的单核细胞增生李斯特菌 RPA 检测技术,以期将该方法引用到其他食源性致病菌快速检测中,为食源性致病菌快速检测提供技术支撑。

参考文献

- [1] BEUCHAT L R, DOYLE M P. *Listeria monocytogenes* [M] // Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition; American Society of Microbiology, 2007: 457-491.
- [2] SCHUCHAT A, SWAMINATHAN B, BROOME C V. Epidemiology of human listeriosis [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1991, 4(2): 169-183.
- [3] ZUNABOVIC M, DOMIG K J, KNEIFEL W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments-A review [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(2): 351-362.
- [4] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [5] 任君安, 满燕, 李安, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品检测中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2063-2071.
- [6] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.
- [7] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(1): 1-5.
- [8] DEIMAN B, VAN AARLE P, SILLEKENS P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. Molecular Biotechnology, 2002, 20(2): 163-180.
- [9] TOLEY B J, COVELLI I, BELOUSOV Y, et al. Isothermal strand displacement amplification (isDA): a rapid and sensitive method of nucleic acid amplification for point-of-care diagnosis [J]. The Analyst, 2015, 140(22): 7540-7549.
- [10] HALL M J, WHARAM S D, WESTON A, et al. Use of signal-mediated amplification of RNA technology (SMART) to detect marine cyanophage DNA [J]. BioTechniques, 2002, 32(3): 604-611.
- [11] AHMED A E W, WEIDMANN M, HUFERT F T. Diagnostics-in-a-suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus [J]. Journal of Clinical Virology, 2015, 69: 16-21.
- [12] 谭炳乾, 肖军. PCR 在快速检测食品单核细胞增多性李斯特菌中的应用 [J]. 湖北农业科技, 2009, 48(7): 1558-1560.
- [13] 黄欣迪, 涂晓波, 亓双, 等. 食源性致病菌的检测方法及其发展趋势 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4794-4800.
- [14] KIM J Y, LEE J L. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis from eggs and chicken meat by real-time recombinase polymerase amplification in comparison with the two-step real-time PCR [J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(3): 402-411.
- [15] TU P A, SHIU J S, LEE S H, et al. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 243: 98-104.
- [16] KIM T H, PARK J, KIM C J, et al. Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(8): 3841-3848.
- [17] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. Microchimica Acta, 2014, 181(13/14): 1715-1723.
- [18] 任君安, 满燕, 李安, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品检测中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2063-2071.
- [19] SANTIAGO-FELIPE S, TORTAJADA-GENARO LA, MORAIS S, et al. Isothermal DNA amplification strategies for duplex microorganism detection [J]. Food Chemistry, 2015, 174(1): 509-515.
- [20] KIM J Y, LEE J L. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis from eggs and chicken meat by real time recombinase polymerase amplification in comparison with the two-step real-time PCR [J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(3): 402-411.
- [21] KIM J Y, LEE J L. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli*, and *jejuni*, from eggs and chicken products [J]. Food Control, 2017, 73: 1247-1255.
- [22] CHOI G, JUNG J H, PARK B H, et al. A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria [J]. Lab on a Chip, 2016, 16(12): 2309-2316.
- [23] EID C, SANTIAGO J G. Assay for *Listeria monocytogenes* cells in whole blood using isotachopheresis and recombinase polymerase amplification [J]. The Analyst, 2017, 142(1): 48-54.
- [24] 闫琳, 王晓英, 郭云昌, 等. 增菌-PCR 法与传统方法检测猪肉中单核细胞增生李斯特菌的比较研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3021-3024.