

综述

重组酶恒温扩增技术在动植物源成分分析中的应用与研究进展

史贇学¹,王鑫²,王峻¹,姚华¹,吴宇³

(1. 成都产品质量检验研究院有限公司,四川成都 610000;2. 空军通信士官学校,辽宁大连 116600;
3. 四川省食品检验研究院,四川成都 610000)

摘要:近年来,以肉制品和转基因农作物掺假掺杂为主的动植物源成分分析成为食品安全研究及监管领域关注的重点,对于靶向物检测水平的要求也逐渐提高。重组酶恒温扩增技术是一种具有实用性和发展前景的检测技术,包括重组酶聚合酶恒温扩增(RPA)和重组酶介导的恒温扩增(RAA)等,因其具备快速便捷、灵敏度高、特异性强等优点,广泛应用于动植物源成分检测及各类分析研究领域。本文综合近年来国内外相关研究,归纳了现有分析检测方法,从引物探针设计、外界影响因素、反应装置和检测途径4个方面对RPA/RAA技术的特点及应用进行概述,并对该领域发展趋势进行展望,为动植物源成分检测方法的完善和重组酶恒温扩增技术的应用提供参考。

关键词:重组酶扩增技术;动物源;植物源;快速检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)02-0231-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.02.019

Application and research progress of recombinase isothermal amplification technology in the analysis of animal and plant components

SHI Yunxue¹, WANG Xin², WANG Jun¹, YAO Hua¹, WU Yu³

(1. Chengdu Institute of Product Quality Inspection Co., Ltd., Sichuan Chengdu 610000, China;
2. Air Force Communication Non-commissioned Officer School, Liaoning Dalian 116600, China;
3. Sichuan Institute of Food Inspection, Sichuan Chengdu, 610000)

Abstract: Recently, the analysis of animal- and plant-derived components, mainly based on the adulteration and smuggling of meat products and genetically modified crops, has been a key focus in the field of food safety. Therefore, the requirement for analytical methods has been increasingly emphasized. Recombinase isothermal amplification is a novel and promising detection technique that currently includes recombinase polymerase amplification (RPA) and recombinase-aided amplification (RAA). This technique has been widely used in animal- and plant-derived component analysis and other detection and analysis fields owing to its speed, convenience, and high sensitivity and specificity. This paper summarizes relevant research conducted locally and abroad in recent years and concludes with an analysis of various detection methods. It also generalizes the characteristics and applications of RPA/RAA technology in four aspects: primer-probe design, external factors, reaction devices, and detection methods, and lays out the prospects for RPA/RAA development trends. Finally, this study also provides a reference for improving the analysis and detection methods of animal- and plant-derived components and promoting RPA/RAA technology.

Key words: Recombinase amplification technology; animal and plant sources; rapid detection

近年来,随着食品安全问题的频繁被报道以及经济和贸易全球化脚步的加快,食品问题已经严重影响社会的公共卫生安全,世界各国也都加大了相关领域的监管力度和科研投入^[1]。动物源与植物源

成分鉴定是目前关注的热点问题之一,随着需求量的增长以及利益驱使,肉及肉制品造假掺假事件屡见不鲜,2013年在欧洲消费市场便有因马肉替换牛肉而爆发的“马肉风波”^[2-3],梭鱼当作金枪鱼销售引发的鱼肉造假事件^[4]。国内也有臭名昭著的狐狸肉事件,不仅扰乱正常市场秩序,甚至引发宗教矛盾^[5-6]。动植物源性食品作为人类饮食的主要构成,在提供人体日常的脂肪、碳水和蛋白质需求外,同时也是微量元素和膳食纤维的主要来源。其中植物源成分相关的食品问题则集中体现在转基因农

收稿日期:2022-06-17

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划项目(2021MK096)

作者简介:史贇学 男 助理研究员 研究方向为食品安全与控制 E-mail:872551416@qq.com

通信作者:吴宇 男 高级工程师 研究方向为食品化工检测 E-mail:9934448@qq.com

作物及其制品^[7-9],目前大部分国家对于转基因农产品都有较为严格的管理措施及安全评价,管理主要涉及农作物对人和农作物生态安全方面,而安全性评价则主要考察转基因作物所带来的食品与环境的安全性。食品安全性包括转基因作物的过敏性评价、毒理学评价和营养学评价,环境安全性则体现在转基因作物对生物多样性的影响、生存竞争效果及基因迁移所带来的生态风险^[10-12]。而动植物源成分的鉴定分析工作则是打击掺假掺杂、保障人民健康和维持正常市场秩序的重要环节。

动植物源成分的分析鉴定已被列为我国食品风险监测的常规项目,目前主要采用理化方法、蛋白质水平分析以及核酸水平分析等技术手段进行鉴定^[13-15]。近年来,随着分子生物学检测技术的飞速发展,基于恒温扩增的重组酶技术得到了广泛应用。这一技术不仅降低了对仪器和检测环境的依赖,还优化了核酸扩增过程中时间长、步骤多的问题。在当前食材从生长到餐桌供应链日益复杂的背景下,建立准确、灵敏且快捷的动植物源检测方法显得尤为重要。这些技术的不断进步和应用,为食品安全提供了有力保障。

1 动植物源成分鉴定分析研究概况

1.1 蛋白质水平检测技术

以蛋白质为基础的动植物源检测方法主要包含了电泳及免疫学检测两种^[16],电泳技术主要以蛋白质的物理及化学性质对检测物中的目的蛋白进行分离,而免疫学检测以酶联免疫法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫印迹法(Western blotting)使用最为广泛,两种方法都是利用抗原抗体发生免疫反应来实现检测目的^[17-18]。目前商业量产的ELISA试剂盒已广泛应用在肉类食品检测及转基因农产品的分析鉴定中,例如利用肉制品在热处理过程中产生的肌钙蛋白TnI可以用作区分动物类别的信号蛋白使用,利用信号蛋白判断来源,从而达到肉制品鉴定的目的。该方法因操作简单且需样量较少等优点,迅速在动植物源检测领域得到广泛应用,但同时存在着样品热处理导致的方法灵敏度下降、蛋白间存在干扰导致的假阳性等问题^[19]。

1.2 基因水平检测技术

基因水平的检测方法主要以检测目标动植物样品是否含有特定的外源DNA片段为主,可以分为外源基因序列、外源调控序列及外源载体序列3种,在此基础上其检测方法可分为基因筛选、结构特异性试验、事件特异性试验和基因特异性试验四

种。目前,关于基因筛选和特异性检测的方法已相当成熟和多样化^[20-21]。

1.3 聚合酶链式反应

传统的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术是采用一组寡核苷酸引物短时间高效地扩增目的基因片段,是目前最常见的DNA片段体外放大方法,被广泛应用在生命科学及检测领域,并由此拓展出多种进阶技术^[22]。

多重PCR在拥有传统PCR技术成本低廉、操作高效省时等优点的同时可以对同一组分下的不同目的基因片段进行快速扩增,实现对多种目标物的检测分析^[23]。例如刘婉婉^[24]建立了可以同时检测肉制品中猪牛羊鸡鸭等十一种动物源成分的多重PCR方法,该方法采用降落PCR的理念,先使用高退火温度71℃进行10次循环,再使用60℃进行25次循环,并以市售肉源进行测定,其灵敏度最高可达0.05 ng/ μ L。而董立明等^[25]则利用转基因水稻中常用的CaMV5S启动子等五种基因为研究对象,结合使用FAM在内的五种荧光信号,建立了筛查转基因水稻的多重实时荧光定量PCR方法,灵敏度可达到0.032%。

数字PCR(Digital PCR, dPCR)的概念于20世纪末由VOGELSTEIN等提出^[26],原理是将含有目标样品DNA的溶液分散在数以万计的微滴或微孔中,然后独立对每个微滴或微孔进行扩增,再对扩增时的荧光信号进行收集,并根据泊松公式(Poisson distribution)计算出样品拷贝数,从而实现目的基因的定量检测^[27]。赵新等^[28]为鉴定抗除草剂的转基因大豆品种“GE-J12”中外源基因拷贝数建立的微滴数字PCR检测方法,检测得到“GE-J12”的外源目的基因G2-EPSPS与GAT在基因组的插入拷贝数均值为0.99和1.01,检测结果与Southern blot方法一致,同时该团队也建立了可以检测肉制品中羊源成分的基于单拷贝核基因的数字PCR方法^[29]。

1.4 传统恒温扩增技术

传统的恒温扩增一般指代LAMP(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术^[30],依赖核酸序列的扩增(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)技术^[31]和依赖解旋酶扩增(Helicase-dependent amplification, HDA)技术^[32],在此基础上,后续也演变出来多种核酸扩增技术,例如滚环式扩增(Rolling circle amplification, RCA)、多重置换式扩增(Multiple displacement amplification, MDA)、链置换式扩增(Strand displacement amplification, SDA)等,这些恒温扩增技术虽然都有

着灵敏度高、特异性强的优点,但同时也有温控设备依赖性高、技术操作难度大、使用范围限制大等缺点^[33]。

1.5 重组酶恒温扩增技术

重组酶恒温扩增技术是在传统恒温扩增的思路改进得到的体外 DNA 扩增技术,原理是来自细菌或真菌的重组酶蛋白与寡核苷酸引物结合形成络状复合物,再与解链后的单链 DNA 结合阻挡单链 DNA 降解,从而使 DNA 延伸并复制^[34-35],反应机制如图 1 所示。目前有重组酶聚合酶的恒温扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术以及重组酶介导的恒温扩增(Recombinase aided amplification, RAA)技术。RPA 扩增技术由 TwistDx 公司开发,以噬菌体的核酸复制为原型,利用重组酶(UvsX/UvsY)与单链 DNA 结合蛋白(gp32)在常温状态下协同作用引导寡核苷酸引物与目的片段特异性结合^[36-37],RPA 技术发展至今,在各个检测领域都发挥着重要作用。而 RAA 技术作为我国自主知识产权的核酸扩增技术,相比 RPA 技术来说其反

应所需的重组酶更加广泛易得,使得恒温扩增技术的推广更加快速、丰富^[38]。两种技术均通过重组酶结合、链置换、复制延伸从而实现 DNA 的体外扩增,不同的是 RPA 技术中使用的是来源于噬菌体的重组酶,而 RAA 技术则使用更为易得的细菌或真菌重组酶。与传统的 PCR 扩增区别的是,重组酶恒温扩增技术全程没有 DNA 解旋,退火等步骤,也没有多组温度的循环,整个反应可在 25~45 °C 下循环进行,因此,重组酶恒温扩增所需的引物对退火温度无需特殊要求,设计难度降低。LILLIS 等人研究发现,RPA 体系的最佳反应温度在 31~43 °C 之间,而当反应温度低于 30 °C 时,结果出现假阳性^[39]。同时重组酶恒温扩增的时间也缩短到 20 min 以内,降低了扩增过程对于仪器设备的依赖,检测样本涵盖了 DNA、RNA、miRNA、ssDNA 和 dsDNA 等多种^[40]。适用的检测分析场景更加多元。本研究针对重组酶恒温扩增技术的反应原理、方法特点及方法在动植物源检测领域的应用进行分析和总结,并对未来动植物源检测方法进行展望。

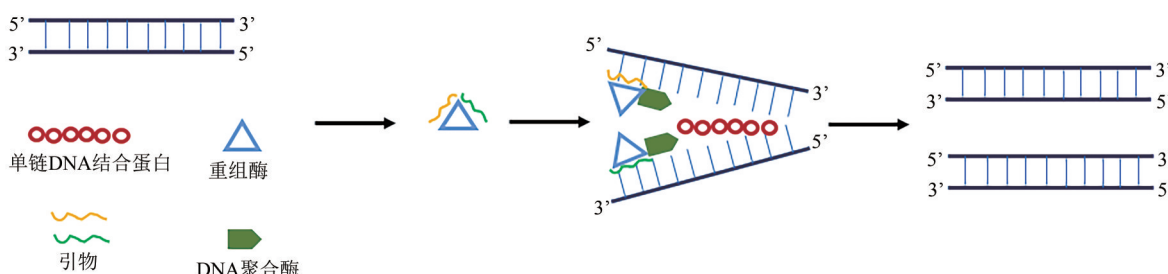


图 1 重组酶恒温扩增原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of the principle of isothermal amplification of recombinase

2 RPA/RAA 反应体系及要求

2.1 RPA/RAA 引物及探针设计

由于没有专门针对重组酶恒温扩增所需引物的设计软件,目前参考 PCR 引物设计原则或是参照 Twist Dx 公司相关试剂盒中的引物设计指南。多数文献研究表明,重组酶扩增的目的基因大小范围在 100~250 bp 间较为适宜,过大的目的基因在扩增时容易出现失真。引物长度范围一般在 30~35 bp 之间,过长的引物容易形成发夹结构和二聚体,同时引物中 GC 含量最好在 30%~70% 之间,5' 端处末尾 3-5 个碱基中避免出现 G,最好为 C 或是 T,而 3' 端末尾 3 个碱基内最好含有 G 和 C^[41-42]。

RPA/RAA 反应的探针也需要筛选并优化,普通 PCR 所用的例如 Taqman 探针则与 RPA/RAA 体系不兼容, TwistAmp 手册中针对 RPA 反应所需的 exo 和 fag 探针设计都有详细规定,RPA 所用探针约 46~52 个碱基,探针分别携带一个荧光基团和一个淬

灭基团,两个基团之间被四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF)或是碳氧键连接的脱氧核糖间隔开,5' 端到 THF 位点最少有 30 个碱基的距离,而 THF 位点到 3' 端则至少要有 15 个碱基的距离,探针可与部分上游引物重合,但不能与下游引物重合。反应未开始时,探针完好,荧光基团信号不可被检测到,扩增开始后大肠杆菌核酸外切酶 III 开始识别并切割 THF,进一步分离淬灭基团,从而释放荧光信号并逐步积累达到定量检测的目的^[43-45]。

2.2 外界因素对 RPA/RAA 的影响

除了体系等内在因素对反应有影响以外,搅拌混匀及反应温度也是决定扩增效率的重要因素,大多数的 RPA/RAA 反应都在 37~42 °C 之间进行,而据研究表明,其温度范围极限可达到 15~50 °C,目前有研究发现 RPA 在人体的各个部位所对应的温度下均可实现反应,而在接近人体腋窝的温度(37 °C)下孵育,反应效果最好^[46]。表明在室外等设备环境

较差的情况下,该方法的优势明显。

2.3 RPA/RAA反应装置

2.3.1 加热装置

RPA/RAA反应目前最常使用的是恒温扩增仪、荧光PCR仪或是金属浴水浴等设备^[47],相关研究也一直在推动该反应装置的便捷化和使用场景的多元化。

由于RPA/RAA反应所需的温度接近室温,因此对于反应装置及能耗要求较低。简易的反应装置常见的有蓄电池、化学自发热及体温加热。蓄电池装置相对较稳定,温度波动较小,但对蓄电能力及放电环境有一定要求。化学自发热装置目前多以可简单实现放热反应的物质为主,例如生石灰或是三水乙酸钠加水反应放热,该技术简单易得,但对物质反应浓度、条件以及持续反应的时间控制都有相对严格的要求。体温加热是将反应物包裹在例如腋窝等温度较恒定的地方,该方法完全摆脱仪器且操作简单便捷,非常适合疾控及现场检测,但由于体温的变化可能会导致扩增失败,因此该方法还有待优化^[48-49]。

2.3.2 RPA/RAA扩增设备

RPA/RAA反应虽然无需复杂的热循环步骤,但为了保证扩增的准确性以及更好地实现现场检测,近些年一些专门针对恒温反应的设备也逐步面市。荧光恒温扩增仪集核酸扩增与荧光信号检测于一体,可用于实时监测扩增情况,目前已广泛地应用于包括动植物源分析在内的食品安全检测、生物医学及科学研究领域^[50]。有研究表明RPA/RAA反应还可在包被有冻干酶的纸片及塑料片上进行,过程简便快速,但由于其他液体需要后续额外加入,因此未能实现反应体系一体成型,容易引发后续污染^[51]。也有研究人员设计RPA/RAA微流体装置,提前将所需的试剂装入安瓶内,反应前将安瓶敲碎,液体试剂与冻干试剂混合,再利用瓶内吸力将混合液等分别加入反应模块,在反应模块中加入样本从而触发反应,该装置可最多同时检测30个样本^[52]。之后SHEN等人将微流控芯片技术与重组酶恒温扩增相结合,实现了对核酸单个分子扩增及绝对定量,芯片内含有1600多个独立单元进行扩增反应,结合荧光模块达到实时监测的目的^[53]。

2.4 RPA/RAA的结果分析

2.4.1 电泳及凝胶成像

凝胶成像检测反应产物是RPA/RAA反应最初的结果呈现方式,RPA/RAA体系除了重组酶、聚合酶与结合蛋白以外,与PCR体系基本相同。为避免

除DNA以外的组分对电泳结果产生例如条带拖尾等影响,需对反应产物提纯后,再进行凝胶成像检测。如徐潮等选取了几种常用的转基因作物检测用靶标,建立了RPA凝胶和荧光快速检测法,通过凝胶成像优化反应体系中 Mg^{2+} 浓度并分别对CaMV35S启动子、T-nos终止子、Bt及SPS基因四种靶标进行反应,结果表明该方法特异性好且适用不同作物的转基因成分鉴定^[54]。郭燕华等根据猪源性线粒体细胞色素b(Cytb)为目的序列设计RPA引物,建立了针对生鲜肉中的猪源性成分的重组酶介导的恒温扩增检测方法,并进行方法学评价验证,结果表明该方法有较高的特异性和灵敏度^[55]。

2.4.2 实时荧光法

实时荧光法是RPA/RAA的扩增产物最常用的鉴定方式,该方法是在普通的重组酶扩增基础上引入核酸外切酶Ⅲ(exonuclease Ⅲ,exo)及荧光探针,从而实现对扩增产物的实时检测,荧光探针中原本的胸腺嘧啶由荧光报告基团及荧光淬灭基团代替,中间由THF隔开,同时为避免探针被非特异性扩增,需在探针3'端添加阻塞基团。当探针与目的基因结合,exo识别并剪切THF位点,将探针上的基团释放,此时荧光增强并被检测,该方法灵敏度最高可达1~10个拷贝^[56-57]。目前荧光法在动植物源检测中已得到了广泛验证及完善,林霖等分别以细胞色素C氧化酶亚型I的水牛、黄牛和牦牛的特异性基因序列设计引物及exo探针建立了荧光RPA的快速检测方法,灵敏度结果显示低至1%的混合肉样本也可被检出,同时对该方法与荧光PCR法进行盲样对比,结果一致^[58]。苗丽等基于鸡线粒体B基因(CytB),设计特异性引物及exo探针,建立了鸡源性成分的实时荧光RAA检测方法,可以同时包括白羽鸡、芦花鸡、乌鸡等在内的多个品种鸡源基因进行扩增,可稳定检出的鸡源性成分最低质量分数为0.1%^[59]。张晨等^[60]以DNA嵌合SYBE Green I为材料,设置RPA特异性引物的方法,完成了可视化RPA用于转基因大豆“B5C9123-5”的检测,并对RPA扩增时间及温度进行优化,使得反应时间控制在20 min内,检测限达到1.00 ng/μL。

2.4.3 侧向流试纸条

侧向流试纸条法又名测流层析法RPA/RAA-LF(lateral flow dipstick, LFD),是在RPA体系的基础上引入核酸外切酶Ⅳ(endonuclease Ⅳ,nfo)、nfo探针及标记生物素或地高辛的反向引物。nfo中包含有THF分子,并在其5'端引入荧光基团FAM,3'端引入阻断基团,反应开始后,探针在THF位点被核酸外切酶切割,被剪切的探针和引物形成双标记

扩增子,该扩增子的荧光基团 FAM 可与抗 FAM 抗体的金标物结合,形成的免疫复合物滴加在侧向流试纸条上并扩散,被检测线上的生物素配体捕获含有生物素标记的扩增子并显色,剩余的复合物则继续扩散到质控线被特殊抗体捕获并显色^[61-62]。侧向流试纸条分为夹心法和竞争法两种,分别对应不同大小的待测组分。该技术结合了胶体金、免疫学、分子杂交和侧向流层析等多种技术,由于该方法特异性强,无场地限制及检测时间在 15 min 以内等优点,已经广泛应用于分子生物检测领域^[63],而在动植物源成分分析测定中,侧向流试纸条法目前研究较少,主要着重在转基因作物的定性检测中,例如贾玄分别根据转基因水稻 mf-MH3301-1、Bar68-1 两个品系的外源基因侧翼序列,设计筛选引物探针组合,建立了一整套包含凝胶电泳、荧光方法和 RPA-LFD 的快速检测方法,其中两种水稻的 RPA-LFD 方法检测限分别可以达到 75 拷贝和 50 拷贝^[64]。

3 展望与总结

随着动物制品制假掺假和转基因成分增加等因素的影响,动植物源成分检测与分析需求持续上升,市场及科研领域对检测方法的要求也越来越高,快速、稳定和高效的分子生物级检测成为大势所趋,RPA/RAA 技术以其无需热循环、反应设备简单易得、操作难度小等优点逐渐脱颖而出,被认为是最近接近常温的扩增技术,在食品及动植物源成分等现场检测领域有着巨大潜力。但同时 RPA/RAA 技术也存在着部分问题,例如引物探针筛选繁琐、样本提取及纯化难度大、靶标大小限制和扩增产物纯化难等。此外,鉴于分子生物学检测的日益崛起与迅猛进步,RPA/RAA 技术的标准化进程亦需逐步深化。为确保技术的可靠性与普适性,其标准的验证与广泛实施尚待细致探究与持续优化。

参考文献

- [1] LI W W, PIRES S M, LIU Z T, et al. Surveillance of foodborne disease outbreaks in China, 2003-2017[J]. Food Control, 2020, 118: 107359.
- [2] 张云雪. 欧盟肉制品安全监管制度研究[D]. 西南大学, 2014. ZHANG Y X, Research on supervision of european union meat products [D]. Southwest University, 2014.
- [3] 田中杰, 郭国富, 王洪波, 等. 从欧洲“马肉风波”看企业诚信和政府监管[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2013(6): 39-40. TIAN Z J, GUO G F, WANG H B, et al. Looking at corporate integrity and government supervision from the European “horse meat storm”. Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013(6): 39-40.
- [4] 艾晓, 唐志远(摄影). 真假海鱼“无间道”[J]. 博物, 2012(8): 78-83. AI X, TANG Z Y(Photography). True and false sea fish “Infernal Affairs”[J]. Natural History, 2012(8): 78-83.
- [5] 宋素泉. 沃尔玛在中国召回驴肉产品[J]. 上海农业学报, 2014, 30(1): 67. SONG S. Q. Walmart recalls donkey meat products in China. Journal of Shanghai Agricultural Sciences, 2013, 30(1): 67.
- [6] 从狐狸肉事件看沃尔玛的危机公关[J]. 质量与认证, 2014(2): 23. Unknown Author. “Viewing Walmart’s crisis public relations from the fox meat incident.” Quality and Certification, 2014(2), 23.
- [7] OMS-OLIU G, ODRIOZOLA-SERRANO I, MARTÍN-BELLOSO O. Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 1172-1183.
- [8] 董旭婉, 高东微, 王菊芳, 等. 食品中植物源成分分子生物学检测技术及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 340-346. DONG X W, GAO D W, WANG J F, et al. Research and application advances of molecular biological detection for plant-derived ingredients in foods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 340-346.
- [9] 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 W Q. Studies on quantitative detection methods for animal-derived ingredients in foods by digital PCR[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [10] 马宇浩, 蔡甘先, 邓晓恬, 等. 我国转基因生物安全评价现状及展望[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(10): 1-7. MA Y H, CAI G X, DENG X T, et al. Current status and prospects of safety evaluation of genetically modified organisms in China. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(10): 1-7.
- [11] 卢军锋, 李晓, 杨公社, 等. 我国转基因动物及其安全性评价发展现状[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(2): 62-64. LU J F, LI X, YANG G S, et al. The Current Development of Transgenic Animals and Their Safety Evaluation in China. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 54(2): 62-64.
- [12] 王国义, 贺晓云, 许文涛, 等. 转基因植物食用安全性评估与监管研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 343-350. WANG G Y, HE X Y, XU W T, et al. Recent Progress in Food Safety Assessment and Regulation of Genetically Modified Plants [J]. Food Science, 2019, 40(11): 343-350.
- [13] 曹宇浩. 5 种动物源成分 PCR 和 RPA 检测可视化鉴定方法的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017. CAO Y H. Visualization and identification of components originated from five animals by PCR and RPA detection[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [14] 史莹莹. 基于核酸分子水平鉴定肉及肉制品中动物种源成分[D]. 扬州: 扬州大学, 2020. SHI Y Y. Identification of animal provenance components in meat and products based on nucleic acid molecular level [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020.
- [15] 刘岑杰, 杨滴. 转基因植物成分检测方法及其标准概述[J]. 食品安全导刊, 2020(21): 24-26.

- LIU C J, YANG D. Overview of detection methods and standards for genetically modified plant components [J]. Food Safety Guide, 2020(21): 24-26.
- [16] 刘彦泓. 食品及饲料中动物源性成分检测方法 & 标准概述 [J]. 食品安全导刊, 2020(21): 6-8.
- LIU Y H. Overview of detection methods and standards for animal-derived components in food and feed [J]. Food Safety Guide, 2020(21): 6-8.
- [17] ARIF I A, KHAN H A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review [J]. Animal Biodiversity and Conservation, 2009, 32(1): 9-17.
- [18] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测 [J]. 食品科学, 2003, 24(8): 200-204.
- ZHANG Y, LIU Y X. Rapid determination of enzyme-linked immunosorbent assay on food safety [J]. Food Science, 2003, 24(8): 200-204.
- [19] 陈辉. 夹心 ELISA 方法检测熟肉中猪肉成分的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- CHEN H. Development of sandwich ELISA for detection of pork ingredient in cooked meat [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [20] 邓汉超, 尹长城, 刘国振, 等. 转基因植物核酸成分检测技术研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(1): 86-95.
- DENG H C, YIN C C, LIU G Z, et al. Progress in nucleic acid detection techniques for genetically modified organisms [J]. China Biotechnology, 2011, 31(1): 86-95.
- [21] 石盼盼, 李旭, 吴昊, 等. 肉及肉制品中动物源性成分核酸检测方法研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(10): 211-214.
- SHI P P, LI X, WU H, et al. Research progress in nucleic acid test for animal-derived material in meat and meat product [J]. Food Research and Development, 2016, 37(10): 211-214.
- [22] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(2): 171-179.
- ZHONG N, WANG J, ZHANG S Y. Advances in multiple PCR technology studies [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(2): 171-179.
- [23] 刘新梅, 蒋卉, 程逸宇, 等. 微滴数字 PCR 技术在动物源性食品成分鉴定中的应用进展 [J]. 食品科技, 2019, 44(6): 353-356.
- LIU X M, JIANG H, CHENG Y Y, et al. Progress in application of droplet digital PCR in identification of ingredients from animal-derived food [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(6): 353-356.
- [24] 刘婉婉. 一种用于肉源鉴定的多重 PCR 技术研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- LIU W W. A multiplex PCR technology for meat source identification [D]. Suzhou: Soochow University, 2019.
- [25] 董立明, 杨帆, 邢珍娟, 等. 一种 5 重 real-time PCR 筛查转基因水稻方法的建立. 食品科学, 2021, 42(24): 329-334.
- DONG L M, YANG F, XING Z J, et al. Establishment of a pentaplex real-time PCR for screening of genetically modified rice. Food Science, 2021, 42(24): 329-334.
- [26] Analytical Methods Committee Amctb No. dPCR - the digital polymerase chain reaction [J]. Analytical Methods, 2017, 9(29): 4225-4227.
- [27] MASSANELLA M, SINGHANIA A, BELIAKOVA-BETHELL N, et al. Differential gene expression in HIV-infected individuals following ART [J]. Antiviral Research, 2013, 100(2): 420-428.
- [28] 赵新, 刘双, 刘娜, 等. 利用微滴数字 PCR 技术分析转基因大豆 ‘GE-J12’ 中外源基因的拷贝数 [J]. 中国农业大学学报, 2022, 27(1): 58-66.
- ZHAO X, LIU S, LIU N, et al. Analysis of the copy number of exogenous gene in transgenic soybean ‘GE-J12’ with droplet digital PCR [J]. Journal of China Agricultural University, 2022, 27(1): 58-66.
- [29] 赵新, 刘娜, 陈锐, 等. 应用通用引物量化检测鲜肉及其制品中羊源性成分 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 179-184.
- ZHAO X, LIU N, CHEN R, et al. Quantitative detection method for ovine-derived materials in fresh meat and meat products using universal primer [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 179-184.
- [30] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2015, 53(1): 1-5.
- [31] LU X L, SHI X Y, WU G G, et al. Visual detection and differentiation of Classic Swine Fever Virus strains using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and G-quadruplex DNAzyme assay [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44211.
- [32] VINCENT M, XU Y, KONG H M. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. EMBO Reports, 2004, 5(8): 795-800.
- [33] 任君安, 满燕, 李安, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品检测中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2063-2071.
- REN J N, MAN Y, LI A, et al. Recombinase polymerase amplification technology and its application in food detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(9): 2063-2071.
- [34] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸 [J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 983-988.
- LÜ B, CHENG H R, YAN Q F, et al. Recombinase-aid amplification: A novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification. Scientia Sinica (Vitae), 2010, 40(10): 983-988.
- [35] JAMES A, MACDONALD J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics [J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2015, 15(11): 1475-1489.
- [36] BEI L, CHENG H R, YAN Q F, et al. Recombinase-Aid Amplification: a Novel Technology of *in vitro* Rapid Nucleic Acid Amplification [J]. Scientia Sinica (Vitae).
- [37] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7): 947-958.
- [38] 齐菊菊. 逆转录重组酶介导等温核酸扩增技术在呼吸道合胞病毒检测中的应用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2019.
- QI J J. Development of A reverse transcription recombinase aid amplification assay for the detection of respiratory syncytial virus [J]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2019.
- [39] LILLIS L, LEHMAN D, SINGHAL M C, et al. Non-instrumented

- incubation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of proviral HIV-1 DNA. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108189.
- [40] LOBATO I M, O' SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 98: 19-35.
- [41] YANG Y, QIN X D, ZHANG W, et al. Rapid and specific detection of porcine parvovirus by isothermal recombinase polymerase amplification assays [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2016, 30(5): 300-305.
- [42] 王晓勋, 徐嘉良. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品安全领域的应用 [J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 1-7.
- WANG X X, XU J L. Recombinase polymerase amplification technology and its application in the field of food safety detection [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(6): 1-7.
- [43] WANG J, WANG J, LIU L, et al. Rapid detection of Porcine circovirus 2 by recombinase polymerase amplification [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016.
- [44] RIMSA V, EADSFORTH T, HUNTER W N. The role of Co²⁺ in the crystallization of human SENP1 and comments on the limitations of automated refinement protocols [J]. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 2011, 67(Pt 4): 442-445.
- [45] CASTELLANOS-GONZALEZ A, WHITE A C, MELBY P C, et al. (2018). Molecular diagnosis of protozoan parasites by Recombinase Polymerase Amplification. *Acta tropica*, 182, 4-11.
- [46] CRANNELL Z A, ROHRMAN B, RICHARDS-KORTUM R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One*. 2014 Nov 5; 9(11): e112146.
- [47] CURTIS K A, RUDOLPH D L, NEJAD I, et al. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *Plos one*. 2012, 7(2): e31432.
- [48] WANG J, WANG J, LIU L, et al. Rapid detection of Porcine *Circovirus* 2 by recombinase polymerase amplification [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(5): 574-578.
- [49] RIMSA V, EADSFORTH T, HUNTER W N. The role of Co²⁺ in the crystallization of human SENP1 and comments on the limitations of automated refinement protocols [J]. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 2011, 67(Pt 4): 442-445.
- [50] CASTELLANOS-GONZALEZ A, WHITE A C JR, MELBY P, et al. Molecular diagnosis of protozoan parasites by Recombinase Polymerase Amplification [J]. *Acta Tropica*, 2018, 182: 4-11.
- [51] CRANNELL Z A, ROHRMAN B, RICHARDS-KORTUM R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112146.
- [52] 牟颖, 尹居鑫, 邹哲宇. 一种集成样品前处理的多重数字 RPA 微流控芯片: CN110575852B [P]. 2020-08-11.
- MOU Y, YIN J X, ZOU Z Y. A multiple digital RPA microfluidic chip with integrated sample pretreatment: CN110575852A [P]. 2020-08-11.
- [53] SHEN F, DAVYDOVA E K, DU W B, et al. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(9): 3533-3540.
- [54] 徐潮. 重组酶介导的等温扩增技术在转基因检测中的应用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- XU C. The application of recombinase mediated isothermal amplification technology in transgenic detection [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [55] 郭燕华, 陈遂, 王德莲, 等. 基于重组酶等温扩增技术快速检测生鲜肉中猪源性成分 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6): 2012-2016.
- GUO Y H, CHEN S, WANG D L, et al. Determination of porcine ingredient in pork with recombinase polymerase mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(6): 2012-2016.
- [56] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [57] 郭燕华, 王德莲, 王强, 等. 重组酶介导等温扩增技术快速检测牛肉及牛肉制品中的牛源性成分 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(5): 1745-1749.
- GUO Y H, WANG D L, WANG Q, et al. Determination of bovine ingredient in beef and its derivatives with recombinase polymerase mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(5): 1745-1749.
- [58] 林霖, 冯荣虎, 王坤, 等. 牛肉真伪鉴别荧光 RPA 现场快检方法建立 [J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 322-326.
- LIN L, FENG R H, WANG K, et al. Construct beef authentication on-site rapid detection method based on fluorescent RPA technology [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(6): 322-326.
- [59] 苗丽, 张秀平, 王建昌, 等. 肉制品中鸡源性成分重组酶介导等温扩增检测方法的建立及应用. *江苏农业学报*, 2019, 35(4): 954-959.
- MIAO L, ZHANG X P, WANG J C, et al. Establishment and application of real-time recombinase-aided amplification assay to detect chicken-derived ingredients in meat products [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 35(4): 954-959.
- [60] 张晨, 雷展, 李凯, 等. RNAi 转基因大豆品系 'B5C9123-5' 的 RPA 可视化检测技术 [J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(1): 50-57.
- ZHANG C, LEI Z, LI K, et al. RPA visual detection technology for RNAi transgenic soybean 'B5C9123-5' [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2022, 27(1): 50-57.
- [61] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. *Mikrochimica Acta*, 2014, 181(13-14): 1715-1723.
- [62] CRANNELL Z A, CABADA M M, RICHARDS-KORTUM R, et al. Recombinase polymerase amplification-based assay to diagnose *Giardia* in stool samples [J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2015, 92(3): 583-587.
- [63] 刘冬虹, 王德莲, 郭燕华, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展 [J]. *检验检疫学刊*, 2016, 26(5): 65-68.
- LIU D H, WANG D L, GUO Y H, et al. Advances in recombinase polymerase amplification. [J] *Journal of Inspection*

and Quarantine, 2016, 26(5): 65-68.
[64] 贾玄. RPA 等温扩增技术在转基因水稻检测中的应用[D].
北京: 中国农业科学院, 2017.

JIA X. The application of recombinase polymerase amplification
(RPA) technology in detection of transgenic rices[D]. Beijing:
Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.

《中国食品卫生杂志》2024年征稿征订启事

《中国食品卫生杂志》创刊于1989年,由中华人民共和国国家卫生健康委员会主管,中华预防医学会、中国卫生信息与健康医疗大数据学会共同主办,刊号:ISSN 1004-8456、CN 11-3156/R,邮发代号:82-450,月刊,国内公开发行。本刊是2008、2011、2017、2020版中文核心期刊,中国科学引文数据库核心刊(C刊),中国科技核心期刊,中国精品科技期刊。中国知网(CNKI)全文收录。2020年版影响因子1.553,在预防医学领域影响力指数排名第8(8/86)。曾连续多年获得中华预防医学会优秀期刊一等奖。

刊登范围:食品卫生领域的科研方法及成果,检验检测技术(包括化学分析技术、微生物检验技术、毒理学方法),有毒有害物质的监测、评估、标准的研究,监督管理措施及方法,应用营养等。

主要栏目:专家述评、论著、研究报告、实验技术与方法、监督管理、调查研究、食品安全标准及监督管理、风险监测、风险评估、应用营养、食源性疾病、综述及国际标准动态。

刊发周期:审稿通过后一般在2个月左右刊出。对具有创新性的优秀论文开通绿色通道,加急审稿、优先发表。

欢迎投稿 欢迎订阅

投稿网址:<http://www.zgspws.com>

订 阅:2024年《中国食品卫生杂志》。每期定价40元,全年480元。

订阅方式可以通过以下:

- 1、杂志官方网站订阅(详情见官网 www.zgspws.com、可咨询购买过刊)。
- 2、通过邮局订阅,邮发代号82-450。
- 3、通过杂志淘宝店,微信公众号线上购买(详情请扫描以下二维码关注)。

地 址:北京市朝阳区广渠路37号院2号楼802室

《中国食品卫生杂志》编辑部

电 话:010-52165596 邮政编码:100021 E-mail:spws462@163.com



杂志公众号



杂志淘宝店



杂志微店