

环介导等温扩增技术(LAMP)在肉源性检测中的应用及前景展望

姜宇飞, 魏昌盛, 胡瑞芳, 王洪宝, 咎林森*

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:近年来, 肉类掺假事件时有发生, 给消费者和相关食品安全监督部门造成一定的困扰, 同时威胁着消费者的身体健康。传统意义上的检测方法如酶联检测法及 PCR 法均存在一定的局限性, 限制其在市场上进行快速的肉类鉴别。环介导等温扩增(LAMP)是一种新型核酸扩增技术, 其灵敏度高、特异性强, 不依赖专业仪器设备, 操作简单, 已开始被广泛应用于食源性微生物的检验。本文从 LAMP 原理出发, 阐述了 LAMP 技术在肉源性检测中的应用, 对 LAMP 技术的发展前景进行了展望。

关键词: 环介导等温扩增(LAMP); 肉源检测; 应用; 展望

中图分类号: S823.8⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2019)01-0033-06

从 2013 年初欧盟的“马肉风波”开始, 国内相继爆出了“牛肉香精假牛肉”、“鸭肉冒充羊肉”等一系列肉类制品原材料掺假案件。仅 2013 年 3 月, 内蒙古包头腾达食品有限公司制售假劣食品案, 案值便达 600 余万元, 其生产的假劣牛肉干、羊肉干销往全国 15 个省区市, 足可见掺假肉在全国乃至全世界的“盛行”。现阶段, 肉类鉴别技术依旧以普通 PCR 和荧光 PCR 为主, 但是由于实验仪器昂贵且体积较大, 这些方法只能局限于实验室中, 无法满足市场上对于快速、简便鉴别的要求。

2000 年, 日本荣研株式会社 Notomi 等人^[1]提出了一种名为 LAMP 的新型核酸扩增技术, 由于其灵敏度高, 特异性强, 时效快, 操作简单等优势迅速应用于食源性微生物的检验。之后经过 Nagamine 等人^[2]的改进, 迅速受到了广泛的关注, 目前被广泛应用于病原微生物^[3-5]、胚胎性别鉴定^[6-7]等方面。近年来, 其在肉类源性检验中的应用也越来越受到重视。

1 LAMP 技术的原理

相关研究显示, DNA 在 65 °C 左右时, 处于一种动态平衡中^[8], DNA 在此温度下利用 4 条特异性引物依靠一种链置换 DNA 聚合酶, 使链置换 DNA 的合成不停地自我循环。LAMP 就是利用这种特性, 在 Bst DNA 聚合酶和特异性引物的作用下以双链 DNA 为模板, 在等温条件下完成 DNA 的合成和扩增^[9]。

最初 Notomi 等人设计的 LAMP 仅有 4 条特异性引物, 包括 2 条内引物(forward inner primer, FIP 和 backward inner primer, BIP)和 2 条外引物(forward outer primer, F3 和 backward outer primer, B3), 之后 Nagamine 等人在此基础上添加了 2 条环引物(loop-forward inner primer, L-FIP 和 loop-backward inner primer, L-BIP), 等温扩增的速度明显加快(可在 10~15 min 内完成检测), 并大大提高了检测效率(高出 7 个数量级)。

LAMP 可分为 2 个阶段。第一阶段, DNA 合

收稿日期: 2018-10-16 修回日期: 2018-10-29

基金项目: 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37)

作者简介: 姜宇飞(1999—), 女, 河南开封人, 本科生, 主要从事动物科学专业研究。E-mail: yufeilou1999@163.com

* 通讯作者: 咎林森(1963—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事肉牛、奶牛遗传改良及产业化研究。E-mail: zanlinsen@163.com

成:首先 FIP 和 BIP 启动链置换合成,接着 F3 和 B3 先后结合到靶基因上,形成 LAMP 扩增的初始结构——环状哑铃结构,在此过程中,环引物的存在加快了核苷酸的延伸速度。第二阶段,循环扩增阶段:以自身 3'末端的 F1 区域为起点,以第一阶段形成

的环状哑铃结果为模板开始新一轮置换反应,进行 DNA 扩增,最后形成一系列大小不一的结构,因此 LAMP 的凝胶电泳会出现多条扩增带,具体原理见图 1。

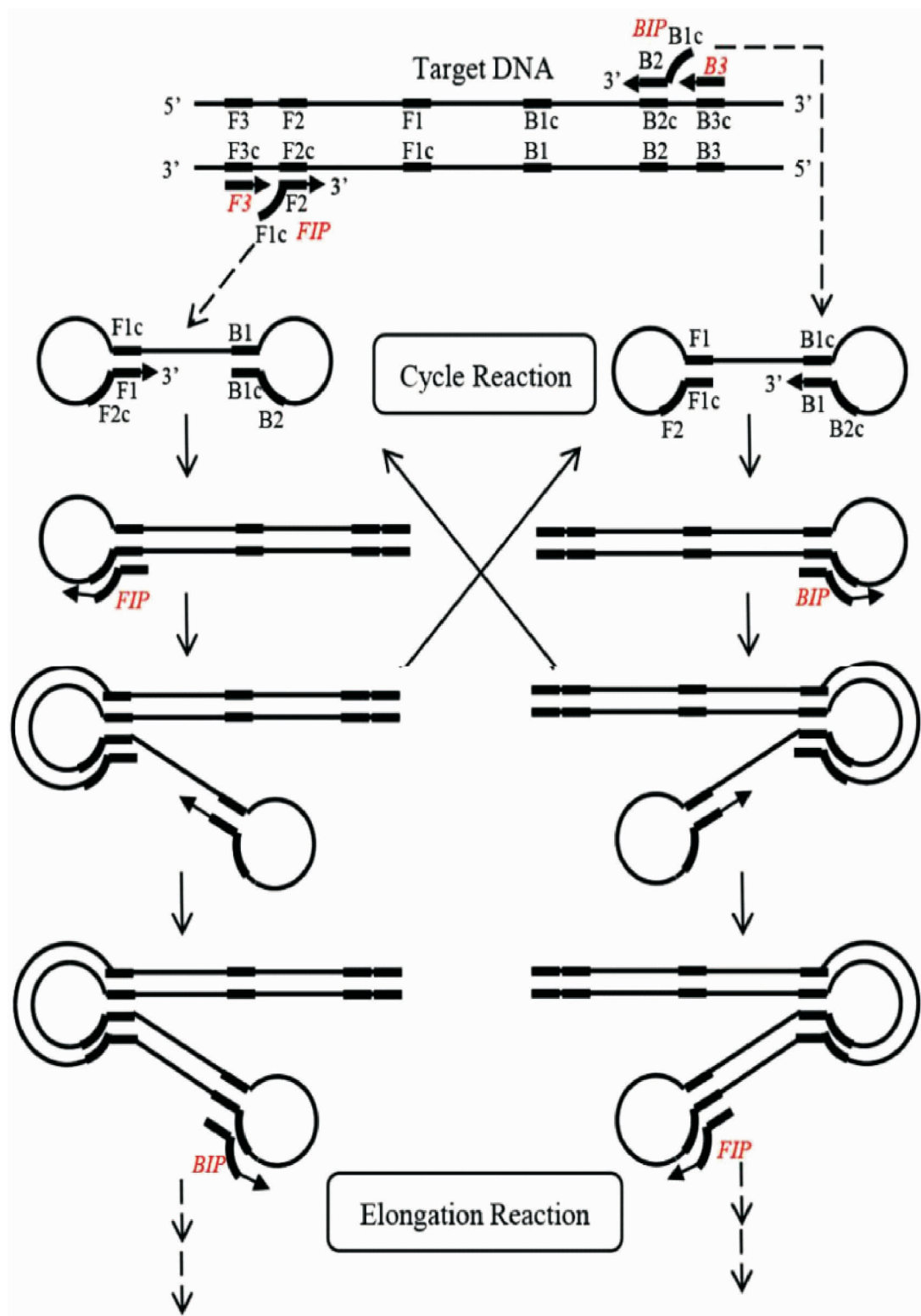


图 1 LAMP 原理图^[9]

2 LAMP 在技术上的优势

目前,在肉类源性检验中有两大方向,一类是基于蛋白质水平的检测,如酶联检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[10-11],但由于蛋白质易于变性,易导致检测失败,尤其是在食品加工的过程中,因此这种方法适用范围较窄,并且需要昂贵的仪器设备;另一种是基于 DNA 水平的检测,例如:普通 PCR^[12]、多重 PCR (Multiplex PCR)^[13-14]、种特异性 PCR (species-specific PCR)^[15]、实时荧光 PCR (quantitative real-time PCR)^[16]等。与这些方法相比,LAMP 法具有以下明显的特点:

(1)灵敏度高。根据 Li 等人的研究表明,LAMP 法的准确性与 qPCR 相当^[17],扩增模板可低至 10 拷贝亦或更少^[18]。

(2)特异性强。最初的 LAMP 仅有内引物和外引物 4 条,改进后 LAMP 增加了 2 条环引物,只有当模板链中 6 个特异性区段全部匹配时才能扩增,因此在提高反应速度的同时极大地提高了鉴别的特异性。

(3)检测速度快,结果直观可视化。整个 LAMP 扩增在 1 h 内即可完成,产率可达 0.5 mg/mL,引物进一步改进下,扩增时间可在原基础上减少 1/3~1/2;DNA 合成时,从脱氧核糖核酸三磷酸底物(dNTPs)中析出的焦磷酸离子与反应溶液中的镁离子反应,产生大量焦磷酸镁沉淀,呈现白色。因此,可以把浑浊度作为反应的指标,只用肉眼可视化观察白色浑浊沉淀,就能鉴定扩增与否,而不需要繁琐的电泳和紫外观察。

(4)成本低,不需特殊仪器。无论是普通 PCR 还是多重 PCR,都离不开 PCR 仪,因此只能在实验室环境中进行,但 LAMP 仅需要给予恒定的温度即可反应,无需特殊的仪器,极大地降低了成本,同时满足了市场对于快速、简便的需要。

3 LAMP 在肉类鉴别中的应用

3.1 LAMP 在检测猪源性成分中的应用

猪肉是目前市场上最常见的掺假成分,在羊肉、

牛肉等产品中均有检出。为了更好保护消费者权益,研发快速检测掺假的方法势在必行,原则上说,使用鸭肉、猪肉等肉掺假制成的肉制品对人体没有太大的危害,但如果来源不明,携带致病菌就有可能危害人类健康。从宗教信仰角度来看,鉴别清真食品中的猪源性成分也有助于进行清真认证,更好地保护宗教信仰。

目前,LAMP 技术在国内外肉源性检测方面已有广泛应用。2010 年,Ahmed 等^[19]使用 LAMP 和 disposable electrochemical printed(DEP)芯片来鉴别加工猪肉、鸡肉和牛肉中肉源性。与多重 PCR (M-PCR)相比,此法更具特异性,并且检测精度更高。

2013 年,杨丽霞等人^[20]利用 LAMP 技术,以猪线粒体 COXI 基因为靶标设计特异性引物,对扩增产物进行凝胶电泳和终点染色,并采用荧光检测仪实时监控反应过程,证实了 LAMP 可以特异的检测出牛羊肉中的猪源性成分。在此基础之上,张英等人^[21]对 LAMP 的反应温度和反应体系进行了优化,实验表明在三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs)浓度为 1.2 mmol/L, MgSO₄ 浓度为 4.0 mmol/L,甜菜碱浓度为 0.8 mol/L,反应温度为 72 ℃,反应时间为 55 min 时,LAMP 反应效率最高,荧光效果最好。

Roy 等^[22]于 2016 年 LAMP 与电化学发光(ECL)技术整合用于检测皮克级别不同肉种的序列特异性 DNA,通过利用该技术,检测到猪肉的靶 DNA 低至 1 pg/ μ L。此外,该技术应用于枯草芽孢杆菌 DNA 样品的检测,实现了 10 pg/ μ L 的检测限。2018 年,唐善虎等人^[23]进一步对猪的 12S rRNA-tRNA Val 基因进行分析并设计特异性引物,确定了 LAMP 体系中猪肉的检出上限为 0.125%。

3.2 LAMP 在检测牛源性成分中的应用

2016 年,徐淑菲等^[24]建立了牛源性成分 LAMP 检测方法。试验结果表明:LAMP 方法的灵敏度比 PCR 方法高 100 倍,可达到 5.408×10^{-2} μ g/ μ L,最快在 10 min 即可完成,反应迅速。同年,洗钰茵等^[25]建立了肉及肉制品中牛源性成分的

LAMP 检测技术,对市售的 9 种生牛肉及 3 种熟肉类制品进行对比检测,结果表明对我国南方主要食用牛肉—水牛、北方地区主要食用牛肉—黄牛及高原地区牛肉源牦牛均具有较高特异性,灵敏度均高达 0.1%。

2017 年, Li 等^[26]采用 LAMP 进行物种特异性靶基因扩增,并在免疫层析条带(ICS)上进行分析,以快速直观地鉴定肉类。基于 LAMP 的 ICS 方法显示出良好的特异性,可重复,对于肉类混合物中的牛肉灵敏度达 0.1%,整个检测过程可在 50 min 内完成。

3.3 LAMP 在检测羊源性成分中的应用

2014 年,朱珠等^[27]根据羊线粒体中物种特异性序列设计引物,应用可视化环状等温扩增技术(vLAMP)对羊源性成分进行快速扩增及可视化判断,建立羊源成分人工污染的饲料模型,考察检测方法的灵敏度。结果表明,羊源性引物仅能够对羊源性成分产生特异性扩增,灵敏度高达 0.001%。所建立的牛、羊源性成分现场可视化筛查方法用于饲料中牛、羊源性成分污染和食品掺伪的现场可视化检测。

2015 年,李向丽等^[28]建立肉制品羊源性成分的 LAMP 检测方法,对市售羊肉片、羊肉卷、羊肉串进行羊源性成分检测分析,对肉制品中羊源性成分的检测灵敏度达 0.5%。SYTO-9 荧光染料的荧光实时检测结果与 SYBR Green I 染料肉眼观察结果一致。调查发现,该批市售羊肉及制品中存在掺假现象,掺假率为 34.5%。

2017 年,宋涛平等^[29]根据羊 cyt B 特异性基因分别设计 LAMP 引物,反应时加入荧光染料 SYTO-9,在 63 °C 条件下反应 45 min,通过实时检测荧光强度判断反应结果,并进行实时监测。实时荧光 LAMP 方法对羊源性成分的检测灵敏度为 10 pg。对熟肉制品中掺杂肉检测时,掺杂羊肉的检出限为 0.01%。

3.4 LAMP 在检测禽源性成分中的应用

2014 年, Cho 等^[30]设计了针对物种特异性线粒体 DNA 的 LAMP 测定,并根据退火曲线分析产

生的独特退火温度区分靶基因。因为退火温度对于物种识别是有效的,并且它与每个靶基因位点的核苷酸组成有关^[31]。生肉和熟肉中 LAMP 测定的检测限(LOD)由 10 pg/ μ L 至 100 fg/ μ L 水平确定,并且原料和熟肉混合物中的 LOD 测定为 0.01%~0.0001%水平。测定在 30 min 内进行,并显示出比 PCR 测定更高的灵敏度。这些新型 LAMP 分析为肉类的鉴别提供了一种简单,快速,准确和灵敏的技术。

4 LAMP 在检测其他肉源性成分中的应用

4.1 LAMP 鸵鸟肉源检测

2014 年,出现了利用鸵鸟线粒体细胞色素 b 基因,将 LAMP 与实时荧光计结合的测定方法。该方法可用于直接在餐厅或零售层识别鸵鸟肉,而且可以使用煮熟的,油炸的和加香料的样品。该 LAMP 测定对于检测鸵鸟肉具有极好的灵敏度和特异性,开发的系统允许检测 0.01%的鸵鸟肉产品,并且取样鉴定时间为 15~20 min。

4.2 马肉源检测

2015 年, Zahradnik 等^[32]开发了一种 LAMP 方法,用于特定检测加工食品中的马肉。该方法对马和驴肉显示出极高的特异性,该方法灵敏度为 0.1 ng。在加工肉制品(香肠)中,该方法在 26 min 内检测到 0.1%的马肉含量。值得注意的是,在各种商业马肉产品中,该方法未检测到血样品中的马肉,甚至 PCR 也无法检测到这些样品中的马源性成分,因此作者认为血中的 mtDNA 含量可能不足以支持 LAMP 反应。

4.3 狐狸肉源检测

2016 年,刘少宁等^[33]优化 LAMP 反应体系检测羊肉中的狐狸源性成分,检测灵敏度达到 1.0%,即最低检测浓度为 2×10^{-4} ng/ μ L。

为了更加清晰地展示 LAMP 技术在各肉源性食品检测中的应用情况,笔者将已有研究汇总整理形成表 1。

表 1 LAMP 在肉源性检测上的应用分析

序号	肉源类别	试验年份(年)	靶基因	检测限(LOD)	用时/min	循环温度
1 ²⁰	猪	2018	猪 12S rRNA-tRNA Val 基因	检测限为 0.125%	65	63 ℃
2 ²⁵	牛	2016	牛 cyt B 基因	检测限达 0.1%	45	63 ℃
3 ²⁹	羊	2017	羊 cyt B 基因	检测限为 0.01%	45	63 ℃
4 ³⁰	禽	2014	鸡 ATP 合酶基因; 鸭 COI(细胞色素氧化酶基因)	检测限为 0.01%~ 0.0001%	30	鸡 63.5 ℃ 鸭 65.5 ℃
5	鸵鸟	2014	鸵鸟 cyt B 基因	检测限为 0.01%	15~20	退火温度 86 ℃左右
6 ³²	马	2015	马 NADH 脱氢酶基因基因	检测限达 0.1%	90	67 ℃
7 ³³	狐狸	2016	狐狸线粒体 COX I 基因	检测限达 1.0%	40	64 ℃最佳

5 小结与展望

环介导等温扩增技术是一门新兴的分子生物学检测技术,具有特异性强、灵敏度高、操作简单、快速省时、易于检测等优点,但同时也存在着其原理复杂、实验设计要求高、引物设计复杂、扩增的靶序列长度需控制在 300 bp 以下等缺点。

其已广泛用于细菌、病毒和转基因食品等各种检测当中,在动物肉源性检测当中的应用逐渐受到关注,技术也不断地被优化和完善,有望开发出一系列肉类检测的便携试剂盒,用于识别和检测新鲜生肉、热处理和加工过的肉类、肉制产品和动物饲料中肉的种类和含量,成为识别肉类品种的快速、可靠、非常适合定量且经济实惠的检测方法,为我国食品检测试剂盒的发展开辟新的方向,应用前景广阔。

参考文献:

[1] Notomi T,Okayama H,Masubuchi H,et al. Loop-mediated i-
sothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research,
2000,28(12):E63.

[2] Nagamine K,Hase T,Notomi T. Accelerated reaction by loop-
mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mo-
lecular and Cellular Probes. ,2002,16(3):223-229.

[3] Bhimani M,Bhanderi B,Roy A. Loop-mediated Isothermal
Amplification assay (LAMP) based detection of *Pasteurella*
multocida in cases of haemorrhagic septicaemia and fowl chol-
era[J]. Vet. Ital. ,2015,51(2):115-21.

[4] Edwards T,Burke P,Helen B. et al. Loop-mediated isothermal
amplification (LAMP) for the rapid detection of mycoplasma
genitalium[J]. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease,
2015,83(1):13-17.

[5] Yamazaki Y,Oba E,Kashiwagi N,et al. Development of a loop-
mediated isothermal amplification assay for rapid and simple
detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Lett. Appl. Mi-
crobiol. ,2014,58(4):362-369.

[6] Khamlor T,Pongpiachan P,Parnpai R,et al. Bovine embryo
sex determination by multiplex loop-mediated isothermal am-
plification[J]. Theriogenology,2015,83(5):891-896.

[7] Hirayama H,Kageyama S,Moriyasu S,et al. Embryo sexing
and sex chromosomal chimerism analysis by loop-mediated iso-
thermal amplification in cattle and water buffaloes[J]. J. Re-
prod. Dev. ,2013,59(4):321-326.

[8] 郑洋妹,陈信忠. 环介导等温扩增技术检测动物病原研究进展
[J]. 生物技术通报,2009(S1):108-112.

[9] Notomi T,Mori Y,Tomita N,et al. Loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(1): 1-5.
- [10] Whyte P, Mc Gill K, Collins J. D, et al. The prevalence and PCR detection of *Salmonella contamination* in raw poultry [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 89(1): 53-60.
- [11] Bartlett S E, Davidson W S. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens[J]. BioTechniques. 1992, 12(3): 408-411.
- [12] Hopwood A J, Fairbrother K S, Lockley A K, et al. An actin gene-related polymerase chain reaction(PCR) test for identification of chicken in meat mixtures[J]. Meat Science, 1999, 53(4): 227-231.
- [13] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(23): 11141-11143.
- [14] 宗卉, 范万红, 温燕辉. 应用多重 PCR 同时检测牛、羊源性成分[J]. 中国草食动物, 2006(6): 21-23.
- [15] Karabasanavar N S, Singh S P, Umapathi V, et al. Authentication of carabeef (water buffalo, *Bubalus bubalis*) using highly specific polymerase chain reaction[J]. European Food Research & Technology, 2011, 233(6): 985-989.
- [16] YANG Li-tao, LIANG Wan-qi, JIANG Ling-xi, et al. A novel universal real-time PCR system using the attached universal duplex probes for quantitative analysis of nucleic acids[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9: 54.
- [17] Shahbazi E, Mollasalehi H, Minai-Tehrani D. Development and evaluation of an improved quantitative loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Morganella morganii*[J]. Talanta, 2018, 19(1): 54-58.
- [18] 吴阳升, 罗淑萍. 一种新的高效快速核酸恒温扩增方法——LAMP 法[J]. 生物技术, 2004(4): 76-78.
- [19] Ahmed M U, Hasan Q, Hossain M M, et al. Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor [J]. Food Control, 2009, 21(5): 599-605.
- [20] 杨丽霞, 淑君, 彭新凯. 环介导等温扩增法检测牛羊肉中的猪肉成分[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 63-65.
- [21] 张英. 鉴定羊肉中掺杂猪肉的 LAMP 检测方法的优化及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(9): 222-224, 254.
- [22] Roy S, Wei S X, Zhi-Ying J L, et al. A novel, sensitive and label-free loop-mediated isothermal amplification detection method for nucleic acids using luminophore dyes[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 86: 346-352.
- [23] 唐善虎, 李雪, 王柳. 用 LAMP 法快速鉴别熟制牦牛肉饼中的猪肉和鸡肉成分[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2018, 44(3): 237-242.
- [24] 徐淑菲, 孔繁德, 苗丽, 等. 牛源性成分 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(12): 94-99.
- [25] 洗钰茵, 易敏英, 张璜, 等. 环介导等温扩增技术快速检测肉及肉制品中的牛源性成分[J]. 食品工业科技, 2016, 37(7): 278-282.
- [26] LI Yong-Jin, FAN Jin-Yu. Rapid visual identification of bovine meat by loop mediated isothermal amplification combined with immunochromatographic strip [J]. BioChip Journal, 2017, 11(1): 8-13.
- [27] 朱珠, 兰青阔, 赵新, 等. 饲料中牛、羊源性成分现场可视化检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(7): 95-98.
- [28] 李向丽, 刘垚, 谭贵良, 等. 基于 LAMP 法快速检测羊肉及其制品中的猪、鸭和羊源性成分[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(3): 247-252.
- [29] 宋涛平, 杨丽霞, 邱华丽, 等. 动物源性成分实时等温扩增检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3207-3212.
- [30] Cho A R, Dong H J, Cho S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2014, 34(6): 799-807.
- [31] Rodriguez M A, Garcia T, Gonzalez I, et al. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction[J]. J. Agr. Food Chem., 2003, 51: 1524-1529.
- [32] Zahradnik C, Martzy R, Robert L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of horse meat in meat and processed meat products[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(6): 1576-1581.
- [33] 刘少宁, 陈智, 张志民, 等. 鉴别绵羊肉中狐狸源性成分的环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 75-78.

(下转第 44 页)

Discussion on Breeding History and Present Situation of Dengchuan Cattle

WANG Jin-mei¹, YANG Yuan², MIAO Yong-wang^{3*}

(1. Faculty of Marxism, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 2. Yunnan Water Resources and Hydropower Vocational College Library, Kunming 650202; 3. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: Dengchuan cattle, mainly produced in Dengchuan area of Eryuan county, Dali Bai Autonomous Prefecture, Yunnan Province, is a fine breed of local dairy cattle bred by local Bai people in the long-term breeding process. It has the characteristics of rough feeding tolerance, strong adaptability, strong disease resistance, good milk quality and so on. In recent years, with the progress of hybrid improvement, the number of purebred Dengchuan cattle is decreasing day by day. It is very necessary and urgent to protect the genetic resource of Dengchuan cattle, which is of great significance to promote the sustainable development of local economy.

Key words: Dengchuan cattle; breeding; history; genetic resources; conservation

~~~~~  
(上接第 38 页)

## Application of Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) in Meat Source Detection and Prospects

LOU Yu-fei, WEI Chang-sheng, HU Rui-fang, WANG Hong-bao, ZAN Lin-sen\*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** In recent years, meat adulteration incidents have occurred from time to time, causing a certain amount of trouble to consumers and related food safety supervision departments, while threatening the health of consumers. Traditional detection methods such as ELISA and PCR have some limitations, which restrict the rapid identification of meat in the market. Application and prospect of loop-mediated isothermal amplification(LAMP) is a novel nucleic acid amplification technique with high sensitivity, specificity, no dependence on professional instruments and simple operation. It has been widely used in the detection of food-borne microorganisms. Based on the principle of LAMP, this paper expounds the application of LAMP technology in meat-borne detection, and prospects the development prospect of LAMP technology.

**Key words:** loop-mediated isothermal amplification(LAMP); meat source detection; application; prospect.