

# 可视化环介导等温扩增技术检测鸡鸭源性成分

杨丽霞\*, 邱华丽, 蒋成, 徐睿鑫, 周金沙, 邱志鹏  
(长沙市食品药品检验所, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 建立生肉及熟肉制品中鸡、鸭源性成分的特异性基因 LAMP 可视化快速检测方法。**方法** 根据鸡鸭物种特异性 *cytb*、*COX3* 基因的 6 个特异性区域设计 LAMP 引物, 在反应前加入羟基萘酚蓝(HNB), 在 63 °C 条件下反应 45 min; 反应结果可以根据颜色变化直接判断, 阳性为天蓝色, 阴性为紫罗兰色。并对 30 个肉制品样品进行可视化 LAMP 和 PCR 方法平行检测。**结果** LAMP 方法的最低检出限为 1 pg, 特异性良好, 同时对肉制品中目标物检测的检出限可达到 0.01%。**结论** 该方法用于肉制品中鸡鸭源性成分的快速检测, 具有操作简单、无需贵重仪器、反应结果肉眼可观察、灵敏度高和特异性强等特点, 适合于基层监管部门进行肉制品现场快速检测。

**关键词:** 鸡源性成分; 鸭源性成分; 环介导等温扩增; 可视化检测

## Visual detection of chicken and duck derived components by loop-mediated isothermal amplification method

YANG Li-Xia\*, QIU Hua-Li, JIANG Cheng, XU Rui-Xin, ZHOU Jin-Sha, QIU Zhi-Peng  
(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410013, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a visual and rapid detection technique for chicken and duck derived components by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** The specific LAMP primers of chicken and duck were designed according to the specific mitochondrial *cytb* and *COX3* genes, respectively. Target DNA was amplified and visualized by hydroxyl naphthol blue (HNB) dye within 45 min at an isothermal temperature of 63 °C and the results were determined by the color change of HNB. Meanwhile, thirty samples were detected by LAMP and PCR. **Results** The detection limit of the LAMP assay was about 1 pg genomic DNA and had good levels of specificity. It was found that the LAMP assays allowed the detection of as little as 0.01% chicken or duck derived components in the meat mixtures. **Conclusion** The established method provides a useful tool for the rapid and sensitive detection of meat species, and it has the advantages of simple operation, no need for expensive instruments, observing the reaction results by the naked eye, high sensitivity and specificity, which is suitable for on-site rapid detection of meat products for grass-roots supervision departments.

**KEY WORDS:** chicken derived component; duck derived component; loop-mediated isothermal amplification; visual detection

基金项目: 长沙市科技计划项目(kh1601093)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Project of Changsha (kh1601093)

\*通讯作者: 杨丽霞, 博士, 高级工程师, 从事食品质量与安全研究。E-mail: yanglixia612@163.com

\*Corresponding author: YANG Li-Xia, Ph.D, Senior Engineer, Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410013, China. E-mail: yanglixia612@163.com

## 1 引言

国内肉制品市场中, 一些企业或个人为了追求利益, 以鸡肉、鸭肉等低价肉冒充牛羊肉, 此类事件的曝光, 引起了人们对肉制品掺假食品安全问题的高度关注<sup>[1-4]</sup>。因此迫切需要建立一种简便、快速、廉价的牛羊肉中掺假肉的鉴别方法, 以维护肉制品市场的安全, 保护广大消费者的利益。

肉制品种类鉴别方法可分为形态学、免疫学和分子生物学等。市场上的熟肉制品经过粉碎、添加香料和烘烤加工等处理后, 采用传统的形态学方法很难进行准确的肉类品种鉴定。由于肉制品在加工过程中易导致蛋白质变性, 使得依赖抗体特异性的 ELISA 法鉴定肉制品种类的可靠性和稳定性较差<sup>[5]</sup>。目前已经开展的对肉种类鉴定的方法中, 基于核酸扩增的 PCR 技术, 以其快速、高效和特异性强的优点, 成为动物源性成分检测的主流<sup>[6,7]</sup>。线粒体基因组具有种内高度保守的特性, 在肉制品种类鉴别中是非常重要的检测目标<sup>[8]</sup>。近年来, 基于线粒体基因的鉴定方法不断出现, 包括 PCR-RFLP、多重 PCR、荧光定量 PCR 等, 这些方法都需要涉及到 PCR、荧光定量 PCR 等贵重仪器。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本 Notomi 等<sup>[9]</sup>发明的一种新型核酸扩增技术, 该技术成本低, 操作简单, 剪剪性强, 已在医学、检验检疫、食品安全等技术领域得到了广泛应用<sup>[10-13]</sup>。在肉制品鉴别研究中, 已运用 LAMP 技术建立了猪肉<sup>[14]</sup>、鸵鸟<sup>[15]</sup>等成分的检测方法。

LAMP 反应在不开盖的情况下, 其结果可以通过 3 种方式呈现: (1)反应产生的焦磷酸镁沉淀物, 可目视浑浊, 也可用浊度仪进行检测; (2)加入 SYBR Green I 等染料, 采用实时荧光检测仪检测荧光值变化; (3)可添加荧光染料通过颜色变化来判定结果<sup>[16]</sup>。常用的显色染料有 SYBR Green I、钙黄绿素、HNB 等。其中, SYBR Green I 和 HNB 的检测灵敏度最高, 是钙黄绿素的 10 倍<sup>[17]</sup>。但采用 SYBR Green I 做显色染料时, 需在 LAMP 反应结束后加入, 开盖容易造成气溶胶污染。本研究采用的 HNB 染料可以在反应前加入, 对反应无影响, 结果易于判断, 且降低了污染的风险。

本文根据实验室检验的条件和需求, 以鸡、鸭物种的线粒体基因为目标, 建立肉制品中鸡、鸭源性成分的可视化 LAMP 检测方法, 整个反应过程在恒温状态下 45 min 以内就可以完成, 而且可以通过肉眼观察反应结果, 以期为肉制品真假鉴别提供有力的技术支撑。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

BD-1000 超微量核酸蛋白分析仪(北京五洲东方科技发展有限公司); K30B 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);

通用型 LAMP 试剂盒(广州迪澳生物科技有限公司); 100 bp DNA ladder, Premix Taq<sup>TM</sup>(宝生物工程(大连)有限公司); HNB: Sigma-Aldrich; 鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉、羊肉、狗肉购自长沙市内大型菜市场; 羊肉串、牛肉串购自长沙市内烧烤店。

### 2.2 试验方法

#### 2.2.1 DNA 提取

参考文献<sup>[18]</sup>。

#### 2.2.2 引物序列

分别根据鸡鸭物种特异性线粒体基因组 *cytb*(KX947010.1)、*COX3*(KX592536.1)基因, 采用 LAMP 专用引物设计软件设计 LAMP 引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Sequences of primers

引物	序列(5'→3')
CH-F3	TCAGCAATTCCTACATTGG
CH-B3	GGTGAGTATGAGAGTTAAGCC
CH-FIP	AGGAGGAAGTGTAAAGCGAAGA-TTTT-CCTA GTAGAGTGAGCCTGAG
CH-BIP	TCATCCACCTCACCTTCTACA-TTTT-TTGCA GAGTCGGATGAGA
CH-LB	CGAATCAGGCTCAAACAACC
DU-F3	TCTGGGCATTCTTCCACTCA
DU-B3	TCGTCAATGTTAGGGCGTG
DU-FIP	TGGGGTTGAGCGGTTTGATGC-TTTT-CTAGTA CCAACCCCGAACT
DU-BIP	AACACAGCCATCCTCCTAGCCT-TTTT-TGGCAT GTTTTCGGTTTCT

#### 2.2.3 LAMP 分析

25 μL LAMP 反应体系中外引物 F3 和 B3 浓度为 0.2 μmol/L, 内引物 FIP 和 BIP 浓度为 1.6 μmol/L, 环引物 LB 浓度为 0.8 μmol/L, 8 U Bst DNA 聚合酶 0.5 μL、2×LAMP reaction mixture 12.5 μL、120 μmol/L HNB 及 DNA 模板 100 ng, 反应条件: 63 °C, 45 min, 在干式恒温器上完成反应。

#### 2.2.4 特异性分析

分别提取鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉、羊肉、狗肉的 DNA, 用于确定 LAMP 引物的特异性。

#### 2.2.5 灵敏度分析

将鸡、鸭源性成分基因组 DNA 稀释成不同浓度梯度(100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg), 进行 LAMP 扩增。

#### 2.2.6 肉制品中目标成分分析

将鸡肉、鸭肉和牛肉粉碎后, 模拟加工条件 100 °C 加热处理 30 min, 分别制备成牛肉中含有不同含量鸡、鸭源

性成分(100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0%)的肉制品混合物,提取基因组 DNA,进行 LAMP 扩增。

### 3 结果与分析

#### 3.1 特异性试验

采用鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉、羊肉、狗肉等样品 DNA 为模版,进行 LAMP 反应。鸡源性成分可视化 LAMP 检测结果见图 1A,结果中只有鸡肉样本反应管内呈蓝色阳性结果。鸭源性成分可视化 LAMP 检测结果见图 1B,结果中只有鸭肉样本呈阳性结果。

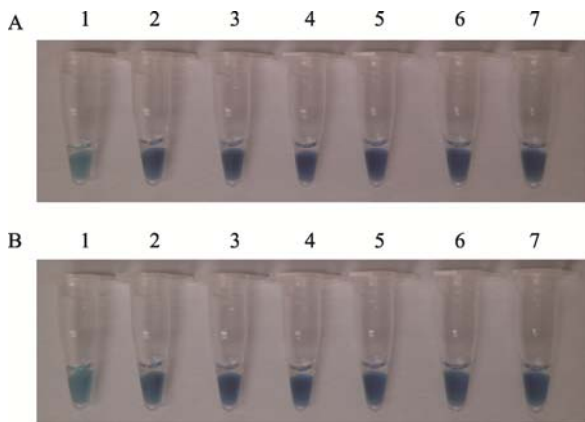


图 1 可视化 LAMP 扩增法检测鸡、鸭源性成分特异性分析

A: 鸡源性成分特异性检测, 1: 鸡, 2: 鸭, 3: 猪, 4: 牛, 5: 羊, 6: 狗, 7: 空白对照

B: 鸭源性成分特异性检测, 1: 鸭, 2: 鸡, 3: 猪, 4: 牛, 5: 羊, 6: 狗, 7: 空白对照

Fig. 1 Specificity analysis of visual LAMP of chicken and duck derived components

A: specificity analysis of chicken derived component, 1: chicken, 2: duck, 3: porcine, 4: beef, 5: sheep, 6: dog, 7: negative control

B: specificity analysis of duck derived component, 1: duck, 2: chicken, 3: porcine, 4: beef, 5: sheep, 6: dog, 7: negative control

#### 3.2 灵敏度试验

将 10 倍梯度稀释的鸡、鸭源性成分基因组 DNA(100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg)分别用于 LAMP 反应和 PCR 反应。鸡、鸭源性成分 LAMP 扩增结果见图 2, 检测灵敏度可达到 1 pg DNA。鸡、鸭源性成分 PCR 扩增结果见图 3, 检测灵敏度分别可达到 1 pg、10 pg。

#### 3.3 熟肉制品中目标成分扩增

将牛肉、鸡肉和鸭肉加热制成熟肉后,在牛肉中分别掺入鸡肉、鸭肉,制备 6 个不同含量(100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0%)的混合样品,进行可视化 LAMP 扩增,检测限均可达到 0.01%(见图 4A、4B)。

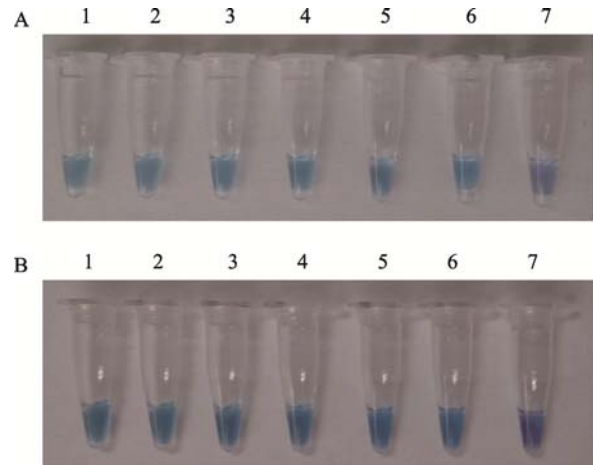


图 2 可视化 LAMP 检测灵敏度

A: 鸡源性成分可视化检测, B: 鸭源性成分可视化检测

1~7 分别为 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg DNA, 空白对照

Fig. 2 Sensitivity analysis of visual LAMP

A: visual LAMP analysis of chicken derived component; B: visual LAMP analysis of duck derived component

Tubes 1~7: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg DNA, negative control

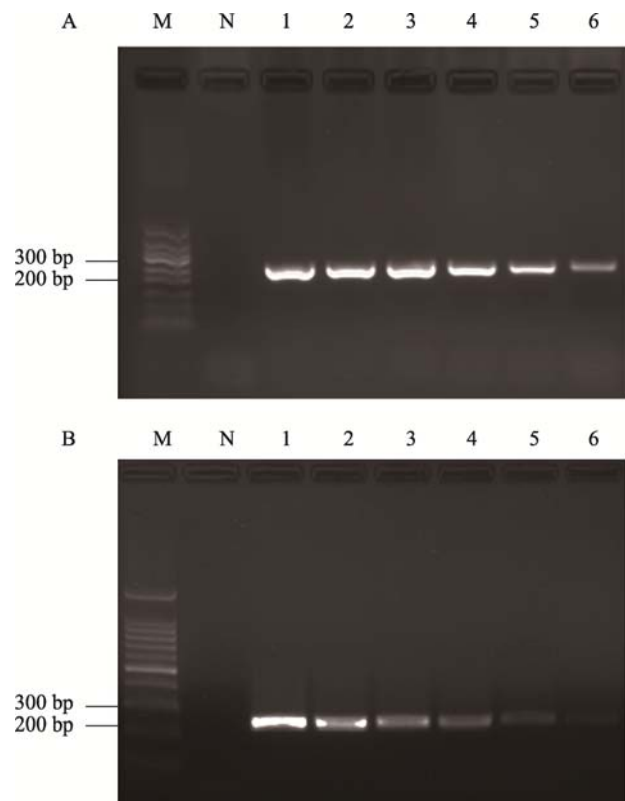


图 3 PCR 检测灵敏度

A: 鸡源性成分检测, B: 鸭源性成分检测

M: DNA marker, N: 空白对照; 1~6 分别为 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg DNA

Fig. 3 Sensitivity analysis of PCR

A: PCR analysis of chicken derived component; B: PCR analysis of duck derived component

M: DNA marker; N: negative control; lanes 1~6: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg DNA

表 2 实际样品中鸡鸭源性成分检测比对  
Table 2 Detection of chicken and duck derived components by LAMP and PCR

检测对象	数量	LAMP 检出鸡源性样品数	PCR 检出鸡源性样品数	LAMP 检出鸭源性样品数	PCR 检出鸭源性样品数
羊肉串	15	0	0	4	4
牛肉串	15	0	0	3	3
合计	30	0	0	7	7

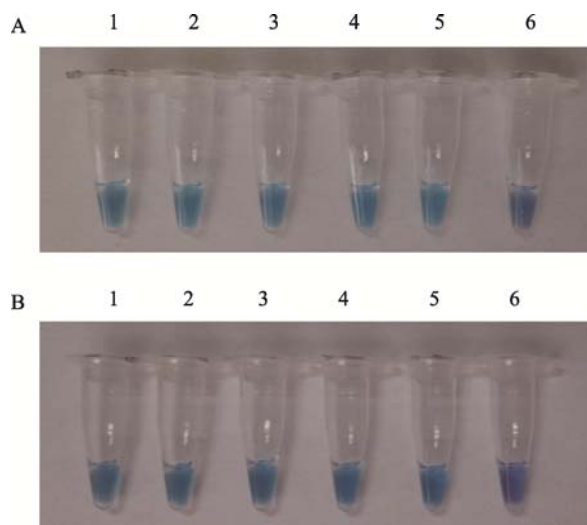


图 4 加工肉制品中鸡鸭成分检测

A: 鸡源性成分可视化检测; B: 鸭源性成分可视化检测

1~6 分别为: 100%、10%、1%、0.1%、0.01% 目标成分含量的肉制品和空白对照

Fig. 4 Visual LAMP analysis of meat products

A: visual LAMP analysis of chicken derived component; B: visual LAMP analysis of duck derived component

Tubes 1~6: 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, negative control

### 3.4 实际样品鉴定结果

在市场上购买 30 个肉制品样品, 制备好基因组 DNA 样本, 用本研究建立的可视化 LAMP 进行检测。结果如表 2 所示, LAMP 法未检出鸡源性阳性样品, 检出 7 个鸭源性阳性样品, 与 PCR 检测结果一致。结果表明, LAMP 法与 PCR 法一致性良好, 在实际检测中可采用 LAMP 法。

## 4 结 论

本研究建立的鸡鸭源性成分 LAMP 检测方法特异性好, 仅扩增目标 DNA, 对其他动物源性成分的 DNA 没有交叉反应。可视化 LAMP 法对鸡肉、鸭肉的检测灵敏度均可达到 1 pg, PCR 的检测灵敏度分别为 1 pg 和 10 pg。对肉制品, 该方法对鸡肉、鸭肉的检测灵敏度均可达到 0.01%。本研究 LAMP 法检测时间仅需 45 min, 只需恒温水箱即可完成检测, 成本低, 操作简单, 灵敏度高, 无需开盖即

可得到检测结果, 避免了开盖可能造成的气溶胶污染, 同时对检验人员要求低, 所以更适合检验检测部门和基层监管部门使用。综上所述, LAMP 法在食品安全快速检测中可发挥重要作用。

### 参考文献

- [1] 何玮玲, 张弛, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880.  
He WL, Zhang C, Yang J, et al. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products [J]. Sci Agric Sin, 2012, 45(9): 1873-1880.
- [2] 李家鹏, 乔晓玲, 田寒友, 等. 食品和饲料中动物源性成分检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 340-347.  
Li JP, Qiao XL, Tian HY, et al. Research progress of identification techniques for animal-derived materials in food and feed [J]. Food Sci, 2011, 32(9): 340-347.
- [3] 许如芬, 周广彪, 魏霜, 等. 锁核酸探针多重荧光 PCR 快速检测肉制品中 4 种动物肉掺假的研究[J]. 检验检疫学刊, 2016, 26(2): 12-16.  
Xu RS, Zhou GB, Wei S, et al. Development of multiplex Taqman-LNA real-time PCR for rapid detecting four meat adulteration in meat and meat products [J]. J Inspect Quarant, 2016, 26(2): 12-16.
- [4] 林彦星, 张彩虹, 阮周曦, 等. 实时荧光定量 PCR 检测畜禽肉制品中鸭源性成分[J]. 动物医学进展, 2016, 37(11): 48-53.  
Lin YX, Zhang CH, Ruan ZX, et al. A real-time fluorescent PCR for detection of duck-derived ingredients in meat products of livestock and poultry [J]. Prog Vet Med, 2016, 37(11): 48-53.
- [5] Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, et al. Identification of meat species by TaqMan-based realtime PCR assay [J]. Meat Sci, 2009, 82 (4): 444-449.
- [6] Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages [J]. Meat Sci, 2007, 77(4): 649-653.
- [7] Zhang CL, Mark RF, Nigel WS, et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses [J]. Food Control, 2007, 18(9): 1149-1158.
- [8] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86, 6196-9200.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [10] Bühlmann A, Pothier J F, Rezzonico F, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight[J]. J Microbiol Meth, 2013, 92(3): 332-339.
- [11] 江再茂, 马雪萍, 殷竹君, 等. 单管可视化环介导等温扩增技术快速检

- 测恶性疟原虫[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(26): 5014-5018.
- Jiang ZM, Ma XP, Yin ZJ, *et al.* A closed-tube isothermal amplification method for highly sensitive and visualized detection of plasmodium falciparum [J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(26): 5014-5018.
- [12] Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of Histoplasma capsulatum DNA in clinical samples [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 483-488.
- [13] 初亚男, 封利颖, 张婕妤, 等. 环介导等温扩增技术改进的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 729-735.
- Chu YN, Feng LY, Zhang JY, *et al.* A systematic review of the research progress and improvement of loop-mediated isothermal amplification [J]. Microbiol China, 2015, 42(4): 729-735.
- [14] Yang LX, Fu SJ, Peng XK, *et al.* Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2014, 28(5): 882-888.
- [15] Abdulmawjood A, Grabowski N, Fohler S, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive identification of ostrich meat [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100717.
- [16] 曾军辉. 可视化环介导等温扩增技术研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, 41(1): 8-10, 19.
- Zeng JH. Review on visualizable loop-mediated isothermal amplification [J]. Guangdong J Anim Vet Sci, 2016, 41(1): 8-10, 19.
- [17] Goto M, Honda E, Ogura A, *et al.* Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue [J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [18] 杨丽霞, 宋涛平, 谢晓红, 等. SYBR Green I 实时 PCR 技术鉴定鸭源性成分的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(11): 16-19.
- Yang LX, Song TP, Xie XH, *et al.* SYBR Green I real-time PCR for detection of duck-derived components [J]. Chin Agric Sci Bull, 2013, 29(11): 16-19.

(责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



杨丽霞, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: yanglixia612@163.com