基于双拖尾重组聚合酶恒温扩增技术的核酸杂交 试纸条快速检测驴肉中的马源性成分

陈 阳,任星形,贾世龙,吴凌亚,王继成,柳海宾* (华北理工大学生命科学学院,唐山 063210)

摘 要:目的 建立快速、操作简单、价格相对低廉的重组聚合酶恒温扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术结合核酸杂交试纸条快速检测驴肉中马源性成分的可视化检测技术。**方法** 将双拖尾 重组聚合酶恒温扩增技术与核酸杂交试纸条相结合。针对马线粒体细胞色素 b (*cytb*)基因设计拖尾 RPA 引物, 这对特殊引物使 RPA 扩增子带有两个单链拖尾序列,这两个单链拖尾序列可以特异性地被金纳米探针和试纸 条上的检测探针识别并捕获,形成一条肉眼可见的红色条带,从而对马源性成分进行检测。**结果** 该方法整个 扩增(15 min)和检测(5 min)过程在 20 min 即可完成,对马肉的检出限达到 0.010%,且仅对马肉核酸有特异性 扩增,与其他 8 个物种的核酸均无交叉反应。20 份市售驴肉样品中有 2 份存在马源性成分,且该方法与 PCR 结合凝胶电泳的检测结果具有很好的一致性。**结论** 该方法特异性强、灵敏度高,可实现驴肉中马源性成分 的可视化快速检测。

关键词: 肉类真实性; 双拖尾扩增; 核酸杂交试纸条; 马源性成分; 可视化检测

Rapid determination of horse-derived components in donkey meat by nucleic acid hybridization strip based on double trailing recombinant polymerase constant temperature amplification technology

CHEN Yang, REN Xing-Tong, JIA Shi-Long, WU Ling-Ya, WANG Ji-Cheng, LIU Hai-Bin*

(College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid, simple and relatively low-cost visual detection technology for rapid determination of horse-derived components in donkey meat by recombinase polymerase amplification (RPA) combined with nucleic acid hybridization lateral flow strip. **Methods** Double tailed RPA was combined with nucleic acid hybridization lateral flow strip. The double tailed RPA primers were designed from horse mitochondrial cytochrome b (*cytb*) gene. This special primers enabled the RPA products carry two single-stranded trailing sequence, which could be specially recognized and captured by the probes on gold nanoparticles and test line forming a red line visible to the naked eyes. **Results** The whole process of amplification (15 min) and detection (5 min) was completed within 20 min. The detection limit of horsemeat reached 0.010%, and there was only specific amplification

基金项目:国家自然科学基金项目(32001791)、唐山市科技计划项目(20150209C)、大学生创新创业训练计划项目(X2021166)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32001791), the Science and Technology Project of Tangshan City (20150209C), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (X2021166)

^{*}通信作者:柳海宾,博士,副教授,主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: liuhaibinhappy1013@126.com

^{*}Corresponding author: LIU Hai-Bin, Ph.D, Associate Professor, College of Life Science, North China University of Science and Technology, 21 Bohai Dadao, Caofeidian District, Tangshan City, Hebei Province 063210, China. E-mail: liuhaibinhappy1013@126.com

of horsemeat nucleic acid, and no cross reaction with nucleic acid of other 8 species. Two of 20 commercial donkey meat samples were detected with horse meat, and this result was in good agreement with that of PCR combined with gel electrophoresis. **Conclusion** This method has high specificity and sensitivity, and can be used for visual and rapid detection of horse derived components in donkey meat.

KEY WORDS: meat authenticity; double trailing; nucleic acid hybridization lateral flow strip; horse-derived components; visual detection

0 引 言

肉类作为全球消耗最广泛的食品之一,最容易被掺 杂掺假^[1]。肉类掺假是指用价值较低廉的肉类代替价值较 昂贵的肉类,以期获得较高的经济利益。英国挂牛头卖马 肉^[2]和欧洲"马肉丑闻^[3]"等大型食品掺假事件的出现,揭 示了马肉掺假现象的广泛存在^[2-5]。驴肉及其制品由于营养 价值高、风味佳等特点深受广大消费者青睐^[6],部分商家 抓住马肉与驴肉纹理相似,且人们难以通过肉眼观察进行 辨别,将马肉原料掺入驴肉制品进行销售,严重侵害消费 者的权益。因此,建立一种成本较低、耗时短暂、操作简 便、准确度高、结果可视化的马肉成分鉴别技术十分重要。

国内外研究机构普遍通过建立精准快速的真实性鉴 别检测技术,实现对特色高值肉制品真实性和掺假的检 测。常见的肉类真伪鉴别方法包括基于形态学、代谢组学、 蛋白质和核酸这4大类方法。基于形态学的方法主要通过 使用显微镜观察肉的形态结构,依据检验员的经验进行肉 种类的判断,该方法只能区分哺乳动物、鱼类和禽类^[7]。 基于代谢物的检测方法通过使用光谱、色谱、质谱等传感 器检测肉类中的氨基酸、糖和酚类物质进行动物种属的鉴 别^[8-10],这些方法依赖于大型仪器、检测成本较高且需要 建立分析模型。基于蛋白的方法主要采用免疫学技术,依 赖抗原抗体的特异性反应进行肉类来源的鉴别, 该方法的 难点是必须找到一个热稳定的抗原并研制出针对此抗原的 特异性抗体[11];且肉类经过加工烹调过程(蒸煮、熏烤、油 炸等)后,会改变蛋白抗原决定簇的立体结构进而影响检 测结果的准确性^[12]。与蛋白质相比, 基于 DNA 扩增技术 的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和实时 荧光定量 PCR (real-time fluorescent PCR, RT-PCR)技术应 用最为广泛^[12-13],但 PCR 和 RT-PCR 具有依赖仪器、需要 专业的操作人员且检测所需的时间长等缺点, 难以实现对 肉源性成分的快速检测。

重组聚合酶恒温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是英国 TwistDx 公司于 2009 年开发的一种新型的恒温核酸扩增技术。该方法无需热循环装置,能够在恒定的温度下完成扩增反应且操作简单,与其他恒温扩增方法相比,特异性更强、操作简单、反应温度较低(37~42°C)、反应更迅速(15~30 min)^[14-16]。由于 cytb 基因具

有母系遗传,基因组结构高度保守,以 cytb 为靶基因建立 肉源性成分快速鉴别技术,可以提高检测效率和检测灵敏 度^[17-18]。此外, RPA 扩增反应只需两条引物,并且引物的 设计较为简单,反应温度较低,甚至可以在常温下进行扩 增反应^[19-23]。目前 RPA 扩增后产物检测的手段主要包括电 泳^[12]、加入荧光染料^[24]以及免疫学^[25]方法。电泳检测 RPA 产物所需的检测时间较长(30~40 min)、荧光染料的加入会 因引物二聚体的存在而产生假阳性结果、免疫学方法的引 人需要重复的洗涤且操作烦琐,这些检测方法的引入弱化 了 RPA 的优势。核酸层析试纸条是一种简单的装置,可以 实现目标分析物的可视化检测。试纸条与其他检测手段相 比优势在于:获得结果所需时间短(5 min)、费用较低、操 作简单^[26-27]。核酸层析试纸条与免疫层析试纸条相比优势 在于成本更低(不使用抗体)、特异性更强。

本研究在 RPA 的基础上引入拖尾引物,使其扩增产物包含双链主体和两侧的单链 DNA 尾巴,便于应用 DNA 杂交技术进行扩增产物的检测,并与核酸杂交试纸条 (nucleic acid hybridization-lateral flow strip, NAH-LFS)相结合,依据马线粒体细胞色素 b (*cytb*)基因设计 RPA 引物,通过实验条件优化,建立一种在驴肉及其制品中特异性检测马源性成分的快速检测方法,为驴肉及其制品的掺假鉴别提供方法依据,为市场监管部门提供方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜的马肉、驴肉、鸡肉、猪肉、羊肉、鸭肉、鹅肉、 鸽子肉、虾肉购买于唐山市各大超市及屠宰场;酱驴肉、 驴肉火烧等商业化产品购买于超市及淘宝店;兔肉、鼠肉 由华北理工大学实验动物中心提供。

链霉亲和素(12 U/mg)、琼脂糖(纯度 99.90%)、柠檬酸 三钠(纯度 99.90%)、氯金酸(纯度 99.99%)、三(2-羧乙基) 膦盐酸盐[tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, TCEP](纯度 98%)(上海 Sigma 公司);磷酸二氢钠(纯 度>99.0%)、磷酸氢二钠(纯度 99%)、氯化钠(纯度 99.5%)、 盐酸(纯度 37%)(上海国药集团化学试剂有限公司); 4-羟乙 基 哌 嗪 乙 磺 酸 {2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic aci, HEPES}(纯度 \geq 99.5%)(上海麦克林生化 科技公司); Tris(纯度 \geq 98%)、tween-20(纯度 \geq 40.0%)、牛 血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度≥96.0%)、蔗 糖(纯度≥99.9%)(北京索莱宝科技有限公司); RPA 扩增试 剂(英国 TwistDX 公司); 天根基因组 DNA 提取试剂盒(北 京天根生物科技有限公司); 所有引物、探针(苏州金唯智生 物科技有限公司); 聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)背 板、玻璃纤维、吸水纸、硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜 (HF135s、HF90s、HF180s)(上海金标生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

Milli-Q纯水系统(美国 Millipore 公司); 6132 紫外可见 分光光度计(德国 Eppendorf 公司); ZQ2000 微电脑自动斩 切机、HM3035 双维往复化膜仪(上海金标生物科技有限公 司); SY-1-2 电热恒温水浴锅(天津欧诺仪器仪表有限公司); Gel Doc 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 5418R 高 速离心机(德国 Eppendorf 公司); HYG-A 回转式恒温调速 摇瓶柜(太仓市实验设备厂); JA2003 电子天平(精度为 0.0001 g, 宁波市力辰科技有限公司); ZK-4OBS 真空干燥 箱(天津三水仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将所采购的样品清洗、切除外层后分割成 20 g/份的小 块, -20℃保存备用。模拟市售掺假的驴肉样品,按不同质 量百分比将处理后的马肉与驴肉混合均匀,制备驴肉中马 肉质量含量为 100.000%、50.000%、10.000%、5.000%、 1.000%、0.100%、0.010%、0.001%、0 (m:m,下同)的掺假 肉样品, -20℃保存备用。驴肉中马肉质量百分比为 10.000%的掺假样品制作方法为取 90 g驴肉并向其中加入 10 g马肉,混合均匀后即得到马肉质量分数为 10.000%的 掺假样品。驴肉中马肉百分比为 1.000%的掺假样品为取 90 g驴肉,向其中加入 10 g 10.000%的掺假样品,即得到 驴肉中马肉含量为 1.000%的掺假样品。通过此种系列稀释 法得到驴肉中马肉含量为 0.010%、0.001%的掺假样品。

1.3.2 DNA 提取

使用天根基因组 DNA 提取试剂盒提取肉类样品

DNA。利用紫外可见分光光度计测量所提取的 DNA 纯度, 保证 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.7~1.9 范围内。

1.3.3 RPA 引物与探针设计

根据 RPA 反应对引物的要求,查询 GenBank 数据库 中马线粒体细胞色素 b 基因序列号(NC_001640.1)并下载 该特异性基因序列,采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 依据碱基互补配对原则设计拖尾序列和检测探针,引物和 探针序列如表 1 所示。

1.3.4 胶体金纳米粒子的制备及其与探针的偶联

采用柠檬酸钠还原氯金酸的方法^[28]合成粒径约为25 nm 的胶体金纳米粒子(gold nanopspheres, AuNPs)。

识别探针(SH-probe)与 AuNPs 的偶联:取 10 μL 100 μmol/L SH-probe 与 10 μL 10 mmol/L TCEP 混合均匀, 室温下振荡反应 1 h 后,与 1.33 mL AuNPs 混合均匀,室温 反应 10 min 后,加入 500 mmol/L 柠檬酸缓冲液,调节体系的 pH至3.0^[29]。反应体系于室温孵育 10 min 后,加入 500 mmol/L HEPES 缓冲液,将体系的 pH 调至 7.6。随后,在 2.5 h 内逐滴 加入 2 mol/L NaCl,使体系中 NaCl 的终浓度为 300 mmol/L, 继续室温孵育 1 h 后,在 8000 r/min 条件下离心 10 min,取 沉淀重悬于缓冲液(1 mmol/L Tris-HCl, 10%蔗糖, 0.5% Tween-20, 1% BSA pH=7.6)中,以 25 μL/cm 的量喷涂于结 合垫上,在真空下干燥 6 h。

1.3.5 NAH-LFS 制备及工作原理

NAH-LFS 检测原理及结构如图 1 所示, 在组装试纸 条前, 需将生物素化的探针与链霉亲和素偶联, 通过固定 链霉亲和素大分子于 NC 膜上来间接固定探针。取 10 μL 100 μmol/L 生物素化检测探针与 7.5 μL 1 mg/mL 的链霉亲 和素混合均匀, 并加入 23 μL 的 1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)缓冲液, 室温下孵育 1 h, 过多的生物素 化检测探针使用离心过滤器(8000×g, 10 min)洗涤除去, 将 最终得到的链霉亲和素-生物素-捕获探针复合物重悬于 500 μL 的 PBS 缓冲液中, 并以 0.9 μL/cm 的量喷涂于 NC 膜上形成检测线。质控线的制备和喷涂步骤与检测线类似, 只是将检测探针替换为质控探针。核酸杂交试纸条由样品

	Ta	ble 1 Primer and probe sequences for RPA-NAH-LFS		
寡核苷酸链名称		序列(5'→3')		扩增长度/bp
正向引物	Forward-primer	*AATTTTTCACTGGGTTTATAGT-Spacer9-TTATCCAACCCAA ACTTCTTTC	RPA	380
反向引物	Reverse-primer	[#] TCGAGTGACAGCTAATGTGTGATT-Spacer9-TTGTTTTGTG ATTAGGTGGGTG	RPA	
识别探针	SH-probe	SH-ACTATAAACCCAGTGAAAAAT*	NAH-LFS	
检测探针	Biotin-Capture-probe	Biotin-A (16)-AATCACACATTAGCTGTCACTCGA#	NAH-LFS	
质控探针	Biotin-Control-probe	Biotin-A (16)-ATTTTTCACTGGGTTTATAGT [∆]	NAH-LFS	

表1 RPA-NAH-LFS 所需的引物与探针

注:*标记的两条序列反向互补; "标记的两条序列反向互补; ^标记的两条序列碱基完全相同。

垫、结合垫、NC 膜、吸水纸、PVC 背板构成。各部分按图 1 所示的顺序进行组装,每两个相邻的部分需要重叠 2 mm, 以便于样品在试纸条上流动,组装完成后用微电脑自动斩 切机切割成宽 4 mm 的试纸条,室温干燥保存备用。

使用拖尾引物进行 RPA 扩增反应,反应结束后产生的扩增片段两端各带一条单链 DNA 尾巴。将双拖尾的扩 增产物与上样缓冲液混合后滴加于试纸条的样品垫上,扩 增产物在毛细管的作用下向吸水纸方向移动,首先水合结 合垫上的 AuNPs-探针复合物, RPA 产物一端的拖尾序列可 被固定在 AuNPs 上的探针特异性识别,形成 AuNPs-单链 尾巴与探针杂交区域-双链扩增子-单链尾巴复合物。此复 合物继续在试纸条上向吸水纸方向移动,移动到检测线位 置时,游离的单链尾巴会被检测线上固定的捕获探针捕获, 使带有 AuNPs 的扩增片段在检测线上聚集。大量的 AuNPs 在检测线上的聚集会形成一条肉眼可见的红色条带,同时 过量 AuNPs-探针复合物会被质控线上的质控探针捕获, 同样形成一条肉眼可见的红色条带。试纸条上同时具有两 条肉眼可见的红色条带,证明样品中存在马肉成分,只有 质控线一条肉眼可见的条带,证明样品中不存在马肉成分; 当试纸条质控线不显色时,证明试纸条已经失效。





1.3.6 RPA 扩增反应

使用 TwistDX 公司的 TwistAmp Basic RPA 扩增试 剂盒进行 RPA 扩增反应, RPA 扩增体系为 50 μ L, 体系 的详细信息如表 2 所示。需要特别说明的是, Mg²⁺要最 后加入, 且加入后立即颠倒混匀, 将 RPA 扩增体系于 39℃条件下孵育 15 min, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳 (agarose gel electrophoresis, AGE)和核酸杂交试纸条同 时检测。

1.3.7 试纸条工作条件优化

使用试纸条检测 RPA 扩增产物时, NC 膜的孔径和上 样缓冲液的类型对检测结果有较大影响, 因此, 通过实验 筛选最优的 NC 膜孔径和上样缓冲液的类型, 以提高试纸 条检测的灵敏度和特异性。

上样缓冲液的优化:将 10 μL 的 RPA 扩增产物与 90 μL 的不同种类的上样缓冲液混匀,滴加于样品垫上,5 min 后 观察结果。上样缓冲液的种类包括 0.01 mol/L 磷酸缓冲液

(phosphate buffer, PB, pH=7.4)和 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=5.6、7.4、8.5),选择试纸条条带颜色清晰且背景色低的缓冲液作为最优的上样缓冲液。

DDA 反应体系

Table 2 Recombinase polymeras	se amplification system
反应成分	加入体积/µL
缓冲液	29.5
正向引物(10 mmol/L)	2.4
反向引物(10 mmol/L)	2.4
DNA 模版	2.5
冻干酶	1 粒
醋酸镁(280 mmol/mL)	2.5
无菌水	10.7

NC 膜的优化: 将 10 μL 的 RPA 扩增产物与 90 μL 的 缓冲液混合均匀, 滴加于由不同型号 NC 膜(流速=180、 135、90 s/4 cm)参与组装的试纸条的样品垫上, 5 min 后观 察结果,选择试纸条条带颜色清晰且背景色低的 NC 膜型 号作为最优的 NC 膜用于后续实验。

1.3.8 RPA-NAH-LFS 灵敏度与特异性分析

取 1.3.1 中制备的驴肉中马肉质量百分比分别为 100.000%、50.000%、10.000%、5.000%、1.000%、0.100%、0.010%、0.001%、0 的掺假肉样品,提取其基因组 DNA 并 进行 RPA 扩增反应,对扩增产物同时使用琼脂糖凝胶电泳 和 NAH-LFS 检测,观察比较两种方法的检出限以评价 RPA-NAH-LFS 的灵敏度。

分别从马肉、羊肉、牛肉等 10 种肉类样品中提取基因组 DNA,按照上述 RPA 扩增方法分别进行扩增。对扩增产物进行 AGE 和 NAH-LFS 检测,观察结果以确定 RPA-NAH-LFS 的特异性。

1.3.9 RPA-NAH-LFS 实际样品检测

购于唐山市屠宰场、大型超市、饭店以及淘宝网的驴肉制品共 20 份,提取其基因组 DNA 并进行 RPA 扩增,应用核酸杂交试纸条进行检验,同时使用 PCR-AGE 方法进行验证,以确定 RPA-NAH-LFS 的准确性与实际应用价值。

2 结果与分析

2.1 试纸条最优工作条件

通过改变 NC 膜的型号以及使用不同种类的上样缓冲 液来确定试纸条的最优工作条件。实验结果如图 2 所示, 当用 PBS (pH=7.4)作为上样缓冲液时,试纸条显色最好。 当 NC 膜的型号为 HF135s 时,试纸条具有相对较好的显色 结果。因此选用 NC 膜型号为 HF135s,上样缓冲液为 PBS (pH=7.4)作为后续 NAH-LFS 的最优工作条件。

2.2 RPA-NAH-LFS 特异性评价

RPA-NAH-LFS 的特异性检测结果如图 3 所示,只有加入马肉基因组 DNA 的 RPA 扩增产物会产生 350 bp 的扩增产物(图 3A),同时可以使 NAH-LFS 的检测线呈红色,其余物种均不能使检测线显色(图 3B)。特异性验证结果表明 RPA-NAH-LFS 对马源性成分特异性良好,与常见物种无交叉反应。





图 2 上样缓冲液(A)和 NC 膜流速(B)优化结果

Fig.2 Optimization results for running buffer (A) and the flow rate of NC membrane (B)

2.3 RPA-NAH-LFS 检测马源性成分的灵敏度

使用 AGE 和 NAH-LFS 检测双拖尾 RPA 扩增产物。 琼脂糖凝胶电泳的检测结果如图 4A 所示,当驴肉中马肉 的质量百分比为0.100%时,在350 bp处有肉眼可见的条带, 即 RPA-AGE 对驴肉中马源性成分检测的灵敏度为 0.100%。使用 NAH-LFS 检测双拖尾 RPA 扩增产物的结果 如图 4B 所示,当马源性成分的质量百分比为 0.010%时, 检测线处的条带颜色与阴性对照有肉眼可见的明显区别, 而马肉质量含量为0.001%时,检测线条带颜色与阴性对照 无肉眼可见的区别,因此将 0.010%定义为 RPA-NAH-LFS 检测马源性成分的最低检出限。而在现实生活中,1.000% 以下的掺假率对于不法贩卖商家来说,利润基本为零,故 本研究 0.010%的灵敏度完全可以满足常规检测的需要。在 以往的研究成果中,掺杂掺假检测灵敏度各不相同,如 ZHAO 等^[30]使用 PCR 结合免疫层析试纸条检测火鸡成分, 检测的灵敏度为 0.100%; 张媛媛通过种属 PCR 法成功检 测出 1.000%的廉价肉掺杂^[31]; 陈珍金等^[32]使用 LAMP 技 术可检测出羊肉制品中 0.100%的大鼠源性成分。与以往检 测产品比较,本研究所建立方法的检测灵敏度与以往方法 相当甚至优于以往方法^[33-35],且无需昂贵仪器,完成整个



检测过程仅需 20 min (RPA 扩增 15 min, NAH-LFS 检测 5 min) 非常适用于驴肉制品中的马肉成分的快速检测。本研究中 建立的 NAH-LFS 是基于核酸杂交的方法识别 RPA 扩增产 物,与传统的基于抗原抗体识别的免疫杂交试纸条方法相 比^[36],不使用抗体价格相对低廉,探针与 AuNPs 的连接相 对简单且试纸条的稳定性更高。



注: 检测物种 1~8 分别为: 驴、鸡、猪、羊、鸭、鹅、鸽子、兔; P: 阳性对照; N: 阴性对照; M: D2000 DNA marker。 图 3 琼脂糖凝胶电泳(A)和 RPA-NAH-LFS (B)的特异性

Fig.3 Specificities of agarose gel electrophoresis (A) and RPA-NAH-LFS (B)



注:N为阴性对照; M: D2000 DNA marker; N: 阴性对照; 1: 100.000%; 2: 50.000%; 3: 10.000%; 4: 5.000%; 5: 1.000%; 6: 0.100%; 7: 0.010%; 8: 0.001%。

图 4 琼脂糖凝胶电泳(A)和 RPA-NAH-LFS (B)检测马源性成分的灵敏度 Fig.4 Sensitivities of RPA-AGE (A) and RPA-NAH-LFS (B) in detection of horse derived components

2.4 RPA-NAH-LFS 检测实际样品

本研究从农贸市场、超市、饭店、淘宝网等购买驴肉及 驴肉制品 20 份,采用建立的 RPA-NAH-LFS 方法对其进行马 源性成分检测,同时使用 PCR-AGE 方法进行验证,结果如表 3 所示。所购买的生驴肉包括 5 份鲜驴肉样品(编号 1~5)和 5 份冷冻驴肉样品(编号 6~10),其中 1 份冷冻驴肉样品(编号 9) 检测出马源性成分;所采集的熟驴肉包括 5 份酱驴肉样品(编 号 11~15)和 5 份驴肉火烧样品(编号 16~20),其中 1 份驴肉火 烧样品(编号 18)检测到马源性成分。使用 PCR-AGE 的方法 对所有的检测结果进行验证, RPA-NAH-LFS 与 PCR-AGE 的 检测结果具有 100%的一致性, 证明 RPA-NAH-LFS 是检测马 源性成分的可靠方法。在采集的这 20 份商业化驴肉样品中, 马肉的掺假率为 10%, 掺假率相对较低。

3 结 论

驴肉及其制品因具有独特的风味和营养价值而备受 消费者的青睐,但一些不良商家为了获得更高的利润, 常在驴肉及其制品中掺杂马源性成分,这种行为既损害 消费者的经济利益和身体健康,还会导致消费者对食品 安全性失去信心。本研究通过将双拖尾 RPA 技术与 NAH-LFS 相结合成功实现驴肉中马肉成分的高灵敏特异 性检测[可以快速(20 min)准确地检测驴肉及其制品中 0.010%的马肉成分]。采集市售的 20 份驴肉及其制品,评 价 RPA-NAH-LFS 检测驴肉中马源性成分的实际应用性 能,同时使用 PCR-AGE 方法对检测结果进行验证。本研 究所建立的方法具有操作简单、所需时间短且价格低廉 等优点,可以作为驴肉中马源性掺假成分检测的可靠方 法。未来可以通过改变 RPA 扩增过程使用的引物对,将 RPA-NAH-LFS 用于其他掺假成分的检测,在食品安全领 域有较大的应用前景。

		Table 5 Tes	sing results of practical samp	105		
样品编号	样品名称	民日平坦	标签中的肉类成分 -	检测马源性	检测马源性成分结果	
		杆面米源		RPA-NAH-LFS	PCR-AGE	
1	鲜驴肉	超市1	驴肉	-	-	
2	鲜驴肉	超市 3	驴肉	-	-	
3	鲜驴肉	农贸市场1	驴肉	-	-	
4	鲜驴肉	农贸市场 2	驴肉	-	-	
5	鲜驴肉	农贸市场 3	驴肉	-	-	
6	冷冻驴肉	超市1	驴肉	-	-	
7	冷冻驴肉	超市1	驴肉	-	-	
8	冷冻驴肉	超市 2	驴肉	-	-	
9	冷冻驴肉	超市 3	驴肉	+	+	
10	冷冻驴肉	超市 4	驴肉	-	-	
11	酱驴肉	超市 2	驴肉	-	-	
12	酱驴肉	农贸市场1	驴肉	-	-	
13	酱驴肉	农贸市场 3	驴肉	-	-	
14	酱驴肉	饭店1	驴肉	-	-	
15	酱驴肉	淘宝网	驴肉	-	-	
16	驴肉火烧	饭店1	驴肉	-	-	
17	驴肉火烧	饭店 2	驴肉	-	-	
18	驴肉火烧	饭店 3	驴肉	+	+	
19	驴肉火烧	淘宝网	驴肉	-	-	
20	驴肉火烧	淘宝网	驴肉	-	-	

表 3 实际样品检测结果 Table 3 Testing results of practical samples

注:+代表马源性成分阳性,-代表马源性成分阴性。

参考文献

 甘永琦, 卢曼曼, 赖青鸟, 等. 高通量测序技术在肉类掺假检测中的应 用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 1–16.
 GAN YQ, LU MM, LAI QN, *et al.* Application and progress in

NAN FQ, EO MIN, EAT QN, et al. Application and progress in high-throughput sequencing technology for meat adulteration detection [J]. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 1–16.

- [2] 曹劼. 65年前英国的"挂牛头卖马肉"事件[J]. 晚报文萃, 2013, (11): 37. CAO J. 65 years ago, the event of "selling horse meat by hanging cow's head" in Britain [J]. Even Ed, 2013, (11): 37.
- [3] 刘国强,罗建兴,其勒木格,等.网销市场中驴肉真伪及掺假分析[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(9):2816–2821.
 LIU GQ, LUO JX, QILE MG, *et al.* Analysis of donkey meat authenticity and adulteration in network marketing [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(9): 2816–2821.
- [4] KESHAVARZI Z, BARZEGARI BS, FAIZI M, et al. Comparison of transmission FTIR and ATR spectra for discrimination between beef and chicken meat and quantification of chicken in beef meat mixture using ATR-FTIR combined with chemometrics [J]. Food Sci Technol, 2020, 57(4): 1430–1438.

- [5] ZHENG XC, LI YY, WEI WS, *et al.* Detection of adulteration with duck meat in minced lamb meat by using visible near-infrared hyperspectral imaging [J]. Meat Sci, 2019, 149: 55–62.
- [6] MANSOURI M, FATHI F, JALILI R, et al. SPR enhanced DNA biosensor for sensitive detection of donkey meat adulteration [J]. Food Chem, 2020, 331: 127163.
- [7] PRAYSON BE, MCMAHON JT, PRAYSON RA. Applying morphologic techniques to evaluate hotdogs: What is in the hotdogs we eat? [J]. Ann Diagn Pathol, 2008, 12(2): 98–102.
- [8] CARDOSO VGK, POPPI RJ. Cleaner and faster method to detect adulteration in cassava starch using Raman spectroscopy and one-class support vector machine [J]. Food Control, 2021, 125: 107917.
- [9] VALAND R, TANNA S, LAWSON G, et al. A review of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations [J]. Food Addit Contam A, 2020, 37(1): 19–38.
- [10] 贾菲菲,王钢力,冯芳,等. 基于脂肪酸指纹图谱的我国羊肉产地溯源研究[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(11):4638-4646.
 JIA FF, WANG GL, FENG F, *et al.* Traceability of mutton origin based on fatty acid fingerprint in China [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(11): 4638-4646.

- [11] JIANG X, RAO Q, MITTL K, et al. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of mammalian meats [J]. Food Control, 2020, 110: 107045.
- [12] 彭媛媛, 武煊, 陶晓奇. 实时荧光 PCR 技术定量检测肉类掺假的研究 进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 279–287.
 PENG YY, WU X, TAO XQ. Quantitative detection of meat adulteration by real-time fluorescent PCR [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(15): 279–287.
- [13] YU N, REN J, HUANG W, et al. An effective analytical droplet digital PCR approach for identification and quantification of fur-bearing animal meat in raw and processed food [J]. Food Chem, 2021, 355: 129525.
- [14] LIU H, WANG J, ZENG H, et al. RPA-Cas12a-FS: A frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification [J]. Food Chem, 2021, 334: 127608.
- [15] AZINHEIRO S, ROUMANI F, RODRÍGUEZ-LORENZO L, et al. Combination of recombinase polymerase amplification with SYBR green I for naked-eye, same-day detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground meat [J]. Food Control, 2022, 132: 108494.
- [16] VELASCO A, RAMILO-FERNÁNDEZ G, DENIS F, et al. A new rapid method for the authentication of common octopus (*Octopus vulgaris*) in seafood products using recombinase polymerase amplification (RPA) and lateral flow assay (LFA) [J]. Foods, 2021, 10(8): 1825.
- [17] 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. Rapid identification of meat based on PCR [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.
- [18] JAHURA F, MUNIRA S, BHUIYAN A, et al. Molecular detection of goat and sheep meat origin using mitochondrial cytochrome b gene [J]. Bangladesh J Anim Sci, 2016, 45(2): 41–45.
- [19] LIN L, ZHENG Y, HUANG H, et al. A visual method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick [J]. Food Chem, 2021, 354: 129526.
- [20] 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.
- [21] WANG Z, LI T, YU W, et al. A low-cost novel lateral flow nucleic acid assay (LFNAA) for yak milk authentication [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 122: 109038.
- [22] ZHENG Y, HU P, REN H, et al. RPA-SYBR green I based instrument-free visual detection for pathogenic Yersinia enterocolitica in meat [J]. Anal Biochem, 2021, 621: 114157.
- [23] ZHAO G, WANG J, YAO C, et al. Alkaline lysis-recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a assay for the ultrafast visual identification of pork in meat products [J]. Food Chem, 2022, 383: 132318.
- [24] 贾慧建,王天添,赵远,等. 肉制品中狗、狐、貂源性成分 DNA 检测 试剂盒的制备[J]. 肉类研究, 2021, 35(8): 48–53.
 JIA HJ, WANG TT, ZHAO Y, *et al.* Development of DNA detection kit for dog, fox and mink-derived components in adulterated meat products [J]. Mear Res, 2021, 35(8): 48–53.
- [25] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, et al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. J Food Protect, 1998, 61(5): 513–518.
- [26] 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 ingredient based on PCR technology [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(11): 3385–3390.

[27] 王守云, 袁明美, 封聪, 等. 肉类掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 56-61.

WANG SY, YUAN MM, FENG C, *et al.* Recent advances in identification techniques for meat adulteration [J]. Meat Res, 2017, 31(4): 56–61.

[28] 陈镇. 纳米金比色传感器检测重金属离子研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.

CHEN Z. Study on functionalized gold nanoparticles for detection of heavy metal ions (CR^{3+} and CD^{2+}) in aqueous solutions [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2016.

- [29] ZHANG X, SERVOS MR, LIU J. Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(17): 7266–7269.
- [30] ZHAO L, WANG K, YAN C, et al. A PCR-based lateral flow assay for the detection of Turkey ingredient in food products [J]. Food Control, 2020, 107: 106774.
- [31] 张媛媛, 孟镇, 仇凯, 等. 种属特异性 PCR 法鉴别罐头食品中猪、牛、 羊、鸡、鸭源性成分[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 164–169. ZHANG YY, MENG Z, QIU K, *et al.* Species-specific PCR method to identify animal-derived ingredients of pork, beef, mutton, chicken and duck in canned food [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(3): 164–169.
- [32] 陈珍金,张璜,石磊,等.利用LAMP技术快速检测羊肉制品中的鼠源 性成分[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 322–327.
 CHEN ZJ, ZHANG H, SHI L, *et al.* Rapid detection of murine-derived ingredients in mutton products using loop-mediated isothermal amplification [J]. Food Sci, 2021, 42(12): 322–327.
- [33] QIN P, XU J, YAO L, et al. Simultaneous and accurate visual identification of chicken, duck and pork components with the molecular amplification integrated lateral flow strip [J]. Food Chem, 2020, 339: 127891.
- [34] WANG Z, LI T, YU W, et al. A low-cost novel lateral flow nucleic acid assay (LFNAA) for yak milk authentication [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 122: 109038.
- [35] THANGSUNAN P, TEMISAK S, MORRIS P, et al. Combination of loop-mediated isothermal amplification and AuNP-oligoprobe colourimetric assay for pork authentication in processed meat products [J]. Food Anal Method, 2021, 14(3): 568–580.
- [36] HENDRICKSON OD, ZVEREVA EA, VOSTRIKOVA NL, et al. Lateral flow immunoassay for sensitive detection of undeclared chicken meat in meat products [J]. Food Chem, 2021, 344: 128598.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)



作者简介



E-mail: 1574235032@qq. com



柳海宾,博士,副教授,主要研究方向 为食品安全快速检测。 E-mail: liuhaibinhappy1013@126.com