彭博, 洪麟, 高世光, 等. 食品中三文鱼源性成分等温快检方法建立 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 360−368. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030257

PENG Bo, HONG Lin, GAO Shiguang, et al. Establishment of Isothermal Rapid Detection Method for Salmon-derived Components in Food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(4): 360−368. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030257

· 分析检测 ·

食品中三文鱼源性成分等温快检方法建立

彭　博[1], 洪　麟[2], 高世光[3], 陈文超[2], 赵　欣[2], 刘彦泓[2,*], 郑秋月[1,*]

（1.大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁大连 116600;
2.大连市检验检测认证技术服务中心, 国家市场监督管理总局技术创新中心（食用农产品安全快速检测与追溯）, 辽宁大连 116000;
3.丹东海关综合技术服务中心, 辽宁丹东 118000）

摘　要: 本文建立了虹鳟和大西洋鲑两种三文鱼源性成分可视化和荧光环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）及重组酶聚合酶扩增（Recombinase polymerase amplification，RPA）快速检测方法。以 COI 基因作为靶标基因，设计筛选适于等温扩增的引物序列，开展等温扩增方法的特异性和灵敏度分析，同时比较基于快速 DNA 提取和磁珠提取 DNA 的 LAMP 方法的适用性。结果表明，所构建的 LAMP 和 RPA 等温扩增方法特异性强，使用磁珠法提取 DNA 的 LAMP 检测的灵敏度分别可达到 2.99×10^{-1} ng/μL 和 5.16×10^{-3} ng/μL，使用快速提取 DNA 的 LAMP 检测灵敏度分别可达到 9.42×10^{0} ng/μL 和 1.13×10^{1} ng/μL。同时制备模拟混合样品，发现虹鳟和大西洋鲑成分 RPA 等温扩增的灵敏度可达到 0.1%（W/W），可视化 LAMP 等温扩增的灵敏度可稳定达到 0.5%（W/W）。LAMP 和 RPA 方法满足低技术要求、低设备成本以及检测时间短的快速检测要求。同时使用裂解液快速提取基因组 DNA，可以在 30~40 min 之内完成检测，对于生产加工及市场等流通环节现场进行三文鱼成分真实性检测是一个很好的选择。

关键词: 虹鳟, 大西洋鲑, 环介导等温扩增, 重组酶聚合酶扩增

中图分类号: TS254.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)04−0360−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030257　　本文网刊:

Establishment of Isothermal Rapid Detection Method for Salmon-derived Components in Food

PENG Bo[1], HONG Lin[2], GAO Shiguang[3], CHEN Wenchao[2], ZHAO Xin[2], LIU Yanhong[2,*], ZHENG Qiuyue[1,*]

（1.Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China;
2.Dalian Center for Certification and Food and Drug Control, Technology Innovation Center of Rapid Screening and Traceability for Edible Agricultural Product Safety, State Administration for Market Regulation, Dalian 116000, China;
3.Dandong Customs Comprehensive Technical Service Center, Dandong 118000, China）

Abstract: This article presented a visualization method for detecting salmon-derived components in *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar*, based on fluorescence-labeled loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and recombinase polymerase amplification (RPA). The widely recognized COI gene was targeted to design and screen optimal primer sequences for isothermal amplification. The specificity and sensitivity of the isothermal amplification methods were analyzed, and the applicability of LAMP using rapid DNA extraction and magnetic bead-based DNA extraction techniques

收稿日期: 2025−03−19

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目（2023MK130）。

作者简介: 彭博（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品质量安全检测, E-mail: 1921213830@qq.com。

*** 通信作者:** 刘彦泓（1976−）, 女, 硕士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全, E-mail: 3252168072@qq.com。
郑秋月（1972−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: zhengqy@dlnu.edu.cn。

was compared. The results demonstrated that the constructed LAMP and RPA methods exhibited high specificity. The sensitivity of LAMP detection using magnetic bead-extracted DNA reached 2.99×10^{-1} ng/μL and 5.16×10^{-3} ng/μL, respectively, whereas using rapid DNA extraction, sensitivity reached 9.42×10^{0} ng/μL and 1.13×10^{1} ng/μL, respectively. Simulated mixed samples were prepared, and results showed that the sensitivity of RPA amplification for detecting *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar* components reached 0.1% (w/w), while the sensitivity of visual LAMP amplification consistently reached 0.5% (w/w). Both LAMP and RPA methods met rapid detection requirements, characterized by low technical complexity, minimal equipment cost, and short detection time. Moreover, rapid DNA extraction using lysis solutions allowed the detection process to be completed within 30~40 min, making this approach an excellent choice for on-site authenticity testing of fish species in production, processing, and market circulation stages.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; *Salmo salar*; loop-mediated isothermal amplification; recombinase polymerase amplification

大西洋鲑(*Salmo salar*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是生产加工和市场流通领域最常见的三文鱼种类,因为营养丰富一直受到消费者欢迎[1]。大西洋鲑主要指挪威三文鱼品种,目前国内尚未形成规模化养殖能力,主要依赖进口。同属鲑科的虹鳟作为北美原生淡水鱼种,凭借抗逆性强、肉质软嫩等优势,已成为我国重要水产养殖品种[2]。伴随消费升级与国际贸易竞争加剧,三文鱼市场存在产品标签溯源混乱、产地信息模糊化标注、原料掺假等问题[3−4]。虹鳟替代大西洋鲑的掺假事件屡有发生[5]。部分商家通过模糊标注“三文鱼”诱导消费者误购,损害消费者权益。开发快速精准的三文鱼物种鉴别方法已成为保障食品安全、规范市场秩序的核心需求。

目前对大西洋鲑和虹鳟的鉴别主要有形态学和分子生物学技术。形态学方法主要依赖主观经验,而且鱼类加工后仅凭形态难以辨别[6]。基于线粒体 COI 和 Cytb 基因的 DNA 条形码技术,通过基因条形码测序可以准确进行鱼种类鉴别[7−13],有效鉴别大西洋鲑与虹鳟[14]。实时荧光定量 PCR 通过设计特异性引物进行物种真实性检测[15−18],已成为物种鉴定的金标准。但是基因条形码方法存在操作繁琐,需要 PCR 扩增、切胶回收纯化、测序、测序产物拼接比对,检测流程长(至少 5~7 d)、需要配备基因测序仪,实时荧光 PCR 方法也需要实时荧光 PCR 扩增仪,对实验人员专业程度及实验室环境设备设施要求高等问题。罗娇依等[19] 应用生物质谱技术解析大西洋鲑中生物标志性肽段及过敏原特异性肽段,实现对大西洋鲑的物种鉴别,但质谱-组学等蛋白质技术也存在依赖昂贵仪器设备和专业化人员、检测成本高的难题[20−21]。无法满足三文鱼生产加工企业检测原料真实性及市场流通监管部门进行鱼种真伪鉴别的现场快速检测需求。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由 Gieroń等[22] 于 2000 年提出的核酸等温扩增技术,利用一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(如 Bst DNA 聚合酶)和 4~6 条特异性引物,在 60~65 ℃ 完成等温扩增反应。LAMP 技术在鱼类鉴定中具有特异性好、灵敏度高,不需要昂贵的仪器,方便快捷等优势[23]。重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)是由 Piepenburg 等[24] 于 2006 年提出的一种核酸等温扩增技术,可以在低温条件下进行高效 DNA 扩增。主要通过重组酶与引物结合形成的复合物在 37~42 ℃ 下定位同源序列,结合单链结合蛋白和链置换型 DNA 聚合酶实现靶标序列扩增,仅需设计两条引物,在 30 min 内完成等温扩增。由于具有扩增速度快、扩增温度更接近常温,RPA 技术已被广泛应用于病原快速诊断[25−26]、食品安全快速检测等领域[27−28]。

鱼种真实属性鉴别中,鱼类基因组 DNA 提取方法是影响检测结果准确性的关键步骤。新兴的环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)技术[29] 通过对水样进行真空过滤,利用特定孔径的过滤器捕获并有效富集水中的鱼类 eDNA,减少杂质干扰,已成功应用于软骨鱼类种类的分布监测[30]。新型的磁珠提取法利用磁珠与核酸的特异性结合能力[31],具有提取效率高、纯度好、能有效去除杂质等优点,并且可减少人为误差、实现提取样品基因组 DNA 浓度和纯度的标准化。配套自动化核酸提取仪,一次性可提取 48~96 个样品,适合大批量鱼类样本的 DNA 提取[32−33]。磁珠提取法需要配套磁珠提取试剂盒和自动提取仪,更适用于较大型和专业的实验室使用,以提高提取效率。为了满足三文鱼种类现场快速检测的需求,本文探索采用快速 DNA 提取方法,使用裂解液裂解鱼类组织,释放核酸,无需进行耗时的醇类沉淀,整个提取过程只需 15~20 min,可快速提取鱼类基因组 DNA,为后续进行三文鱼现场等温扩增快检提供保障。

综上,本文基于等温扩增技术,建立三文鱼源性成分 LAMP 和 RPA 两种等温扩增快检方法,同时基于磁珠法提取 DNA 作比较,探讨快速提取鱼类基因组 DNA 的适用性,为食品中三文鱼成分的现场快速检测提供技术手段。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

虹鳟、大西洋鲑、银鲑、粉鲑、红鲑、大马哈鱼

样品　大连市瑞驰生产加工企业，物种真实性通过 DNA 条形码进行测序确认；DNA 扩增试剂、动物组织基因组 DNA 快速提取试剂、显色液（SYBR GREEN I）　广州双螺旋基因技术有限公司；DNA 恒温快速扩增试剂（基础型）　潍坊安普未来生物科技有限公司；Maxwell ® RSC PureFood GMO and Authentication Kit Maxwell 磁珠法核酸提取仪器、DNA 磁珠提取试剂盒　普洛麦格（北京）生物技术有限公司；Micro Drop 超微量分光光度计　上海宝予德科学仪器有限公司；ABI QuantStudio 7 定量 PCR 仪　美国赛默飞世尔科技公司；AD160E 型 Mupid-One 核酸电泳仪　TaKaRa 宝生物工程株式会社；Synergy H1 多功能微孔板检测仪　博腾仪器公司；MINIT-100 恒温金属浴　日本 AS ONE CORPORATION 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　提取 DNA 方法比较

1.2.1.1　磁珠法提取 DNA　取鱼肉组织样品 200 mg，使用磁珠法提取试剂，应用核酸提取仪提取 DNA。称取 200 mg 的鱼肉，无需进行破碎处理，转移至离心管中。按纯化试剂盒说明书进行纯化后，取出洗脱管，获得所提取鱼肉 DNA，测定磁珠法提取的基因组 DNA 的核酸纯度和浓度。磁珠法提取基因组 DNA 总提取时间为 90 min。

1.2.1.2　快速 DNA 提取法　称取 5 g 鱼肉，采用研钵进行破碎处理后，转移至无菌均质袋中，加入 10 mL 生理盐水进行均质混匀。取均质组织 20~30 mg，转移至离心管 A 中，加入 500 μL 裂解缓冲液 A，振荡混匀，80 ℃ 下热浴 15 min 后，取 10 μL 上清液至离心管 B 中，加入 90 μL 的缓冲液 B 中和混匀，得到基因组 DNA，测定提取基因组 DNA 的核酸纯度和浓度。快速 DNA 提取方法提取基因组 DNA 时间为 20 min。

1.2.1.3　基因组 DNA 的核酸纯度和浓度测定　采用超微量分光光度计测定提取基因组 DNA 的核酸纯度和浓度[34]。取 1 μL 提取的基因组 DNA 测定 DNA 浓度。通过比较 260 nm 处的吸光度值（A260）与 280 nm 处的吸光度（A280）的比值评估提取 DNA 纯度。

1.2.2　引物设计及特异性比对　基于 NCBI 核苷酸数据库（www.NCBI.nlm.nih.gov/nucleoties），从美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）数据库中检索虹鳟和大西洋鲑鱼的 COI 基因序列，选取具有代表性的基因序列，采用 DNAStar 软件（DNAStar 公司，美国）分析种间的同源性。将 COI 基因序列用作 blast 搜索中的模板，从 blast 输出中，在方法开发中选择了得分最高的结果。此外，还检索了用于排他性测试的其他三文鱼的基因序列。使用 MEGA 4.0 对基因序列进行比对。最终选用虹鳟 COI 基因序列（LC050735.1）、大西洋鲑（MN850430.1）COI 基因序列作为靶标基因，使用 LAMP Primer Explorer 5 软件（荣研 EIKEN 公司，日本）分别设计 2 组虹鳟 LAMP 引物及 1 组大西洋鲑 LAMP 引物，并评估了二级结构和可能的引物二聚体的存在，具体序列见表 1。同时设计 2 组 RPA 引物，虹鳟 RPA 上游引物 F：AGTAATTATCGGCATACGAAACCAG，虹鳟 RPA 下游引物 R：GTTTCGATAATGATCAGTACTGGGATC，扩增产物长度为 102 bp；大西洋鲑 RPA 上游引物 F：ACGAAGGCATGGGCTGTAAC，大西洋鲑 RPA 下游引物 R：GCACCGCCCTAAGTCTCTTG，扩增产物长度为 103 bp。引物均由宝生物工程（大连）有限公司合成。

1.2.3　LAMP 等温扩增方法建立

1.2.3.1　可视化 LAMP 方法建立　可视化 LAMP 等温扩增在金属浴上进行。LAMP 反应体系体积为 26 μL，其中，虹鳟 LAMP 反应体系为：12.5 μL 等温扩增反应液，1 μL Bst 聚合酶溶液，1 μL 二（4-羟基苯

表 1　虹鳟和大西洋鲑用于 LAMP 等温扩增的引物

Table 1　Primers for LAMP isothermal amplification in *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar*

名称	分组	引物	引物序列（5'→3'）	位置
虹鳟	第一组 Group1	F3-1	TGAGCCGGGATAGTAGGC	23~40
		B3-1	TGGAGGGAGGAGTCAGAAG	253~271
		FIP-1	ATGGGCTGTGACGATCACGTTCTACTGATTCGGGCGGAAC	71~52
		BIP-1	ATCGGGGGCTTTGGAAACTGAGGAATGCCATATCAGGGGC	173~193
	第二组 Group2	F3-2	CTTCTGGGGGATGACCAAAT	89~108
		B3-2	ACAGGAGGAGGAGAAAGGAT	271~291
		FIP-2	TCAGTTTCCAAAGCCCCCGATTAACGTGATCGTCACAGCC	130~112
		BIP-2	TCCCCTAATAATCGGAGCCCCTGAGGGAGGAGTCAGAAGAT	199~222
大西洋鲑		F3	CCCTTCTGGGAGATGACCAA	87~106
		B3	GGCTTCAACTCCAGATGAGG	291~310
		FIP	AGTTTCCAAAGCCGCCGATCAT- ATTGTTACAGCCCATGCCTT	170~191 119~138
		BIP	TCCTCTTATAATCGGGGCCCCC- AAGGAGGGAGGGAGAAGTC	199~220 258~276
		LB	GACATAGCATTCCCCCGAATG	221~241

基)-6(4-甲氧基苯基)-三甲基吡啶三乙酸铵(SYBR GREEN I)显色液，1 μL（0.2 μmol/L）外引物 F3+外引物 B3，1 μL（1.6 μmol/L））内引物 FIP+内引物 BIP，0.5 μL 荧光染料，7 μL 无 DNA 酶的超纯水，2 μL DNA 模板。

大西洋鲑反应体系为：12.5 μL 等温扩增反应液，1 μL Bst 聚合酶溶液，1 μL SYBR GREEN I 显色液，1 μL（0.2 μmol/L）外引物 F3+外引物 B3，1 μL（1.6 μmol/L）内引物 FIP+内引物 BIP，1 μL（0.4 μmol/L））环引物 LB，0.5 μL 荧光染料，6 μL 无 DNA 酶的超纯水，2 μL DNA 模板。

可视化 LAMP 的等温扩增程序：63 ℃ 于金属浴恒温孵育 45 min，肉眼观察颜色变化。阳性反应将变成黄色，阴性对照保持为橙色。

1.2.3.2　荧光 LAMP 方法建立　荧光 LAMP 等温扩增在 Flex QuantStudio TM7 实时荧光 PCR 上进行。LAMP 反应体系体积为 25 μL，其中，虹鳟 LAMP 反应体系为：12.5 μL 等温扩增反应液，1 μL Bst 聚合酶溶液，1 μL（0.2 μmol/L）外引物 F3+外引物 B3，1 μL（1.6 μmol/L）内引物 FIP+内引物 BIP，0.5 μL 荧光染料，7 μL 无 DNA 酶的超纯水，2 μL DNA 模板。

大西洋鲑反应体系为：12.5 μL 等温扩增反应液，1 μL Bst 聚合酶溶液，1 μL（0.2 μmol/L）外引物 F3+外引物 B3，1 μL（1.6 μmol/L）内引物 FIP+内引物 BIP，1 μL（0.4 μmol/L）环引物 LB，0.5 μL 荧光染料，6 μL 无 DNA 酶的超纯水，2 μL DNA 模板。

荧光 LAMP 等温扩增程序：63 ℃ 恒温反应 45 min，通过实时荧光 PCR 仪来观察荧光扩增曲线。

1.2.4　RPA 等温扩增方法建立　以提取的虹鳟和大西洋鲑的基因组 DNA 为模板，分别使用 RPA 引物进行 RPA 等温扩增。RPA 反应体系（50 μL）：29.4 μL 缓冲液 A，2 μL 上游引物（10 μmol/L），2 μL 下游引物（10 μmol/L），11.1 μL ddH_2O，3 μL DNA 模板，2.5 μL 激活液 B。

RPA 反应参数：金属浴 38 ℃ 孵育 20 min。反应结束后，进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5　特异性分析　分别使用虹鳟和大西洋鲑的同属或近属的其他鱼种的基因组 DNA 进行交叉反应性分析，采用 1.2.2 中快速提取 DNA 法提取银鲑、粉鲑、红鲑、大马哈鱼的基因组 DNA，用来评估虹鳟与大西洋鲑的可视化 LAMP、荧光法 LAMP、RPA 方法的特异性。

1.2.6　基因组 DNA 灵敏度实验　以磁珠法提取的虹鳟基因组 DNA（初始质量浓度 2.99×10^2 ng/μL）为模板，进行 10 倍梯度稀释，分别制备 2.99×10^1 ng/μL、2.99×10^0 ng/μL、2.99×10^{-1} ng/μL、2.99×10^{-2} ng/μL 总计 4 个浓度的 DNA 稀释液。以快速法提取的虹鳟基因组 DNA（初始质量浓度 9.42×10^1 ng/μL）为模板，进行 10 倍梯度稀释，分别制备 9.42×10^1 ng/μL、9.42×10^0 ng/μL、9.42×10^{-1} ng/μL、9.42×10^{-2} ng/μL 总计 4 个浓度的 DNA 稀释液。分别测试荧光法 LAMP、可视化 LAMP 方法的灵敏度。

以磁珠法提取的大西洋鲑基因组 DNA（初始质量浓度 5.16×10^2 ng/μL）为模板，进行 10 倍梯度稀释，分别制备 5.16×10^2 ng/μL、5.16×10^1 ng/μL、5.16×10^0 ng/μL、5.16×10^{-1} ng/μL、5.16×10^{-2} ng/μL、5.16×10^{-3} ng/μL、5.16×10^{-4} ng/μL 总计 7 个浓度的 DNA 稀释液。以快速法提取的大西洋鲑基因组 DNA（初始质量浓度 1.13×10^2 ng/μL）为模板，进行 10 倍梯度稀释，分别制备 1.13×10^2 ng/μL、1.13×10^1 ng/μL、1.13×10^0 ng/μL、1.13×10^{-1} ng/μL、1.13×10^{-2} ng/μL、1.13×10^{-3} ng/μL、1.13×10^{-4} ng/μL 总计 7 个浓度的 DNA 稀释液。分别测试荧光法 LAMP、可视化 LAMP 方法的灵敏度。

1.2.7　鳕鱼基质添加样品灵敏度　为了更好评价所建立的等温方法适用性，采集虹鳟和大西洋鲑样品，置于电热恒温鼓风干燥箱中，105 ℃ 烘干，搅拌机打磨成干粉，分别与鳕鱼粉按照干重质量以不同比例混合，再置于搅拌机中充分打磨混合。虹鳟和大西洋鳟样品分别与鳕鱼粉样品按质量比例（50%、20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%）进行混合，提取不同浓度混合样品的 DNA 作为模板，分别比较可视化 LAMP 和 RPA 检测模拟添加样品的灵敏度，评估建立的可视 LAMP 方法与 RPA 方法检测基质样品中的虹鳟和大西洋鲑源性成分的适用性。

1.3　数据处理

实验中统计学分析方法软件采用 SPSS V27.0；采用独立样本 t 检验对样本进行显著性分析；图表绘制软件为 Origin2021、Excel 2013。

2　结果与分析

2.1　基因组 DNA 提取方法比较

分别采用快速法和磁珠法提取大西洋鲑和虹鳟基因组 DNA，使用超微量分光光度计测定吸收值及计算浓度，核酸纯度及浓度测定结果（表 2）。并通过 SPSS 进行了方差分析，计算得出虹鳟基于两种 DNA 提取方法的 P=0.1052，大西洋鲑基于两种 DNA 提取方法的 P=0.0636，二者均满足 P>0.05，表明两种 DNA 提取方法之间无显著差异，满足后续核酸检测需求。

2.2　虹鳟 LAMP 引物筛选结果

通过荧光法 LAMP 对表 1 中设计的 2 组虹鳟 LAMP 引物进行筛选，分析荧光扩增曲线结果显示（图 1），第 1 组引物阳性对照的出峰时间约为 21 min，平行扩增曲线拟合度较好；第 2 组引物阳性对照的出峰时间约为 24 min，平行扩增曲线重复性

表 2 两种鱼类提取基因组 DNA 吸光值和浓度值

Table 2 Absorption value and purity value of two fish genomic DNA

鱼种	DNA提取方法	测定均值			
		A260	A280	A260/A280比值	浓度(ng/μL)
虹鳟	磁珠法	3.599±0.142	1.764±0.031	2.04±0.063	299.316±17.484
	快速提取法	1.59±0.274	0.824±0.054	1.93±0.038	94.263±8.319
大西洋鲑	磁珠法	8.795±0.161	4.649±0.275	1.89±0.037	516.384±14.761
	快速提取法	3.049±0.075	1.654±0.013	1.84±0.034	113.472±8.237

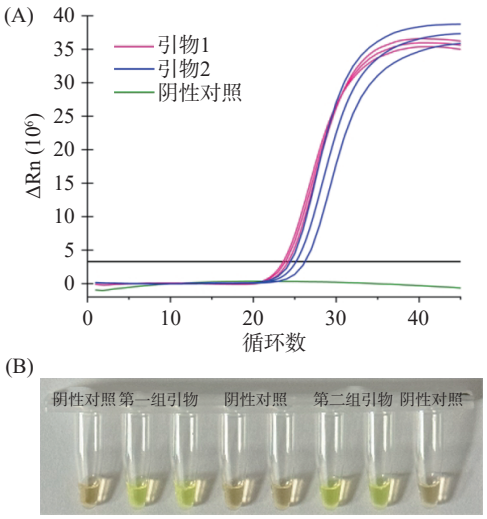


图 1 虹鳟源性成分 2 组 LAMP 引物筛选结果

Fig.1 Screening results of *Oncorhynchus mykiss* LAMP primer

注: A.虹鳟 2 组引物的荧光 LAMP 筛选结果; B.虹鳟 2 组引物显色可视 LAMP 引物筛选结果。

稍差, 两组引物阴性对照均无扩增。因此选择出峰较早且重复性较好的虹鳟第 1 套引物(表 1), 用于建立虹鳟源性成分 LAMP 方法及特异性和灵敏度试验。

2.3 特异性分析

2.3.1 虹鳟 LAMP 方法优化及特异性测试 采用虹鳟源性成分优化筛选后的第 1 组 LAMP 引物进行特异性试验, 对大西洋鲑、银鲑、粉鲑、红鲑、大马哈鱼的基因组 DNA 进行可视化和荧光法 LAMP 分析, 通过颜色变化和荧光分析特异性。由图 2(A)和图 2(B)所示, LAMP 反应 40 min 时, 红鲑及银鲑出现交叉反应, 荧光法 LAMP 也出现非特异性荧光扩增曲线, 可视 LAMP 结果发生非特异性显色变化。为了降低交叉反应的发生, 将 LAMP 等温扩增时间优化至 30 min。结果表明, LAMP 扩增 30 min, 荧光法 LAMP 只有虹鳟检出阳性的荧光扩增曲线, 其他样品均为阴性(图 2(C)); 可视化 LAMP 仅虹鳟源性成分呈现出阳性反应的黄色, 其他样品均为阴性反应的橙色(图 2(D))。表明虹鳟源性成分采用 LAMP 等温扩增 30 min 具有良好特异性。据此以改进后的 63 ℃、恒温孵育 30 min, 作为虹鳟可视化和荧光 LAMP 的等温扩增程序, 用于后续实验。

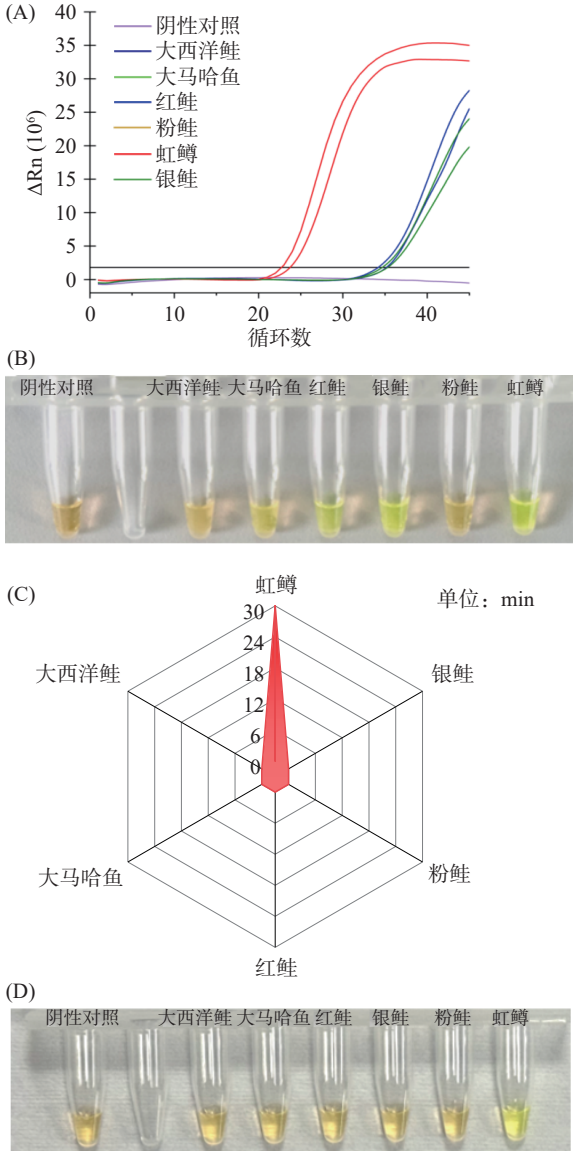


图 2 虹鳟源性成分 LAMP 特异性实验结果

Fig.2 Results of *Oncorhynchus mykiss* LAMP specificity experiment

注: A.虹鳟荧光 LAMP 扩增 45 min 结果(红鲑、银鲑出现非特异性扩增); B.虹鳟可视 LAMP 扩增 45 min 结果(红鲑、银鲑出现非特异性显色); C.虹鳟优化后荧光 LAMP 扩增 30 min 的特异性结果(均无非特异性扩增); D.虹鳟优化后可视 LAMP 扩增 30 min 结果(均无非特异性显色)。

2.3.2 大西洋鲑 LAMP 方法特异性测试及优化 采用大西洋鲑 LAMP 引物进行特异性试验, 对虹鳟、银鲑、粉鲑、红鲑、大马哈鱼的基因组 DNA 进行可视化和荧光法 LAMP 分析, 通过颜色变化和荧光分

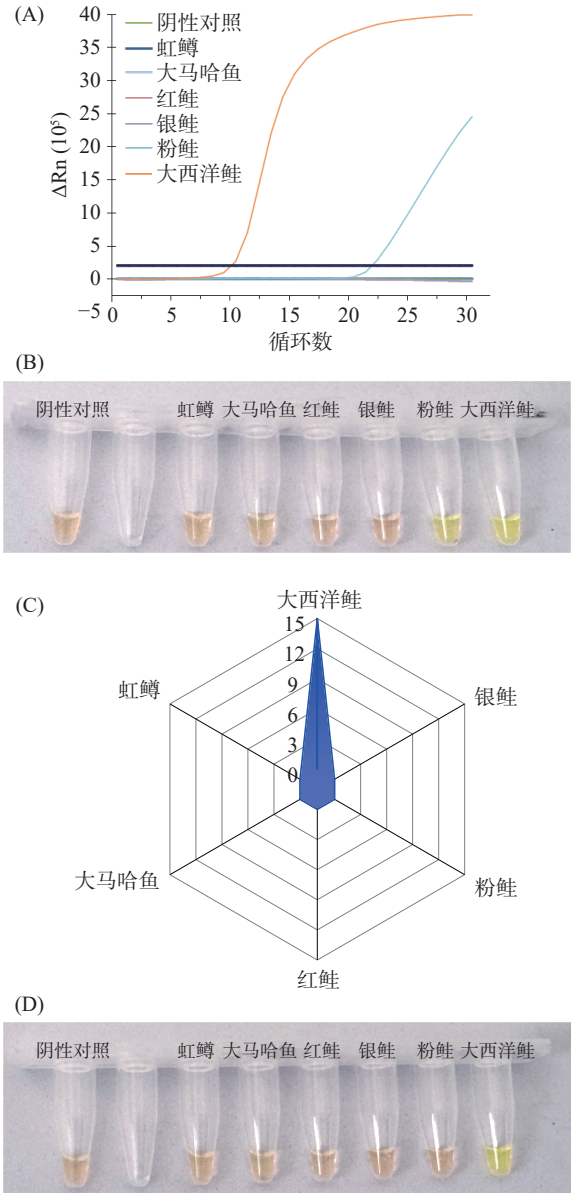


图 3　大西洋鲑源性成分 LAMP 特异性实验结果

Fig.3　Results of *Salmo salar* LAMP specificity experiment

注：A.大西洋鲑荧光 LAMP 扩增 30 min 结果（粉鲑产生非特异性扩增）；B.大西洋鲑可视 LAMP 扩增 30 min 结果（粉鲑出现非特异性显色）；C.大西洋鲑优化后荧光 LAMP 扩增 20 min 特异性结果（均无非特异性扩增）；D.大西洋鲑优化后可视 LAMP 扩增 20 min 结果（均无非特异性显色）。

析检测特异性。在虹鳟 LAMP 实验基础上，为了避免发生非特异性扩增，将大西洋鲑 LAMP 反应初始时间更改为 30 min 进行初始反应。由图 3（A）和图 3（B）所示，发现 LAMP 扩增 30 min 时，可视 LAMP 扩增粉鲑发生非特异性显色变化，荧光法 LAMP 扩增粉鲑也发生非特异性荧光扩增曲线。本文进一步改进 LAMP 等温扩增条件，将等温扩增时间优化至 15 min。经改进后，荧光法 LAMP 在反应 15 min 时只有大西洋鲑检出阳性的荧光扩增曲线，其他样品均为阴性（图 3（C））；可视化法 LAMP（图 3（D））仅大西洋鲑呈现出阳性反应的黄色，其他样品均为阴性反应的橙色。证明大西洋鲑 LAMP 引物在等温扩增 15 min时具有良好特异性。据此以改进后的 63 ℃、等温扩增 15 min，作为大西洋鲑可视化和荧光 LAMP 的等温扩增程序，用于后续实验。

2.4　LAMP 方法检测基因组 DNA 的灵敏度

2.4.1　虹鳟源性成分基因组 DNA 灵敏度结果　对不同核酸提取方法获得的虹鳟 DNA 进行 LAMP 灵敏度实验。图 4 结果表明，磁珠法提取 DNA 进行 LAMP 扩增，最低检测浓度可达到 2.99×10^{-1} ng/μL（图 4（B）），快速法提取 DNA 进行 LAMP 扩增，最低检测浓度可达到 9.42×10^{0} ng/μL（图 4（C）），荧光 LAMP 扩增均出现典型的阳性荧光扩增曲线且结果稳定，可视 LAMP 呈现明显颜色变化（图 4（A））。使用 SPSS 软件进行统计分析，比较基于磁珠法提取 DNA 和以快速提取 DNA 建立的 LAMP 方法灵敏度的差异性，计算得到 $P = 0.281>0.05$，证实两种虹鳟 DNA 提取方式的 LAMP 检测灵敏度结果没有显著性差异。

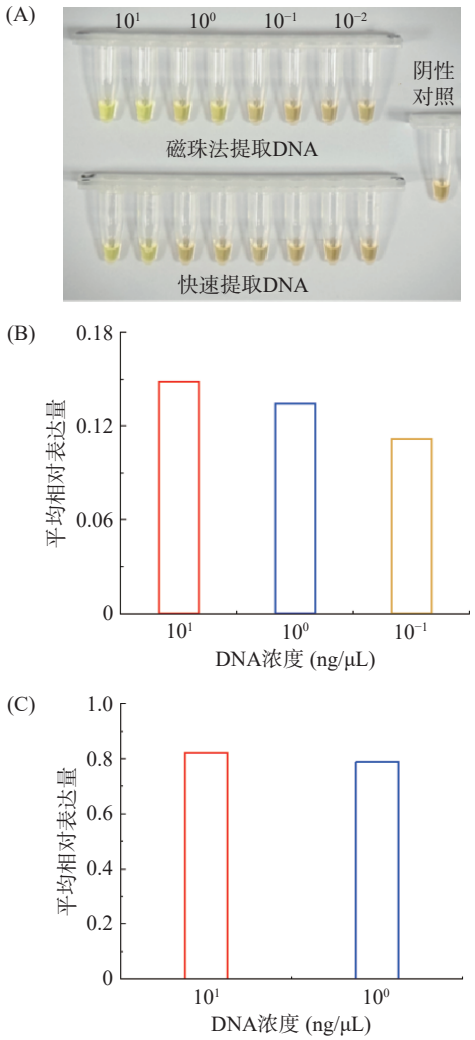


图 4　虹鳟源性成分灵敏度实验结果

Fig.4　Results of *Oncorhynchus mykiss* sensitivity experiment

注：A.虹鳟成分可视化 LAMP 灵敏度实验（包括磁珠法和快速提取法）结果；B.虹鳟成分磁珠法提取 DNA 荧光法 LAMP 灵敏度实验结果；C.虹鳟成分快速提取 DNA 荧光法 LAMP 灵敏度实验结果。

2.4.2 大西洋鲑源性成分基因组 DNA 的灵敏度

对不同核酸提取方法获得的大西洋鲑 DNA 进行 LAMP 的灵敏度实验。图 5 结果表明，磁珠法提取 DNA 进行 LAMP 扩增，最低检测浓度可达到 5.16×10^{-3} ng/μL（图 5(D)），快速法提取 DNA 进行 LAMP 扩增，最低检测浓度可达到 1.13×10^{1} ng/μL（图 5(B)），荧光 LAMP 扩增均出现典型的阳性荧光扩增曲线且结果稳定，可视 LAMP 呈现明显颜色变化（图 5(A)、图 5(B)）。比较基于磁珠法和快速提取法建立的 LAMP 方法灵敏度的差异性，计算得到 P=0.611>0.05，证实两种大西洋鲑 DNA 提取方式的 LAMP 灵敏度结果没有显著性差异。

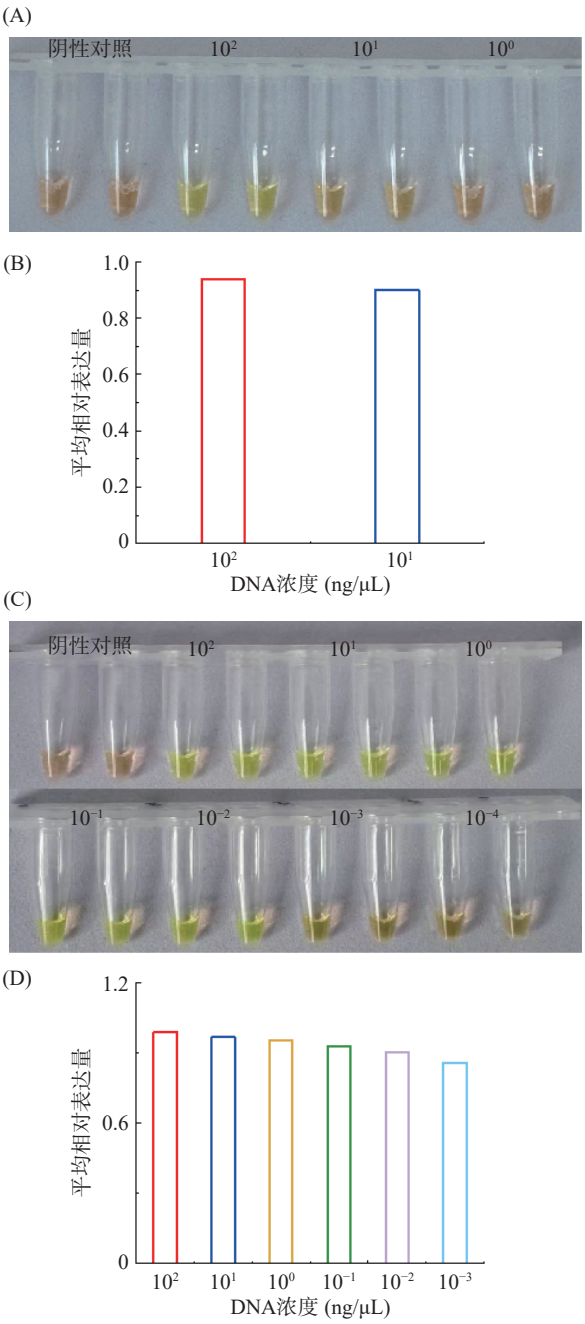


图 5 大西洋鲑源性成分灵敏度实验结果

Fig.5 Results of *Salmo salar* sensitivity experiment

注：A.快速提取大西洋鲑 DNA 可视化法 LAMP 灵敏度结果；B.快速提取大西洋鲑 DNA 荧光法 LAMP 灵敏度实验结果；C.磁珠法提取大西洋鲑 DNA 可视化法 LAMP 灵敏度结果；D.磁珠法提取大西洋鲑 DNA 荧光法 LAMP 灵敏度实验结果。

2.5 RPA 方法检测结果

虹鳟和大西洋鲑的 RPA 等温扩增结果如图 6 所示。虹鳟及大西洋鲑成分均出现相应电泳条带，虹鳟的特异性扩增产物为 102 bp，大西洋鲑的特异性扩增产物为 103 bp。分别以虹鳟和大西洋鲑的引物检测银鲑、粉鲑、红鲑、大马哈鱼等近源或相关鱼种 DNA，均未出现特异性扩增电泳条带。特异性实验结果表明，本文建立的大西洋鲑和虹鳟源性成分的 RPA 等温扩增方法具有良好特异性。

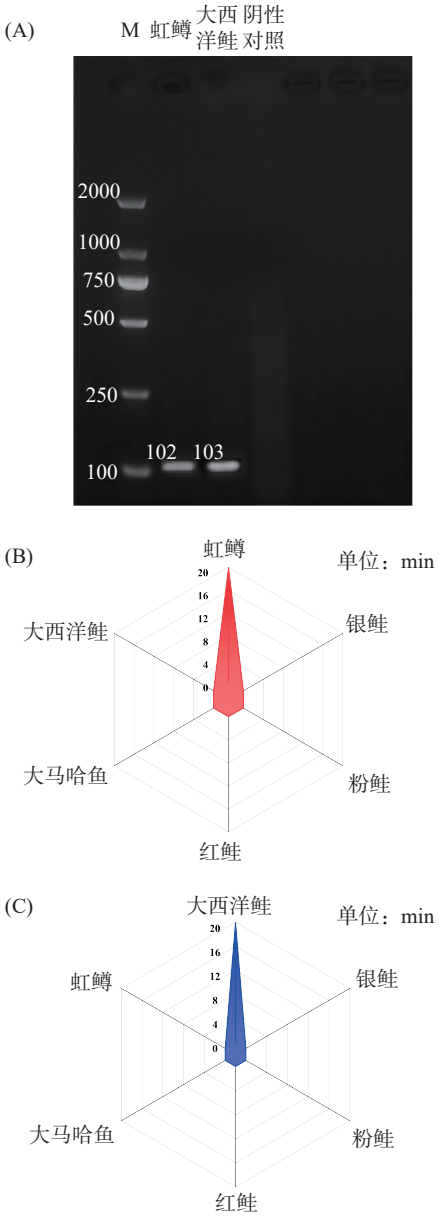


图 6 虹鳟及大西洋鲑源性成分 RPA 结果

Fig.6 RPA results of *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar*

注：A.虹鳟及大西洋鲑的 RPA 等温扩增结果；B.虹鳟 RPA 实验特异性结果；C.大西洋鲑 RPA 实验特异性结果。

2.6 模拟添加样品灵敏度实验结果

模拟添加样品灵敏度实验结果如图 7 所示。虹

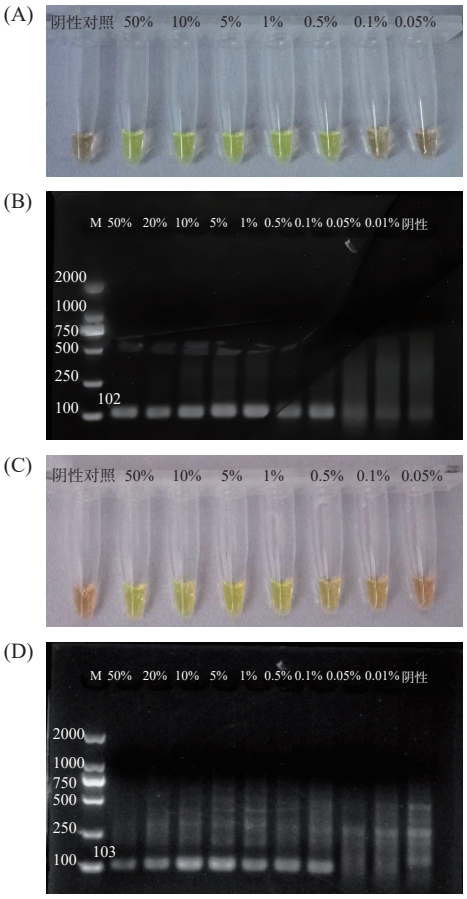


图 7　鳕鱼基质模拟添加样品灵敏度实验结果

Fig.7　Simulation of cod matrix adding sample sensitivity

注：A.虹鳟模拟添加样品可视化法 LAMP 灵敏度结果；B.虹鳟模拟添加样品 RPA 灵敏度实验结果；C.大西洋鲑模拟添加样品可视化法 LAMP 灵敏度结果；D.大西洋鲑模拟添加样品 RPA 灵敏度实验结果。

鳟和大西洋鲑可视化 LAMP 等温方法的灵敏度可稳定达到 0.5%（W/W）（图 7（A）、图 7（C））。虹鳟和大西洋鳟模拟添加样品的 RPA 等温方法的灵敏度可达到 0.1%（W/W）（图 7（B）、图 7（D））。

3　结论

本文进行了食品中主要两种三文鱼，大西洋鲑和虹鳟源性成分等温扩增方法研究，建立了两种三文鱼荧光 LAMP 和可视化 LAMP 方法以及 RPA 等温扩增方法。与虹鳟基于内引物和外引物的 LAMP 方法相比，大西洋鲑引入一对环引物，基于内引物、外引物和环引物组合可极大缩短 LAMP 反应时间，提高扩增效率，可在 20 min 内完成 LAMP 等温扩增检测，引入外引物极大提高 LAMP 等温扩增的灵敏度。同时，本文探讨了基于快速提取和磁珠法提取 DNA 的 LAMP 方法的检测效率，发现快速提取和磁珠法提取 DNA 适用于后续等温扩增检测三文鱼源性成分，都具有很好的特异性和灵敏度。两种 DNA 提取方法适合不同检测目的和检测场景需要，磁珠法提取 DNA 适合专业实验室大批量精准检测需要；基于快速 DNA 提取的可视化 LAMP 方法由于简化了样本预处理步骤，降低了检测成本，不需要复杂的仪器设备，具有稳定热源的设备即可进行反应，操作简便，更适合在养殖一线和生产流通场所进行现场快速检测。所建立的 RPA 等温扩增方法可以与胶体金试纸条或者 CRISPR-Cas 基因编辑技术联用，为等温扩增技术推广至更广泛的检测场景提供了可能。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］ YANG J, NELSON T H, ZDENKA B, et al. Diet and life stage-associated lipidome remodeling in Atlantic salmon[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3787−3796.

［2］ BARFUSS J E, BROWN E B, SACHDEVA S, et al. Using genetic data to determine origin for out-migrating smolt and returning adult steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a southeast alaska drainage[J]. Ecology and evolution, 2024, 14(10): e70472.

［3］ 吴浩，周秀雯，陈海泉，等. 不同产地三文鱼的稳定同位素指纹特征及原产地溯源[J]. 食品科学，2021, 42(16): 304−311. ［WU Hao, ZHOU Xiuwen, CHEN Haiquan, et al. Stable isotope fingerprinting of salmon from different geographical origins and geographical origin traceability analysis[J]. Food Science, 2021, 42(16): 304−311.］

［4］ 马聪聪. 基于蛋白组学的三文鱼物种鉴别及新鲜度变化机理研究[D]. 石家庄：河北科技大学, 2020. ［MA Congcong. Identification of salmon species and the mechanism of freshness change based on proteomics[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2020.］

［5］ 王紫晔. 进口三文鱼真伪鉴别与产地溯源技术研究[D]. 杭州：中国计量大学, 2020. ［WANG Ziye. Research on the identification of imported salmon and origin tracing technology[D]. Hangzhou: China University of Metrology, 2020.］

［6］ LI Q P, XUE H Y, FEI Y J, et al. Visual detection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) simultaneously by duplex loop-mediated isothermal amplification[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2022, 4(30): 100107.

［7］ YUAN J R, WANG L, HE F, et al. Hue-change coupled with CRISPR-Cas12a lateral flow assay for the semiquantitative detection of *Salmo salar* adulteration[J]. Food Chemistry, 2024, 463 (Pt 1): 141088.

［8］ XIONG X, HUA M H, XU W J, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) identification in processed fish products using loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction assays.[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(13): 4696−4704.

［9］ 王楠. 基于 DNA 条码技术的食品中鲑科鱼物种成分鉴别研究[D]. 泰安：山东农业大学, 2019. ［WANG Nan. Species composition identification of salmonidae in food based on dna barcode technology［D］. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019.］

［10］ BEACHAM D T, WALLACE G C. Salmon species identification via direct DNA sequencing of single amplicons[J]. Conservation Genetics Resources, 2019, 12(2): 1−7.

［11］ 李蓉，温瑞丹，李晓环，等. DNA 条形码技术在鱼类生物学和保护生物学中的研究进展[J]. 生命科学，2024, 36(11): 1439−1449. ［LI Rong, WEN Ruidan, LI Xiaohuan, et al. Research progress of DNA barcoding technique in fish biology and conserva-

tion biology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2024, 36(11): 1439−1449.]
[12] HAN C, DONG S L, LI L, et al. DNA barcoding and mini-DNA barcoding reveal mislabeling of Salmonids in different distribution channels in the Qingdao area[J]. Journal of Ocean University of China, 2021, 20(6): 1537−1544.
[13] ZHENG S L, LIN J B, WU F X, et al. DNA barcodes for identifying fish egg species diversity in summer and autumn in the southwest daya bay, China[J]. Fishes, 2024, 9(12): 510.
[14] 黄权, 蒋焯. 基于线粒体 COI 和 16S rRNA 基因序列的虹鳟 DNA 条形码研究[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(2): 215−220. [HUANG Quan, JIANG Zhuo. Rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) DNA barcode based on bitochondrial COI and 16S rRNA gene sequences[J]. Food Science, 2022, 44(2): 215−220.]
[15] WANG S H, XIONG X, SONG H W, et al. A Novel method for rapid screening of salmonidae ingredients and accurate detection of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) simultaneously using duplex Real-Time PCR coupled with melting curve analysis[J]. Molecules, 2024, 29(20): 4904.
[16] KOTSANOPOULOS K V, EXADACTYLOS A, GKAFAS G A, et al. The use of molecular markers in the verification of fish and seafood authenticity and the detection of adulteration[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(2): 1584−1654.
[17] SOUSA C M, DUMAS D, PIOTR E, et al. A fast HRMA tool to authenticate eight salmonid species in commercial food products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021(prepublish): 112440.
[18] LI H, KONG J Q, XIE R B, et al. Comparative rapid identification of *Salmo salar, Oncorhynchus mykiss*, and *Oncorhynchus keta* components based on loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction[J]. Aquaculture, 2022, 550.
[19] 罗娇依, 郑越男, 刘彤彤, 等. 基于生物质谱的蛋白质组学分析大西洋鲑中生物标志性肽段及过敏原特异性肽段[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(1): 1−12. [LUO Jiaoyi, ZHENG Yuenan, LIU Tongtong, et al. Analysis of biomarker peptides and allergen specific peptide in *Salmo Salar* by proteomics based on biomass spectrometry[J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part B: Chemical Analysis), 2023, 59(1): 1−12.]
[20] 蒋冰雪, 张晓梅, 丁矛, 等. 基于蛋白质/肽组学的三文鱼物种溯源[J]. 中国食品学报, 2023, 23(10): 273−283. [JIANG Bingxue, ZHANG Xiaomei, DING Mao, et al. Traceability analysis of salmon species based on proteomics/peptidomics analysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(10): 273−283.]
[21] YU X N, LI H H, WANG G S, et al. Lipidomics study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmons (*Oncorhynchus tshawytscha* and *Salmo salar*) using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry[J]. LWT, 2020, 121108988.
[22] GIEROŃ M, ŻARNOWIEC P, ZEGADŁO K, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP) as an alternative method for determining bacteria in wound infections[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 25(1): 411.
[23] LI Y, XUE H Y, FEI Y J, et al. A rapid and closed-tube method based on the dual-color fluorescence loop-mediated isothermal amplification for visual detection of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Food Chemistry, 2023, 405(PB): 134975.
[24] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins.[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
[25] LI J L, MA B, FANG J H, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of salmonella in food[J]. Foods, 2019, 9(1): 27.
[26] MAHMOUD M, SIVARAMASAMY E, PUTITA C, et al. Rapid visualization in the specific detection of *Flavobacterium columnare*, a causative agent of freshwater columnaris using a novel recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow dipstick (LFD) assay[J]. Aquaculture, 2021, 531(prepublish): 735780.
[27] 张永江, 魏霜, 袁俊杰, 等. 一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 96−98. [ZHANG Yongjiang, WEI Shuang, YUAN Yongjie, et al. One-step reverse transcription recombinase polymerase amplification (RT-RPA) technology for detection of BPMV[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(21): 96−98.]
[28] LIU Y X, HAO J Y, GUO Q Y, et al. Establishment of a recombinase polymerase amplification detection method for *Puccinia striiformis* f. sp. tritici[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 16133−16133.
[29] 李苗, 陈小勇. 环境 DNA 技术在鱼类生态学中的应用研究进展[J]. 生态学报, 2023, 43(17): 6951−6967. [LI Miao, CHEN Xiaoyong. Advances in the application of environmental DNA technology in fish ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(17): 6951−6967.]
[30] DUNN N, WARD S, BARKER J, et al. Revealing elasmobranch distributions in turbid coastal waters: insights from environmental DNA and particle tracking[J]. Ecology and Evolution, 2025, 15(1): e70857.
[31] YU C H, SONG H, CAO W G, et al. Plasmid DNA extraction by double magnetic beads method and its application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4708−4717.
[32] 许朋, 郑春辉, 孙智勇, 等. 磁珠法快速提取基因组 DNA 的实验研究[J]. 生物信息学, 2018, 16(3): 190−195. [XU Peng, ZHENG Chunhui, SUN Zhiyong, et al. Rapid extraction of genomic DNA by magnetic beads method[J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2018, 16(3): 190−195.]
[33] 李雅馨. 高质量快速核酸提取系统的研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2022. [LI Yaxin. Research on a high-quality and rapid nucleic acid extraction system[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2022.]
[34] 廖弘毅. 超微量分光光度计检测方法研究[J]. 计量与测试技术, 2016, 43(8): 31−34. [LIAO Hongyi. Study on detection method of ultra micro spectrophotometer[J]. Metrology & Measurement Technique, 2016, 43(8): 31−34.]