

环介导等温扩增与 qPCR 用于检测肉制品中 狗源性成分的比较

韦 涛¹, 黄继锦^{1*}, 黄惠琳¹, 黄晓韵¹, 谢耐珍¹, 张 璜²

(1. 广西-东盟食品检验检测中心, 南宁 530022; 2. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广州 510320)

摘 要: **目的** 建立基于实时荧光 PCR 和环介导等温扩增检测肉制品中狗源性成分的检测方法并比较 2 种方法的检测效能。**方法** 针对狗线粒体 CYTB 基因保守序列, 采用 Primer Explorer Version 4 软件设计环介导等温扩增引物, Primer Express 3.0.1 软件设计实时荧光 PCR 引物及探针。提取狗肉基因组 DNA 作为阳性模板, 黄牛牛肉等 20 种基因组 DNA 作为阴性对照, 分析扩增特异性; 用含靶序列的人工质粒确定检测灵敏度及人工掺肉样确定最低检出限; 用市售肉制品分析检出率。**结果** 对于肉制品中狗源性成分检测, 实时荧光 PCR 和环介导等温扩增检测均有较好的特异性, 人工质粒分析灵敏度分别为 0.1、1 fg/μL。对 10 种市售狗肉制品的狗源性成分均检出阳性、10 份不含狗肉制品均检出阴性, qPCR 法和环介导等温扩增法的检测结果符合率均为 100%。**结论** qPCR 法和环介导等温扩增法在检测肉及肉制品中的狗源性成分时, 在灵敏度、检出限和准确度上具有相当的效能。

关键词: 狗源性成分; 肉类掺假鉴定; 环介导等温扩增技术; 实时荧光 PCR; 肉制品

Comparison of loop-mediated isothermal amplification and qPCR used for the detection of the dog-derived ingredients in meat products

WEI Tao¹, HUANG Ji-Jin^{1*}, HUANG Hui-Lin¹, HUANG Xiao-Yun¹, XIE Nai-Zhen¹, ZHANG Huang²

(1. Guangxi-ASEAN Food Inspection and Testing Center, Nanning 530022, China;
2. Guangzhou Double Helix Gene Technology Co., Ltd., Guangzhou 510320, China)

ABSTRACT: Objective To establish detection methods based on real-time fluorescent PCR and loop-mediated isothermal amplification for detecting dog-derived ingredients in meat products and compare the detection performances of the two methods. **Methods** Aiming at the conservative sequence of dog mitochondrial CYTB gene, the loop-mediated isothermal amplification primers were designed using Primer Explorer Version 4 software and the real-time fluorescent PCR primers and probes were designed using Primer Express 3.0.1 software. The genomic DNA of dog meat was extracted as the positive template, and 20 kinds of genomic DNA such as yellow beef were used as the negative control to analyze the amplification specificity. The artificial plasmid containing target sequences were used to determine the detection sensitivity and the artificial mixed meat samples were used to determine the minimum detection limit. The detection rate was analyzed with commercial meat products. **Results** For the detection of

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB18126084)

Fund: Supported by the Guangxi Key Research and Development Plan Project (Guike AB18126084)

*通信作者: 黄继锦, 硕士, 主要研究方向为食品、保健食品质量检测。E-mail: 410766474@qq.com

*Corresponding author: HUANG Ji-Jin, Master, Guangxi-ASEAN Center for Food and Drug Safety Control, Nanning 530022, China. E-mail: 410766474@qq.com

dog-derived ingredients in meat products, real-time fluorescent PCR and loop-mediated isothermal amplification both had good specificity, and the analytical sensitivities of artificial plasmids were 0.1 and 1 fg/ μ L, respectively. The dog-derived ingredients of 10 commercial dog meat products were positive, and those of 10 products without dog meat were negative. The coincidence rates of detection results by qPCR method and loop-mediated isothermal amplification method were both 100%. **Conclusion** The qPCR method and the loop-mediated isothermal amplification method are quite efficient in detecting dog-derived ingredients in meat and meat products with respect to sensitivity, detection limit and accuracy.

KEY WORDS: dog-derived ingredients; meat adulteration identification; loop-mediated isothermal amplification technology; quantitative real-time PCR; meat products

0 引言

狗的养殖成本高,食用狗肉供应不足,价格高,不法商贩用狐狸、貂肉等毛皮动物混入狗肉中进行销售^[1],产生了食品安全、社会伦理道德、公共卫生安全等问题,危害巨大,已引起社会各界的强烈关注,必须加以打击,而打击的关键手段是对掺假成分进行有效地检测。

近年已经发布的食品中狗源性成分检测标准有 GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》和 SN/T 3730.2《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第2部分:狗成分检测 实时荧光 PCR 法》,为打击非法售制狗肉提供了技术支撑。二者均采用实时荧光 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术,它是一种基于 DNA 检测的定量、定性方法,具有快速、特异性强、灵敏度高、准确性高等特点,主要用于肉制品中动物源性成分定性检测,基于该技术的定量检测较少^[2]。目前, qPCR 技术被众多行标、地标、国标采用,已经成为国内外肉类掺假检测的主流方法之一^[3-5],但在基层监管中有诸多不足。一是 qPCR 检测需要昂贵的设备和专门的 PCR 实验室,作为监管技术支撑的基层食品检验检测机构中尚不能普及。二是我国食品加工的规模化和集中度太低,导致市面的食品来源极其复杂,仅依靠实验室检测难以解决肉制品掺假引起的食品安全问题。现实可行的办法是采用快检设备对进入市场的食品进行大范围的现场筛查,与 qPCR 法搭配使用,可以有效阻断伪劣食品混入市场^[6]。目前,国内外已经开发出很多快检方法,但一些方法存在便捷性不高、灵敏度低或准确度低等缺点,影响了其在大范围筛查的实用性^[4,6]。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种恒温核酸检测方法。由于 LAMP 在等温条件下具有快速、特异性强、灵敏度高、准确性高以及简便等特点,在食源性病原体、过敏原及转基因生物的检测,尤其是现场检测中被广泛应用^[7]。当前, LAMP 在肉制品掺假检验方面应用取得了一定进展,建立了猪、鸡、鸭、牛、绵羊、山羊、猫、狗、貂(水貂)、兔、狐狸、小鼠等肉源性成分的快速检测方法,在特异性、灵

敏度、检出限、检测准确度等方面与 qPCR 法相当,检测耗时更短^[7-11]。因此, LAMP 技术成了现场大范围筛查的理想手段。但基于 LAMP 的肉制品中狗源性检验的方法研究鲜有报道,仅检索到一个相关专利^[12]。该专利采用了荧光目测比色法,依靠目测液体颜色判断结果,然而在不同实验条件下,外观判断容易产生偏差。通过特定仪器平台检测荧光强度,既可以有效避免误差、实现对扩增的实时定量检测^[13],又能进一步往自动化检测方向开发,提高检测时效。

在各类现行动物源性成分检测标准中, DNA 模板制备也是一个重要部分,一般情况下,需要先对样品进行 DNA 或 RNA 的抽提以制备反应模板。DNA 制备方法按时效大致分为快速制备和高质量制备 2 种。对于一般动物组织样本的基因组 DNA 提取,前者耗时短至 30 s 且操作简便^[14],后者大约 2~3 h,甚至更长时间且需要烦琐核酸抽提操作。同类研究中基本采用高质量制备的方法^[1,8-12],采用快速制备的比较少。快速制备配合快检更能充分发挥时效优势。在快检中是否可以使用快速制备 DNA 的方法,需要通过实验确定。本研究通过建立肉制品中狗源性成分的实时荧光 LAMP 检测方法搭配快速制备 DNA 方法作为快检方法,建立实时荧光 qPCR 检测方法搭配高质量制备 DNA 方法作为参考方法,并以特异性、灵敏性及准确度为指标,比较 2 种方法的检测效能,探讨二者在肉制品中狗源性成分检测方面的实用性,为打击非法售制狗肉提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

新鲜的狗肉、黄牛肉、水牛肉、猪肉、牦牛肉、山羊肉、绵羊肉、番鸭肉、水鸭肉、马肉、驴肉、乳鸽肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、罗非鱼、南美白对虾、田鸡、鹌鹑、鹧鸪、兔肉各 1 份,共 21 种;深加工的红烧狗肉、干锅狗肉、酸辣狗肉、麻辣狗肉、黄焖狗肉、茶香狗肉、四香狗肉、乌龙山狗肉、荷香回锅狗肉、狗肉拌豇豆、小

炒黄牛肉、羊蝎子、烤羊排、白切鸡、烧鹅、牛肉火锅、回锅肉、驴肉火烧、咕噜肉、螺蛳粉各 1 份,共 20 份熟肉制品,均购自南宁市农贸市场、餐饮店或超市。将上述样品用自来水冲洗干净,剔除骨头、皮、脂肪组织后切成小块,用绞肉机搅成肉糜,置于干净的自封袋,做好标记,−20 °C 冰箱中冻存备用。制样工具均清洁后专用,其他一次性耗材一样一用,避免交叉污染。

MK2000-2E 干式恒温器(杭州奥盛公司); TGem Plus 微量分光光度计(北京天根公司); ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

动物组织基因组 DNA 快速提取试剂盒、动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(广州双螺旋基因技术有限公司); 链置换(bacillus stearothermophilus, Bst)DNA 聚合酶(北京 NEB 公司); Taq 酶、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)(大连宝生物工程有限公司); 甜菜碱、氯化钠(NaCl)、乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA)、硫酸镁(MgSO₄)(分析纯,美国 Sigma 公司); 石蜡油(色谱纯,上海生工生物工程股份有限公司); SYTO-9 绿色荧光核酸染料(美国 Invitrogen 公司); Real Master mix (Probe)(北京天根公司); 含靶序列的人工质粒 DNA、所有引物及探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成,纯度为色谱纯; 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 检测方法原理

LAMP 法检测原理^[13]: LAMP 技术利用上游外部引物 F3、下游外部引物 B3,上游内部引物 FIP、下游内部引物 BIP、环状引物 FLP、环状引物 FLB 和有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在 63 °C 恒温条件下, FIP 的 F2 序列结合到 F2c 上,在 Bst DNA 聚合酶作用下引导合成互补的 DNA 链,进而上游外引物 F3 结合到模板 DNA 的 F3c 区,引导合成模板 DNA 的互补链,释放出由 FIP 引导合成的互补链,被释放的互补链 5'端的 F1c 区和 F1 发生自我碱基配对形成一个环状结构;同时下游内引物 BIP 结合到其 3'端,引导合成该链互补链,并把 5'端的环状结构打开,以类似于引物 F3 的方式,下游外引物 B3 从 BIP 引物外侧结构结合到 B3c 上引导合成该链的互补链,同时置换出由 BIP 引导合成的互补链。被置换出的互补链两端分别带有 F1-F2c-F1c 和 B1c-B2-B1 互补结构,自然发生碱基配对,形成一条两端环状结构的哑铃单链结构。哑铃结构的单链 DNA 通过自我引导延伸迅速生成双链茎环结构,循环反应中,引物 FIP 结合到茎环结构的环状结构上,引导合成新的 DNA 双链,同时置换出与之相同序列的链,解离出的单链再形成一个过渡性茎环结构 DNA。迅速以 3'末端的 B1 区段为起点,以自身为模板进行延伸,使 F2 合成链解离,进而形成哑铃状,接着引物 BIP 与其杂交,启动新一轮扩增,再经过链解离、环状结构自身扩增、单链置换等过程,最后形

成大小不一的茎环结构和多环花椰菜结构的 DNA 片段混合物,且产物 DNA 为扩增靶序列的交替反向重复序列。环引物 FLP 与环状引物 FLB 通过与所有形成的环状结构杂交,启动链置换 DNA 的合成,周而复始,扩增产物是不同个数茎环结构的 DNA 混合物。使用环状引物的 LAMP 反应明显提高了反应速度和灵敏度。在检测阶段,利用荧光染料 SYTO-9 与 DNA 双链结合,在 485 nm 激发光下,发出 498 nm 的绿色荧光,随着合成 DNA 量的增加,荧光信号强度也增加。通过荧光检测仪的 FAM 荧光通道收集该荧光信号,实时检测荧光强度并转换成扩增曲线。检出时间(Ct 值)在设定反应时间内,有“S”型扩增曲线,有靶基因检出,即阳性;若无“S”型扩增曲线,则样品中不含靶基因或含量低于检出限,即阴性。

qPCR 法检测原理:本 qPCR 法采用水解探针法(Taq Man probes)。在 PCR 反应阶段,模板 DNA、引物在 DNA 聚合酶的作用下,经过变性-退火(复性)-延伸的反复循环,不断合成与模板 DNA 双链一致的新链。在检测阶段,当溶液中的模板变性后低温退火时,引物与探针同时与模板结合。当延伸至探针结合处,发生链置换, Taq 酶将探针的荧光基团切割下来,从而脱离荧光淬灭基团的屏蔽,在激发光下发出荧光信号。每扩增一条 DNA 链就有一个荧光分子生成,荧光信号累积与 PCR 产物形成完全同步。通过荧光定量 PCR 仪的 FAM 荧光通道收集该荧光信号,实时检测荧光强度并转换成扩增曲线。反应结束后, Ct 值 ≤ 35.0 或 2 次均 35.0 < Ct 值 ≤ 40.0,且扩增曲线呈“S”型为阳性,否则阴性。

1.2.2 靶序列选择与引物设计

采用 BLAST 对 GenBank 数据库中已发表的狗线粒体 CYTB 基因序列进行同源性分析,确定保守序列,仅对犬属狗种、犬属灰狼种 100%匹配。针对该序列使用 LAMP 引物的在线设计软件 Primer Explorer Version 4 设计 LAMP 引物序列。同时,使用 Primer Express 3.0.1 设计狗的 qPCR 引物及探针。引物设计完成后,逐一对 LAMP 及 qPCR 的上下游引物及探针序列,在 GenBank 上对其进行同源性检索。结果显示,设计的引物与其他物种基因不具有互补性,仅对犬属狗种及灰狼种的 CYTB 基因序列有互补性。说明设计的各套引物组具有高度种属特异性。上述引物序列交予上海生工生物工程股份有限公司合成和纯化,见表 1。

1.2.3 DNA 模板制备

(1)制备 LAMP 检测模板

按动物组织基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书操作。称取 5 g 肉糜加入 10 mL 生理盐水的无菌均质袋中,混匀。转移至离心管 A 中,加入 500 μL Buffer A,震荡混匀,80 °C 下热溶 10~15 min。热溶完成后,取 10 μL 上清液至离心管 B 中,加入 1 mL Buffer B 进行中和混匀,中和后的液体即为 DNA 溶液,置于 −20 °C 冻存备用。

(2)制备 qPCR 检测模板

按动物组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。用电子天平称取约 20 mg,并转移至 1.5 mL 离心管中,加入裂解液过夜。在消化液中加入 RNA 酶降解 RNA。依次加入 Buffer A、无水乙醇抽提,将得到的混合液转移至装有 DePureg DNA Mini Column 的收集管中,依次加入 Buffer GW1、Buffer GW2 洗涤,倒弃滤液,把柱子重新装回收集管中,离心 2 min,去残液。加入 50 μ L 超纯水洗脱 DNA,洗脱的 DNA 测定浓度和纯度,置于-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.4 反应体系的建立

(1)LAMP 反应条件

25 μ L LAMP 反应体系中含有 2.4 μ mol/L FIP、2.4 μ mol/L BIP、0.2 μ mol/L F3、0.2 μ mol/L B3、1.0 μ mol/L FLP、1.0 μ mol/L BLP、1.2 mol/L 甜菜碱、4 mmol/L $MgSO_4$ 、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μ L 10 $\times$ Thermo pol Buffer、8 U Bst DNA 聚合酶、0.4 μ mol/L SYTO-9 及 2 μ L DNA 模板。反应条件为 63 $^{\circ}$ C 反应,45 min。以双蒸水作为空白对照,以人工质粒为阳性对照。将 LAMP 反应体系配制完成后置于 0.2 mL 离心管中,在离心管中加入 1 滴石蜡油以避免反应体系挥发和污染。通过实时荧光 qPCR 仪设定 Holding Stage 为 63 $^{\circ}$ C 30 s,1 个循环;Cycling Stage 为 63 $^{\circ}$ C 15 s,63 $^{\circ}$ C 45 s,45 个循环,于 63 $^{\circ}$ C 45 s 处收集荧光信号,荧光通道为 FAM。

(2)qPCR 反应条件

25 μ L qPCR 反应体系中含有 12.5 μ L PCR Mix,0.4 μ mol/L 上、下游引物,0.2 μ mol/L 探针及 2 μ L DNA 模板。以双蒸水作为空白对照,以人工质粒为阳性对照。使用 ABI 7500 qPCR 仪,荧光基团选择 FAM,淬灭基团选择 TAMRA。反应条件为 Holding Stage: 95 $^{\circ}$ C 10 min,1 cycle, Cycling Stage: 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40 cycles。

1.2.5 特异性引物筛选及验证实验

对 LAMP 及 qPCR 合成的所有引物按“1.2.3”相关反应条件进行检测,均设置空白对照和阳性对照组,每组 2 个平行。按照“1.2.1”中相关规则判定检测结果,各筛选出 1 套能特异性扩增的引物。

对于筛选好的引物,本研究将“1.2.2”制备的狗 DNA 作为阳性样品,以黄牛、水牛、猪、牦牛、山羊、绵羊、番鸭、水鸭、马、驴、乳鸽、鸡、鸭、鹅、罗非鱼、南美白对虾、田鸡、鹌鹑、鹧鸪、兔的基因组 DNA 为阴性样品,超纯水作为空白对照,分别进行 LAMP 检测及 qPCR 检测,根据各反应结果考察各组引物对于狗源性成分的特异性。

1.2.6 检测灵敏度实验

本研究将 10 ng/ μ L 含靶序列的人工质粒 DNA 用超纯水分别稀释至 1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L、1 fg/ μ L、0.1 fg/ μ L 作为实验组,同时

以超纯水为空白对照组,每组做 3 个平行,按照“1.2.3”相关反应体系加样检测,以出现阳性结果的质粒最高稀释度作为灵敏度的评价指标,确定 2 种方法的检测灵敏度。将所购买的羊肉(作为基底肉)与狗肉分别按不同质量比例(W/W)进行混合制备人工掺肉样,分别稀释至 10%、1%、0.1%、0.01%,提取人工掺肉样的基因组 DNA,按照 1.2.3 所述反应体系进行扩增,同时以超纯水为空白对照组,以出现阳性结果的人工掺入肉最低质量比作为检出限的评价指标,确定 2 种方法的最低检测限。同时,以 2 种方法的人工质粒及人工肉样模板含量的对数值(lg)为 X 轴,以测得的 Ct 值为 Y 轴,采用 EXCEL 绘制相关曲线,分析二者线性相关程度及 Ct 值离散情况,判断是否可以作为标准曲线从而实现对样品的定量检测。

1.2.7 市售鲜肉及熟肉制品的狗源性成分检测

将狗肉、黄牛肉、水牛肉、猪肉、牦牛肉、山羊肉、绵羊肉、番鸭肉、水鸭肉、马肉、驴肉、乳鸽肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、罗非鱼、南美白对虾、田鸡、鹌鹑、鹧鸪、兔肉等 21 份已知物种的新鲜肉样及红烧狗肉、干锅狗肉、酸辣狗肉、麻辣狗肉、黄焖狗肉、茶香狗肉、四香狗肉、乌龙山狗肉、荷香回锅狗肉、狗肉拌豇豆、小炒黄牛肉、羊蝎子、烤羊排、白切鸡、烧鹅、牛肉火锅、回锅肉、驴肉火烧、咕噜肉、螺蛳粉等 20 份已知成分的深加工熟肉制品,按照“1.2.3”操作提取 DNA 模板,按照“1.2.4”操作进行检测,评估 2 种方法对市售鲜肉及熟肉制品中狗源性成分检测的适用性和准确性。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

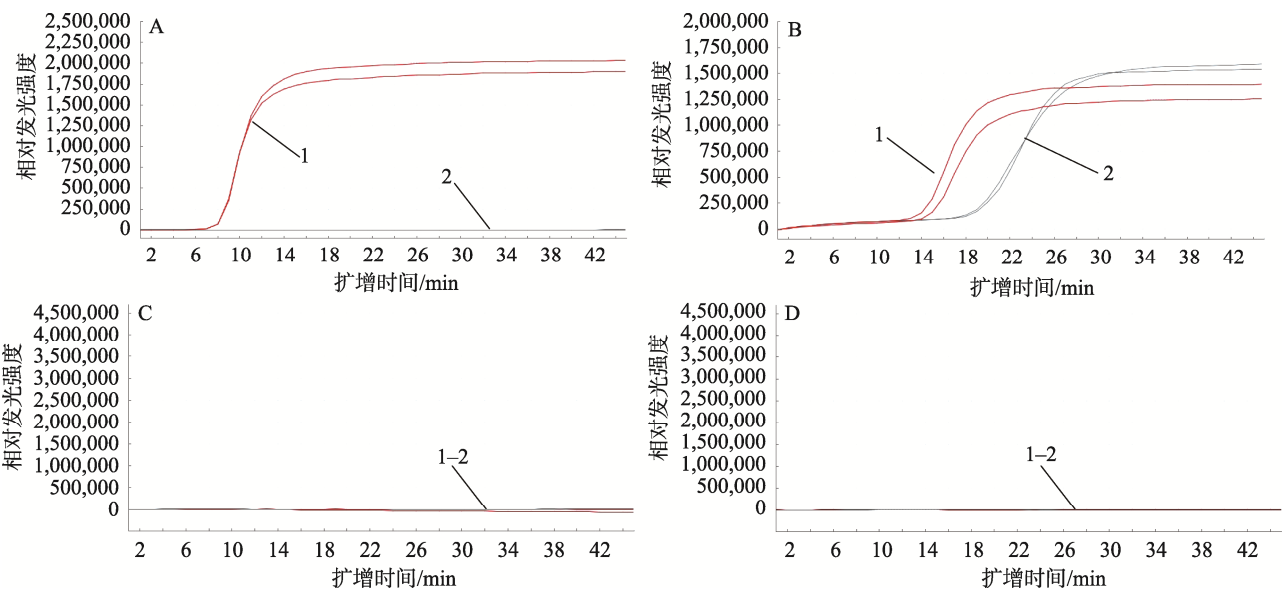
将 4 套 LAMP 引物进行检测,检测结果如图 1 所示。第 1 套 LAMP 引物(图 1A)的空白对照组没有扩增迹象,阳性组扩增曲线呈“S”型,Ct 值为 8.6,成功扩增靶基因。第 2 套引物(图 1B)空白对照有非特异性“S”型扩增,第 3、4 套引物的阳性组没有“S”型扩增,均不符合条件。因此,选用第 1 套 LAMP 引物,见表 2。LAMP 存在无法用于长片段扩增的不足,为了保证高效率的扩增,靶序列从 F2 5'端到 B2 5'端的最佳距离为 120~180 bp,一般不超过 300 bp,超过 500 bp 扩增效率会明显降低。第 1 套引物靶序列长度为 279 bp,符合条件。该扩增产物的酶切位点有“agg|cct”、“g|gatcc”、“a|catgt”等,因为本实验室没有电泳设备,本研究没有对扩增产物进行鉴定,因此无法排除非特异性扩增。通过实验观察,没有发现其他因素的不良影响。

将 2 套 qPCR 引物进行检测,检测结果如图 2 所示。2 套 qPCR 引物(图 2)的空白对照组均没有扩增迹象,阳性组扩增曲线均呈“S”型,第 1 套 Ct 值为 22.7,第 2 套 Ct 值为 26.1,均成功扩增靶基因。因此,选用第 1 套

qPCR 引物, 见表 3。经过 NCBI Primer-BLAST 验证, 该 qPCR 引物、探针相对保守, 扩增产物序列长 59 bp, 保证了扩增效率。

在靶序列选择上, 国内外研究开发的肉源性 DNA 检测方法中靶序列多数选择线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA), 较核基因组 DNA, 它的拷贝数更高, 这使得基于 mtDNA 检测方法灵敏度更高^[2,5]。其中 mtDNA 的 CYTB 基因、16S rRNA 和 12S rRNA 以及 D-loop 区成为物种鉴定的常用基因^[5], 在狗的物种检测或鉴定中广为应用^[1-2,12,15]。本研究以狗线粒体 CYTB 基因上的保守序列作为靶序列, 显示较好的种属特异性。

在引物设计上, 2 种方法要考虑共同因素^[13]有, 一是引物的大小及引物结合区之间的距离要合适; 二是引物区的 *Tm* 值要合适; 三是引物 GC 含量要合适; 四是避免引物二级结构, 产生非特异性扩增。但具体要求又有所区别。不同的地方在于, 探针法的 qPCR 为了实现绝对定量引入了探针和跨外显子设计, 这增加了设计难度。LAMP 相对于 qPCR 的引物要多 2 对, 却要靶向 8 个区域, 扩增产物还需带有限制性酶切位点, 方便鉴定扩增产物, 其设计过程更复杂, 尽管也有引物设计软件, 但设计出一套合适的难度更高。因此, 本研究设计了 4 套 LAMP 引物却只有 1 套合适, 而设计的 2 套 qPCR 引物均合适。



注: 图中扩增曲线 1 为阳性组, 2 为空白对照组。A、B、C、D 依次为第 1、2、3、4 套狗源性成分的 LAMP 引物筛选图。

图 1 狗源性成分的 LAMP 引物筛选图

Fig.1 LAMP primers for screening of dog-derived ingredients

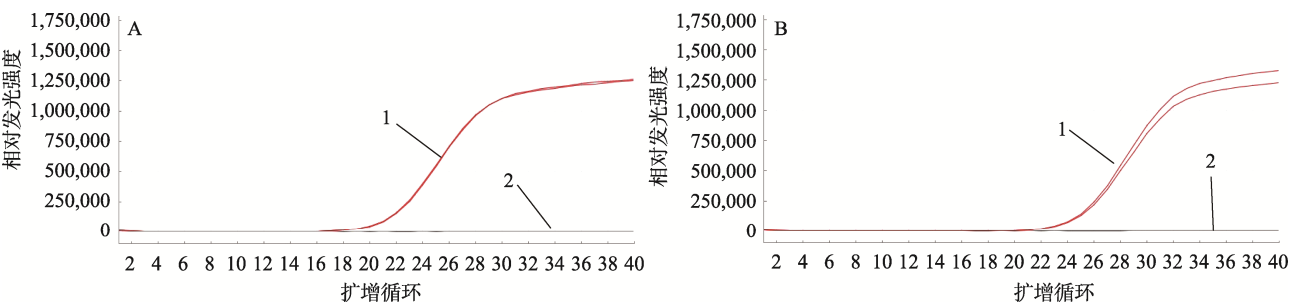
表 1 狗线粒体 CYTB 基因的保守序列
Table 1 Conserved sequence of mitochondrial CYTB gene in dogs

种属	保守序列(5'→3')
犬属狗种、灰狼种	CGGATCCTTACTAGGAGTA(TGCTTGATTCTACAGATTCTAACA-F3 区)GGTTTATTCTTAG
	CTATGCACTAT(ACATCGGACACAGCCA-F2 区)CAGCTTTTTCATCAGTCAC(CCACATCTGCC GAGACG-FLP
	区)(TAACTACGGCTGAATTATCCGCT-F1 区)ATATGCACGCAAATGGCGCTTCCA
	TATTCTTTATCTGCCTATTCCTACATGTAGGACGAGGCCTATATTACGGATCCTATGTATTCATAGAAACATGAAACAT
	TGGAATTGT(ACTATTATTCGCAACCATAGCCACA-B1c 区)GCATTTCATG(GGC TATGTACTACCATGAGGAC-BLP
	区)AAATATCATTTTGAGG(AGCAACTGTAATCACTAATCTTC T-B2c
	区)CTCTGCCATCCCTTATATCGGAAGTGAAGT(GGATCTGAGGCGGCT-B3c
	区)TCTCAGTGGAACAAAGCAACCCTAACACGATTCTTTGCATTCCATTTCATCCTCCCTTTCATCA
	TCGCAGCTCTAGCAATAGTACACCTCCTATTCTACACGAAACCGGATCCAACAACCCTTCAGGAATCACATCAGA
	CTCAGACAAAATTCCATTTCACCCTTACTACACAATCAAGGAT

注: 表中标记的各区域关系见原理部分, 下同。

表 2 第 1 套狗源性成分 LAMP 引物序列
Table 2 First set of LAMP primer sequence of dog-derived ingredients

名称	引物序列(5'→3')
F3	TGCTTGATTCTACAGATTCTAACA(F3 区)
B3	AGCCGCCTCAGATCC(B3 区)
FIP	(AGCGGATAATTACAGCCGTAGTTAA-F1c 区)(ACATCGGACACAGCCA-F2 区)
BIP	(ACTATTATTCGCAACCATAGCCACA-B1c 区)(AGAAGATTAGTGATTACAGTTGCT-B2 区)
FLP	CGTCTCGGCAGATGTGG(FLP 区)
BLP	GGCTATGTACTACCATGAGGAC(BLP 区)



注: 图中扩增曲线“1”为阳性模板组, “2”为空白对照组。A、B 依次为第 1、2 套狗源性成分的 qPCR 引物筛选图。

图 2 狗源性成分的 qPCR 引物筛选图
Fig.2 Figure of qPCR primer screening for dog-derived ingredients

表 3 第 1 套狗源性成分 qPCR 引物及探针
Table 3 First set of qPCR primers and probes for dog-derived ingredients

名称	引物序列(5'→3')
正向引物	CCACATCTGCCGAGACGTTA
反向引物	CGCCATTGCGTGTCATATAG
探针	FAM-CTACGGCTGAATTAT-TAMRA

2.2 特异性实验结果

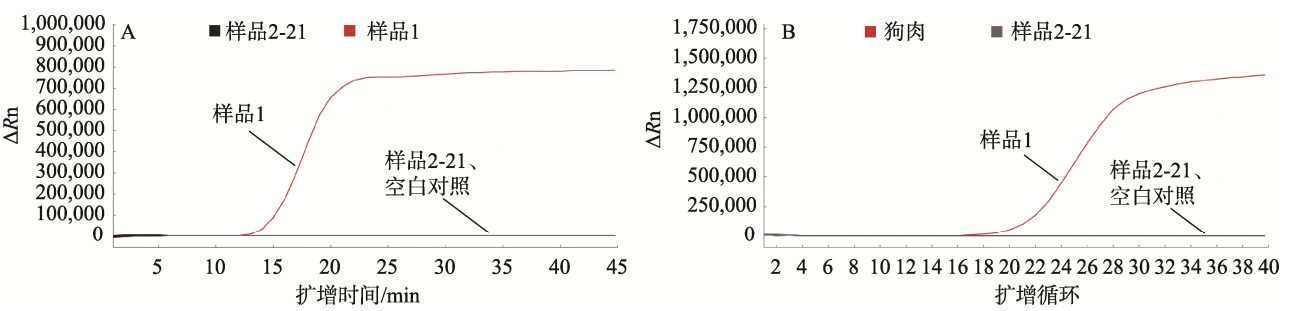
用本研究建立的 LAMP 法及 qPCR 法对 1 份狗肉及 20 份非狗肉样品的基因组 DNA 进行检测, 结果见表 4, 图 3。结果显示, 2 种方法均仅有狗肉样品出现了“S”型的扩增曲线, 其他动物或阴性对照样品没有扩增。在含有狗源性成分的样品中, 分析方法能准确检出狗源性成分阳性, 而不含狗源性成分的样品则没有检出, 说明 2 种方法均具有较好的特异性。

特异性指的是在 PCR 扩增过程中, 专一性地扩增目的片段而非其他片段的性能。模板、引物性质及质量、反应条件的控制等均会影响 PCR 扩增的特异性^[13]。对于模板制备, qPCR 的模板一般需要高质量制备, 模板纯度及浓

度高, 提取物干扰成分含量就少, 对 PCR 反应的抑制作用减弱。相反, LAMP 对模板的纯度要求较低, 有报道^[16]称 LAMP 反应可以对副溶血性弧菌进行无需核酸提取的直接菌液检测, 足见其抗干扰能力。此外, LAMP 能对细胞进行原位检测^[13,16], 搭配 SYTO-9, 一种能够对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的活细胞和死细胞进行染色的绿色荧光核酸染料, 即使经快速提取的模板中存在不完全裂解的细胞, 也能被检测到。本研究中 LAMP 采用快速制备和 SYTO-9 染料检测的方法得到了较好的检测效果, 证实 LAMP 的模板并不一定要高质量制备。因而 LAMP 模板的适用范围更宽, 省去了纯化和浓缩步骤, 节省了大量时间。对于引物性质及质量, 经过设计筛选的引物, 理论上对靶基因序列具有高度特异性, 在非靶基因序列共存的情况下, 特异性扩增也不受影响。实际上, 在实验条件未充分优化的情况下, 通常会在目的片段出现的同时伴随有其他杂带的现象, 发生非特异性扩增, 因而需要对实验条件进行优化。目前 LAMP 及 qPCR 的反应体系均开发有成熟且通用的反应体系, 可以保证实验的重复性和可靠性。本研究的 2 种方法均采用通用反应体系, 获得了较好的结果。综上所述, LAMP 及 qPCR 同为基因检测方法, 在理想的实验条件下, 特异性相当, 但 LAMP 法在 DNA 制备方法的选择上更加灵活。

表 4 市售鲜肉检测结果
Table 4 Test results of commercial fresh meat

样品编号	样品种类	数量/份	狗源性成分	
			LAMP 结果	qPCR 结果
1	狗肉	1	阳性	阳性
2-21	非狗新鲜肉	20	全阴性	全阴性



注: A 为狗源性成分的 LAMP 引物特异性图, B 为狗源性成分的 qPCR 引物特异性图。

图 3 狗源性成分的 LAMP、qPCR 引物特异性图

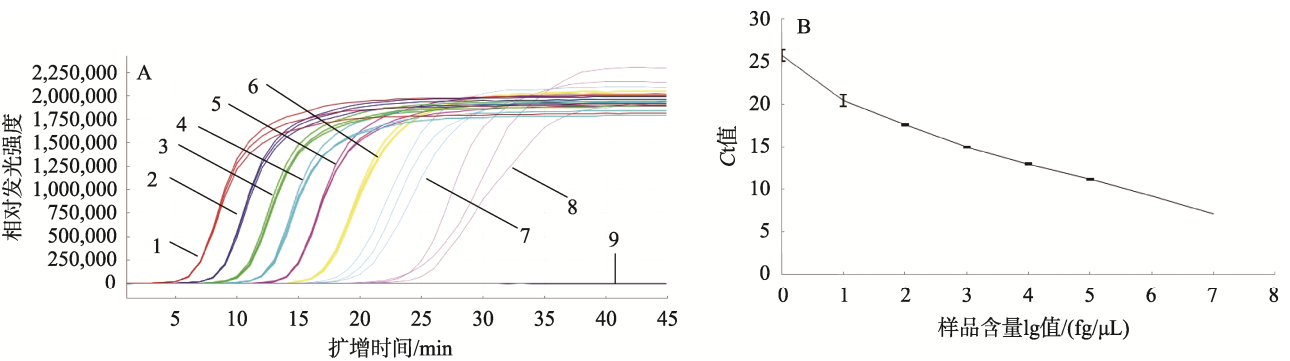
Fig.3 LAMP and qPCR primer specific maps of dog-derived ingredients

2.3 灵敏度实验结果

首先,本研究用 10 ng/μL~0.1 fg/μL 的人工质粒作为模板,分别进行了 qPCR 及 LAMP 检测。LAMP 扩增结果见图 4A,相关曲线见图 4B。LAMP 扩增结果显示,该法能检出人工质粒的最低质量浓度为 1 fg/μL,对质量浓度为 0.1 fg/μL 没有检出。因此,该法检测人工质粒的灵敏度为 1 fg/μL。线性相关统计结果显示,在 10 ng/μL~1 fg/μL 浓度范围内, $Y=-2.1631lg(X)+24.173$, 线性相关系数 $r^2=0.9934$, Ct 值与 lg(起始浓度)呈线性相关关系,平行检测结果之间离散程度小,检测稳定性高,可作为标准曲线对样品进行定量检测。当浓度小于 1 fg/μL, $r^2=0.9663$, 线性相关明显降低,随着狗源性成分含量逐渐增大,其检出时间逐步滞后,且平行检测结果之间离散程度增大,检测稳定性降低。qPCR 扩增结果见图 5A,相关曲线见图 5B。qPCR 扩增结果显示,该法能检出人工质粒的最低质量浓度为 0.1 fg/μL。线性相关统计结果显示,在 10 ng/μL~0.1 fg/μL 浓度范围内, $Y=-3.2767lg(X)+42.887$, $r^2=0.9995$, 扩增效率为 102%, 可见 Ct 值与 lg(起始浓度)呈线性相关关系,平行检测结果之间离散程度小,检测稳定性高,可作为标准曲线对样品进行定量检测。因此,qPCR 法检测人工质粒的灵敏度为 0.1 fg/μL。实验显示,LAMP 在 10 ng/μL~1 fg/μL 浓度上,其 Ct 值结果分别比 qPCR 小 6、8、9、10、11、12、13、11,说明在上样量相同的情况下,LAMP 检出 Ct 值均小于 qPCR。本研究中 LAMP 检出 Ct 值 1 个循环为 1 min, qPCR 则为 1 min 15 s,说明 LAMP 检测时间较 qPCR 快。实验结果表明,对人工质粒样品,qPCR 灵敏度、方法稳定性较 LAMP 法高,但 LAMP 检测时间较 qPCR 快。

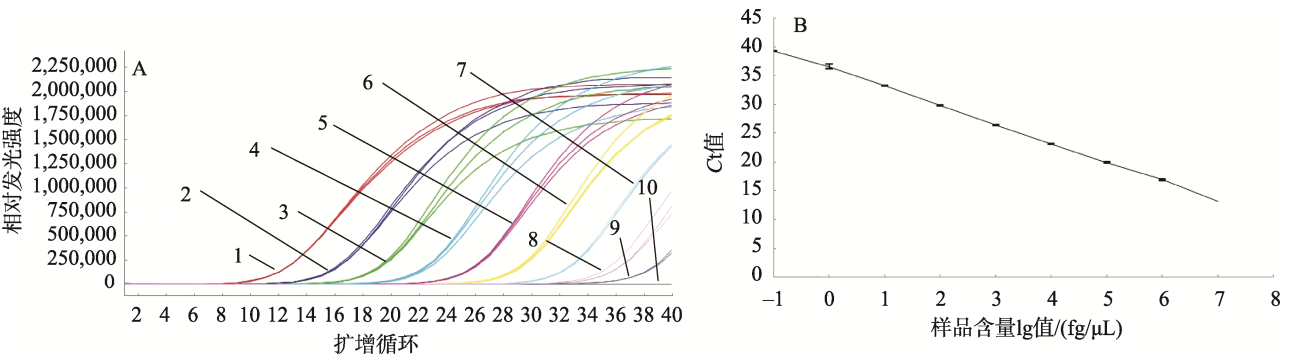
然后,将梯度稀释的人工掺肉样品提取 DNA 作为模板,分别进行了 qPCR 及 LAMP 检测。LAMP 扩增结果见图 6A,相关曲线见图 6B。LAMP 扩增结果显示,该法能检出人工掺肉样的最低质量百分比为 0.01%(W/W)。线性相关统计结果显示,在 1%~100% 质量比范围内, $Y=-1.9751lg(X)+22.967$, $r^2=0.9911$, 可见 Ct 值与 lg(质量百分比)呈线性相关关系,平行检测结果之间离散程度小,检测稳定性高。当质量比小于 1%, $r^2=0.9745$, 线性相关度降低,随着狗源性成分含量逐渐增大,其检出时间逐步滞后,且平行检测结果之间离散程度增大,检测稳定性降低。qPCR 扩增结果见图 7A,相关曲线见图 7B。qPCR 扩增结果显示,该法能检出人工掺肉样的最低质量百分比为 0.01%(W/W)。线性相关统计结果显示, qPCR 人工肉样相关曲线在 0.01%~100% 质量百分比范围内, $Y=-3.395X+43.155$, $r^2=0.9989$, 扩增效率为 97%, 可见 Ct 值与 lg(质量百分比)呈线性相关关系,离散程度小,检测稳定性高。实验结果表明,对人工掺肉样品,LAMP 及 qPCR 均能检出狗源性成分含量为 0.01%,由于两者没有继续做更低质量比样品的实验,暂时认为 2 种方法用于检测狗源性成分的最低检出限处于同一水平,且 qPCR 法定量的准确程度及方法稳定性较 LAMP 法高。

本研究建立的 qPCR 法相对于 LAMP 法,在狗源性成分较高时,其敏感性持平,在狗源性成分较低时,其敏感性更好。在扩增时间方面,由于 LAMP 没有反复变性复性的过程,又有 3 对引物从头到尾不停的进行扩增反应,其扩增效率比 qPCR 高,产物量更大,因而检测时间也更快。



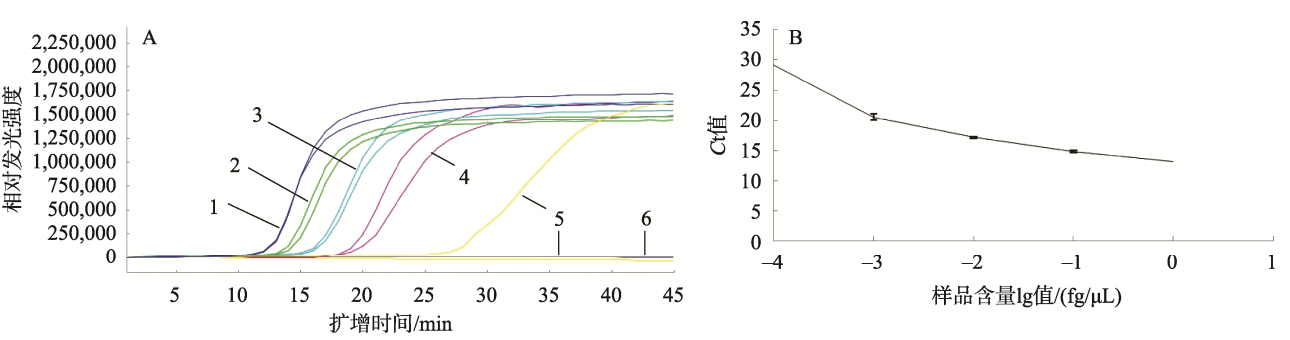
注: “1”为 10 ng/μL, “2”为 1 ng/μL, “3”为 100 pg/μL, “4”为 10 pg/μL, “5”为 1 pg/μL, “6”为 100 fg/μL, “7”为 10 fg/μL, “8”为 1 fg/μL, “9”为 0.1 fg/μL、空白对照。A 为狗源性成分的 LAMP 质粒灵敏度图, B 为狗源性成分的 LAMP 质粒标准曲线。

图 4 狗源性成分的 LAMP 质粒灵敏度及 LAMP 质粒标准曲线
Fig.4 LAMP plasmid sensitivity map and LAMP standard curve of dog-derived ingredients



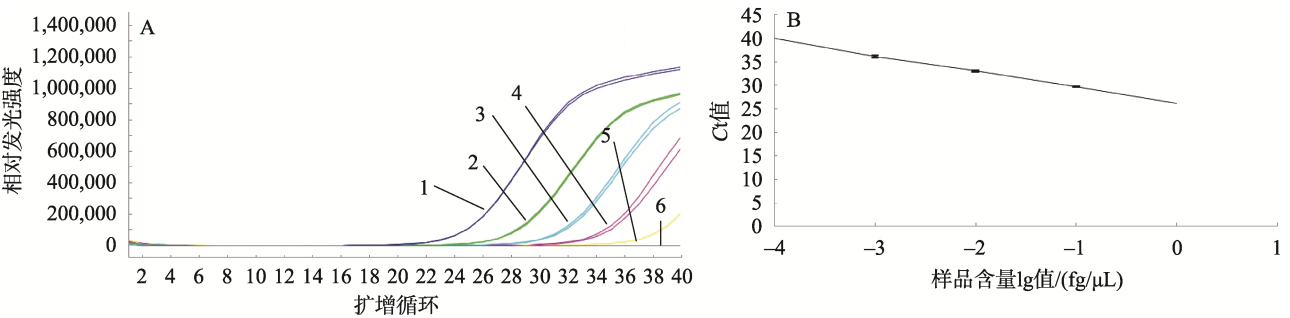
注: “1”为 10 ng/μL, “2”为 1 ng/μL, “3”为 100 pg/μL, “4”为 10 pg/μL, “5”为 1 pg/μL, “6”为 100 fg/μL, “7”为 10 fg/μL, “8”为 1 fg/μL, “9”为 0.1 fg/μL, “10”为空白对照。A 为狗源性成分的 qPCR 质粒灵敏度图, B 为狗源性成分的 qPCR 质粒标准曲线。

图 5 狗源性成分的 qPCR 质粒灵敏度及 qPCR 质粒标准曲线
Fig.5 qPCR plasmid sensitivity map and qPCR plasmid standard curve of dog-derived ingredients



注: “1”为 100%, “2”为 10%, “3”为 1%, “4”为 0.1%, “5”为 0.01%, “6”为空白对照。A 为狗源性成分的 LAMP 质量百分比灵敏度图, B 为狗源性成分的 LAMP 人工肉样标准曲线。

图 6 狗源性成分的 LAMP 质量百分比灵敏度及 LAMP 人工肉样标准曲线
Fig.6 LAMP mass percentage sensitivity of dog-derived ingredients and standard curve of LAMP artificial meat sample



注：“1”为 100%，“2”为 10%，“3”为 1%，“4”为 0.1%，“5”为 0.01%，“6”为空白对照。A 为狗源性成分的 qPCR 质量百分比灵敏度图，B 为狗源性成分的 qPCR 人工肉样标准曲线。

图 7 狗源性成分的 qPCR 质量百分比灵敏度及 qPCR 人工肉样标准曲线

Fig.7 qPCR mass percentage sensitivity of dog-derived ingredients and standard curve of qPCR artificial meat sample

2.4 市售肉及肉制品的狗源性成分检测结果

对 20 份已知成分的深加工肉制品的 DNA 模板进行 LAMP 及 qPCR 检测，检测结果见表 5、图 8 以及特异性验证实验中的 21 份已知物种的新鲜肉样检测结果(表 4)。对新鲜和深加工 2 种类型样品的检测结果显示，LAMP 法和 qPCR 法对 1 份狗肉及 10 份狗肉制品均检出阳性；除狗肉以外的另 20 份新鲜肉类及 10 份不含狗肉的制品均检出阴性，2 种方法的检测结果符合率为 100%。

一种检验方法对样品类型有一定的适用范围，不同类型样品本身的特性和成分均会影响检测结果的准确度，如基质效应^[17]。市售肉制品通常是经过深加工的成分复杂的样品，基质效应的影响难以预测，往往取决于具体样品，需要通过实验来确定。本研究以市售肉及肉制品为样品，通过 LAMP 和 qPCR 2 种方法进行比对，验证 2 种方法在实际应用中准确度是否可以接受。结果表明，本研究建立的 LAMP 法和 qPCR 法均适用于肉及肉制品中狗源性成分检测，准确度相当。

表 5 市售熟肉制品检测结果

Table 5 Test results of commercial cooked meat products

样品种类	数量/份	狗源性成分	
		LAMP 结果	qPCR 结果
狗肉制品	10	全阳性	全阳性
非狗肉制品	10	全阴性	全阴性

3 结论与讨论

本研究成功建立了肉及肉制品中狗源性成分的实时荧光 LAMP 检测方法，搭配快速制备 DNA 方法大大加快了检测时间，具有良好的特异性。在灵敏度方面，本研究建立的 LAMP 实时荧光法的 1 fg/μL，最低检出限为 0.01%(质量分数)。有研究^[12]以含有狗肉线粒体细胞色素 C

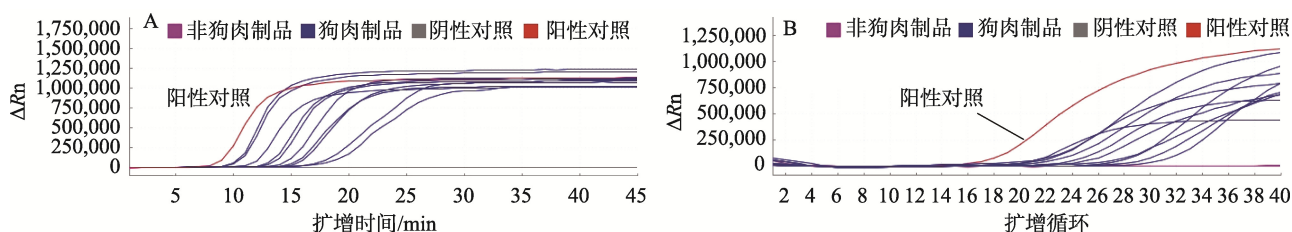
氧化酶亚单位 I(COXI)基因的阳性质粒为模板，基于 LAMP 技术对 COXI 基因进行荧光目视比色法检测，所能检测到的最低浓度为 2×10^{-4} ng/μL，即 100 fg/μL，低于本研究 100 倍，说明目视灵敏度低于仪器检测。YANG 等^[18]采用一步实时 LAMP 测定法在 63 °C 下使用 SYBR Green I 在 45 min 内扩增猪线粒体 CYTB 基因，在肉混合物中检测到 0.01% 质量分数的猪肉(相当于 1 pg 的基因组 DNA)，与本研究持平。CHO 等^[19]基于实时荧光 LAMP 技术开发了一种结合退火曲线分析牛、猪、马、山羊、绵羊、鸡、鸭和火鸡等 8 种动物源性的方法，生肉和熟肉中检出限确定为 10 pg/μL 至 100 fg/μL 水平，生肉和熟肉混合物中的检出限含量确定为 0.01% 至 0.0001% 水平，显示了较本研究更低的检出限。同时该研究者认为以肉含量(W/W)表示的检出限不能显示分析的绝对能力，结果不能直接进行比较，应以当量(DNA/DNA)更为准确。在定量检测方面，模板浓度在一定范围内与 Ct 值呈现较好的线性关系，理论上可作为标准曲线用于对待测样品的精确定量^[13]。实际上由于线粒体 DNA 的拷贝数并不恒定，难以实现对动物源性成分的量化分析，而核基因组 DNA 拷贝数恒定^[2]，但能不能实现对狗源性成分定量分析仍是未知数。可见，本研究建立的 LAMP 法具有快速、特异性好、检出限低、灵敏度高和准确度高的特点，但在反应体系优化、测定灵敏度方法、实现定量分析上仍需进一步改进。

本研究成功建立了肉及肉制品中狗源性成分的 qPCR 检测方法，显示了良好的特异性。在灵敏度方面，高晓丽等^[20-21]在研究中以狗基因组 DNA 为模板，采用 qPCR(Taq Man 探针法)靶向检测狗线粒体 NADH 氧化还原酶亚基 2(DH2)基因，灵敏度均为 100 fg/μL。刘艳艳等^[22]以狗基因组 DNA 为模板，采用多重实时荧光 PCR 法靶向检测狗线粒体 16S rRNA 基因序列为靶标，以 0.01 ng/μL 作为最低检出限。上述研究的灵敏度均低于本研究基于人工质粒的 0.1 fg/μL，但其分析方法与本研究有所不同，没有可比性。本研究沿用各类肉源性成分检测

标准中以质量分数作为最低检出限评价指标, 对人工掺肉样的最低检出限则为 0.01%, 与同类研究持平^[4]。这说明, qPCR 法对肉及肉制品中狗源性成分的分析具有特异性好、灵敏度高、检出限低、准确度高的特点, 但在狗源性成分定量分析的方法设计上如靶序列的选择、跨外显子设计引物仍需进一步改进。

当前, 单纯依靠某种技术打假已经不能满足日益复杂的食品掺假形势要求, 必须要发挥各种技术的优势, 才能快速、准确地应对一个个食品安全风险和挑战。LAMP 技术和

qPCR 技术是食品掺假检测中 2 种重要的检测方法, 具有各自的技术特点, 在不同情况下扮演着重要角色。在检测性能方面, 本研究结果显示, qPCR 的灵敏度、最低检出限、准确度上稍好于 LAMP, 但 LAMP 更便捷。在分析成本方面, LAMP 法的仪器平台、检测配套设施、耗材成本较 qPCR 法低。在应用价值方面, 无论是 LAMP 法还是 qPCR 法, 均有局限性, 选用何种方法应根据实际情况而定: LAMP 在大范围的现场检测、基层检测机构普及来说更实用, qPCR 在实验室检测中更能有效发挥性能稳定、精准定量的优势。



注: A、B 依次为市售熟肉制品的 LAMP 及 qPCR 检测结果。

图 8 市售熟肉制品的 LAMP 及 qPCR 检测结果

Fig.8 LAMP and qPCR results of commercial cooked meat products

参考文献

- [1] 王天添, 刘佳琳, 李亚晗, 等. 狗源性 DNA 检测试剂盒的研制与评价[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 208–212.
WANG TT, LIU JL, LI YH, *et al.* Development and evaluation of a dog-derived DNA test kit [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(10): 208–212.
- [2] 支琴, 郭金超, 龚强. 肉制品中动物源性成分 DNA 检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4204–4211.
ZHI Q, GUO JC, GONG Q. Advance in DNA analytical techniques for ingredients of animal origin in meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(16): 4204–4211.
- [3] SALIH AH NT, HOSSAIN MM, LUBIS H, *et al.* Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction [J]. *J Food Sci Technol Mys*, 2016, 53(5): 2196–2209.
- [4] 何玮玲, 黄明, 张驰. 食品中肉类成分种属鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 304–307.
HE WL, HUANG M, ZHANG C. Recent technological advances for identification of meat species in food products [J]. *Food Sci*, 2012, 33(3): 304–307.
- [5] 胡馨予, 黄朱梁, 汤海凤, 等. 基于 PCR 技术的肉类成分溯源鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3385–3390.
HU XY, HUANG ZL, TANG HF, *et al.* Research progress in species identification methods of meat ingredients based on PCR technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(11): 3385–3390.
- [6] 吴克墀. 食品安全产业链困境与快检共享网络平台[J]. 特区经济, 2018, 354(7): 110–112.
WU KC. Predicament of food security industry chain and quickly-tested sharing network platform [J]. *Special Zone Econ*, 2018, 354(7): 110–112.
- [7] HUANG TZ, LI LZ, LIU X, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification technique principle, development and wide application in food safety [J]. *Anal Methods*, 2020, 12: 5551–5561.
- [8] CAI SX, KONG FD, XU SF. Detection of porcine-derived ingredients from adulterated meat based on real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. *Mol Cell Probe*, 2020, 53: 101609.
- [9] 于媛媛, 曲勤凤, 张奕南. 环介导等温扩增法快速检测牛羊肉中的掺杂肉[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 325–330.
YU YY, QU QF, ZHANG YN. Meat species authenticity rapid identification by loop-mediated isothermal amplification assay in beef and mutton [J]. *Food Ind*, 2019, 40(3): 325–330.
- [10] LI XN, GAO XQ, GUAN YF, *et al.* A novel isothermal amplification method for detecting mouse source component in meat [J]. *J AOAC Int*, 2019, 102(3): 872–887.
- [11] DEB R, SENGAR GS, SINGH U, *et al.* Application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of cow components adulterated in buffalo milk/meat [J]. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(12): 850–860.
- [12] 山东省农业科学院畜牧兽医研究所. 一种利用线粒体 DNA 鉴别牛羊肉中狗肉的 LAMP 检测方法: 中国, 201510411069.8 [P]. 2015-10-21.
Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences. A LAMP detection method using mtDNA to identify dog meat in beef and mutton: China, 201510411069.8 [P]. 2015-10-21.
- [13] 谭贵良, 赖心田. 现代分子生物学及组学技术在食品安全检测中的应用[M]. 广州: 中山大学出版社, 2014.
TAN GL, LAI XT. Application of molecular biology and omics technology in food safety [M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2014.
- [14] ZOU Y, MASO MG, WANG Y, *et al.* Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds [J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(11): e2003916.
- [15] 叶懿, 吴谨, 罗海波, 等. 线粒体 16SrRNA 和 Cytb 基因复合扩增进行种属鉴定[J]. 法医学杂志, 2008, 24(4): 259–261.

- YE Y, WU J, LUO HB, *et al.* Multiple amplification of 16srna gene and cytb gene in mitochondrial dna for species identification [J]. J Forensic Med, 2008, 24(4): 259–261.
- [16] 王富鑫. LAMP 法检测副溶血性弧菌核酸及其防污染研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2018.
- WANG FX. Study on lamp method to detect *Vibrio Parahaemolyticus* and the control of carryover contamination [D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2018.
- [17] WS/T 356—2011 基质效应与互通性评估指南[S].
- WS/T 356—2011 Guideline for evaluation of matrix effects and commutability [S].
- [18] YANG L, FU S, PENG X, *et al.* Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2014, 28(5): 882–888.
- [19] CHO AR, DONG HJ, CHO S, *et al.* Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA [J]. Korean J Food Sci Anim Res, 2014, 34(6): 799–807.
- [20] 高晓丽, 杨昕霆, 薛晨玉, 等. 实时荧光聚合酶链式反应法检测食品中狗源性成分[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 61–64.
- GAO XL, YANG XT, XUE CY, *et al.* Detection for dog-derived components in foods by real-time polymerase chain reaction [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(2): 61–64.
- [21] 北京市食品安全监控和风险评估中心. 一种检测食品中狗源性成分的试剂盒及其应用: 中国, 201510024486.7 [P]. 2015-04-28.
- Beijing Municipal Center For Food Safety Monitoring And Risk Assessment. A kit for detecting dog-derived components in food and its application: China, 201510024486.7 [P]. 2015-04-28.
- [22] 刘艳艳, 李会荣, 胡悦, 等. 饲料中狐狸、水貂、貉子和狗源性的五重实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(12): 67–76.
- LIU YY, LI HR, HU Y, *et al.* Multiplex fluorescent real-time PCR detection of fox, mink, raccoon and dog derived materials in feedstuff [J]. China Biotechnol, 2017, 37(12): 67–76.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



韦 涛, 主管技师, 主要研究方向食品
质量与安全。

E-mail: 52137462@qq.com



黄继锦, 硕士, 主要研究方向为食品、
保健食品质量检测。

E-mail: 410766474@qq.com