基于高分辨率溶解曲线分析鉴别食品中的3种李斯特氏菌

岳苑[1,2]，周梦诗[3]，徐娟[2,4]，李睿[3]，何利华[2]，赵飞[2]，张建中[2]，龚杰[2]

（1.宁夏回族自治区食品检测研究院，宁夏银川 750001）（2.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，北京 102206）（3.西安博睿康宁生物医学中心有限公司，陕西西安 710000）（4.武汉科技大学医学院公共卫生学院，湖北武汉 430000）

摘要：本研究利用高分辨率熔解曲线的方法，以 *iap* 基因为靶标新设计一对引物同时鉴别单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌，其余14种常见食源性病原微生物扩增为阴性结果，单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌的检出限为10个拷贝，英诺克李斯特氏菌的检测限为50个拷贝。本研究对78份样品进行HRM-real time PCR法、GB4789.30-2016和SN/T 1870-2016（荧光PCR法）的检测，并对3种方法的检测结果进行统计学分析。结果显示：HRM法和国标方法、HRM法和荧光PCR法的检测结果之间存在统计学差异，国标方法和荧光PCR法检测结果之间无统计学差异。本研究建立的基于HRM-real time PCR法检测3种李斯特氏菌的方法快速高效、特异性好、成本低，适用于食品中李斯特氏菌的日常检测和监管。

关键词：高分辨率熔解曲线；单核细胞增生李斯特氏菌；伊氏李斯特氏菌；英诺克李斯特氏菌；食品

文章篇号：1673-9078(2020)06-285-290 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1176

Identification of Three *Listeria* Species in Foods based on High Resolution Melting Curve Analysis

YUE Yuan[1,2], ZHOU Meng-shi[3], XU Juan[2,4], LI Rui[3], HE Li-hua[2], ZHAO Fei[2], ZHANG Jian-zhong[2], GONG Jie[2]

(1.Ningxia hui autonomous region food testing and research institute, Yinchuan 750001, China) (2.Institute of infectious disease control and prevention, Chinese center for disease control and prevention, State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China) (3.Xi'an biorealcoming biomedical center co. LTD, Xi 'an 710000, China) (4.School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract: In this study, a new pair of primers was designed to identify Listeria monocytogenes, Listeria evanescens and Listeria innominata at the same time with iap gene as the target by using high-resolution fusion curve method. The amplification of the other 14 common foodborne pathogens was negative. The detection limit of Listeria monocytogenes and Listeria evanescens was 10 copies, and that of Listeria innominata was 50 copies. In this study, 78 samples were tested by HRM-real time PCR method, GB4789.30-2016 and SN/T 1870-2016 (real-time PCR), and the results of three methods were analyzed statistically. The results showed that there were statistical differences between the detection results of HRM method and national standard method, HRM method and fluorescent PCR method, and there was no statistical difference between the results of national standard method and fluorescent PCR method. The method based on HRM-real time PCR for the detection of three Listeria species in this study is fast, efficient, specific, and low cost. It is suitable for the daily detection and supervision of Listeria species in food.

引文格式：

岳苑,周梦诗,徐娟,等.基于高分辨率溶解曲线分析鉴别食品中的3种李斯特氏菌[J].现代食品科技,2020,36(6):285-290

YUE Yuan, ZHOU Meng-shi, XU Juan, et al. Identification of three *Listeria* species in foods based on high resolution melting curve analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 285-290

收稿日期：2019-12-02

基金项目："十三五"国家科技重大专项课题（2018ZX10712-001）；传染病预防控制国家重点实验室重点项目（2014SKLID102）

作者简介：岳苑（1982-），女，博士研究生，高级工程师，研究方向：病原微生物

通讯作者：龚杰（1985-），男，博士，助理研究员，研究方向：分子诊断学

Key words: high-resolution melting curve; *Listeria monocytogenes*; *Listeria ivanovii*; *Listeria innocua*; foods

李斯特氏菌（*Listeria*）也称李氏杆菌，常见的有单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌等。该菌属能够引起食物中毒的主要是单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*，简称单增李斯特氏菌)。单增李斯特氏菌是一种常见的食源性致病菌，为四大食源性致病菌之一[1]。该菌为革兰氏阳性短杆菌，广泛存在于自然界中，肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等都已被证实是感染源。该菌能耐受较高的渗透压，在土壤、地表水、污水、植物、青储饲料中存在，所以动物很容易食入该菌，并通过口腔-粪便的途径进行传播[2,3]。由于单增李斯特氏菌特有的毒力相关蛋白（包括与黏附和侵入宿主细胞、在胞内生存复制、逃逸吞噬液泡及细胞间扩散等相关的毒力因子）的分子特点及作用机制[4]，人类受感染后可导致脑膜炎、肠胃炎、败血症、孕妇流产等，新生儿及免疫力低下者更易感染[5]。该菌在 4 ℃的环境中仍可生长繁殖，因此是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一[6]，对人体的身体健康造成潜在的危害。

目前，分离鉴定李斯特氏菌的方法有国家标准 GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》[7]、SN/T 1869-2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》和 SN/T 1870-2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》。国标中的生化鉴定方法，鉴定周期长（10 天左右）、步骤繁琐，溶血试验和协同溶血试验对检验人员的能力和经验要求较高。除形态学培养鉴定外，普通 PCR 法[6,8,9]和实时荧光 PCR 法[3,9-11]，步骤繁琐耗时长，或是探针成本较高，使得无法及时鉴定病原，进而影响食品安全监测的时效性。

高分辨率熔解曲线分析技术（High Resolution Melting，HRM）是基于饱和突光染料 LC Green 的发明而进行基因突变检测的新技术[12]。技术基本原理是利用与荧光染料结合的双链在温度升高的过程中会发生减色效应的物理性质，通过检测双链在熔解过程中释放的染料荧光信号所形成的特征熔解曲线，进行产物中核苷酸差异的鉴别[13]。HRM 技术无需使用荧光标记探针，具有快速、准确、廉价、闭管操作等优点，现已广泛用于医学、遗传学、微生物学、动植物学、法医学和农业等学科[14]。本文利用高分辨率熔解曲线的方法，利用一对引物同时鉴别单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）、伊氏李斯特氏菌（*Listeria ivanovii*）和英诺克李斯特氏菌（*Listeria innocua*），为食品中李斯特氏菌的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品

本研究使用的菌株：标准菌株包括单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115、伊氏李斯特氏菌 ATCC19119、英诺克李斯特氏菌 ATCC33090、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、马红球菌 ATCC6939，由宁夏回族自治区食品检测研究院提供。其它菌株包括金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、空肠弯曲菌、肺炎沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、阪崎肠杆菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、白色念珠菌、毛孢子菌、弯孢菌、链格孢菌、枝孢菌临床分离株，由中国疾病预防控制中心传染病所诊断室提供。

样品一部分来自宁夏回族自治区食品检测研究院 2018-2019 年监督检验、国家抽检的样品，另一部分购自宁夏银川市兴庆区和金凤区的 4 家超市，包括牛板筋、酱牛肉、扒鸡、鸡翅、鸡爪、鸭脖、鸭爪等共 78 份。

1.1.2 主要试剂

Premix Ex Taq，Takara；Evagreen，Biotium；细菌 DNA 提取试剂盒，QIAGEN；李氏增菌肉汤，广东环凯微生物科技有限公司；含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂（TSA-YE），广东环凯微生物科技有限公司；LB 培养基，北京陆桥技术有限责任公司；3%的碱性氯化钠蛋白胨水，广东环凯微生物科技有限公司；布氏肉汤培养基，Oxoid；马铃薯葡萄糖琼脂培养基，北京陆桥技术有限责任公司；基因组 DNA 提取试剂盒（货号 51306），Qiagen；引物探针由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.1.3 主要仪器

ABI QuantStudio 6 flex 荧光定量 PCR 仪，Thermo 高速离心机，恒温培养箱，生物安全柜。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

比对 NCBI 数据库中所有单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌高度特异的目的基因，最终确定 *iap* 基因（登录号：DQ054587.1）。在 *iap* 基因序列中寻找差异性靶序列，设计 3 种李斯特氏菌鉴别引物，通过设计、在线序列比对和筛选，得到适

用于高分辨熔解曲线（High resolution melting，HRM）技术的特异性引物，序列如下：

F：5’-TGACACTATTTGGGCTTTATCC-3’；

R：5’-CCGTTTTCACTTCTGCTTTTG-3’。

扩增产物序列如图 1 所示。

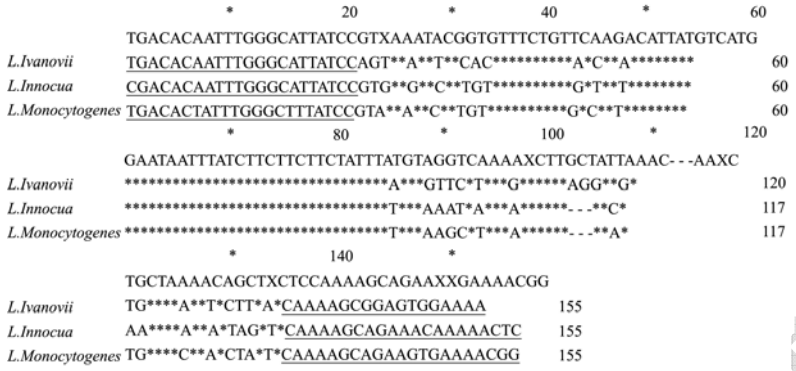


图 1 李斯特氏菌 *iap* 基因扩增片段序列

Fig.1 *Listeria iap* gene amplified fragment sequence

1.2.2 DNA 提取

单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115、伊氏李斯特氏菌 ATCC19119、英诺克李斯特氏菌 ATCC33090 使用李氏增菌肉汤，30 ℃增菌 24 h，再用 TSA-YE 琼脂，36 ℃培养 24 h。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、空肠弯曲菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、阪崎肠杆菌、铜绿假单胞菌采用 LB 培养基，36 ℃培养 24 h。霍乱弧菌和副溶血弧菌采用 3%的碱性氯化钠蛋白胨水，36 ℃培养 24 h。空肠弯曲菌采用布氏肉汤培养基，42 ℃培养 24 h。真菌采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基，28 ℃培养 72 h。按照 QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen）试剂盒提取基因组 DNA。提取好的 DNA 贮存于-20 ℃备用。

1.2.3 HRM-real time PCR 反应体系的建立

在每一个 PCR 反应孔中加入：2×Mix Taqman PCR Master 15 μL、上下游引物各 0.9 μL（引物浓度均为 10 μM）、Rox Reference Dye Ⅱ(100×）0.3 μL、Evagreen 20×in Water 1.5 μL、待测 DNA 模板 2 μL（10~50 ng/μL），用灭菌纯水补足体系至 30 μL。

HRM-real time PCR 反应程序为（升降温速度 1.6 ℃/s）：95 ℃预变性 10 min；95 ℃ 15 s，68 ℃ 40 s 扩增 35 个循环。熔解程序为（升降温速度 1.6 ℃/s）：95 ℃ 10 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s。

1.2.4 HRM-real time PCR 特异性试验

在 HRM-real time PCR 反应体系建立的基础上，以目标菌和 14 种非目标菌株的基因组 DNA 为模板进行 HRM-real time PCR 反应，检验所建立体系的特异性。

1.2.5 HRM-real time PCR 检测限试验

将单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌按 1.2.2 的方法进行培养后，用棉签沾取少量菌苔于 1000 μL 灭菌生理盐水中，混匀。吸取 50 μL 菌悬液检测 OD 值，直至 OD600 值达到 1.0。将测得的 1OD 菌悬液逐级稀释，取各稀释液 100 μL 涂布于 TSA-YE 平板上，37 ℃培养 24 h，计数。将稀释好的菌液按照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。用 1.2.3 中建立的 HRM-real time PCR 反应条件与反应体系进行检测限试验。

1.2.6 样本检测

以无菌操作取样品 25 g 加入到含有 225 mL 的 LB1 增菌液的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min，于 30 ℃恒温箱中培养 24 h。吸取增菌液 1~2 mL，12000 r/min 离心 5 min，用 DNA 提取试剂盒提取增菌液中 DNA，进行 HRM-real time PCR 扩增，同时使用 GB 4789.30-2016 和 SN/T 1870-2016 的方法进行鉴定，将 3 种方法的检测结果进行鉴定比对。

1.2.7 数据统计分析

将 HRM-real time 法、real-time PCR 法和国标方法检测的 78 个样本的数据，进行统计学 McNemar 检验，比较三种检验方法是否存在差异。

2 结果与讨论

2.1 HRM-real time PCR 特异性试验

本方法在进行熔解程序的同时连续检测荧光强度，以荧光信号对温度的一阶负导数为纵坐标，温度为横坐标，得到熔解峰值图。鉴别结果的判断原则是每一种特异性扩增产物 Tm 值的熔解峰代表一种特定的李斯特氏菌，其中单增李斯特氏菌的 Tm 值在 78~80 ℃范围内出现熔解峰；伊氏李斯特氏菌的 Tm 值在 78~80 ℃范围内出现熔解峰；英诺克李斯特氏菌的 Tm 值在 77~79 ℃范围内出现熔解峰。方法对其他

14 种非目标菌无交叉反应。结果见图 2。

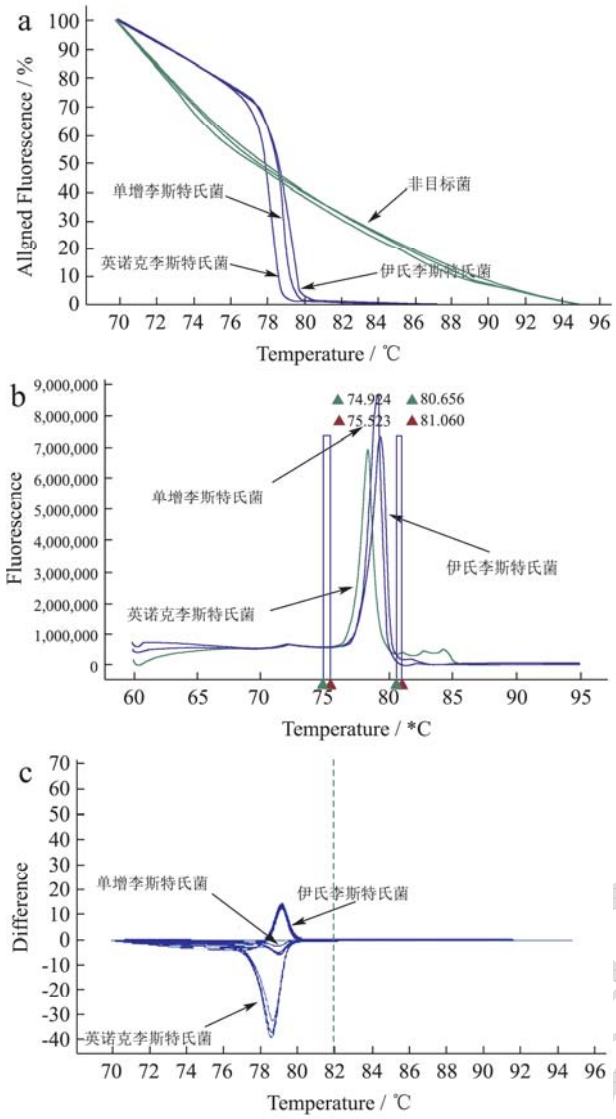


图 2 李斯特氏菌 HRM-real time PCR 特异性试验

Fig.2 *Listeria* HRM-real time PCR specificity test

注：a：熔解曲线图；b：HRM 熔解峰值图；c：HRM 曲线差异图。

2.2 HRM-real time PCR 检测限试验

HRM-real time PCR 反应结果表明，随着稀释梯度的不断增加，Ct 值逐渐增大，单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌直至稀释至 10^3 cfu/mL 时达到检测低限，英诺克李斯特氏菌稀释至 10^4 cfu/mL 时达到检测低限。结合平板计数结果，单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌的检测灵敏度为 10 个拷贝，英诺克李斯特氏菌检测灵敏度为 50 个拷贝。结果表明上述方法对 3 种李斯特氏菌的检测均具有良好的灵敏度（见图 3）。

病原微生物检测的关键是特异靶基因的选择及引物的设计。在李斯特氏菌的分子检测中，研究者们通常用于扩增的靶基因包括 *hly*、*inl*、*iap* 等[15-17]。本研究选择的 *iap* 基因是李斯特氏菌的主要毒力因子，利用该基因两端的保守区序列和中间的可变区序列建立的分子生物学检测方法能够对李斯特氏菌的种、属进行鉴定[3]。本研究利用 HRM 分析技术，通过实时监测升温过程中双链 DNA 荧光染料与 PCR 产物的结合情况，*iap* 基因序列不同使双链 DNA 的 Tm 值发生变化，从而双链 DNA 在升温过程中先后解链，形成不同的熔解曲线形状。荧光染料从局部解链的 DNA 分子上释放，从荧光强度和时间曲线上就能判断是否存在有差异的 *iap* 基因片段，且该序列的差异会影响熔解曲线的峰形，能有效区分不同李斯特氏菌的 *iap* 基因序列。

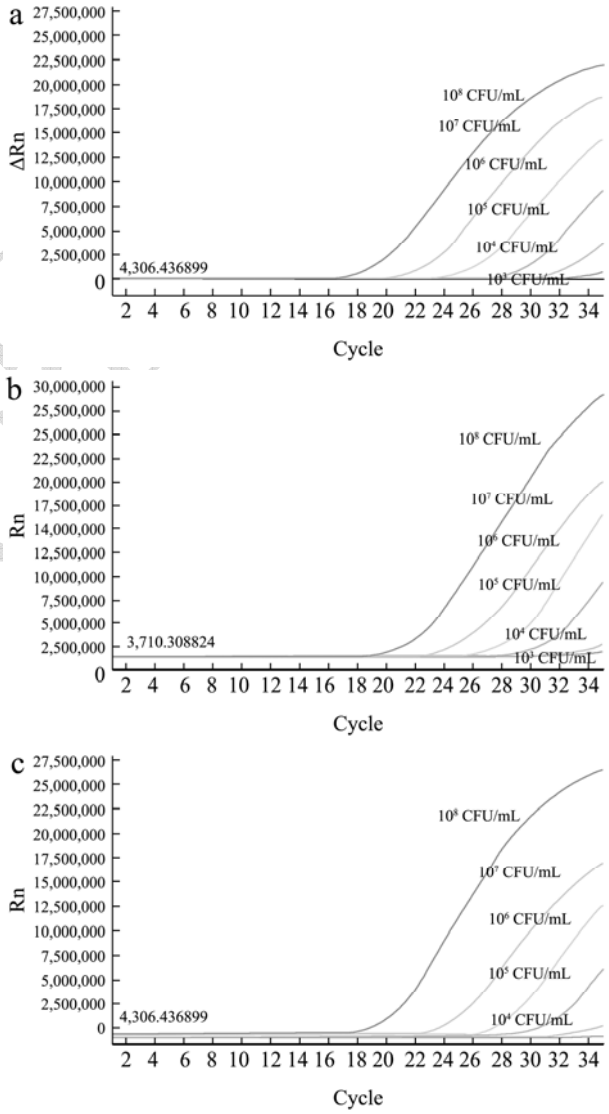


图 3 李斯特氏菌 HRM-real time PCR 检测限试验

Fig.3 *Listeria* HRM-real time PCR detection limit test

注：a：单增李斯特氏菌；b：伊氏李斯特氏菌；c：英诺克李斯特氏菌。

此外，Carl 等的研究还表明：当 PCR 产物较短时，杂合子扩增产物更容易检测，而随着扩增子大小的增

加，识别杂合子变得越来越困难[18]。基于这个原因，本研究在设计引物时，尽量控制扩增产物的长度在300 bp以内，以保证结果的特异性。另外，还可以通过在扩增或熔化前将对照 DNA 添加到每个样品中来提供每个曲线的温度校准[18]。本研究中单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌的Tm值均在78~80 ℃范围内出现熔解峰，因此在检测时建议使用标准菌株或是具有同等效果的阳性质控菌株一同扩增，为每个曲线提供温度校准。

2.3 样本检测结果

根据GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》的要求，对熟肉制品和即时生肉制品中单增李斯特氏菌的指标做出了限量要求。样品选取来自宁夏回族自治区食品检测研究院的检样及自购样品共78份，其中牛板筋16份、酱牛肉8份、扒鸡8份、鸡翅10份、鸡爪13份、鸭脖11、鸭爪12份。按照GB 4789.30-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》中的方法增菌后，分别采用HRM-real time法、GB 4789.30-2016和SN/T 1870-2016的方法同时进行鉴定。结果详见表1。

目前，国标中针对单增李斯特氏菌的检验方法周期长（10~20 d），步骤繁琐复杂，需要使用6种标准菌株以外还需要进行溶血试验和协同溶血试验。溶血实验对实验人员的经验、操作及血平板的质量要求较高，操作时穿刺血平板的深浅会直接影响溶血结果[19]。这些不确定因素给李斯特氏菌的分离鉴定工作带来了一定的困难，使得检验人员容易出现误判。同时，在食品中经常遇到两种或三种李斯特氏菌混合存在的情况，更增加了检测工作的难度，使得结果准确性无法保证。SN/T 1870-2016荧光PCR法操作简便，能够实时监测结果，耗时短，但是Taqman探针成本较高。

表1 78份样本检测结果对比

Table 1 Comparison of 78 samples test results

方法	检出/份			未检出/份	阳性率/%
	L. monocytogenes	*L. ivanovii*	*L. innocua*		
HRM	10	2	4	62	20.51
GB	8	0	0	70	10.26
SN	10	0	0	68	12.82

注：GB表示GB 4789.30-2016方法，SN表示SN/T 1870-2016方法。

由表1可知，在本研究检验的78份样品中，用HRM-real time法在10份样品中检测出单增李斯特氏菌，在2份样品中检出伊氏李斯特氏菌，在4份样品中检出英诺克李斯特氏菌，检出率为20.51%；GB 4789.30-2016方法在8份样品中检出单增李斯特氏菌，检出率为10.26%；SN/T 1870-2016方法在10份样品中检出单增李斯特氏菌，检出率为10.82%。因为后面两种方法仅仅是针对食品中单增李斯特氏菌的检验，无法检测出另外2种李斯特氏菌，因而检出率较低。荧光PCR方法的检出率高于国标方法的原因可能在于：一、荧光PCR法的灵敏度高于传统培养方法；二、样品中存在的李斯特氏菌非活菌，存在核酸残留。经过统计学分析表明：HRM法和国标方法的检测结果x^2=6.125，p<0.05；国标方法和荧光PCR法的检测结果x^2=0.5，p>0.05；HRM法和荧光PCR法的检测结果x^2=4.167，p<0.05。以p<0.05为差异有统计学意义，说明HRM法和国标方法、HRM法和荧光PCR法的检测结果之间存在统计学差异，国标方法和荧光PCR法检测结果之间无统计学差异。

3 结论

本研究利用高分辨率熔解曲线的方法，以*iap*基因为靶标新设计一对引物同时鉴别单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌，其余14种常见食源性病原微生物扩增为阴性结果。单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌的检出限为10个拷贝，英诺克李斯特氏菌的检测限为50个拷贝。本研究对78份样品进行HRM-real time PCR法、GB 4789.30-2016和SN/T 1870-2016（荧光PCR法）的检测，并对3种方法的检测结果进行统计学分析。结果显示：HRM法和国标方法、HRM法和荧光PCR法的检测结果之间存在统计学差异，国标方法和荧光PCR法检测结果之间无统计学差异。本研究建立的基于HRM-real time PCR法检测3种李斯特氏菌的方法快速高效、特异性好、成本低，适用于食品中李斯特氏菌的日常检测和监管。

参考文献

[1] 赵一鸣.三种分型技术对食源性单增李斯特菌分型研究[D].广州:华南理工大学,2015
ZHAO Yi-ming. Study on the classification of food-borne *Listeria monocytogenes* by three types of typing techniques [D]. Guangzhou: South China University of Technology,

2015

[2] Renato H O, Henk C B, Martin W. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2011, 301: 79-96

[3] 李丹丹,徐义刚,李梦圆,等.单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光定量PCR快速检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2016,43(6):1453-1457
LI Dan-dan, XU Yi-gang, LI Meng-yuan, et al. Development of a dual real-time PCR for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43(6): 1453-1457

[4] 李爱华,叶长芸.单核细胞增生性李斯特氏菌致病相关机制的研究进展[J].疾病监测,2011,26(11):914-919
LI Ai-hua, YE Chang-yun. Advances in research on pathogenesis of *Listeria monocytogenes* [J]. Disease Surveillance, 2011, 26(11): 914-919

[5] Robert L. Buchanan GM, Gorris, MM Hayman. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments [J]. Food Control, 2017, 75: 1-13

[6] Liu D, Ainseorth AJ, Austin FW, et al. A Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes* [J].International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3): 297-304

[7] GB 4789.30-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》[S].2016
GB 4789.30-2016 National Food Safety Standards Food Microbiological Examination *Listeria monocytogenes* Test [S]. 2016

[8] Chen J Q, Stephanie H, Patrick R, et al. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources [J]. Food Science and Human Wellness, 2017, 6: 39-59

[9] 闫琳.食品中沙门氏菌、单增李斯特氏菌快速检测技术研究[D].北京:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,2011
YAN Lin. Study on rapid detection technology of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in food [D]. Beijing: China Center for Disease Control and Prevention, Institute of Nutrition and Food Safety, 2011

[10] 马晓燕,张会彦,贾春凤,等.荧光定量 PCR 检测单核细胞增生性李斯特氏菌[J].安徽农业科学,2011,39(15):9274-9276
MA Xiao-yan, ZHANG Hui-yan, JIA Chun-feng, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* by Real-time PCR [J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2011, 39(15): 9274-9276

[11] 陈楷,蒋佳希,张明明,等.实时荧光 PCR 检测熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌的结果分析与探讨[J].轻工科技,2018,34(5):3-5
CHEN Kai, JIANG Jia-xi, ZHANG Ming-ming, et al. Analysis and discussion on the results of real-time PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in cooked meat products [J]. Light Industry Science and Technology, 2018, 34(5): 3-5.

[12] Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC green [J]. Clinical chemistry, 2003, 49: 853-860

[13] 嘎利兵嘎.高分辨率熔解曲线(HRM)技术在动物病毒基因分型中的研究及应用[D].北京:中国农业大学,2015
GALI Bing-ga. Research and application of high resolution melting curve analysis in the genotyping and detection of animal viruses [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015

[14] 王姣,尤崇革.高分辨率熔解曲线技术及应用新进展[J].兰州大学学报(医学版),2016,42(5):55-61
WANG Jiao, YOU Chong-ge. Application advances of high resolution melting technology [J]. Journal of Lanzhou University (Medical Sciences), 2016, 42(5): 55-61

[15] Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coil* O157: H7 in meat samples [J]. Journal of Food Product, 2005, 68(3): 551-556

[16] Datta A R. Systhetic olinodeoxyrihonucleolicle probes for detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 54(12): 2933

[17] 杭华,吴斌,钱斯日古楞,等.IMS-PCR 快速检测单核细胞增生李斯特氏菌[J].大连轻工业学院学报,2007,26(3):218-220
HANG Hua, WU Bin, QIAN Si-ri-gu-leng, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by Immuno-magnetic cell separation combined with fluorescence PCR [J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2007, 26(3): 218-220

[18] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC green [J]. Clinical Chemistry, 2003, 49(6): 853-860

（下转第 171 页）