

环介导等温扩增技术在鸭源成分检测中的研究

吴 潇^{1,2}, 吕贝贝^{1,2}, 蒋 玮^{1,2}, 白 蓝^{1,2}, 武国干^{1,2},
王金斌^{1,2,3}, 王荣谈³, 潘爱虎^{1,2}, 唐雪明^{*1,2}

(1. 上海市农业科学院 生物技术研究所, 上海 201106; 2. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;
3. 上海瑞丰农业科技有限公司, 上海 201106)

摘要: 为了建立肉产品中鸭源成分的现场快速检测技术, 根据动物种间特异性的原则, 筛选出一对品种特异的 PCR 引物, 在此引物扩增片段的基础上, 设计了环介导等温扩增(LAMP)引物序列, 能特异检测鸭源成分。通过条件优化实验, 发现在 25 μL 的扩增体系中, 内外引物浓度比为 1:4, 温度为 63.5 $^{\circ}\text{C}$, MgSO_4 添加量为 5 $\text{mM}/\mu\text{L}$, dNTPs 添加量为 1.75 $\text{mM}/\mu\text{L}$, Bst DNA 聚合酶添加量为 0.4 $\text{U}/\mu\text{L}$, 甜菜碱添加量为 0.25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, LAMP 反应时间为 30 min 时, LAMP 检测体系检测效果达到最优, 鸭肉 DNA 的检测灵敏度可达到 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。对牛羊肉中鸭源成分比例的检测灵敏度为 0.000 1%。应用该方法对上海市闵行区市场中的牛羊肉产品进行抽样检测, 结果从 21 份样品中成功检测出 5 份含鸭源成分的混合肉。本研究建立的 LAMP 检测方法灵敏、快捷, 可以实现鸭源成分的现场速测, 为肉制品市场的监管提供了一种新方法。

关键词: 牛、羊肉制品; 等温扩增技术; 环介导等温扩增技术; 可视化检测

中图分类号: Q 81 文章编号: 1673-1689(2019)08-0126-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.08.018

Rapid Detection Technique of Duck-Derived Components in Beef and Sheep Products by LAMP

WU Xiao^{1,2}, LV Beibei^{1,2}, JIANG Wei^{1,2}, BAI Lan^{1,2}, WU Guogan^{1,2},
WANG Jinbin^{1,2,3}, WANG Rongtan³, PAN Aihu^{1,2}, TANG Xueming^{*1,2}

(1. Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;
2. Biotechnology Research Institute and Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; 3. Shanghai Ruifeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Shanghai 201106, China)

Abstract: A pair of specific PCR primers was selected based on the principle of animal species specificity in order to establish a duck meat products source components on-site rapid detection technology. The fragment was obtained by the specific primers only in duck samples. On the basis of

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 上海市转基因生物与食品安全检测公共服务平台项目(15DZ2290900), 闵行区人才发展专项资金资助项目, 闵行区产学研合作计划项目(2016MH256)。

作者简介: 吴 潇(1978—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事分子生物学与分子遗传研究。E-mail: qwuxiao@126.com

* 通信作者: 唐雪明(1930—), 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事微生物与发酵工程研究。E-mail: xueming70@foxmail.com

引用本文: 吴潇, 吕贝贝, 蒋玮, 等. 环介导等温扩增技术在鸭源成分检测中的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(08): 126-133.

this fragment, the ring mediated isothermal amplification (LAMP) primers were designed and the primers could detect duck source component specifically. By conditions optimization experiments, the most optimal amplification system for LAMP (25 μL) as follow: concentration ratio of inside primer and outside primer was 1:4, temperature was 63.5 $^{\circ}\text{C}$, MgSO_4 was 5 $\text{mM}/\mu\text{L}$, dNTPs was 1.75 $\text{mM}/\mu\text{L}$, Bst DNA polymerase was 0.4 $\text{U}/\mu\text{L}$, betaine was 0.25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, the LAMP reaction time was 30 min. Under the optimized conditions, the detection sensitivity of duck DNA was 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$. The detection sensitivity of component proportion for beef or mutton in the duck source was 0.000 1%. 21 samples from markets of Shanghai Minhang district were detected using this method and 5 samples contained duck source. The results showed LAMP was a sensitive rapid technology. It provides a new method to realize on-site detection of duck source components for meat products.

Keywords: bovine and mutton products, isothermal amplification techniques, loop-mediated isothermal amplification, visualization detection

食品安全关系到老百姓的身体健康和生命安全,关系到社会的稳定。肉制品是人们日常生活中主要的动物蛋白来源,包括:鲜肉(分割肉,肉卷),腌制肉(咸肉,香肠,火腿等),另外还有酱卤肉,培根,肉干,肉脯,肉丸,调理肉串等^[1-2]。由于肉制品无法具备动物整体形态的特异性,一旦经过加工工艺的处理,消费者更是难以辨认真假^[3]。面对目前牛羊肉市场存在的混乱现象,根据肉的色泽,气味,纹理,肥瘦等方面进行鉴别的传统方法已不能满足职能部门监管的需求^[4-6],为了鉴别肉产品的成分,已建立了物理,化学,免疫学和分子生物学等方法^[7-9]。

目前,在肉产品的成分检测中使用的有 PCR 方法^[10-12],光谱法^[13-15]和质谱法^[16]。PCR 方法包括常规 PCR 方法、多重 PCR 方法^[17]、PCR-RFLP 分析方法^[18]、荧光定量 PCR 技术^[19-21]和微滴数字 PCR 定量检测方法^[19]。在现有的检测方法中,无论是 PCR 方法,还是光谱法和质谱法,都是离不开昂贵的实验仪器的实验室检测方法,侧重于终端产品检测,难以在现阶段我国食品安全事件多发、样本分散的情况下及时快速、全面地从源头和现场进行检测。在肉产品质量监管过程中,采集样品带回实验室进行检测费时费事,因此非常需要建立一种检测技术实现快速检测,并在现场获得检测结果。

等温扩增技术 (Isothermal amplification technology) 是 PCR 技术的衍生技术,通过添加不同活性的酶和特异性引物,在恒温下进行反应过程,来达到快速核酸扩增的目的,环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是

其中的一种^[4]。LAMP 技术除了高特异性、高灵敏度外,其优势在于对仪器设备要求低,置于水浴锅或恒温箱中 63 $^{\circ}\text{C}$ 左右保温 30~60 min 就能完成反应,结果的检测不需要进行凝胶电泳,只需通过肉眼观察绿色荧光的生成来判断,简便快捷,非常适合现场快速可视化检测^[1],因此, LAMP 技术已广泛应用于各种食源性病毒的基层检测^[22-24]。目前, LAMP 技术应用于动物源产品成分的现场可视化速测的研究还鲜有报道。

鉴于商贩多用鸭肉对牛、羊肉进行掺假,本研究采用环介导等温扩增技术建立了一种鸭源性成分的检测方法,旨在实现市面销售的不同类型肉产品中鸭源成分的现场快速检测,为市场监管部门提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所用鸭肉,鸡肉,羊肉,牛肉,猪肉均购于上海市超市和农贸市场;冰冻羊肉卷,肉串,牛肉粒,牛肉干等畜肉加工食品购于上海市超市和农贸市场。DNA 提取试剂盒、 MgSO_4 、dNTPs、甜菜碱购于生工生物工程(上海)股份有限公司;苯酚、氯仿、异戊醇、乙醇购于国药集团化学试剂有限公司;Bst DNA 聚合酶购于 NEB 公司。本实验同时采用酚氯仿抽提法和试剂盒提取样品的 DNA。

1.2 LAMP 引物设计

根据鸭的基因全序列 (NCBI, accession No. NW_004676510), 使用 Primer5.0 软件设计, 经

BLAST 分析筛选出一对品种特异性引物。正向引物:5'-GGGGAATTTAGAGGTCAGT-3', 反向引物:5'-GAAGCATGGAGGAAGATAG-3'。

对 PCR 产物进行凝胶回收用于克隆测序,用以验证扩增片段为预期产物。以此序列为模板,登陆 Eiken Chemical 公司的在线软件 PrimerExplore (<http://www.primerexplorer.jp/e/>)设计引物^[15]。设计一对外引物 F3 和 B3, 一对内引物 FIP 和 BIP 及一对 LF 和 LB 引物。内引物 FIP 由 F1c、F2(F2c 的互补序列)及中间间隔区组成,BIP 由 B1c、B2(B2c 的互补序列)及中间间隔区组成(表 1)。

表 1 LAMP 引物的设计

Table 1 Primers designed of LAMP

引物	序 列
F3	AAGGTGACCGCTTTCAAGG
B3	TTCCCCCTCACCCCTATG
FIP	CTGCGCTGCCATACTGCTCAAAAGCCAGTGCGTGTCTG
BIP	AGCTCTGTGACGAATCTGGCAGGACCATCCCGAACC TCCT
LF	CTCACTGCTCCTCTCTGCA
LB	GCATTTCTGGAATCTGCA

1.3 LAMP 反应条件的优化

1.3.1 引物对 LAMP 反应的影响 内引物和外引物的浓度比例优化:依次按照内、外引物比例 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 进行实验,选择最佳浓度比。

1.3.2 反应温度的优化 为了确定 LAMP 反应的最佳温度,用梯度 PCR 仪设计温度梯度为 58.0~65.0 °C 内的 12 个梯度,其他反应条件不变,确定 LAMP 反应的最适温度。

1.3.3 MgSO₄ 添加量的优化 本实验对 MgSO₄ 添加量进行了优化,将反应体系中的 MgSO₄ 添加量依次设为 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 μL,分别进行 LAMP 反应,确定 MgSO₄ 的最佳反应添加量。

1.3.4 甜菜碱添加量的优化 本实验对甜菜碱添加量进行了优化,将反应体系中甜菜碱添加量依次设为 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 μL,分别进行 LAMP 反应,确定甜菜碱的最佳反应添加量。

1.3.5 Bst DNA 聚合酶添加量的优化 Bst DNA 聚合酶的浓度为 8 U/μL,本实验对 Bst DNA 聚合酶添加量进行了优化,将反应体系中的 Bst DNA 聚合酶

添加量依次设为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 μL,根据扩增结果确定 Bst DNA 聚合酶的最佳添加量。

1.3.6 反应时间的优化 将 LAMP 反应时间分别设定为 25、30、35、40、45、50、55 和 60 min,根据产物亮度确定 LAMP 反应完成的最短时间。

1.3.7 dNTPs 添加量的优化 本实验对 dNTPs 添加量进行了优化,将反应体系中的 dNTPs 添加量依次设定为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 μL,分别进行 LAMP 反应,确定 dNTPs 的最佳反应添加量。

1.4 LAMP 引物特异性和灵敏度分析

使用设计的鸭的 LAMP 引物分别在羊肉、牛肉、猪肉、鸡肉和不同品种的鸭肉中进行 PCR 扩增,进行特异性实验。为了判断引物能否用于混合肉(市场上出售的含有鸭肉成分的牛羊肉)中鸭源成分的检测,按照一定的比例将牛羊肉的 DNA 和鸭肉 DNA 混合在一起使混合 DNA 中鸭 DNA 的含量分别是 100%、50%、10%、5%、1%、0.5% 和 0.1%。

1.5 市场牛羊肉制品抽样调查

对市场上买回来的羊肉卷、牛肉卷和牛肉粒采用 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取:首先将离心管做好编号;将动物组织放入研钵,加入液氮并快速磨碎,称取磨好的组织 30 mg 放入已编好记号的离心管中;然后按照 DNA 提取试剂盒的操作说明依次进行,最后把提取的 DNA 冷藏备用。然后由两个实验室同时分别使用 PCR 特异引物(SNT3731.5—2013)和 LAMP 引物(表 1)对每个样品的 DNA 进行扩增,记录 LAMP 检测的结果和常规 PCR 的结果,并进行比较。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应的检验与验证

为了保证 LAMP 扩增的目的片段,对 LAMP 产物进行验证。使用引物 F3 和 B3 对 LAMP 的产物进行重扩增,得到一条 250 bp 长度左右的亮带,然后割胶回收片段进行克隆测序,得到序列长度是 241 bp,如图 1 所示。将测序得到 DNA 片段进行比对分析,确认 LAMP 反应扩增的是目的片段,没有发生非特异性扩增。


```

AAGGTGACCGCTTTCAAGG GCGAAAGCCAGTGCCTGCCTGCAGAGA 50
GGAGCAGTGAGATGAGCAGTATGGCAGCGCAGAACTCAGTACAGAAAATA 100
TCAGAGGTCGCTGTTCTGTTTCCAGCTCTGTGACGAATCTGGCAGAAGC 150
ATTCTGGAATCTGCAGTTCTCATCTTACTGCTCAGGAGGTTCCGGGATG 200
GTCAGCTGCTGTGATGCCCTTGCATAGGGGTGAGGGGAA 241

```

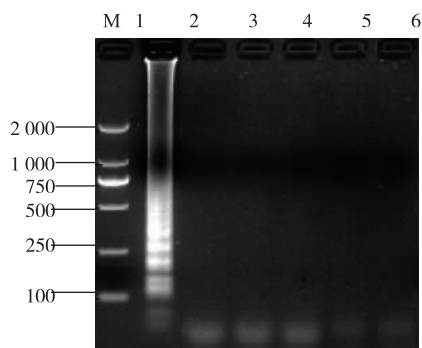
红色部分为引物 F3 和 B3 序列

图 1 重扩增获得的序列

Fig. 1 Sequence re-amplification

2.2 LAMP 引物特异性

选择鸭肉和牛肉、猪肉、鸡肉、羊肉的 DNA 作为 LAMP 反应的模板,按照优化好的 LAMP 反应条件进行反应并检测结果,如图 2 所示。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 鸭肉; 2: 牛肉; 3: 猪肉; 4: 鸡肉; 5: 羊肉; 6: 阴性对照

图 2 LAMP 反应的特异性实验结果

Fig. 2 Result of specificity test of LAMP reaction

由图 2 可知,只有鸭肉的 DNA 能扩增出特异性条带,而在其他 4 个物种中的扩增结果为阴性,说明本研究建立的 LAMP 方法具有特异性。

2.3 LAMP 反应条件的优化

2.3.1 引物对 LAMP 反应的影响 为了研究不同内外引物浓度比例对 LAMP 反应的影响,固定内引物的浓度改变外引物的浓度,结果如图 3(a)所示。在反应体系中,当内引物与外引物的浓度比例为 1:1~1:8 时均可产生梯形条带,内引物与外引物的浓度比为 1:4 和 1:5 时条带最亮,为节约引物成本,故选择内引物和外引物浓度比为 1:4 的反应体系。

2.3.2 反应温度的优化 根据梯度 PCR 仪设计温度 58.0~65.0 °C 12 个梯度分别为 58.0、58.4、58.8、59.5、60.4、61.3、61.9、62.8、63.5、64.4、64.8 和 65.0 °C,进行 LAMP 反应,结果如图 3(b)所示。由图 3(b)可见,1~12 泳道均有梯形条带,说明 58.0~65.0 °C 温度下都能进行反应,当反应温度为 63.5 °C 时 LAMP 反应的条带最亮,因此确定 LAMP 反应的最适温度为

63.5 °C。

2.3.3 MgSO₄ 添加量的优化 将反应体系中的 MgSO₄ 添加量依次设为 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 μL,分别进行 LAMP 反应,结果如图 3(c)所示。由图 3(c)可见,当 LAMP 反应体系中 MgSO₄ 添加量从 0.5 μL 开始出现梯形条带, MgSO₄ 添加量为 1.0 μL 时 LAMP 反应的条带最亮,因此确定 LAMP 反应的 MgSO₄ 最佳反应添加量为 5 mM/μL。

2.3.4 甜菜碱添加量的优化 将反应体系中甜菜碱添加量依次设为 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 μL,分别进行 LAMP 反应,结果如图 3(d)所示。由图 3(d)可见,当 LAMP 反应体系中不添加甜菜碱时,也能扩增出梯形条带。但随着甜菜碱添加量的增加,条带不断增亮。当甜菜碱添加量为 5.0 μL 时,条带最亮,因此确定甜菜碱的最佳反应添加量为 0.25 μmol/μL。

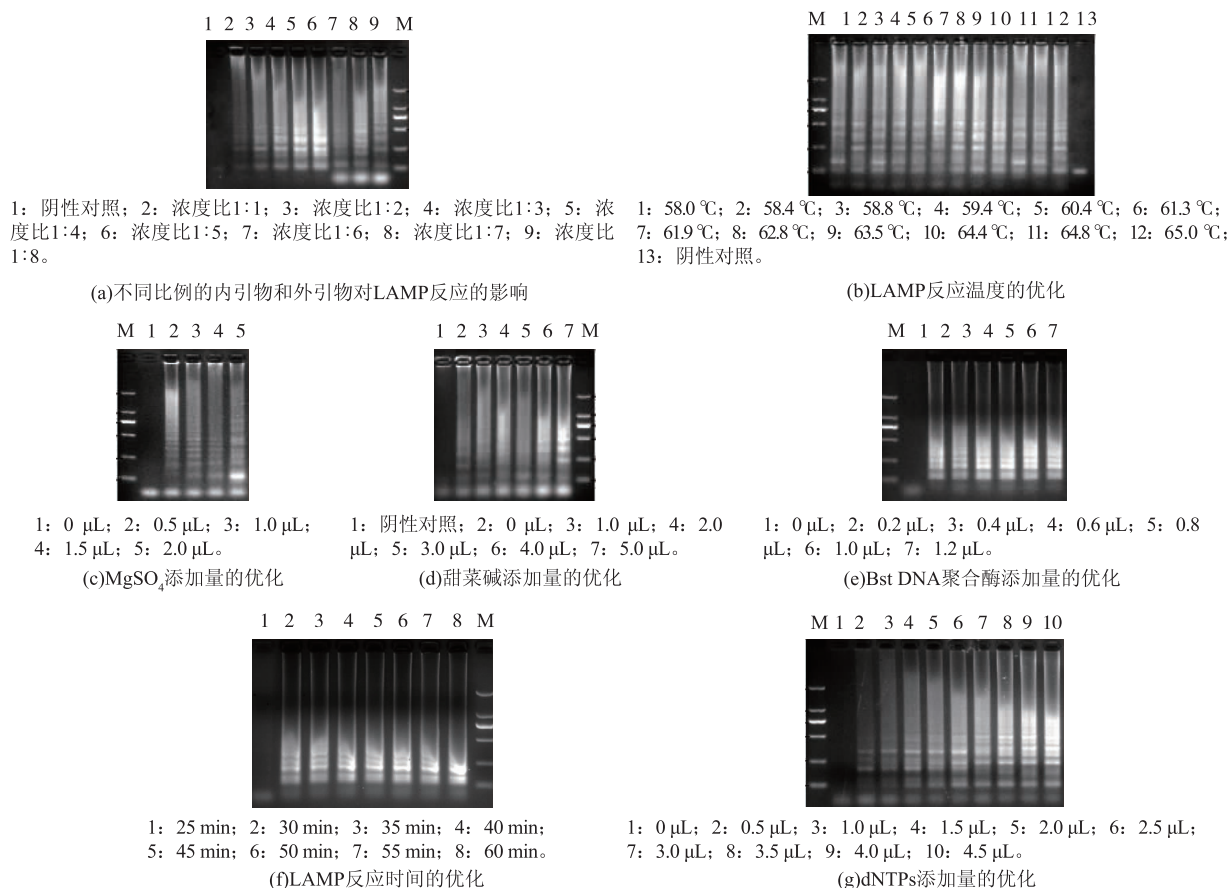
2.3.5 Bst DNA 聚合酶添加量的优化 改变反应体系中的 Bst DNA 聚合酶添加量分别进行 LAMP 反应,结果如图 3(e)所示。由图 3(e)可见,当 LAMP 反应体系中 Bst DNA 聚合酶添加量从 0.2 μL 开始出现梯形条带,当 Bst DNA 聚合酶添加量达到 1.0 μL 时,梯形条带最亮。因此确定 LAMP 反应的 Bst DNA 聚合酶的最佳反应添加量为 0.4 U/μL。

2.3.6 反应时间的优化 反应时间是 LAMP 扩增效率的一个重要因素,按照反应的时间梯度进行扩增,结果如图 3(f)所示。由图 3(f)可见,第二泳道开始出现条带, LAMP 反应的最短完成时间为 30 min。随着反应时间的增加,产物的亮度稍有增加,30 min 即可满足检测的要求。

2.3.7 dNTPs 添加量的优化 将反应体系中的 dNTPs 添加量依次设为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 μL,分别进行 LAMP 反应,结果如图 3(g)所示。由图 3(g)可见,当 LAMP 反应体系中 dNTPs 添加量从 0.5 μL 开始出现梯形条带, dNTPs 添加量为 3.5 μL 时条带最亮,因此确定 LAMP 反应的 dNTPs 最佳反应添加量为 1.75 mM/μL。

2.4 LAMP 反应灵敏度实验

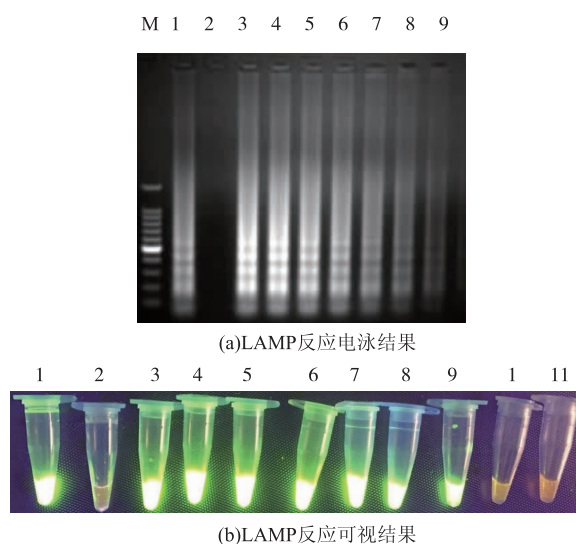
用提取的牛肉、羊肉 DNA 溶液对鸭肉 DNA 进行梯度稀释,将混合 DNA 作为扩增模板,按照优化好的 LAMP 反应体系和条件进行 LAMP 反应。以牛肉为例,结果如图 4 所示。



Marker 均为 DL2000 DNA Marker, 条带依次为 100, 250, 500, 750, 1 000 和 2 000 bp。

图 3 LAMP 扩增条件优化

Fig. 3 Conditions optimized for LAMP amplification



M:DL2000 DNA Marker;1: 阳性对照;2: 阴性对照;3~9: 分别含 100%、50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%鸭肉 DNA;10~11: 空白。

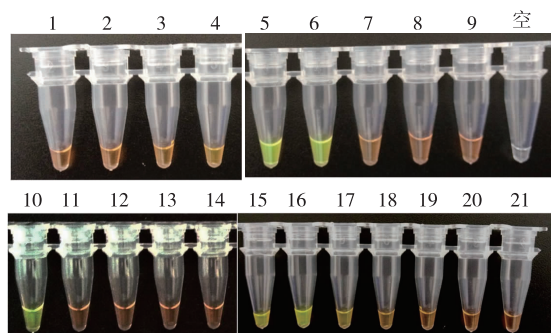
图 4 LAMP 反应灵敏度实验结果

Fig. 4 Result of sensitivity test of LAMP reaction

以牛肉为例,由图 4 可见,当鸭肉 DNA 含量为 100%~0.1%,电泳出现梯状条带,扩增产物加入 SYBR Green I 染料后变绿色。用核酸测定仪测得鸭肉 DNA 质量浓度为 130 $\mu g/\mu L$,鸭源 DNA 为 0.1% 时,鸭源 DNA 质量浓度为 13 $pg/\mu L$ 。说明该方法对鸭肉 DNA 的检测灵敏度可达到 10 $pg/\mu L$ 左右,而且高浓度牛肉或羊肉 DNA 的存在对鸭肉 DNA 的检测灵敏度没有影响。

2.5 市场牛羊肉制品抽样调查

从上海闵行区 3 个超市和 2 个农贸市场采集了 21 份样品(图 5),包括五香卤牛肉,盐水牛肉,肥牛,羊肉卷,羊肉串,牛肉酱和牛肉粒等。利用建立的 LAMP 检测方法对市售牛羊肉食品进行抽样检测,采用常规 PCR 技术进行验证(表 2)。



1~21 依次为 21 份样品,空为空白对照。

图 5 21 份样品的 LAMP 检测结果

Fig. 5 Results of 21 samples by LAMP

表 2 21 份待测样品的检测结果

Table 2 Text results of the 21 samples

样品 编号	样品名称	样品来源	牛/羊 成分	鸭成分
S 1	羊肉串 1	农贸市场 A	阳性	
S 2	羊肉卷 1	农贸市场 A	阳性	
S 3	羊肉串 2	农贸市场 A	阳性	
S 4	羊肉卷 2	农贸市场 A	阳性	
S 5	牛肉粒 1	超市 A		阳性
S 6	牛肉干 1	超市 A	阳性	阳性
S 7	五香卤牛肉	超市 A	阳性	
S 8	盐水牛肉	超市 A	阳性	
S 9	肥牛卷 1	超市 A	阳性	
S 10	牛肉粒 2	超市 B		阳性
S 11	羊肉串 3	超市 B	阳性	
S 12	牛肉干 2	超市 B	阳性	
S 13	羊肉卷 3	超市 B	阳性	
S 14	牛肉条	超市 B	阳性	
S 15	牛肉酱	超市 C	阳性	阳性
S 16	羔羊肉卷	超市 C	阳性	阳性
S 17	五香酱牛肉	超市 C	阳性	
S 18	牛肉粒 3	超市 C		
S 19	羊肉卷 4	农贸市场 B	阳性	
S 20	羊肉串 4	农贸市场 B	阳性	
S 21	肥牛卷 2	农贸市场 B	阳性	

由表 2 可见,牛肉的加工产品和羊肉卷检测出掺入了鸭源成分,在 3 种牛肉粒中检测不到牛肉成分,其中 3 号牛肉粒既无牛源成分也无鸭源成分;有 5 份样品中存在鸭源成分,分别是牛肉粒(S 5, S 10),牛肉干(S 6),牛肉酱(S 15)和羔羊肉卷(S 16)。

3 讨论

自 2000 年 Notomi 在 Nucleic Acids Res 杂志上

公开了 LAMP 技术后,立即受到了各国学者、世界卫生组织和相关政府部门的关注。日本荣研公司完成了 H1N1 环介导等温扩增法检测试剂盒的研制,并通过早期快速诊断防止该病症的快速蔓延。短短几年,LAMP 技术已广泛应用于各种食源性病毒^[22,25]、细菌、寄生虫等引起的疾病检测、食品化妆品安全检查及进出口快速诊断中^[1,5]。如鸭瘟病毒(DPV)检测方法^[26]、鸭 I 型肝炎病毒(DHV I) LAMP 可视化检测方法^[23]、鸭圆环病毒(DuCV)的 LAMP 快速检测方法^[24],此外还用于转基因产品的检测^[25]。

LAMP 方法和常规 PCR 方法相比,LAMP 反应在恒温下进行,省去了升温 and 降温的步骤,缩短了检测时间;LAMP 方法只要有恒温加热装置即可完成扩增过程;常规核酸扩增产物需要用凝胶电泳来检测,而 LAMP 方法可以直接用肉眼观察,可以在现场完成高灵敏度的快速可视化检测,这是其他检测方法无法实现的。在肉产品质量监管过程中,采集样品带回实验室进行检测费时费事,如出现样品混淆,则导致无法得到准确的检测结果,因此 LAMP 方法更符合基层及市场快速检测的需要。

在 LAMP 反应体系中,多个因素会影响 LAMP 的检测效果。本研究对内外引物浓度比例、反应温度和时间、MgSO₄、dNTPs、Bst DNA 聚合酶、甜菜碱的添加量进行了优化。在优化后的 LAMP 检测体系中,鸭肉 DNA 的检测灵敏度可达到 10 pg/μL。在混合肉的检测中,LAMP 方法的检出限高于 PCR 和液相色谱、质谱联用^[16]。在单一鸭源成分的检测中,LAMP 方法的灵敏度高于 PCR 方法,比传统的 PCR 方法高 4 个数量级,虽低于荧光定量 PCR 技术的检出限 1.78 pg^[27-28],但是已经完全满足实际意义上的检测需求。李向丽等^[29]建立的 LAMP 法快速检测羊肉及其制品中的猪、鸭成分,反应时间需要 60 min,灵敏度为 0.5%。本研究建立的反应体系在金属模块浴中 63.5 °C 30 min 即可肉眼观察结果,并且灵敏度达 0.1%。与李向丽等建立的 LAMP 体系相比,除了引物不同之外,本研究优化的 LAMP 扩增体系中内引物浓度、dNTPs 添加量和 Bst DNA 聚合酶添加量都较高,这可能是反应时间能缩短的原因之一。

有研究者报道 LAMP 方法容易出现假阳性,为了验证本研究建立的鸭源成分 LAMP 快速检测方法的准确性,运用该方法对市售牛羊肉食品进行抽样检测。同时,根据 SNT1119—2002 标准,对样品进

行了牛、羊成分的检测,检测结果显示两种方法的鉴定结果一致。其中3号牛肉粒LAMP方法的检测结果是既无牛源成分也无鸭源成分,常规PCR也显示该牛肉粒样品中没有牛、羊、猪、鸭源成分存在,该样品可能含有别的动物成分。在本研究中,建立的LAMP方法未出现假阳性,可能跟样本含量小有关系,今后需要进一步扩大样本含量对本研究建立

的方法进行验证。

4 结 语

本研究建立的LAMP检测体系可以用于不同类型肉产品中鸭源成分的现场快速检测。对单一鸭肉DNA的检测限达到10 pg/ μ L,对牛羊肉中混入鸭源成分比例的检测灵敏度为0.1%。

参考文献:

- [1] LIU Shuaishuai, LI Hong, LUO Shi, et al. Progress in meat adulteration identification using PCR method [J]. **Food Safety and Quality Detection Technology**, 2011, 2(6): 280-284. (in Chinese)
- [2] XIONG Rui, GUO Fengliu, LIU Xiaohui, et al. Establishment of method for PCR detection of pig ingredient in beef and sheep meat products[J]. **Food Industry**, 2014, 35(8): 199-201. (in Chinese)
- [3] WANG Kuan, LIU Shubai, ZHANG Xiaomei, et al. Advances on detection of meat adulteration [J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2014, 5(9): 2634-2639. (in Chinese)
- [4] LIN Wenhui, ZOU Bingjie, SONG Qinxin, et al. Progress in multiplex loop-mediated isothermal amplification technology [J]. **Hereditas**, 2015, 37(9): 899-910. (in Chinese)
- [5] YIN R H, BAI W L, WANG J M, et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique[J]. **Meat Science**, 2009, 83(1): 38-44.
- [6] GHORVATI S, NASSIRI M R, MIRHOSEINI S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay [J]. **Food Control**, 2009, 20(8): 696-699.
- [7] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products[J]. **Food Chemistry**, 2009, 116(3): 806-810.
- [8] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products[J]. **Food Control**, 2012, 28(2): 246-249.
- [9] CHEN S Y, YAO Y G, LIU Y P. Species Identification of ten common farm animals based on mitochondrial 12S rRNA gene polymorphisms[J]. **Animal Biotechnology**, 2012, 23(3): 213-220.
- [10] GAO Jing, WEI Di, ZHANG Guirong, et al. Recent progress on commonly used techniques for identification of meat species[J]. **Food Science**, 2014, 35(11): 356-360. (in Chinese)
- [11] SHI Yanyu, LIU Jinhua, WANG Ying, et al. A polymerase chain reaction method for rapid detection of duck-derived materials in meat products[J]. **Food Science**, 2014, 35(10): 163-165. (in Chinese)
- [12] ZHANG Shuya, CHEN Hongchao, SONG Qing, et al. Identification of turkey derived material in food and feed using real-time PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(2): 207-211. (in Chinese)
- [13] WU Xiyu, ZHAO Guohua, ZHU Shiping. Study on the application of near infrared spectroscopy in the meat quality evaluation[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35(1): 371-380. (in Chinese)
- [14] LIU Youhua, BAI Yabin, QIU Zhufu, et al. Hyperspectral imaging technology and wavelength selection method for nondestructive detection of mutton adulteration [J]. **Journal of Hainan Normal University (Natural Science)**, 2015, 28(3): 265-269. (in Chinese)
- [15] NIU Xiaoying, SHAO Limin, DONG Fang, et al. Discrimination of donkey meat by NIR and chemometrics[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2014(10): 2737-2742. (in Chinese)
- [16] LI Yingying, ZHANG Yingying, DING Xiaojun, et al. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the detection of adulterated duck in lamb[J]. **Food Science**, 2016, 37(6): 204-20. (in Chinese)
- [17] SHANG Ke, DUAN Qingzi, ZHANG Yu, et al. Multiplex PCR for identification of species origin of meat [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(8): 83-85. (in Chinese)

- [18] FENG Haiyong, LIU Chousheng, HE Jianwen, et al. Identification of mutton from duck meat by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA Cyt b gene[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(13): 319-321. (in Chinese)
- [19] YANG Lixia, SONG Haiping, XIE Xiaohong, et al. SYBR green I real-time PCR for detection of duck-derived components[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, 2013, 29(11): 16-19. (in Chinese)
- [20] LIU Cenjie, LIU Yanhong, YANG Di, et al. Detection of components of duck origin in meat products with real-time PCR method [J]. **Meat Industry**, 2015, 405(1): 51-53. (in Chinese)
- [21] ZHANG Chi, QIU Haopu, ZHANG Yun. A quantitative fluorescent PCR method for detection of duck-derived ingredients in meat products[J]. **Food Science**, 2013, 34(18): 154-157. (in Chinese)
- [22] DONG Jiawen, SUN Minhua, LI Linlin, et al. Application of real-time fluorescent technique in the detection of duck Tembusu virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 2015, 42(1): 109-112. (in Chinese)
- [23] XIE Liji, XIE Zhixun, LIU Jiabo, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of duck hepatitis virus type I [J]. **Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine**, 2012, 34(2): 112-115. (in Chinese)
- [24] ZHAO Guangyuan, XIE Zhixun, XIE Liji, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of duck circovirus[J]. **China Journal Of Animal Quarantine**, 2012, 29(3): 24-26. (in Chinese)
- [25] LI Lin, ZHANG Zhou, HE Yi, et al. Establishment of LAMP method for detection of transgenic soybean [J]. **Food Science and Technology**, 2010, 11(20): 311-315. (in Chinese)
- [26] MA Lili, WU Shuang, HU Cheng, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of duck plague virus[J]. **Progress in Veterinary Medicine**, 2015(4): 27-31. (in Chinese)
- [27] JIN Ping, DING Hongliu, LI Pei, et al. Detection for duck-derived ingredients in foods with real-time polymerase chain reaction method[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(18): 61-67. (in Chinese)
- [28] WANG Ying, SHI Yanyu, LIU Jinhua, et al. Detection of porcine-derived materials in meat products by real time PCR method[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2013(5): 1529-1534. (in Chinese)
- [29] LI Xiangli, LIU Yao, TAN Guiliang, et al. Identification of porcine, duck and sheep-derived materials in mutton and its products by LAMP assay[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2015, 27(3): 247-252. (in Chinese)

科 技 信 息

印度制定专供运动员的特殊膳食用途食品的指导说明

2019年7月17日,印度 FSSAI 网站发布消息,制定专供运动员的特殊膳食用途食品的指导说明。本文件适用于制造商、进口商、零售商和一般公众。

特殊膳食用途食品应符合 2016 年颁布的食品安全标准法规,包括食品的基本成分、声明和标签、允许使用的添加剂以及污染物、毒素和残留物的允许限值。印度不允许在食品中使用激素或类固醇或精神药物成分。此外,指导说明还规定了各类附表,涉及维生素和矿物质、氨基酸、植物或植物源成分、营养物质、益生菌和益生元的来源和使用。专供运动员的特殊膳食用途食品还应在标签上添加“专供运动员使用”、“建议按照医嘱使用”和“孕妇、5 岁以下儿童和老年人不得使用该产品”等警示语。FSSAI 强调,进口商必须确保进口的此类食品符合印度相关的标准和规定。

[信息来源] 厦门 WTO/TBT-SPS 通报咨询工作站. 印度制定专供运动员的特殊膳食用途食品的指导说明 [EB/OL]. (2019-7-19). <http://swj.xm.gov.cn/xmtbt-sps/show.asp?id=59971>