

核酸检测技术检测肉类种源研究进展

谷蒙林^{1,2}, 肖付刚^{2,3*}, 王德国^{2,3}, 丁长河¹

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450000; 2. 许昌学院食品与药学院, 许昌 461000;
3. 河南省食品安全生物标识快检技术重点实验室, 许昌 461000)

摘要: 肉及肉制品是人类重要的食物来源, 为人体提供必要的营养素。但是以经济为目的的肉制品掺假, 是食品安全中屡禁不止的全球性问题。快速、准确、有效的检测技术是有效监督肉类掺假的关键。本文综述了核酸检测技术中热循环扩增技术(如普通 PCR、实时 PCR、多重 PCR)和等温扩增技术[如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术、交叉引物等温扩增(cross prime amplification, CPA)技术等]的原理及在肉类种源鉴别中的应用。提出梯型熔解温度等温扩增(ladder-shape melting temperature isothermal amplification, LMTIA)技术, 以期推进核酸检测技术的研究及在肉制品领域的应用。在肉类种源的检测中, 实时荧光定量 PCR 技术、跨越式滚环等温扩增(saltatory rolling circle amplification, SRCA)技术等均能检出 0.01% 的掺伪, 可用于定量检测, 表明这些核酸技术在肉类种源检测中有很好的应用前景。

关键词: 核酸检测; 掺假; 肉制品; 聚合酶链式反应; 梯型熔解温度等温扩增技术

Research progress on detection of meat provenance by nucleic acid detection technology

GU Meng-Lin^{1,2}, XIAO Fu-Gang^{2,3}, WANG De-Guo^{2,3}, DING Chang-He¹

(1. College of Grain and Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, China; 2. Food and Pharmacy College, Xuchang University, Xuchang 461000, China; 3. Henan Key Laboratory of Biomarker Based Rapid-detection Technology for Food Safety, Xuchang 461000, China)

ABSTRACT: Meat and meat products are important food sources for human beings and provide necessary nutrients for human body. However, adulteration of meat products for economic purposes is a global problem that has been banned repeatedly in food safety. Fast, accurate and effective detection technologies are the key to effectively supervise meat adulteration. This paper reviewed the thermal cycle amplification technologies in nucleic acid detection technologies [such as ordinary polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, multiplex PCR] and isothermal amplification technologies [such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polymerase amplification (RPA), rolling circle amplification (RCA), cross prime amplification (CPA)] and their application in the field of meat products were discussed in the paper, ladder-shape melting temperature isothermal amplification (LMTIA) was proposed. which would help us to reveal the adulteration of meat products from the perspective of nucleic acid detection, and promote the research and application of nucleic acid detection technology

基金项目: 河南省科技攻关项目(212102310912)、河南省高等学校重点科研项目(21B550006)

Fund: Supported by the Henan Provincial Department of Science and Technology Research Project (212102310912), and the Henan Province Education Department Science Research Project (21B550006)

*通信作者: 肖付刚, 博士, 教授, 主要研究方向为农副产品加工及食品质量安全研究。E-mail: xfug@163.com

*Corresponding author: XIAO Fu-Gang, Ph.D, Professor, Xuchang University, 88 Bayi Road, Xuchang 461000, China. E-mail: xfug@163.com

in the field of meat products. In the detection of meat adulteration, 0.01% adulteration can be detected by real-time fluorescence quantitative PCR and saltatory rolling circle amplification (SRCA), which can be used for quantitative detection, indicating that these nucleic acid technologies have a good application prospect in the detection of meat provenance.

KEY WORDS: nucleic acid testing; adulteration; meat products; polymerase chain reaction; ladder-shape melting temperature isothermal amplification

0 引言

肉及肉制品是人类生活的重要营养来源, 为人体提供必要的氨基酸、蛋白质。自 2015 年 10 月 1 日《中华人民共和国食品安全法》施行以来, 中国食品安全呈良好稳定状态发展, 但是在某些肉制品中还存在添加相对廉价的鸡肉、鸭肉等情况, 严重威胁着消费者的合法权益和身体健康^[1]。肉制品掺假一直是食品安全中屡禁不止的全球性问题^[2-3], 特别是猪肉掺假, 还涉及到宗教信仰问题(如在羊肉中掺入猪肉)^[4]。肉类种源检测技术是打击肉制品掺假、维护市场秩序的有效保障。

目前, 常用的检测方法有感官鉴别技术^[5]、免疫学技术^[6]、核酸检测技术^[7]、质谱技术^[8]。近年来, 随着分子生物学的发展, 核酸检测技术凭借其灵敏、快速、设备要求低等优势, 在肉类种源鉴定中成为一大研究热点。本文主要综述了核酸检测技术在肉类种源检测中的研究进展, 并对这些技术总结分析, 以期对肉制品监测提供理论依据。

1 核酸检测技术概况

在肉类种源检测中, 核酸检测技术可以分为两类: 热循环扩增技术和等温扩增技术。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种常见的热循环扩增技术。等温扩增技术区别于传统的方法, 摆脱了对精密仪器的依赖。从近几年的研究发现, 等温扩增技术如环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[9]、重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA)^[10]、滚环扩增技术 (rolling circle amplification, RCA)^[11]、交叉引物等温扩增技术 (cross prime amplification, CPA)^[12] 已经应用于肉制品的种源检测。

2 核酸检测技术在肉制品中的应用

2.1 热循环扩增技术

PCR 技术是一种在体外扩增基因的方式, 机制类似于 DNA 的天然复制过程。DNA 经变性、退火、延伸 3 个步骤, 并在 DNA 聚合酶的作用下形成互补链, 再对新的 DNA 链解链, 循环复制^[13]。普通 PCR、多重 PCR、RT-PCR 和荧光定量 PCR 都被应用到肉制品种源检测中。在定性分

析中, 往往选用线粒体基因为靶基因, 而定量分析则选用单拷贝的核基因。

2.1.1 普通 PCR 检测

PCR 技术中, 引物设计较为复杂, 长度一般在 18~25 bp。普通 PCR 技术用于肉制品种源检测是很常见的, 可以检测极微量含量的肉成分。朱扬等^[14]根据 PCR 技术对牛肉中掺杂的猪肉进行定性检测, 检测限为 0.1%, 其研究结果表明 DNA 的含量、纯度、完整性不会影响检测限和灵敏度。秦盼柱^[15]也做了相关研究, 建立了一种检测肉样品中鸡肉、鸭肉和猪肉成分的 PCR 方法, 普通 PCR 和多重 PCR 的灵敏度均为 0.05%。将 PCR 技术与其他技术相结合, 可以提高检测的灵敏度。CHEN 等^[16]建立了马特异性聚合酶链式反应结合测流传感器检测马肉的方法。肉眼在 2~3 min 内读出检测结果, 检测限为 0.01%。基于 PCR 的检测方法特异性强、灵敏度高、速度快, 可为肉类行业质量把控提供可靠依据。

2.1.2 实时 PCR 检测

普通 PCR 多为定性鉴定, 而实时 PCR 技术已被证明是一种有效检测小分子物质的工具。在复杂的肉制品中, 实时荧光 PCR 是常用的检测方法。

BHAGWAN 等^[17]创建了一种从加工过肉制品中提取 DNA 的新型试纸装置, 利用实时荧光 PCR 检测不同浓度的稀释肉样品 (0.1%~100%), 可以选择性地从肉制品中检测出不同种类的肉类, 节约了成本。线粒体基因具有高拷贝数, 常作为扩增靶序列。章晶晶等^[18]选择线粒体 DNA 片段建立的实时荧光 PCR 测定方法, 可以用来检测实际样品中是否含有狐狸、貉子源性成分, 与普通 PCR 相比更省时、快速、高效, 但是无法确定肉类掺混比例。金萍等^[19]基于鸭线粒体细胞色素 *Cyt b* 基因建立了肉制品中的鸭源性成分检测的 RT-PCR 方法, 可检测 1% 及更低含量鸭源成分。LI 等^[20]选取单拷贝核基因建立了一种定量鉴别羊肉掺假的方法, 该方法可准确定量模拟羊肉、羊肉中掺鸡或鸭的掺假样品。实时荧光定量 PCR 被中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 (Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, AQSIQ) 推荐为鉴定鸭基因的标准方法, 虽然具有更高的灵敏度、特异性、准确性, 但是该技术需要反复升降温且需要昂贵的设备, 只能在专业分析实验室中使用。

2.1.3 多重 PCR 检测

多重 PCR 只需 1 次反应和 1 次电泳即可同时检测多个目的基因,各引物扩增时存在竞争,与普通 PCR 相比,可避免假阳性、提高鉴定结果的准确性。因此,多重 PCR 方法的建立对鉴定肉制品动物源性成分具有重大意义^[21]。有研究表明,根据动物线粒体 *Cyt b* 基因的差异性位点,开发的多重 PCR 体系,检测灵敏度甚至可以达到 0.05 ng/ μL ^[22-25]。

2.2 等温扩增技术

2.2.1 LAMP 技术

LAMP 技术作为近几年的新型核酸扩增技术克服了 PCR 检测方法反复升降温且检测周期相对较长的缺点,具有恒温、特异性强、灵敏度高、操作简单、性价比高的特点。选用 Bst DNA 合成酶,使得 LAMP 在扩增过程中发生链置换反应^[26]。在引物设计时,常以线粒体细胞色素 b 基因^[27]、D-loop 区^[28]为靶基因。将 LAMP 与其他技术相结合,如实时 LAMP 法、LAMP-LFA 法、可视化 LAMP 法等,在灵敏度、检测时间、便携性等方面具有一定的优势。

CAI 等^[29]建立了一种实时 LAMP 方法,用于肉制品中猪基因的检测。检出限为 1.76 pg/ μL ,灵敏度是 PCR 的 1000 倍。JAWLA 等^[30]针对线粒体的 D-loop 基因开发和标准化纸基 LAMP 和侧向流动(LAMP-LFA)法鉴定牛源组织。研究表明,LAMP-LFA 对牛组织具有高度特异性,DNA 的分析灵敏度为 0.1 μg ,能够在 3 h 内得出结果,可用作鉴定牛源组织的即时检测(point-of-care testing, POCT)法。朱凯等^[31]建立的可视化 LAMP 检测法,以 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚钠盐为指示剂,检测结果 2 h 可见,灵敏度为 10 pg/ μL 。SHI 等^[32]将简单 DNA 提取法与 LAMP-LFD 或 LAMP-HNB 法相结合,在 40 min 内即可鉴定出 0.1% 的鸭肉掺假。KUMARI 等^[33]针对线粒体 *Cyt b* 基因序列,开发了基于试管的 LAMP 检测方法,并与传统的 PCR 反应进行特异性、敏感性比较。LAMP 反应在 64 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 45 min,仅在牛的样品中检查到了扩增。LAMP 法和 PCR 法的分析灵敏度分别为 0.0001 和 1 ng。LAMP 较于其他检测技术,操作更简便,成本更低、耗时较短,且易于实现肉源性成分分析的现场检测,目前研究已经解决了 LAMP 技术由非特异性扩增或气溶胶污染引起的假阳性问题。

2.2.2 RPA 技术

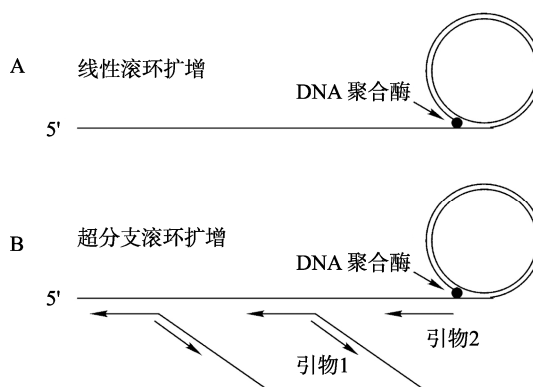
RPA 在能结合单链核酸(寡核苷酸引物)的重组酶、单链 DNA 结合蛋白(SSB)和链置换 DNA 聚合酶 3 种酶的作用下等温扩增 DNA^[34],具有特异性强、灵敏度高、反应迅速等优点,在肉制品种源检测方面应用也是比较多的。

将 RPA 技术与其他技术相结合,可提高灵敏度,缩短检测时间。最常用的方法是与横向流动试纸条检测法相结合,HSU 等^[35]从快速提取 DNA 到观察结果仅用了 30 min。在检测牛肉中的鸭肉成分中,FU 等^[36]建立了 RPA 结合多

重侧向流动检测棒(MLFD)的快速可视化方法,使用重组酶和链置换聚合酶使 RPA 能够在室温下扩增不同的双标记 DNA 扩增子,整个反应过程可以在 35 min 内完成,可检测 5% 的鸭肉掺假。JONAS 等^[37]以猪线粒体 *ND2* 和 *ATP6-8* 基因为靶基因,马肉和猪肉 RPA 检测分别在 6~11 min 内检测到 1 个 DNA 分子和 16 个 DNA 分子,能识别出 0.1% 以下的目标 DNA。RPA 技术对温度要求不高,被称为是可以替代 PCR 的核酸检测技术。该技术不需要昂贵的设备,不受场地限制,建立的可视化方法在肉源性检测中具有较好的应用潜力,但是该方法试剂成本高,反应体系固定,实用性受限。

2.2.3 RCA 技术

RCA 可以实现短时间的大量 DNA 扩增。使用单侧引物,结合在环形待检测的核酸序列上,在聚合酶的作用下,不断循环复制,形成长单链 DNA 分子^[38],扩增原理如图 1 所示^[39]。目前,RCA 技术已经用于食品安全检测方面^[40]。



注:A:线性滚环扩增;B:分支滚环扩增。

图 1 滚环扩增示意图

Fig.1 Schematic diagram of rolling circle amplification

RCA 技术操较 LAMP 技术而言可以避免出现假阳性。在食品安全方面主要用于致病菌检测^[41]、生物毒素^[42]、重金属检测^[43],在肉源性成分检测方面报道的较少。胡学佳等^[44]构建了一种跨越式滚环等温扩增技术(saltatory rolling circle amplification, SRCA),SRCA 荧光可视法检测猪肉 DNA 的灵敏度为 6.5 fg/ μL 。之后,选取鼠的线粒体 *Cyt b* 基因为靶基因,验证 SRCA 方法的准确性。在人工添加鼠肉的模拟掺假样品中,SRCA 方法可检测到含量为 0.01% 的鼠肉^[45]。RCA 技术无论是线性扩增还是指数扩增,都要求模板为环状,过程繁琐,耗时费力。SRCA 技术与之相比,操作简单,更适用于掺伪检测分析。

2.2.4 CPA 技术

CPA 是中国首个具有自主知识产权的新型等温扩增技术,根据交叉引物数量的不同,该技术可以分为单交叉扩增和双交叉扩增^[46]。交叉引物的 5' 端与模板不互补,当

DNA 聚合酶延伸到上游置换引物时会被置换。该技术无需预变性步骤, 在恒温 63 °C 下引物与模板结合成混合物, 反应产物中通过自发形成的泡状结构, 交叉引物与 5' 端的结合可激发链置换反应的进行^[47]。目前, 主要用于检测细菌^[48]、病毒^[49]、病原体^[50], 在肉源性成分检测中相对较少, 常与其他技术结合使用。

ZHENG 等^[51]建立了一种 CPA 结合胶体金核酸试纸条技术, 用于区分牛、羊、北极狐和猪肉, 检测限为 1%。FENG 等^[52]建立了一种 CPA 结合核酸试纸条的快速检测方法检测肉类混合物中的羊肉, 核酸条带能够在 5 min 内在靶基因的存在下显示相应的测试线, 检测限为 1%。研究表明, 在灵敏度上, CPA 技术较 LAMP 技术低些^[53]。但是通用引物可以简化 CPA 检测体系, 可用于多个肉源性成分分析的现场检测。

2.2.5 梯型熔解温度等温扩增技术

梯型熔解温度等温扩增 (ladder-shape melting temperature isothermal amplification, LMTIA) 技术是一种新型等温扩增技术^[54]。LMTIA 技术采用 1 对引物或 2 对巢式引物和一个热稳定 DNA 聚合酶(大片段)对水稻内部转录间隔区(ITS)进行了梯状熔融曲线扩增。与具有相同特异性水平的 LAMP 法相比, 嵌套引物 LMTIA 法的灵敏度提高了 50 倍。与其他核酸检测技术相比, 该技术最大的优势是

非热、非酶促, 引物设计简单, 适用范围广。可扩增 DNA、也可扩增 RNA, 可用单链为模板、也可用双链为模板, 靶标长度 ≥ 60 nt, 灵敏度 3~5 copies/reaction, 扩增检测时间 15 min 左右。比 PCR 和 LAMP 更简便快捷, 又不损失灵敏度。LMTIA 技术在新冠肺炎检测中总用时能控制在 18 min 内(包括样品前处理), 灵敏度 50 拷贝。下一步将开展 LMTIA 技术在肉源性成分检测中的应用研究, 扩展其应用领域。

3 结束语

综上所述, 核酸检测技术已经应用于肉源性成分检测中, 现对各技术总结如表 1~2 所示。目前, 以 PCR 技术为基础的核酸检测基础仍占主导地位, 特别是实时荧光 PCR, 是国家标准(GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》)中常用的检测方法。但是该技术需要反复升温, 且需要昂贵的热循环仪, 不适宜现场检测, 因而研究者的研究方向更倾向于操作简单、性价比高的等温扩增技术。目前, 等温技术扩增的研究主要是 2 个方面, 一是理论研究及工艺优化; 二是探索其在其他领域的应用。其他核酸等温扩增技术如单引物等温扩增、滚动循环扩增、链置换扩增在肉源性成分检测检测方面尚有很大的开发和应用前景。

表 1 常用核酸检测技术的特点

Table 1 Characteristics of common nucleic acid detection techniques

技术名称	提出时间	模板	酶数量	最适温度/°C	反应时间/min	引物数量/条	产物检测 [#]
PCR 技术	1985 年 Mullis 首次提出	DNA、RNA	1	温度梯度	120~180	2	GE、RT
LAMP 技术	2000 年日本学者 Notomi 提出	DNA [*]	1	60~65	60~90	4~6	GE、RT、
RPA 技术	2006 年英国公司 TwistDx Inc 研发	DNA [*]	2	25~42	20~40	2	GE、RT
RCA 技术	20 世纪 90 年代中期	DNA [*]	2	37	60	1	GE
CPA 技术	2009 年杭州尤思达研发	DNA	1	58~63	40~60	4~8	GE、RT

注: * : 体系中引入逆转录酶可扩增 RNA。#: GE: 表示凝胶电泳; RT: 表示实时监测侧。

表 2 不同核酸检测技术的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of different nucleic acid detection technologies

技术名称	优点	缺点
PCR 技术	特异性高; 灵敏度高; 应用广泛	反复升降温; 设备昂贵; 易受 PCR 抑制剂影响
LAMP 技术	特异性高; 扩增结果可通过肉眼判断	产物设计复杂; 易产生非特异性扩增
RPA 技术	反应条件温和; 反应时间短; 灵敏度高; 特异性高	新兴技术, 有待做进一步研究
RCA 技术	一条引物即可完成扩增; 高通量	要求模板为环状; 耗时费力
CPA 技术	反应速度快; 检测成本低, 操作简单	容易造成假阳性

参考文献

- [1] MOORE JC, SPINK J, LIPP M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010 [J]. J Food Sci, 2012, 77(4): 118-126.
- [2] MOYER DC, DEVRIES JW, SPINK J. The economics of a food fraud incident-case studies and examples including melamine in wheat gluten [J]. Food Control, 2017, 71: 358-364.
- [3] 解卉, 李军民. 从欧洲“马肉丑闻”看全球形势下食品安全监管[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(22): 122-125.

- XIE H, LI JM. Food safety supervision under the global situation from the European horse meat scandal [J]. *Food Res Dev*, 2013, 34(22): 122–125.
- [4] TIAN XJ, WANG J, SHEN RQ, *et al.* Discrimination of pork/chicken adulteration in minced mutton by electronic taste system [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2019, 54(3): 670–678.
- [5] 余桂平, 朱建锡, 马晓钟, 等. 电子鼻技术在肉类品质检测中的应用[J]. *现代食品*, 2020, (5): 7–10.
- YU GP, ZHU JX, MA XZ, *et al.* Application of electronic nose technology in meat quality detection [J]. *Mod Food*, 2020, (5): 7–10.
- [6] 职爱民, 余曼, 乔苗苗, 等. 免疫技术在动物源性食品快速检测中的研究进展[J]. *肉类研究*, 2019, 33(5): 60–66.
- ZHI AIM, YU M, QIAO MM, *et al.* Research progress of immune technology in rapid detection of animal derived food [J]. *Meat Res*, 2019, 33(5): 60–66.
- [7] 王天添, 刘佳琳, 李亚哈, 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 dog derived DNA detection kit [J]. *Food Ind Technol*, 2020, 41(10): 208–212.
- [8] 张宗国, 陈东杰, 孟一, 等. 基于顶空气相色谱-离子迁移谱与电子鼻技术快速检测宁夏滩羊肉中掺假鸭肉[J]. *肉类研究*, 2020, 34(12): 43–48.
- ZHANG ZG, CHEN DJ, MENG Y, *et al.* Rapid detection of adulterated duck meat in Ningxia Tan mutton based on headspace gas chromatography ion mobility spectrometry and electronic nose technology [J]. *Meat Res*, 2020, 34(12): 43–48.
- [9] WANG F, WU XF, XU DS, *et al.* Identification of chicken-derived ingredients in adulterated meat using loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(7): 1175–1180.
- [10] FU M, ZHANG QW, ZHOU X, *et al.* Recombinase polymerase amplification based multiplex lateral flow dipstick for fast identification of duck ingredient in adulterated beef [J]. *Animals*, 2020, 10(10): 1765.
- [11] HU XJ, XU H, ZHANG YZ, *et al.* Saltatory rolling circle amplification (SRCA) for sensitive visual detection of horsemeat adulteration in beef products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2021. DOI: 10.1007/s00217-021-03720-2
- [12] 冯涛, 杨韩, 张颖洁, 等. CPA-核酸试纸条检测鸭肉源性成分方法的建立和优化[J]. *核农学报*, 2016, 30(11): 2151–2159.
- FENG T, YANG H, ZHANG YJ, *et al.* Cross priming amplification and nucleic acid test strip analysis of duck meat in meat mixtures [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2016, 30(11): 2151–2159.
- [13] 李文伟. PCR 技术在食品工程中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2020, (30): 184.
- LI WW. Application of PCR technology in food engineering [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2020, (30): 184.
- [14] 朱扬, 刘永峰, 魏燕超, 等. 牛肉及其中式加工品中猪肉成分的定性、定量检测方法研究[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(22): 4352–4363.
- ZHU Y, LIU YF, WEI YC, *et al.* Study on qualitative and quantitative detection methods of pork components in beef and its Chinese processed products [J]. *Chin Agric Sci*, 2018, 51(22): 4352–4363.
- [15] 秦盼柱. 基于 PCR 原理的常见肉品快速真伪鉴别技术研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- QIN PZ. Research on rapid identification technology of common meat products based on PCR principle [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.
- [16] CHEN Y, WANG YL, XIAO MY, *et al.* Polymerase chain reaction with lateral flow sensor assay for the identification of horse meat in raw and processed meat products [J]. *Food Chem*, 2021, 345: 128840.
- [17] BATULE BS, SEOK Y, KIM MG. An innovative paper-based device for DNA extraction from processed meat products [J]. *Food Chem*, 2020, 321: 126708.
- [18] 章晶晶, 杜利强, 李永艳, 等. 实时荧光 PCR 法快速鉴别狐狸貉子肉源性成分研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(8): 269–275.
- ZHANG JJ, DU LQ, LI YY, *et al.* Rapid identification of meat derived components from fox and raccoon dog by real time PCR [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(8): 269–275.
- [19] 金萍, 丁洪流, 李培, 等. 实时荧光 PCR 快速筛选食品中鸭源性成分[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18): 61–63, 67.
- JIN P, DING HL, LI P, *et al.* Rapid screening of duck derived components in food by real-time fluorescent PCR [J]. *Food Ind Technol*, 2013, 34(18): 61–63, 67.
- [20] LI TT, WANG JS, WANG ZY, *et al.* Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR [J]. *Food Chem*, 2021, 344: 128622.
- [21] 唐桂华. PCR 快速鉴别肉制食品动物源性成分[J]. *现代食品*, 2016, (24): 47–48.
- TANG GH. Rapid identification of animal derived components in meat products by PCR [J]. *Mod Food*, 2016, (24): 47–48.
- [22] LIU WW, TAO J, XUE M, *et al.* A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2019, 245(11): 2385–2392.
- [23] 李盈诺, 王艳双, 苑广信, 等. 多重位点特异性 PCR 快速检测牛肉中常见掺假动物源性成分[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 82–87.
- LI YN, WANG SY, YUAN GX, *et al.* Rapid detection of adulterated animal derived ingredients in beef by multiple locus specific PCR [J]. *Food Ind Technol*, 2019, 40(24): 82–87.
- [24] 刘婉婉. 一种用于肉源鉴定的多重 PCR 技术研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- LIU WW. A multiplex PCR technique for meat identification [D]. Suzhou: Suzhou University, 2019.
- [25] 陈维忠, 张健, 王鑫, 等. 同时鉴定 9 种肉源种属的复合检测体系的建立及其应用[J]. *中国法医学杂志*, 2020, 35(2): 177–181.
- CHEN WZ, ZHANG J, WANG X, *et al.* Establishment and application of a multiplex detection system for simultaneous identification of nine meat derived species [J]. *Chin J Foren Med*, 2020, 35(2): 177–181.
- [26] 刘旺, 靳晶豪, 陈孝仁. 环介导等温扩增技术的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(2): 128–135.
- LIU W, JIN JH, CHEN XR. Application progress of loop mediated isothermal amplification [J]. *Curr Biotechnol*, 2021, 11(2): 128–135.
- [27] WANG Y, ZHU K, WANG D. Visual detection of donkey-derived ingredients by loop-mediated isothermal amplification with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol sodium salt [J]. *CyTA J Food*, 2020, 18(1): 240–244.
- [28] MOUNIKA T, GIRISH PS, KUMAR MS, *et al.* Identification of sheep (*Ovis aries*) meat by alkaline lysis-loop mediated isothermal amplification technique targeting mitochondrial D-loop region [J]. *J Food Sci Technol Mys*, 2020. DOI: 10.1007/s13197-020-04843-2
- [29] 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.
- [30] JAWLA J, KUMAR RR, MENDIRATTA SK, *et al.* Paper-based loop-mediated isothermal amplification and lateral flow (LAMP-LF) assay for identification of tissues of cattle origin [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1150: 338220.
- [31] 朱凯, 康怀彬, 王德国. 可视化 LAMP 检测常见肉制品中猪肉成分[J]. *食品科学*, 2019, 40(12): 296–302.
- ZHU K, KANG HB, WANG DG. Detection of pork components in

- common meat products by visual LAMP [J]. *Food Sci*, 2019, 40(12): 296–302.
- [32] SHI Y, FENG Y, XU CP, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assays for the rapid identification of duck-derived ingredients in adulterated meat [J]. *Food Anal Methods*, 2017, 10(7): 2325–2331.
- [33] KUMARI S, KUMAR RR, MENDIRATTA SK, *et al.* Development of loop-mediated isothermal method and comparison with conventional PCR assay for rapid on spot identification of tissue of cattle origin [J]. *J Food Sci Technol*, 2021. DOI:10.1007/S13197-020-04948-8
- [34] 施奕, 徐昌平, 余蓓蓓, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 522–532.
- SHI Y, XU CP, YU BB, *et al.* Research progress of recombinase polymerase amplification technology [J]. *Chin J Virol*, 2020, 36(3): 522–532.
- [35] YUNHSIU H, WEICHENG Y, KUNWEI C. Bushmeat species identification: Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for identification of formosan reeves' muntjac [J]. *Animals*, 2021, 11(2): 426–426.
- [36] MING F, QUANWANG Z, XIANG Z, *et al.* Recombinase polymerase amplification based multiplex lateral flow dipstick for fast identification of duck ingredient in adulterated beef [J]. *Animals*, 2020, 10(10): 1765–1765.
- [37] KISSENKÖTTER J, BÖHLKEN-FASCHER S, FORREST MS, *et al.* Recombinase polymerase amplification assays for the identification of pork and horsemeat [J]. *Food Chem*, 2020, 322: 126759. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126759
- [38] 张彤, 陶晴, 卞晓军, 等. 基于滚环扩增技术的 DNA 水凝胶用于大肠杆菌 O157:H7 的可视化快速检测[J]. *分析化学*, 2021, 49(3): 377–386.
- ZHANG T, TAO Q, BIAN XJ, *et al.* Visualization and rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using DNA hydrogel based on rolling ring amplification technology [J]. *Chem Newsl*, 2021, 49(3): 377–386.
- [39] DEAN FB, NELSON JR, GIESLER TL, *et al.* Rapid amplification of plasmid and phage dna using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification [J]. *Cold Spring Harbor Lab Press*, 2001, 11(6): 1095–1099.
- [40] 王冲, 宋亚宁, 梁煜, 等. 滚环扩增技术在食品安全检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 423–429.
- WANG C, SONG YN, LIANG Y, *et al.* Research progress of rolling loop amplification technology in food safety detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 423–429.
- [41] JU L, GUOYANG X, QIN X, *et al.* Sensitive dual readout assays based on rolling circle amplification for fluorescent and colorimetric detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula [J]. *Food Control*, 2021, 124: 107840. DOI:10.1016/J.FOODCONT.2020.107840
- [42] 杨鹏, 陈骏伯, 蒋小明, 等. DNA 发夹引发滚环扩增和纳米金组装反应应用于检测赭曲霉毒素 A[C]. 第三届全国质谱分析学术报告会摘要集-分会场 5: 有机/生物质谱新方法, 2017.
- YANG P, CHEN JB, JIANG XM, *et al.* DNA hairpin initiated rolling loop amplification and nanogold assembly for the detection of ochratoxin A [C]. Abstracts of the 3rd National Symposium on mass spectrometry 5: New methods of organic/biological mass spectrometry, 2017.
- [43] 李婷婷, 王嫦娥, 白向茹, 等. 等温核酸放大技术在重金属检测方面的应用[J]. *武汉工程大学学报*, 2021, 43(1): 38–44.
- LI TT, WANG CC, BAI XR, *et al.* Application of isothermal nucleic acid amplification technology in heavy metal detection [J]. *J Wuhan Inst Technol*, 2021, 43(1): 38–44.
- [44] 胡学佳, 张蕴哲, 徐慧, 等. 可视化跨越式滚环等温扩增技术在猪肉掺假检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 75–80.
- HU CJ, ZHANG YZ, XU H, *et al.* Application of visual spanning rolling loop isothermal amplification technology in detection of pork adulteration [J]. *Food Ind Technol*, 2020, 41(24): 75–80.
- [45] 胡学佳, 张蕴哲, 徐慧, 等. 可视化-跨越式滚环等温扩增技术检测鼠肉掺假[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 466–471.
- HU XJ, ZHANG YZ, XU H, *et al.* Detection of adulteration in rat meat by visualization spanning rolling loop isothermal amplification technique [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 466–471.
- [46] XU G, HU L, ZHONG H, *et al.* Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification [J]. *Sci Rep-Uk*, 2012, 2(1): 1350–1354.
- [47] 庞建虎, 乔龙亮, 朱鹏, 等. 核酸等温扩增技术在水产病原体快速检测中的应用[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2018, 47(5): 530–540.
- PANG JH, QIAO LL, ZHU P, *et al.* Application of nucleic acid isothermal amplification technology in rapid detection of aquatic pathogens [J]. *J Fujian Agric Forest Univ (Nat Sci Ed)*, 2018, 47(5): 530–540.
- [48] XU Z, LUO Y, SOTEYOME T, *et al.* Rapid detection of food-borne *Escherichia coli* O157:H7 with visual inspection by crossing priming amplification (CPA) [J]. *Food Anal Methods*, 2020, 13(2): 474–481.
- [49] WANG FX, YUAN DY, JIN YN, *et al.* Reverse transcription cross-priming amplification-nucleic acid test strip for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, 6: 24702.
- [50] PRZYBYLKOŃSKI A, SZELIGOWSKA J, JANUSZEWICZ M, *et al.* Evaluation of liver fibrosis in patients with Wilson's disease [J]. *Eur J Gastroen Hepat*, 2020, 33: 535–540.
- [51] ZHENG FY, LI SF, WANG SN, *et al.* Cross-priming isothermal amplification combined with nucleic acid test strips for detection of meat species [J]. *Anal Biochem*, 2020, 597: 113672.
- [52] FENG T, LI SF, WANG SN, *et al.* Cross priming amplification with nucleic acid test strip analysis of mutton in meat mixtures [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 641–645.
- [53] WOZNIAKOWSKI G, FRACZYK M, MAZUR N. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and cross-priming amplification (CPA) for detection of African swine fever virus [J]. *Pol J Vet Sci*, 2018, 21(4): 827–830.
- [54] WANG DG, WANG YZ, ZHANG M, *et al.* Ladder-shape melting temperature isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Biotechniques*, 2021, 71: 359–370.

(责任编辑: 于梦娇 郑丽)

作者简介

谷蒙林, 硕士研究生, 主要研究方向为食品真实性检测。

E-mail: 424132643@qq.com.

肖付刚, 博士, 教授, 主要研究方向为农副产品加工及食品质量安全研究。

E-mail: xfug@163.com