程雅妮, 孙林瑶, 王晴, 等. 双拖尾恒温扩增结合核酸杂交侧流层析试纸条高通量快速检测驴肉中的掺假动物源性成分 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 328−338. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040095

CHENG Yani, SUN Linyao, WANG Qing, et al. Nucleic Acid Hybridization-Lateral Flow Strip Combined with Double Tailed Isothermal Amplification for High-throughput Rapid Detection of Adulterated Animal-derived Components in Donkey Meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 328−338. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040095

· 分析检测 ·

双拖尾恒温扩增结合核酸杂交侧流层析试纸条高通量快速检测驴肉中的掺假动物源性成分

程雅妮[1], 孙林瑶[1], 王　晴[1], 王晟宇[1], 刘丙蕊[2,*], 柳海宾[1,*]
（1.华北理工大学生命科学学院, 河北唐山 063210;
2.华北理工大学公共卫生学院, 河北唐山 063210）

摘　要: 目的：建立一种基于双拖尾重组聚合酶恒温扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）结合核酸杂交侧流层析试纸条（nucleic acid hybridization-lateral flow strip，NAH-LFS）的多重可视化检测技术，用于同步鉴别驴肉及其制品中鸡、猪、马源性成分，满足快速检测、操作简便及低成本的需求。方法：首先制备不同掺假比例的样品并进行 DNA 提取。利用 primer5 软件设计针对鸡、猪、马线粒体细胞色素 b（*cytb*）基因的特异性引物，引物包含 3 个功能区，即引物序列、spacer9 间隔区和单链 DNA 标签序列（作为拖尾序列），spacer9 可以阻止 DNA 聚合酶的作用使单链 DNA 标签序列在 RPA 扩增后仍保持单链状态。随后，制备胶体金纳米粒子并与识别探针偶联、构建核酸杂交侧流层析试纸条、优化 RPA 反应条件及试纸条的最佳工作条件，并对其检测灵敏度和特异性进行系统验证。最后，应用所建立的方法对 40 份市售驴肉样品进行检测。结果：RPA 最佳反应温度为 39 ℃，孵育时间是 10 min，Mg^{2+}（280 mmol/L）添加量为 2.5 μL，鸡、猪、马引物（10 μmol/L）的加入量分别为 0.7、0.7、1 μL。试纸条采用流速为 33.75 cm/s 型号的硝酸纤维素膜、流动缓冲液 RB_4（0.01 mol/L PBS pH8.0、0.05% 吐温-20）时显色效果最佳。RPA-NAH-LFS 可同时呈现 T_1（鸡源）、T_2（猪源）、T_3（马源）3 条特征性检测线，总检测时间控制在 15 min 以内（含 10 min 扩增及 5 min 检测反应），对目标肉类的检测灵敏度达 0.01%（w/w），对牛、羊等 9 种常见肉类无交叉反应。用 RPA-NAH-LFS 对 40 份市售驴肉样品检测结果显示，1 份驴肉包子中检出猪肉和鸡肉成分，1 份火锅驴肉卷中检出猪肉成分，检测结果与标准检测（DB42/T 1591-2020）结果完全一致。结论：RPA-NAH-LFS 技术通过双拖尾引物设计与多重探针杂交策略，实现了肉类掺假成分的同步可视化检测。该方法兼具高灵敏度、强特异性和操作便捷性，特别适用于基层监管部门和现场快速筛查需求，为肉制品真实性鉴别提供了高效技术手段。

关键词: 肉类掺假, 双拖尾重组聚合酶恒温扩增技术, 核酸杂交侧流层析试纸条, 可视化检测
中图分类号: TS251.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0328−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040095
本文网刊:

Nucleic Acid Hybridization-Lateral Flow Strip Combined with Double Tailed Isothermal Amplification for High-throughput Rapid Detection of Adulterated Animal-derived Components in Donkey Meat

CHENG Yani[1], SUN Linyao[1], WANG Qing[1], WANG Shengyu[1], LIU Bingrui[2,*], LIU Haibin[1,*]

收稿日期: 2025−04−09
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）。
作者简介: 程雅妮（2004−）, 女, 大学本科, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: cyn15032577150@126.com。
*** 通信作者:** 刘丙蕊（1984−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: liubingrui@ncst.edu.cn。
柳海宾（1987−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: liuhaibinhappy1013@126.com。

（1.School of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China；
2.School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China）

Abstract: Objective: To develop a multiplex visual meat adulteration detection method, dual-tailed recombinase polymerase amplification (RPA) with nucleic acid hybridization-lateral flow strip (NAH-LFS) was established for the simultaneous identification of chicken, pork, and horse derived components in donkey meat and its products. This RPA-NAH-LFS method met the requirements of meat adulteration detection for rapidity, simplicity, and low cost. Methods: Firstly, samples was prepared with different adulteration ratios and perform DNA extraction. The primer5 software was utilized to design specific primers targeting the mitochondrial cytochrome b (*cytb*) gene of chicken, pork, and horse. The primers included three functional regions: primer sequence, spacer9, and single-stranded DNA tag sequence (as a tailing sequence). Spacer9 could prevent the action of DNA polymerase, allowing the single-stranded DNA tag sequence to remain single-stranded after RPA amplification. Subsequently, colloidal gold nanoparticles were prepared and conjugated with recognition probes. NAH-LFS were then constructed. The RPA reaction conditions and the optimal working parameters were optimized for the LFS, followed by systematic validation of the sensitivity and specificity of the RPA-NAH-LFS. Finally, the established assay was applied to analyze 40 commercial donkey meat samples. Results: The optimal RPA conditions were determined as follows: reaction temperature of 39 ℃, incubation time of 10 min, Mg^{2+} (280 mmol/L) addition volume of 2.5 μL, and primer addition volumes of 0.7 μL (chicken), 0.7 μL (pork), and 1.0 μL (horse). The NC membrane with a flow rate of 33.75 cm/s and the running buffer 4 (0.01 mol/L PBS, pH8.0, 0.05% Tween-20) were selected as optimal conditions. The LFS had three test lines targeting for chicken (T_1), pork (T_2), and horse (T_3). The detection process was completed within 15 min, which included RPA reaction (10 min) and LFS detection (5 min). The method could detect as little as 0.01% (w/w) chicken, pork, or horse meat in simulated adulterated donkey meat. Cross-reactivity test with 9 meat species demonstrated the excellent specificity of the assay. Analysis of the 40 commercial meat products revealed pork adulteration present in one sample, and simultaneous chicken and pork adulteration in another sample. These results were 100% consistent with those obtained by the standard detection method (DB42/T 1591-2020). Conclusion: The RPA-NAH-LFS technique, utilizing the dual-tailed primer design and a multiplex probe hybridization strategy, enables the simultaneous visual detection of meat adulterants. This method has high sensitivity, strong specificity, and operational convenience, making it particularly suitable for rapid on-site screening by basic-level regulatory agencies. It provides an efficient technology for detecting the authenticity of meat products.

Key words: meat adulteration; double tailed recombinase polymerase amplification technology; nucleic acid hybridization lateral flow strip; visual detection

在全球食品供应链高度融合的背景下，食品安全与产品真实性已成为国际性议题，其中肉类掺假问题因直接关系消费者权益及市场秩序而备受关注。驴肉制品凭借独特风味与优良质地拥有稳定的消费群体，但其养殖周期长、出栏率低导致市场供给有限且成本居高。2013 年欧盟地区的“马肉风波”事件[1]以及市场上利用蒸、卤、腌、烤等方式掩盖掺假肉（如猪、鸡肉等）气味、口感等事件[2] 的报道，揭示鸡肉、猪肉及马肉等易获取、低成本的动物源性成分逐渐成为高端肉类的主要掺假对象[3]。

针对此类掺假行为，现有检测技术主要涵盖电子感官技术（电子鼻[4]/电子舌[5]）、免疫分析法[6]、近红外光谱检测技术[7] 及 DNA 分子杂交法[8] 等。然而，电子感官技术需结合机器学习算法且对微量掺假的识别能力有限；基于蛋白质靶标的免疫学方法虽具备良好的特异性与灵敏度，却易因加工过程中蛋白结构变性引发假阴性结果，且检测结果的重现性有待提升[9]；近红外光谱检测的原理是基于分子振动产生的倍频和合频吸收，信号强度较弱，难以检测低浓度（如低于 0.1%）的微量成分，且近红外分析属于间接方法，直接影响检测结果的准确性。相较于蛋白质，DNA 分子在肉类细胞中分布广泛，其双螺旋结构在高温加工条件下仍保持高度稳定性，这使得基于 DNA 的溯源检测技术更具应用优势。当前以 DNA 为靶标的主流方法包括传统聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）[10]、实时荧光定量 PCR（qPCR）[11] 及数字 PCR[12]，这些技术虽具有纳克级检测灵敏度与种属特异性，但依赖精密热循环设备与专业操作人员，难以满足市场监管中对于肉制品掺假的现场快速筛查需求。近年来快速发展的核酸等温扩增技术，凭借其仪器依赖性低、操作便捷、反应迅速及高灵敏度等优势[13]，在分子检测领域展现出广阔应用前景。目前主流技术包括：重组聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）[14]、环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）[15]、滚环扩增（rolling circle amplification, RCA）[16] 及交叉引物扩增（cross primer amplification, CPA）[17]。其中，LAMP 与 RPA 技术已在食品安全检测领域实现规模化应用。LAMP 技术需在 60~65 ℃ 恒温条件下通过 4~6 条特异性引物实现扩

增, 但其复杂的引物设计体系易导致非特异性扩增[18]; 相较之下, RPA 技术仅需 35~42 ℃ 恒温环境, 可在 20 min 内完成扩增, 且无需复杂温控设备。此外, RPA 通过多重引物体系可同步扩增多靶标, 在肉源检测中能展现出优异的特异性与灵敏度[19]。为提升检测便捷性, 侧流层析技术(lateral flow strip, LFS)因其仪器非依赖性及可视化优势, 已被整合应用于扩增产物的即时分析[20]。传统免疫层析法依赖抗原-抗体互作实现信号捕获, 需在引物端标记荧光基团或地高辛等分子, 同时固定化抗体的制备显著增加检测成本[21]。而基于核酸杂交的 LFS 通过互补序列特异性识别靶标 DNA, 不仅降低探针修饰成本, 更延长试纸条储存稳定性, 为现场检测提供经济高效的技术路径。

为此, 本研究基于双拖尾重组聚合酶恒温扩增(double-tailed RPA)技术, 开发了一种核酸杂交侧流层析试纸条(NAH-LFS)。该试纸条设计 1 条质控线(C 线)和 3 条检测线(T 线), 通过 C 线显色指示有效性, T 线显色实现驴肉制品中鸡、猪及马源性成分的多靶标同步检测。本技术(RPA-NAH-LFS)突破了传统 PCR 对热循环仪的依赖, 且可以拓展应用于其他肉类中鸡、猪及马源性成分的快速检测, 旨在建立一种无需专业环境的现场即时检测(point-of-care testing, POCT)方法。该体系具备双重应用维度: 在消费端, 其便携性支撑市场终端产品真实性快速筛查; 在监管端, 其简易的“采样-扩增-显色”流程便于大量样品的现场初筛, 为肉制品质量监控提供关键技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验样本的生物材料 来源于唐山市域内多个规范渠道, 具体包括: 市售新鲜肉类(猪、牛、鸡、兔、鸭、鹅、鱼、虾及羊肉)采购自唐山市主要生鲜零售市场(包括综合超市、专业水产市场及屠宰场), 特殊物种样本(驴、马肉)通过唐山市农产品批发市场获取, 鼠源性组织样本由华北理工大学实验动物中心按需提供; 琼脂糖(agarose gel, AG)(纯度 99.90%)、链霉亲和素(streptavidin, SA)(纯度 99.90%) 上海源叶生物科技有限公司; RPA 扩增试剂 英国 TwistDX 公司; 天根基因组 DNA 提取试剂盒 DP304, 北京天根生物科技有限公司; 三(2-羧乙基)膦盐酸盐(Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP)纯度 99.90%, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 氯化钠(NaCl)(纯度 99.50%)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)(500 mmol/L)、磷酸盐缓冲液(PBS)(pH3.0、7.2、7.6)、氯金酸($HAuCl_4$)、硝酸银($AgNO_3$)(纯度均≥99.00%) 上海依赫生物科技有限公司; 柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7$) 纯度 99.90%, 上海阿拉丁试剂有限公司; 聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)背板、玻璃纤维、吸水纸、硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜 上海金标生物科技有限公司。

Milli-Q 纯水系统 美国 Millipore 公司; TGem Pro(OSE-260-03)超微量分光光度计 天根生化科技(北京)有限公司; 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; Gel Doc 2000 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司; 5418R 高速离心机 德国 Eppen-dorf 公司; 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; KB-5010 涡旋振荡器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; HX-20 恒温金属浴仪器 长沙巴跃仪器有限公司; nexus GSX1 PCR 仪 德国艾本德股份公司; JY600 电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司; TU-1900紫外可见光谱仪(UV-Vis 仪器) 北京普析通用仪器有限责任公司; JEM-1400Flash 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM) 日本电子株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理与 DNA 的提取 为确保实验数据的科学性与可重复性, 本研究预先采购了驴、鸡、猪及马 4 种动物源性肉类原料, 并进行预处理。具体处理步骤包括: 首先使用蒸馏水将肉类清洗 3 次去除表面杂质, 使用手术刀分割成 10 g/份的小块, 然后将驴、鸡、猪、马肉分别放在加入液氮的研钵中研磨成肉糜状态, 以满足后续实验对样本均一性的要求。为模拟市场流通中常见的掺假肉样, 本研究采用梯度掺杂法构建实验样本。掺杂比例以质量百分比(w/w)设定为 8 个梯度, 具体为 30%、15%、10%、5%、1%、0.1%、0.01% 及 0.001%。其中, 掺杂物质为鸡、猪及马肉糜的等比例混合物, 其总掺杂量以驴肉为基准进行配比。具体制备方法如下:

a.高浓度掺杂组(≥1%): 以 30%、15%、10%、5% 及 1% 的质量百分比在驴肉中掺入鸡、猪、马肉成分。以 30%(w/w)的掺假比例为例, 精确称取 30 g 鸡肉、30 g 猪肉及 30 g 马肉, 与 10 g 纯驴肉基质混合(此时共 100 g 的肉, 其中含鸡肉 30 g, 则鸡肉掺假为 30%, 猪肉与马肉掺假率按同等方式计算), 其他比例的掺假肉组同样按此法制备。

b.超低浓度掺杂组(≤0.1%): 采用逐级稀释法实现 0.1%、0.01% 及 0.001%(w/w)的微量掺杂。以 0.1%(w/w)组为例, 取 10 g 已知 1% 掺杂浓度的混合样本(已知 1% 掺假肉样指 10 g 肉样中分别含有 0.1 g 鸡肉、0.1 g 猪肉、0.1 g 马肉), 与 90 g 纯驴肉基质充分混匀(此时共 100 g 的肉, 其中鸡肉 0.1 g, 则鸡肉掺假为 0.1%, 猪肉与马肉掺假率按同等方式计算)。同法依次制备 0.01% 及 0.001% 浓度组, 该方法有效解决了微量掺杂样本制备中称量准确性问题。

所有样本制备过程中避免交叉污染, 每批次样本经 3 次涡旋振荡(3000 r/min, 5 min)确保均匀性。

使用天根基因组 DNA 提取试剂盒提取肉类样品中的 DNA，并将提取的 DNA 产物分装于 1.5 mL 无菌离心管中，于-20 ℃ 超低温冰箱保存，并于储存期间定期进行 OD260/280 比值检测（1.8~2.0）及 200 V 恒压下进行 30 min 的 2% 琼脂糖凝胶电泳（agarose gel electrophoresis，AGE）验证，确保 DNA 完整性符合后续分析要求。

1.2.2　RPA 引物与探针的设计　本研究严格遵循 RPA 技术的引物设计规范，其具体实施流程如下：首先从 NCBI GenBank 数据库中精准检索并下载鸡（登录号：NC_040902.1）、猪（登录号：AF034253）、马（登录号：NC_001640.1）3 个物种的线粒体基因序列。基于序列保守性片段、引物退火温度（Tm 值）及发卡结构预测等参数，使用 Primer Premier 5.0 软件设计具有物种特异性的候选引物对（每物种设计 4 对）。利用 BAC-browser v2.1 软件随机生成 6 条单链核苷酸序列（分别用作 3 个物种正反向引物的拖尾序列），再根据碱基互补配对原则设计与拖尾序列互补的探针。将设计好的拖尾引物、生物素或巯基标记的探针交由江苏金唯智生物技术有限公司合成。通过 RPA 技术筛选扩增效率高且不产生非特异性扩增产物的引物序列用于后续实验。

1.2.3　胶体金纳米粒子的制备及其与探针的偶联　采用传统柠檬酸钠还原氯金酸[22] 的方法合成粒径约为 20 nm 的胶体金纳米粒子（gold nanopspheres，AuNPs），参考万涛等[23] 的方法使用 UV-Vis 和 TEM 对制备好的金纳米粒子进行表征。参考曹婷婷等[24] 的方法将巯基（SH）化的识别探针与 AuNPs 偶联，以 AuNPs-鸡 SH 探针为例，将 10 μL 的鸡 SH 探针（100 μmol/L）与等体积的 TCEP（10 mmol/L）混合均匀，室温下振荡反应 1 h 后加入 1.33 mL AuNPs，混匀并孵育 10 min，再用柠檬酸缓冲液（500 mmol/L，pH3.0）将溶液 pH 调整至 3.0。继续在室温下孵育 10 min，再用 HEPES（500 mmol/L，pH7.6）将体系 pH 调节至 7.6。接下来，在 2.5 h 内缓慢滴加 NaCl（2 mol/L），使体系中 NaCl 终浓度达到 300 mmol/L，继续室温下孵育 1 h。反应结束后以 8000 r/min 离心 10 min，收集沉淀并重悬于 200 μL 缓冲溶液中（1 mmol/L Tris-HCl，pH7.6，1% BSA，0.5% Tween20，10% 蔗糖）。以同样方法制备 AuNPs-猪 SH 探针、AuNPs-马 SH 探针。最终以 1∶1∶1 的比例将 3 种偶联探针混合后以 25 μL/cm 的速度喷洒于结合垫上，室温下干燥 3~6 h 备用。

1.2.4　核酸杂交侧流层析试纸条的制备　试纸条由 5 部分组成，包括样品垫、结合垫、NC 膜、PVC 背板及吸水纸。各组件依照图 1 所示顺序依次粘附于 PVC

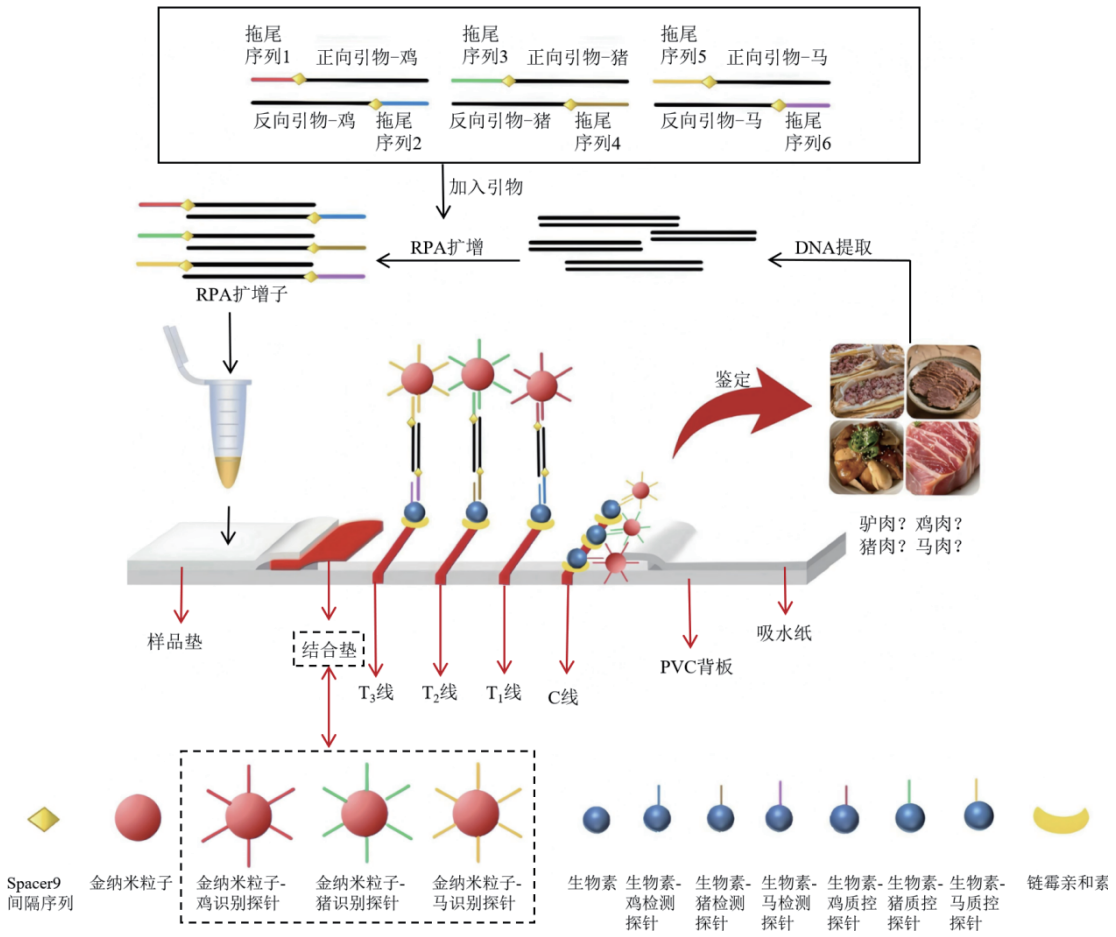


图 1　核酸杂交侧流层析试纸条的组成及工作原理

Fig.1　Composition and working principle of NAH-LFS

背板上。在 NC 膜上设置了 1 条质控线(C 线)和 3 条针对不同物种的检测线: T_1(鸡源)、T_2(猪源)和 T_3(马源)。具体操作步骤如下: 首先,将生物素标记的 3 个物种的特异性检测探针(10 μL, 100 μmol/L)分别与 SA(7.5 μL, 1.0 mg/mL)以及 23 μL 超纯水(ultrapure water, UP)混合,形成探针-生物素-链霉亲和素复合体。将复合物以 0.9 μL/cm 的量喷涂于 NC 膜上,形成 3 条独立的 T 线。T 线上的检测探针能与对应目标扩增子反向引物上的拖尾序列结合,而该扩增子正向引物上的拖尾序列能与对应的偶联金纳米粒子的识别探针结合,因此 T 线会出现红色条带。对于 C 线,将生物素标记的鸡、猪、马质控探针按相同比例混合与 SA 孵育后,以同样方式喷涂在 NC 膜上。C 线上的质控探针能与对应的偶联金纳米粒子的识别探针结合,因此 C 线会出现红色条带。所有检测线与质控线的间距保持在 5 mm。完成喷涂后,NC 膜置于 37 ℃ 恒温干燥箱中进行至少 3 h 的固化处理,以增强探针复合物与 NC 膜的结合稳定性。最后,将组装好的试纸条裁切成宽度为 3.7 mm 的条带,并存放在适宜的干燥条件下以便后续实验使用。

1.2.5 RPA 反应条件的优化 通过系统性参数优化实验,对 RPA 反应体系的关键条件进行优化,以提升对鸡、猪、马模板 DNA 扩增效率。具体优化方案如下。

1.2.5.1 反应温度的优化 基于试剂盒推荐的温度区间(37~41 ℃),对三重 RPA 反应体系的最适温度进行筛选。反应体系中,MgAcO(280 mmol/L)的加入量为 2.0 μL,鸡、猪、马三种引物(10 μmol/L)的加入量分别为 0.7、0.7、1 μL,将配制完成的 RPA 反应液分别置于 37、38、39、40、41 ℃ 恒温水浴中孵育 15 min,随后通过 2% 琼脂糖凝胶电泳(200 V 恒压,30 min)检测扩增产物的条带亮度。通过对比不同温度下目标条带的亮度,确定最佳反应温度。

1.2.5.2 孵育时间的优化 在确定的最优反应温度下,进一步优化反应时间。反应体系中,MgAcO(280 mmol/L)及三种引物(10 μmol/L)的加入量均与 1.2.5.1 中的初始条件保持一致,将 RPA 反应体系分别孵育 5、10、15、20 min,再通过 2% 琼脂糖凝胶电泳(200 V 恒压,30 min)检测扩增产物的条带强度,以筛选出最佳孵育时间。

1.2.5.3 Mg^{2+}加入量的优化 将试剂盒中的 MgAcO(280 mmol/L)以不同的体积添加到反应体系中,添加量分别为 2.0、2.5、3.0、3.5 μL,鸡、猪、马三种引物(10 μmol/L)的加入量均与 1.2.5.1 中的初始条件保持一致,在最优的温度和孵育时间下进行 RPA 扩增反应,结束后用 2% 琼脂糖凝胶电泳(200 V 恒压,30 min)检测 RPA 产物条带的亮度,以确定最适的 Mg^{2+}加入量。

1.2.5.4 引物加入量的优化 RPA 反应总体积 50 μL,对鸡、猪、马引物的加入量进行优化,引物浓度均为 10 μmol/L。鸡、猪、马引物加入量如下: a.鸡、猪、马引物加入量分别为 1、0.7、0.7 μL, b.鸡、猪、马引物加入量分别为 0.7、0.7、1 μL, c.鸡、猪、马引物加入量分别为 0.7、1、0.7 μL, d.鸡、猪、马引物加入量分别为 0.7、0.7、0.7 μL。在最适的温度、孵育时间和 MgAcO 浓度下分别使用上述 4 种配比的引物对进行 RPA 反应,选取亮度最强的条带所对应的引物加入量用于后续实验。

1.2.6 侧流层析试纸条最佳工作条件的优化 通过系统性实验评估不同型号的 NC 膜与不同参数的流动缓冲液(running buffer, RB)对试纸条检测性能的影响,具体优化方案如下。

1.2.6.1 NC 膜流速的优化 NC 膜的流速(velocity of flow, VF)会对试纸条的显色效果产生影响。基于此,选择了 3 种 NC 膜(流速分别为 22.5、33.75、45 cm/s)。向各型号 NC 膜的试纸条样品垫区域精确滴加 100 μL 混合液(含 RPA 扩增产物 10 μL 与流动缓冲液(0.01 mol/L PBS pH7.0)90 μL),5 min 后观察并对比试纸条条带的清晰度以选择最佳型号的 NC 膜。

1.2.6.2 RB 的优化 本实验在选用最佳型号 NC 膜的情况下设计 4 组 RB(RB_1~RB_4): RB_1 为 0.01 mol/L PBS pH7.0; RB_2 为 0.01 mol/L PBS pH7.0、0.05% 吐温-20; RB_3 为 0.01 mol/L PBS pH8.0; RB_4 为 0.01 mol/L PBS pH8.0、0.05% 吐温-20。量取 RB_1~RB_4 4 种缓冲液各 90 μL,分别与 10 μL 的 RPA 扩增产物混合,形成终体积为 100 μL 的待测液,将其滴加至试纸条的样品垫,5 min 后观察试纸条条带清晰度以确定最佳的 RB。

1.2.7 特异性及灵敏度判定 分别以 3 个目标物种: 鸡、猪、马和 9 种非目标物种: 牛、鼠、兔、鸭、鹅、鱼、虾、羊、驴的 DNA 为模板,进行 RPA 扩增。然后通过 AGE 和 NAH-LFS 两种方法对扩增产物进行检测,以检验本研究方法的特异性。具体来看,AGE 检测是将扩增产物在 200 V 恒压下通过 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 观察是否有对应条带的出现; NAH-LFS 检测是将扩增产物与缓冲液混合后滴加至试纸条上样孔,观察对应的 T 线是否出现红色条带。此实验重复 3 次。

根据 1.2.1 中的方法,将鸡、猪和马肉按不同比例掺入驴肉,制作掺假驴肉样品。对各掺假比例的样品进行 DNA 提取和 RPA 扩增,然后通过 AGE 和 NAH-LFS 两种方法对扩增产物进行检测。以肉眼可清晰辨识到与阴性对照组有明显差别的条带所对应的模板浓度作为上述两种方法的最低检出限。为确保结果准确性,此实验重复进行 3 次。

1.2.8 市售实际样品检测 为评估 RPA-NAH-LFS 技术的准确性与实际应用性,研究团队从多个渠道(唐山市生鲜市场、屠宰场、各大超市、餐馆、街摊小

吃及淘宝网）采集了 40 份驴肉制品样本。对采集到的样本，进行基因组 DNA 的提取及 RPA 扩增，并用 NAH-LFS 对扩增产物进行检测，同时采用湖北省最新发布的针对畜禽肉及其肉制品中掺假动物源性成分检测的标准方法（DB42/T 1591-2020）进行验证，以综合判定本研究方法的可靠性与实用性。

1.3　数据处理

各实验重复 3 次，实验数据均使用 Microsoft Excel 2021 进行初步整理与统计；使用 BioRender 软件进行图像绘制；电泳与试纸条系列图像使用智能手机（OPPO Find X7 Ultra）拍摄。

2　结果与分析

2.1　鸡、猪、马特异性引物对的筛选

本研究采用 Primer Premier 5.0 软件，针对鸡、猪和马 3 个物种分别设计了 4 组引物，如表 1。通过 RPA 扩增反应对各引物对进行验证，并利用 2% AGE 分析扩增产物，实验结果如图 2 所示。图 2A 呈现了鸡引物对经 RPA 扩增后的电泳结果，其中泳道 2 的 DNA 条带亮度最高，因此 C_2 为鸡的最优引物对；图 2B 展示了猪引物对的扩增结果，泳道 1 的条

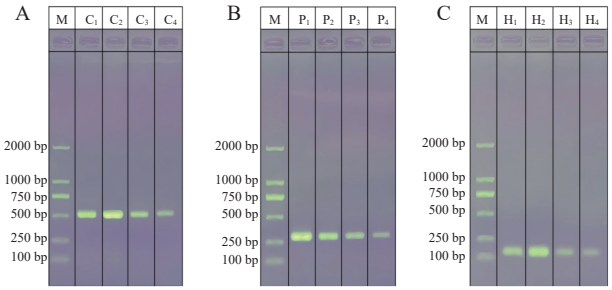


图 2　引物筛选的电泳分析结果

Fig.2　Electrophoretic analysis results of primer screening

注：A 为鸡引物对（C_1~C_4）的筛选结果，C_1~C_4 代表不同序列的鸡引物对；B 为猪引物对（P_1~P_4）的筛选结果，P_1~P_4 代表不同序列的猪引物对；C 为马引物对（H_1~H_4）的筛选结果，H_1~H_4 代表不同序列的马引物对；M 为 D2000 DNA Marker。

表 1　针对鸡、猪、马 3 个物种设计的特异性引物对

Table 1　Specific primer pairs designed for chicken, pork and horse species

物种	组号	正向引物序列（5'→3'）	反向引物序列（5'→3'）
鸡	C_1	CGTCTTCGTCCTCCTCCTAAG	CTTCTGTGATGCTGTGGTGAG
	C_2	CTCAGGGCGGCTTAGAATGA	CGAGGCGATTAGAAGGCTGT
	C_3	GCCTTGCCAACCTTCATCTC	TGAGTGTGAGGAGGAGGATTAC
	C_4	CGGATATGGCATCATACGAGTC	GTAAGAGGCGGTTAGGAGTGT
猪	P_1	AGCCTAAATCTCCCCTCAATG	CGTTTGGGTGTTGGGAATAG
	P_2	CTCAATCCTCCTCGCCTCAG	AGTGGTGGTTGGATGTGAAGT
	P_3	AACTCGGAGGCTATGGCATAA	GTTAGTGTTGGCTAGGCAGAAT
	P_4	CTCAATCCTCCTCGCCTCAG	GTGGTTGGATGTGAAGTGGAAT
马	H_1	CTGCCTTCTCATCCGTCACT	AGGAATGTGTAAGAGCCGTAGT
	H_2	ATCGAGACTATCAGCCTATTTATTCAACCT	CGTAATAAGGGCTGTTGAGGGGCTGATGC
	H_3	GCCTTCTCATCCGTCACTCA	AGGAATGTGTAAGAGCCGTAGT
	H_4	CGACAACTGCCTTCTCATCC	TGTGTAAGAGCCGTAGTAGAGG

表 2　基于 RPA-NAH-LFS 体系的物种特异性引物序列及探针组合设计

Table 2　Optimized primer sequences and probe configurations for the RPA-NAH-LFS system

物种	寡核苷酸链名称		序列（5'→3'）	参与反应	扩增长度（bp）
鸡	正向引物	F-tag-chicken-F	$^{\Delta}$acttatacatacatataatgatg-spacer9-CTCAGGGCGGCTTAGAATGA	RPA	504
	反向引物	R-tag-chicken-R	aacttacacaatagtatctatat-spacer9-CGAGGCGATTAGAAGGCTGT	RPA	
	识别探针	Chicken-SH-probe	CATCATTATATGTATGTATAAGT	NAH-LFS	
	检测探针	biotin-capture-C	ATATAGATACTATTGTGTAAGTT	NAH-LFS	
	质控探针	biotin-control-C	$^{\Delta}$ACTTATACATACATATAATGATG	NAH-LFS	
猪	正向引物	F-tag-pig-F	$^{\Delta}$agtgtaacctcgtacactagatt-spacer9-AGCCTAAATCTCCCCTCAATG	RPA	291
	反向引物	R-tag-pig-R	gacatagatacatcgagatacag-spacer9-CGTTTGGGTGTTGGGAATAG	RPA	
	识别探针	Pig-SH-probe	AATCTAGTGTACGAGGTTACACT	NAH-LFS	
	检测探针	biotin-capture-P	CTGTATCTCGATGTATCTATGTC	NAH-LFS	
	质控探针	biotin-control-P	$^{\Delta}$AGTGTAACCTCGTACACTAGATT	NAH-LFS	
马	正向引物	F-tag-horse-F	$^{\Delta}$atgtatctgtccaaagtaagcca-spacer9-ATCGAGACTATCAGCCTATTTATTCAACCT	RPA	147
	反向引物	R-tag-horse-R	tccatcggcatagagaaagctac-spacer9-CGTAATAAGGGCTGTTGAGGGGCTGATGC	RPA	
	识别探针	Horse-SH-probe	TGGCTTACTTTGGACAGATACAT	NAH-LFS	
	检测探针	biotin-capture-H	GTAGCTTTCTCTATGCCGATGGA	NAH-LFS	
	质控探针	biotin-control-H	$^{\Delta}$ATGTATCTGTCCAAAGTAAGCCA	NAH-LFS	

注：各物种正向与反向引物结构包含3部分：拖尾序列（小写字母）、Spacer9间隔区、引物序列（大写字母）。其中，每个物种中颜色相同的序列为反向互补序列（正向引物中的拖尾序列与识别探针互补，反向引物中的拖尾序列与检测探针互补）；每个物种中$^{\Delta}$标记的区域为两段相同的核酸序列，即质控探针序列与正向引物拖尾序列相同、与识别探针互补。

带亮度显著高于其他泳道，表明引物对 P_1 是猪的最适引物对；图 2C 显示马引物对的扩增电泳结果，泳道 2 的 DNA 条带最亮，因此选择引物对 H_2 为马的最优引物对。基于上述实验数据，最终确定的最优引物对分别为鸡：引物对 C_2（正向引物：CTCAGGGCGGCTTAGAATGA，反向引物：CGAGGCGATTAGAAGGCTGT），猪：引物对 P_1（正向引物：AGCCTAAATCTCCCCTCAATG，反向引物：CGTTTGGGTGTTGGGAATAG）和马：引物对 H_2（正向引物：ATCGAGACTATCAGCCTATTTATTCAACCT，反向引物：CGTAATAAGGGCTGTTGAGGGGCTGATGC），各物种完整的最优引物对、识别探针、检测探针与质控探针序列信息详见表 2。

2.2 RPA 的最优反应条件

为提升 RPA 扩增效率及特异性，对反应条件进行优化。结果如图 3 所示，图 3A 中，第 3 条泳道（39 ℃）条带最亮，因此确定 39 ℃ 为 RPA 的最佳反应温度；图 3B 中，2、3、4 泳道（分别为 10、15、20 min）条带亮度相同，为缩短反应时间，选择 10 min 作为最佳反应时间；图 3C 中，第 2 条泳道（Mg^{2+}加入量为 2.5 μL）条带最亮，因此确定 2.5 μL 为最佳 Mg^{2+}加入量；图 3D 中，第 2 条泳道（鸡、猪、马引物加入量分别为 0.7、0.7、1 μL）条带最亮，确定其为最佳的引物体积。因此 RPA 的最优反应体系为扩增温度：39 ℃，孵育时间：10 min，Mg^{2+}（280 mmol/L）加入量：2.5 μL，鸡、猪、马引物加入量：0.7、0.7、1 μL。具体试剂组分如表 3 所示。

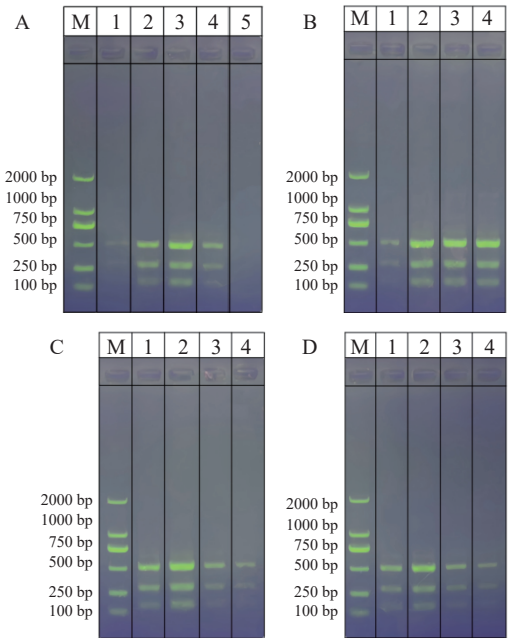


图 3 RPA 反应条件优化的电泳分析结果

Fig.3 Electrophoretic analysis results of RPA reaction parameter optimization

注：A（扩增温度优化）：1~5 分别对应 37、38、39、40、41 ℃；B（孵育时间优化）：1~4 分别对应 5、10、15、20 min；C（Mg^{2+}加入量优化）：1~4 分别对应 2.0、2.5、3.0、3.5 μL；D（引物加入量优化）：1~4 分别对应鸡、猪、马引物加入量为 1、0.7、0.7 μL；0.7、0.7、1 μL；0.7、1、0.7 μL；0.7、0.7、0.7 μL；M 为 D2000 DNA Marker。

表 3 RPA 最优反应体系组分

Table 3 Optimal composition of the RPA reaction system

反应成分	加入体积（μL）
Rehydration缓冲液	29.5
正向引物-鸡（10 μmol/L）	0.7
反向引物-鸡（10 μmol/L）	0.7
正向引物-猪（10 μmol/L）	0.7
反向引物-猪（10 μmol/L）	0.7
正向引物-马（10 μmol/L）	1.0
反向引物-马（10 μmol/L）	1.0
DNA模板-鸡	1.0
DNA模板-猪	1.0
DNA模板-马	1.0
冻干酶	1粒
Mg^{2+}（280 mmol/L）	2.5
无菌水	10.2
总体积	50.0

2.3 侧流层析试纸条的最优工作条件

通过对不同流速的 NC 膜及不同的 RB 进行试验，得到结果如图 4 所示。图 4A 中，2 号试纸条（VF=33.75 cm/s）显色效果最佳；图 4B 中，4 号试纸条（RB_4）显色效果最佳。因此最终选用的 NC 膜流速为：VF=33.75 cm/s 型，流动缓冲液为：RB_4。

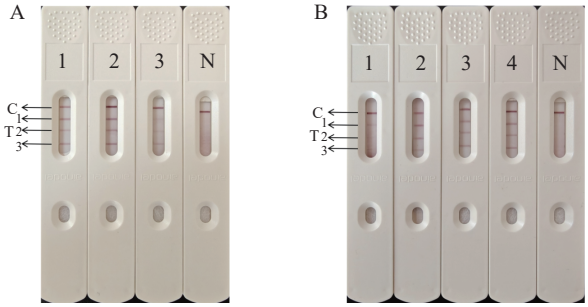


图 4 NAH-LFS 体系中 NC 膜型号和 RB 参数的优化结果

Fig.4 Optimization results of NC film type and RB parameters in NAH-LFS system

注：A（NC 膜的优化）：1~3 分别对应 VF=22.5、33.75、45 cm/s，N 为阴性对照；B（RB 的优化）：1~4 分别对应 RB_1、RB_2、RB_3、RB_4，N 为阴性对照。

2.4 核酸杂交侧流层析试纸条特异性及灵敏度判定

分别对鸡、猪、马及另外 9 种动物的 DNA 进行 RPA 扩增，并采用 AGE 和 NAH-LFS 同时对扩增产物进行检测，实验结果如图 5 所示。图 5A AGE 结果表明，当 RPA 体系中同时存在鸡、猪、马 DNA 时，分别在 504 bp（鸡源）、291 bp（猪源）及 147 bp（马源）位置观察到特异性扩增条带，而牛、羊等 9 种非目标物种 DNA 不能产生 RPA 扩增产物。图 5B NAH-LFS 检测结果显示，鸡、猪、马 RPA 扩增产物可同时使质控线（C 线）与对应物种检测线（T_1~T_3）显色，其余物种扩增产物仅使 C 线显色（阴性判读标

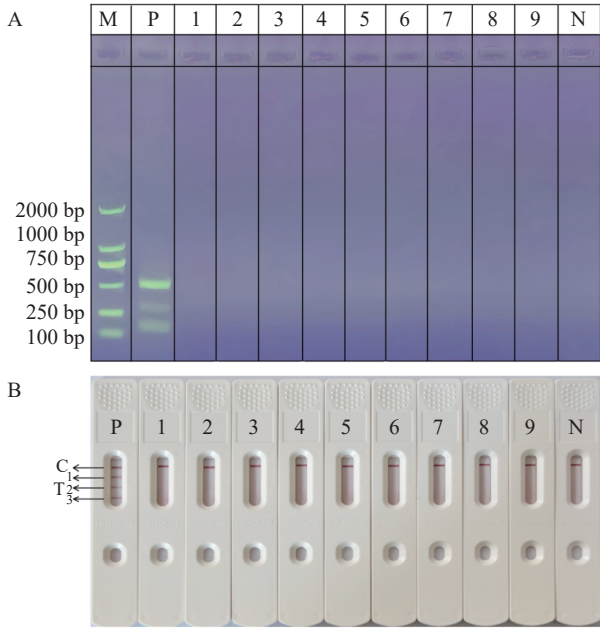


图 5　RPA-AGE(A)与 RPA-NAH-LFS(B)体系的物种特异性检测

Fig.5　Specificity validation of RPA on AGE (A) and RPA-NAH-LFS (B)

注：M 为 D2000 DNA Marker，P 为阳性对照(鸡源：504 bp、猪源：291 bp、马源：147 bp)，1~9 分别代表牛、鼠、兔、鸭、鹅、鱼、虾、羊、驴肉样本，N 为阴性对照。

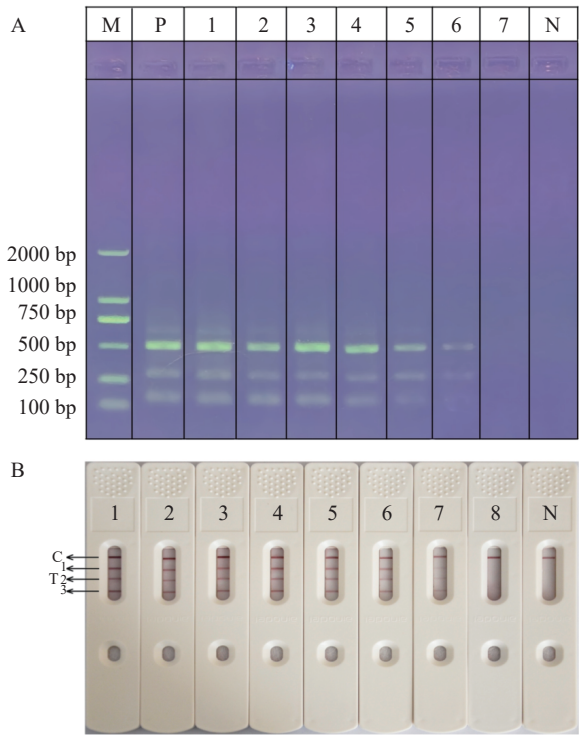


图 6　RPA-AGE(A)与 RPA-NAH-LFS(B)对鸡、猪、马源性成分的灵敏度检测

Fig.6　Sensitivity test of RPA on AGE (A) and NAH-LFS (B) for the detection of chicken, pork, and horse adulteration

注：A 中 M 为 D2000 DNA Marker；P 为阳性模板对照，1~7 分别代表驴肉基质中鸡、猪、马源性成分的掺假浓度梯度为 30%、15%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%，N 为阴性对照；B 中 1~8 分别代表驴肉基质中鸡、猪、马源性成分的掺假浓度梯度为 30%、15%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%，N 为阴性对照。

准)，验证了 RPA-NAH-LFS 的检测特异性。

为系统评估检测灵敏度，对构建的梯度掺假样本（0.001%~30%，w/w）进行 RPA-AGE 和 RPA-NAH-LFS 检测。图 6A 结果显示，鸡、猪、马掺假比例≥0.1%(w/w)时，在 AGE 上有肉眼可见的特异性条带，而<0.1%(w/w)组未观察到明显条带。图 6B NAH-LFS 检测结果表明，当掺假比例≥0.01%(w/w)时，T_1~T_3 检测线均呈现肉眼可见的红色条带，其可视化检测灵敏度较传统电泳技术提升 10 倍。因此，本研究建立的 RPA-NAH-LFS 体系可实现驴肉基质中 0.01%(w/w)掺假比例的鸡、猪、马源性成分的同时检测，且检测时间缩短至 15 min(包括 10 min 的 PRA 扩增与 5 min 的 NAH-LFS 检测)。

2.5　市售实际样品检测

为验证 RPA-NAH-LFS 检测体系的实际应用性，本研究从唐山市生鲜市场、屠宰场、各大超市、餐馆、街摊小吃及淘宝网等多渠道获取 40 份驴肉制品，构建涵盖酱香卤驴肉(n=5)、驴肉火烧(n=5)、驴肉包子(n=5)、驴肉蒸饺(n=5)、生鲜驴肉(n=10)及火锅驴肉卷(n=10)的样本库。通过 RPA-NAH-LFS 方法检测发现，编号 4 的驴肉包子样本同时检出鸡源(T_1)与猪源(T_2)成分；编号 2 的火锅驴肉卷样本检出猪源(T_2)成分。进一步采用湖北省最新发布的针对畜禽肉及肉制品中掺假动物源性成分检测的标准方法(DB42/T 1591-2020)对所有样本进行复检，结果显示两种方法检测结果 100% 一致，证实本研究方法对实际肉类样本检测的可靠性。表 4 详细展示了样本来源、加工类型及检测结果。本检测体系通过多靶标同步识别与可视化结果判读，为肉类制品真实性监管提供方法支持，其快速筛查能力与现场适应性凸显其在市场监管中的应用潜力。

表 4　基于 RPA-NAH-LFS 与标准检测方法对比的市售肉类制品检测结果

Table 4　Testing results of commercial meat products using the RPA-NAH-LFS and the standard detection method

编号	市售样品名称	样品来源	所标肉类成分	检测结果					
				RPA-NAH-LFS			DB42/T 1591-2020		
				鸡	猪	马	鸡	猪	马
1	酱香卤驴肉1	餐馆		–	–	–	–	–	–
2	酱香卤驴肉2	餐馆		–	–	–	–	–	–
3	酱香卤驴肉3	餐馆	驴肉	–	–	–	–	–	–

续表 4

编号	市售样品名称	样品来源	所标肉类成分	检测结果					
				RPA-NAH-LFS			DB42/T 1591-2020		
				鸡	猪	马	鸡	猪	马
4	酱香卤驴肉4	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
5	酱香卤驴肉5	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
1	驴肉火烧1	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
2	驴肉火烧2	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
3	驴肉火烧3	街摊小吃	驴肉	−	−	−	−	−	−
4	驴肉火烧4	餐馆		−	−	−	−	−	−
5	驴肉火烧5	餐馆		−	−	−	−	−	−
1	驴肉包子1	餐馆		−	−	−	−	−	−
2	驴肉包子2	餐馆		−	−	−	−	−	−
3	驴肉包子3	餐馆	驴肉	−	−	−	−	−	−
4	驴肉包子4	餐馆		+	+	−	+	+	−
5	驴肉包子5	餐馆		−	−	−	−	−	−
1	驴肉蒸饺1	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
2	驴肉蒸饺2	街摊小吃		−	−	−	−	−	−
3	驴肉蒸饺3	街摊小吃	驴肉	−	−	−	−	−	−
4	驴肉蒸饺4	餐馆		−	−	−	−	−	−
5	驴肉蒸饺5	餐馆		−	−	−	−	−	−
1	生鲜驴肉样品1	屠宰场		−	−	−	−	−	−
2	生鲜驴肉样品2	屠宰场		−	−	−	−	−	−
3	生鲜驴肉样品3	屠宰场		−	−	−	−	−	−
4	生鲜驴肉样品4	屠宰场		−	−	−	−	−	−
5	生鲜驴肉样品5	屠宰场		−	−	−	−	−	−
6	生鲜驴肉样品6	超市	驴肉	−	−	−	−	−	−
7	生鲜驴肉样品7	超市		−	−	−	−	−	−
8	生鲜驴肉样品8	超市		−	−	−	−	−	−
9	生鲜驴肉样品9	超市		−	−	−	−	−	−
10	生鲜驴肉样品10	超市		−	−	−	−	−	−
1	火锅驴肉卷1	淘宝网		−	−	−	−	−	−
2	火锅驴肉卷2	淘宝网		−	+	−	−	+	−
3	火锅驴肉卷3	淘宝网		−	−	−	−	−	−
4	火锅驴肉卷4	淘宝网		−	−	−	−	−	−
5	火锅驴肉卷5	淘宝网		−	−	−	−	−	−
6	火锅驴肉卷6	超市	驴肉	−	−	−	−	−	−
7	火锅驴肉卷7	超市		−	−	−	−	−	−
8	火锅驴肉卷8	超市		−	−	−	−	−	−
9	火锅驴肉卷9	超市		−	−	−	−	−	−
10	火锅驴肉卷10	超市		−	−	−	−	−	−

注: “+”符号代表目标物种源性成分检出, 即阳性结果; “−”符号代表目标物种源性成分未检出, 即阴性结果。

3 讨论与结论

肉类真实性鉴定研究领域, 已有大量相关研究。赵静远等[25] 利用高光谱成像的无损定量检测方法因操作简便、无需破坏样本等优势受到关注, 但其实际应用有明显的局限性, 如低灵敏度、弱抗干扰性及模型依赖性等, 导致其难以替代主流分子生物学技术。陈东昌[26] 开发的 LAMP-免疫层析试纸条法虽能检测 1 pg 的鸡肉 DNA, 人工模拟肉类掺假的检测限为 0.12%(w/w), 但因 LAMP 引物设计复杂且免疫层析试纸条成本较高, 难以在现场即时检测中广泛使用; 胡学佳[27] 利用跨越式滚环恒温扩增技术(saltatory rolling circle amplification, SRCA)[28] 检测牛肉中的马肉和猪肉, 虽灵敏度达 0.01%(w/w), 却存在引物设计复杂、易产生副产物等局限性; CAO 等[29] 基于 RPA 结合 SYBR Green I 的荧光检测法虽实现 1%(w/w)掺假水平的可视化检测, 但其需要额外的荧光检测器。相比之下, 本研究采用 RPA 与 NAH-LFS 结合的技术具有特异性强、灵敏度高、10 min 快速扩增及引物设计简便等显著优势, 更适合现场快速检测[30]。如表 5 所示, 通过与其他多种方法进行系统的比较, RPA-NAH-LFS 在检测速度、设备依赖性及操作复杂度等关键性能指标上均展现出显著优势。

本研究成功建立了一种基于双拖尾重组酶聚合

表 5　不同肉类真实性检测技术的性能对比分析

Table 5　Comparative performance analysis of methodologies for meat authenticity verification

方法	时间	仪器	灵敏度	优点	缺点
电子鼻/电子舌	5~15 min	便携式气体传感器阵列	5%	快速、低成本、可现场操作	准确度低(≤80%)，易受温湿度影响，重复性差
近红外光谱	10~30 min	台式光谱仪+化学计量学软件	3%	可同时分析成分(水分/脂肪/蛋白)	对加工肉敏感度低，需复杂预处理，水分干扰大
高光谱成像	20~60 min	高光谱相机+图像处理工作站	1%	具有空间分辨能力(定位掺假区域)	数据冗余大，处理耗时，深层掺假分辨力弱
质谱法[31]	1~3 h	LC-MS/MS系统	0.1%	可多物种同步检测、结果较权威	设备昂贵(>100万元)、需高级技术人员
免疫分析	3~10 min	胶体金试纸条+读卡器	1%	操作简单、无需专业培训	仅定性/半定量，热加工样本易假阴性
PCR[32]	1~3 h	热循环仪	0.1%	高特异性；可定量；产物适用于测序	依赖精密仪器；耗时；需温度循环
RCA[33]	30 min~2 h	恒温设备	0.01%	等温扩增；适用于环形模板(如质粒、病毒基因组)	依赖预环化模板；多重扩增困难；非特异性背景较高
CPA[34]	40~60 min	恒温设备	0.1%	等温扩增；灵敏度接近PCR	引物设计复杂(需4~6条引物)；优化难度大
LAMP[35]	15~60 min	恒温设备	0.05%	快速；高产物量；可视化检测(浊度/pH指示剂)	引物设计复杂(需4~6条引物)；易产生气溶胶污染；产物难以直接测序
RPA[36]	10~30 min	恒温设备(或便携式仪器)	0.01%	超快速；常温反应(35~42 ℃)；低能耗；适用于现场检测	反应条件较严格；专利限制

酶恒温扩增(RPA)与核酸杂交侧流层析试纸条(NAH-LFS)的多重可视化检测技术，实现了驴肉及其他肉类制品中鸡、猪、马源性成分的同步、快速鉴别。通过设计含 spacer9 间隔区与单链标签序列的双拖尾引物，结合胶体金探针杂交层析体系，可在 15 min 内完成“扩增-检测”全流程(10 min RPA 扩增+5 min LFS 显色)，灵敏度达 0.01%(w/w)，且对牛、羊等 9 种非目标肉类无交叉反应。系统优化表明，该技术在 39 ℃、特定 Mg^{2+}浓度(280 mmol/L)及定制引物配比条件下性能最优，并匹配高流速 NC 膜(33.75 cm/s)与专用缓冲液(RB_4)以保障显色可靠性。经 40 份市售驴肉样品验证，所检出的猪肉与鸡肉成分与标准方法(DB42/T 1591-2020)结果完全一致，证实了本方法的准确性与实用性。同时，RPA-NAH-LFS 技术还实现了三重创新设计：a.免热循环：突破 PCR 对仪器的依赖，实现恒温扩增；b.多靶标同步可视化：单次检测可并行输出 3 种掺假成分结果；c.现场适配性：操作简易、无需专业实验环境，满足 POCT 需求，为市场监管部门实施肉类真实性快速筛查提供了方法支持。

© 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] 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 Guoqiang, LUO Jianxing, QI Lemuge, et al. Analysis of authenticity and adulteration of donkey meat in online sales markets[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(9): 2816−2821.]

[2] 孔丽琴, 牛晓虎, 王程磊, 等. 高光谱技术在牛肉丸复合掺假类型鉴别中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2024, 44(8): 2183−2191. [KONG Liqin, NIU Xiaohu, WANG Chenglei, et al. Application of hyperspectral imaging technology in the identification of composite adulteration type in beef balls[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2024, 44(8): 2183−2191.]

[3] 李伟琦. 食品中动物源性成分数字 PCR 定量检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [LI Weiqi. Studies on quantitative detection methods for animal-derived ingredients in foods by digital PCR[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]

[4] LU Lin, HU Zhanqiang, HU Xianqiao, et al. Electronic tongue and electronic nose for food quality and safety[J]. Food Research International, 2022, 162: 112214.

[5] MUNEKATA P E S, FINARDI S, de SOUZA C K, et al. Applications of electronic nose, electronic eye and electronic tongue in quality, safety and shelf life of meat and meat products: A review[J]. Sensors, 2023, 23(2): 23020672.

[6] SINGH YADAV S, TARIQ R, KUMAR PADHY P, et al. A multiplex DNA probe-based method for simultaneous identification of adulteration in meat samples[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2024, 8: 100200.

[7] LIU Yachao, LI Yongyu, PENG Yankun, et al. Detection of fraud in high-quality rice by near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(9): 2773−2782.

[8] YIN Rui, SUN Yajuan, WANG Kangyu, et al. Development of a PCR-based lateral flow strip assay for the simple, rapid, and accurate detection of pork in meat and meat products[J]. Food Chemistry, 2020, 318: 126541.

[9] MATHAY M, KELLER A, BRUCE J E. Studying protein-ligand interactions by protein denaturation and quantitative cross-linking mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(25): 9432−9436.

[10] AFIFA KHATUN M, HOSSAIN A, HOSSAIN M S, et al. Detection of species adulteration in meat products and Mozzarella-type cheeses using duplex PCR of mitochondrial *cyt b* gene: A food safety concern in Bangladesh[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 2: 100017.

[11] AL-KAHTANI H A, ISMAIL E A, ASIF AHMED M. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques[J]. Food Chemistry, 2017, 219: 54−60.

[12] SCHJEIDE B M, SCHENKE M, SEEGER B, et al. Valida-

tion of a novel double control quantitative copy number PCR method to quantify off-target transgene integration after CRISPR-induced DNA modification[J]. Methods and Protocols, 2022, 5(3): 5030043.

[13] ZHAO Yongxi, CHEN Feng, LI Qian, et al. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. Chemical Reviews, 2015, 115(22): 12491−12545.

[14] LIU Yaqun, LIN Liyun, WEI Huagui, et al. Design and development of a rapid meat detection system based on RPA-CRISPR/Cas12a-LFD[J]. Current Research in Food Science, 2023, 7: 100609.

[15] XIAO Bin, ZHAO Ruiming, WANG Nan, et al. Integrating microneedle DNA extraction to hand-held microfluidic colorimetric LAMP chip system for meat adulteration detection[J]. Food Chemistry, 2023, 411: 135508.

[16] XIE Guoyang, ZHAN Zhongxu, YE Yu, et al. Hybrid RCA-DLS assay combined with aPCR for sensitive *Salmonella enteritidis* detection[J]. Analytical Biochemistry, 2022, 646: 114647.

[17] QIAO B, CUI J Y, SUN L, et al. Cross-priming amplification targeting the coagulase gene for rapid detection of coagulase-positive *Staphylococci*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(1): 188−195.

[18] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR?[J]. Cells, 2021, 10(8): 10081931.

[19] CAO Gaihua, YANG Nannan, XIONG Yifan, et al. Completely free from PAM limitations: Asymmetric RPA with CRISPR/Cas12a for nucleic acid assays[J]. ACS Sensors, 2023, 8(12): 4655−4663.

[20] LIU Yuelin, LIU Libing, WANG Jinfeng, et al. Rapid detection of bovine rotavirus a by isothermal reverse transcription recombinase polymerase amplification assays[J]. BMC Veterinary Research, 2022, 18(1): 339.

[21] EL-SHALL M N, ALY I, SAMEN A, et al. Immunochromatography lateral flow strip enhancement based on passive gold nanoparticles conjugation to detect *Schistosma haematobium* antigens in human serum[J]. Acta Parasitologica, 2024, 69(2): 1267−1274.

[22] 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 Zhen. 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.]

[23] 万涛, 王跃川. 反胶束法纳米 TiO_2 的 UV-vis 和 TEM 研究[J]. 精细化工, 2005, 22(11): 809−813. [WAN Tao, WANG Yuechuan. UV-vis spectrum and TEM study of nanosized titania synthesized by reverse micelles[J]. Fine Chemicals, 2005, 22(11): 809−813.]

[24] 曹婷婷, 袁毅, 王晶, 等. 双拖尾重组聚合酶恒温扩增技术结合核酸杂交侧流条快速检测牛肉中的鸡、鸭、猪源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 119−128. [CAO Tingting, YUAN Yi, WANG Jing, et al. Nucleic acid hybridization-lateral flow strip combined with double tailed recombinase polymerase amplification for rapid detection of chicken, duck and pig adulteration in beef[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(15): 119−128.]

[25] 赵静远, 张俊芹, 孙梅, 等. 基于高光谱成像的羊肉掺假可视化无损定量检测[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 61−68. [ZHAO Jingyuan, ZHANG Junqin, SUN Mei, et al. Visualization of lamb adulteration based on hyperspectral imaging for non-destructive quantitative detection[J]. Food and Machinery, 2022, 38(10): 61−68.]

[26] 陈东昌. 基于环介导等温扩增技术的食品源鸡肉成分检测方法的开发[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. [CHEN Dongchang. Development of methods for detection of food source chicken ingredients based on loop-mediated isothermal amplification[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.]

[27] 胡学佳. 跨越式滚环等温扩增技术检测牛肉及其制品中马肉和猪肉掺假的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2020. [HU Xuejia. The saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of pork and horsemeat adulteration in beef and its products [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2020.]

[28] YANG Qian, ZHANG Yunzhe, LI Sen, et al. Saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(11): 9702−9710.

[29] CAO Yuhao, ZHENG Kaizhi, JIANG Junfang, et al. A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I[J]. Food Chemistry, 2018, 266: 73−78.

[30] GREEN M R, SAMBROOK J. Polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2020, 2020(12): 100412.

[31] AZOV V A, MUELLER L, MAKAROV A A. Laser ionization mass spectrometry at 55: Quo vadis?[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2022, 41(1): 100−151.

[32] DOROUDIAN M, SOEZI M, RASOULI M, et al. Identification of meat adulteration in minced meat samples labeled as beef and mutton in Tehran stores using duplex PCR[J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(10): 7504−7511.

[33] GAO Yongping, HUANG Kejing, WANG Futing, et al. Recent advances in biological detection with rolling circle amplification: Design strategy, biosensing mechanism, and practical applications[J]. Analyst, 2022, 147(15): 3396−3414.

[34] QIU Xiaotong, XU Shuai, LIU Xueping, et al. A CRISPR-based nucleic acid detection platform (CRISPR-CPA): Application for detection of *Nocardia farcinica*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(5): 3685−3693.

[35] PRIYA G B, AGRAWAL R K, MILTON A A P, et al. Rapid and visual detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in carabeef meat harnessing loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2024, 55(2): 1723−1733.

[36] BAI Wenxia, CHEN Jie, CHEN Dong, et al. Sensitive and rapid detection of three foodborne pathogens in meat by recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick (RPA-LFD)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 422: 110822.