

植物蛋白饮料中榛子成分环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法的建立

肖剑¹, 梁美丹¹, 冼燕萍², 刘冬豪¹, 劳嘉倩¹, 曹霞飞¹, 黄志深¹, 李丽丽^{3*}

(1. 广州市食品检验所, 广东广州 511400) (2. 广州质量监督检测研究院, 广东广州 511447)

(3. 暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 511443)

摘要: 该研究基于植物蛋白饮料掺杂使假现象普遍, 建立一种针对榛子成分检测目标的环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)快速检测技术方法。根据欧洲榛子染色体 *Ca8* (登录号: LR899430.1) 基因保守序列(第 19517533~19519500 bp), 设计榛子成分环介导等温扩增检测特异性引物, 构建反应体系, 并验证方法的特异性、灵敏度和稳定性; 以 Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) 为对照方法, 采用显著性差异检验(McNemar's 检验)方法, 通过 32 种植物蛋白饮料检测结果验证 LAMP 方法的性能指标和准确性。该研究建立的 LAMP 方法特异性强, 33 种植物成分中除了榛子 DNA 外, 其它植物成分 DNA 均未获得阳性扩增结果; 重复性实验稳定性好(扩增 Ct 值, RSD=5.41%), 最低检出限为 0.1% (以质量分数计); 通过植物蛋白饮料产品应用性验证, 得出方法特异性和灵敏度均为 100%, 不存在假阳性和假阴性。综上, 该研究建立的植物蛋白饮料榛子成分 LAMP 检测技术, 具有操作简单、快速高效(从样品处理到最终结果可在 2 h 内完成)、准确度高优点, 可应用于植物蛋白饮料榛子成分快速检测。

关键词: 植物蛋白饮料; 榛子成分; 环介导等温扩增(LAMP)

文章编号: 1673-9078(2022)08-302-308

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1209

Establishment of a Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for the Rapid Detection of Hazelnut Components in Plant-based Protein Beverages

XIAO Jian¹, LIANG Meidan¹, XIAN Yanping², LIU Donghao¹, LAO Jiaqian¹, CAO Xiafei¹, HUANG Zhishen¹, LI Lili^{3*}

(1. Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 511400, China)

(2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

(3. Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 511443, China)

Abstract: To address the widespread adulteration of plant-based protein beverages, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed for the rapid detection of hazelnut components. The conserved sequence (No. 19517533~19519500 bp) of chromosome *Ca8* (accession number: LR899430.1) in European hazelnut was adopted to design the specific primers for the LAMP detection of hazelnut components. The reaction system was optimized and the specificity, sensitivity, and stability of the LAMP method were verified. Using real-time polymerase chain reaction as the reference method, McNemar's test was performed to verify the performance indexes and accuracy of

引文格式:

肖剑,梁美丹,冼燕萍,等.植物蛋白饮料中榛子成分环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法的建立[J].现代食品科技,2022,38(8):302-308

XIAO Jian, LIANG Meidan, XIAN Yanping, et al. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the rapid detection of hazelnut components in plant-based protein beverages [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 302-308

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2019MK090); 广东省市场监督管理局科技项目(2020CS01); 广州市市场监督管理局科技项目(2020kj52)

作者简介: 肖剑(1980-), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: xjq521@163.com

通讯作者: 李丽丽(1985-), 女, 博士, 研究方向: 分子生物技术, E-mail: lilili2017@jnu.edu.cn

the LAMP method for 32 plant-based protein beverages. The LAMP method had strong specificity, and no positive amplification results were obtained for 33 plant ingredients except hazelnut. The reproducibility test was stable (Ct value, RSD=5.41%), and the lower limit of detection was 0.1% (by mass fraction). The results indicated that the LAMP method had a specificity and sensitivity of 100%, with no false positives or false negatives. In conclusion, the LAMP detection method had the advantages of simple operation, fast and efficient detection (<2 h from sample processing to final results), and high accuracy. Hence, it can be applied to the rapid detection of hazelnut components in plant-based protein beverages.

Key words: plant-based protein beverages; hazelnut components; loop-mediated isothermal amplification

榛子, 又称榛栗, 山板栗等, 有“坚果之王”的美誉, 由于其富含蛋白质、脂肪、胡萝卜素、维生素、微量元素等, 具有较高的营养价值而被越来越多应用到食品生产中, 尤其是以榛子为原料的植物蛋白饮料, 凭借其“天然、绿色、营养、健康”等特点, 深受广大消费者的喜爱^[1,2]。当前, 我国整个植物蛋白饮料产业发展迅速, 2007~2016年增速甚至已达24.5%, 且在不断上升趋势, 产品类型复杂多样, 主要类型包括有豆乳类饮料、坚果类乳饮料、椰子乳饮料等^[3]。榛子乳属于坚果类乳饮料的一种, 近年来发展迅猛, 但由于原材料成本较高, 部分不法商家为谋求私利, 采用低廉的大豆或花生等原材料伪造榛子乳饮料, 并以低价的优势争抢市场, 这种欺诈行为严重损害消费者的权益, 破坏饮料市场行业的秩序^[4]。目前, 国内外对植物蛋白饮料成分检测的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[5,6]、酶联免疫法^[7,8]、普通PCR法^[9,10]、实时荧光PCR法^[11]和数字PCR法^[12], 但现有方法由于对操作要求(人员、环境、仪器设备、检测试剂)高、仪器设备高昂、检测成本高等缺点未广泛推广应用于基层检测。

以DNA为目标的源性成分鉴定是当今食品掺杂掺假研究较热门的技术之一, 其具有灵敏度高、特异性强等优点。环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[13], 具有特异性强、灵敏度高、操作简单快速、实验设施要求低等优点^[14], 可应用于实验室外的快速高通量检测。该技术已广泛应用在致病菌和病毒检测^[15-19]、转基因成分分析^[20,21]、动物源性成分鉴定^[22-24]、寄生虫鉴定^[25]等领域中。本研究基于环介导等温技术, 选择榛子特异性保守基因序列, 设计一组LAMP特异性检测引物, 研究LAMP的检测体系, 建立植物蛋白饮料榛子成分快速检测方法, 为抵制榛子蛋白饮料掺杂掺假提供高效的检测技术方法, 保障饮料行业食品质量与安全。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样本来源

榛子、板栗、芝麻、杏仁、核桃、花生、玉米、椰子、绿豆、黄大豆、黑大豆、红豆、糯米、小米、荞麦、燕麦、葵花籽、开心果、腰果、碧根果、松子、巴旦木、莲子、无花果、夏威夷果、红香米、黑香米、薏米、白眉豆、红腰豆、赤小豆、西瓜籽、红枣 33种植物成分购于本地超市; 32种植物蛋白饮料(标签声称含有榛子成分的有4个)购于京东超市。

1.1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒, 德国QIAGEN公司; *Bst* DNA聚合酶、反应预混液(主要含dNTPs, MgSO₄, 甜菜碱等)、密封液、SYTO-9荧光染料, 广州市双螺旋生物有限公司; 引物由北京六合华大基因生物公司合成。

1.2 仪器与设备

II级A2型1376生物安全、NANODROP ONE超微量紫外分光光度计, 购于美国Thermo Fisher Scientific公司; 1-14K高速冷冻离心机, 购于德国Sigma-aldrich公司; CFX96 Touch实时荧光PCR仪, 购于美国Bio-Rad公司; HDTC-100恒温金属浴, 购于上海汉诺仪器有限公司; 微量移液器, 购于德国Eppendorf公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计与合成

```

1361 CTATTTTCAAGAAATATTTGAATAAAAATTTGGTCTCTATTGTATTTTTGAAAAATCTAAGAAATATGTTCTAATGCT
GATAAAGTCTTTTATAAACCCTATTTTTAAACCAAGAGATAAACATAAAACCTTTTAGATTCTTTATACAACGATTACGA

1441 TTATCGTCTTGATTACCATAAACTCAGATTGTTTTTCTATAGTAATAAAATATAATAATTAATGTTGTTTCTCTCT
AATAGCAGAACTAATGGTATTTGAGATCTAACAAAAAGATACATTATTTTTAATAATTAATAACCAAAAAAGAGAA

1521 CATGAGTCTGATCTCTCTCAACAGACTTAAATCAGACAA AAGGCAACGTGTCCCAAAACCAAGCCCTTCGTCTACATG
GTACTCAGACTAGAGAAAGTTGCTGAATTTAGTCTGTTTTCTGTTGACAGGTTTTGGTTCCGGGAAGCAGATGATC

1601 CAACCCCTGCATGAAAACCTCCTAACACGTTGCCACCCCTTTTCAACAGCAGCCACCAGCCGCTCCTCTATATAAAACCC
GTTGGGACGCTACTTTTTGAAGATTGTGCACGGTGGGGAAAAAAGTTGTGGTGGTGGGTCGGAGGAAGATATTTTTGGG

1681 CCACCTCTCACAGTACGCTCACGGCCACACCAATATATCATCAGCATCACACATAACGCTAAGTCTCTGATCAACTCTC
GGTGGAGAGTGTGTCGAGTCCGGGTGTGTTATAATAGTAGTCTAGTGTGTTATGCGATTGAGGACTAGTTGAGAG

1761 CGCCGTCGATCTTCATAAAATGGCTGAGCACCACCAAGGCAATGCAGGACCCCGCCCAACCAACCCGCTCCCAACCAAGT
GCGGACAGCTAGAAGTATTTTACCGACTCGTGGTTCCTGTTAACCTCTCGGGCCGGTGGTGGGGCCAGGGTGGTTCAA

1841 GTCAAGGGCCGACTGCTCCACCGCGGTGGGTCCCTCTGTCCTCTCCGTTGATCTAGCCGGCAGCGTCAATTC
CAGTTCCCGCGGTGACGAGGTTGGCGGCCACCCAGGGAGCAGGAGGACCCAACTAGGATCGCCGCTGCCAGTAACG

1921 GTTGACCTTAGCCACCCCGCTGTTTGTGATATTCAAGTCCCGTTCTGCT
CAACTGGAATCGGTGGGGCGACAAACACTATAAGTCAGGCAAGAGCA

```

图1 5条LAMP引物在欧洲榛子染色体 *Ca8* 基因上位置

Fig.1 The location of primers for LAMP in the Hazelnut chromosome *Ca8* gene

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物名称 | 序列 (5'-3') |
|------|--|
| F3 | CATGAGTCTGATCTCTTCA |
| B3 | GTGAGCGTAGCTGTGAGA |
| FIP | TTGCATGTAGACGAAGGGGCACAGACTTAAATCAGACAAAAGC |
| BIP | CTGCATGAAAACCTCCTAACACGTGGGTTTTATATAGAAGGAGGCT |
| LB | CCCCTTTTCAACACGCACC |

根据 NCBI 数据库中欧洲榛子染色体 *Ca8* (登录号: LR899430.1) 基因序列, 通过 Blast 比对分析, 确定该序列的特异性区域 (第 19517533~19519500 bp), 使用软件 Primer Explorer Version 4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) 设计 LAMP 引物 5 条, 包括 2 条外引物 F3、B3, 2 条内引物 FIP (F1c+F2)、BIP (B1c+B2), 1 条环引物, 引物序列设计位置见图 1, 引物序列见表 1, 引物由北京六合一华大基因公司合成, 纯化方式为高效液相色谱法 (HPLC)。

1.3.2 DNA 模板的制备

坚果类、豆类、粮食种子等样品先用研磨机研磨成粉末, 然后称取适量样品在液氮条件下进一步研磨, 参考 QIAGEN 植物 DNA 提取试剂盒进行坚果类、豆类、粮食种子基因组 DNA 的提取。植物蛋白饮料样品, 取样 0.5 mL, 按照磁珠法提取基因组 DNA^[26]。所有材料基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.7~2.0 之间, 符合要求的 DNA 于 -20 °C 保存备用。

1.3.3 LAMP 反应体系的构建

LAMP 反应体系 (25 μL): 反应预混液 12.5 μL, *Bst* DNA 聚合酶 1 μL, 荧光染料 0.5 μL, FIP 1.6 μmol/L, BIP 1.6 μmol/L, F3 0.2 μmol/L, B3 0.2 μmol/L, LB 0.8 μmol/L, DNA 2 μL, 补水至 25 μL, 每个 PCR 反应管加入 20 μL 无菌石蜡油进行密封。每次反应以 ddH₂O 和空白提取对照为阴性对照, 以榛子 DNA 为阳性对照。使用实时荧光 PCR 仪进行 LAMP 恒温扩增, 设置程序为 63 °C 30 s, (63 °C 15 s, 63 °C 45 s) 45 个循环。

1.3.4 榛子成分 LAMP 特异性检测

按照 1.3.3 建立的 LAMP 反应体系, 以榛子 DNA 为阳性对照, 以 ddH₂O 和空白提取对照为阴性对照, 以榛子、芝麻、杏仁、核桃、花生、玉米、椰子、绿豆、黄大豆、黑大豆、红豆、糯米、小米、荞麦、燕麦、葵花籽、开心果、腰果、板栗、碧根果、松子、巴旦木、莲子、无花果、夏威夷果、红香米、黑香米、薏米、白眉豆、红腰豆、赤小豆、西瓜籽、红枣 32 种植物成分作为特异性实验模板, 用于验证该方法的特异性。

1.3.5 榛子成分 LAMP 引物灵敏度实验

以绿豆粉为基质, 按比例制备不同质量分数的榛子混合样品 (50.0%、10.0%、5.0%、0.5%、0.1%), 提取 DNA, 同时将质量分数为 0.1% 的榛子样品 DNA 稀释 10 倍, 获得质量分数为 0.01% 榛子样品 DNA, 按照 1.2.3 反应体系及程序进行扩增, 确定该方法的灵敏度。

1.3.6 榛子成分 LAMP 稳定性实验

以榛子最低检出限的样品 DNA 进行 LAMP 扩增, 重复 10 次实验, 同时以 ddH₂O 和空白提取对照为阴性对照, 以验证该方法的稳定性。

1.3.7 LAMP 检测植物蛋白饮料中榛子成分

对市场上销售的 32 种植物蛋白饮料进行检测, 验证本研究建立的 LAMP 检测方法, 并以实时荧光 PCR 方法为参考比较方法^[27], 综合评价植物蛋白饮料中榛子成分 LAMP 检测方法的灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率和准确度; 根据方法确认性能指标要求^[28]: 灵敏度≥98.0%, 特异性≥90.4%, 假阴性率≥2.0%, 假阳性率≥9.6%, 准确度≥94.0%。

1.3.8 数据处理

1.3.8.1 灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率和准确度的计算

$$\text{灵敏度} / \% = \frac{\text{真阳性数}}{(\text{真阳性数} + \text{假阴性数})} \times 100\%$$

$$\text{特异性} / \% = \frac{\text{真阴性数}}{(\text{真阴性数} + \text{假阳性数})} \times 100\%$$

$$\text{假阴性率} / \% = (1 - \text{灵敏度}) \times 100\%$$

$$\text{假阳性率} / \% = (1 - \text{特异性}) \times 100\%$$

$$\text{准确度} / \% = \frac{(\text{真阳性数} + \text{真阴性数})}{\text{总数}} \times 100\%$$

式中:

真阳性数——测试方法和参比方法均为阳性的数量;

真阴性数——测试方法和参比方法均为阴性的数量;

假阳性数——测试方法为阳性、参比方法为阴性的数量;

假阴性数——测试方法为阴性、参比方法为阳性的数量。

1.3.8.2 稳定性测试 Ct 值相对标准偏差 (RSD)

$$RSD(Ct值) = \frac{SD(Ct值标准偏差)}{(Ct值均值)} \times 100\%$$

$$SD(Ct值标准偏差) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Ct值_i - Ct值均值)^2}{n-1}}$$

2 结果与分析

2.1 榛子成分 LAMP 扩增特异性检测结果

本研究采用 33 种不同的植物种子, 按照设计的 LAMP 引物和构建的反应体系, 在 63 °C 温度条件下进行榛子成分 LAMP 恒温扩增, 检测结果见图 2。结果表明榛子样品 DNA 能扩增出明显的 S 型曲线, 表现出良好的特异性扩增, 其余 32 种植物包括绿豆、黄大豆等杂豆类, 杏仁核桃等干果类, 糯米、小米等粮食作物及其他成分的 DNA 均未得到任何扩增产物。孙敏等^[2]对 10 种不含榛子食品, 采用实时荧光 PCR 方法检测榛子成分, 获得较好的特异性, 本研究使用 32 种包含各种类别植物成分进行特异性研究, 能充分证实建立的 LAMP 检测方法对榛子具有高度的特异性。

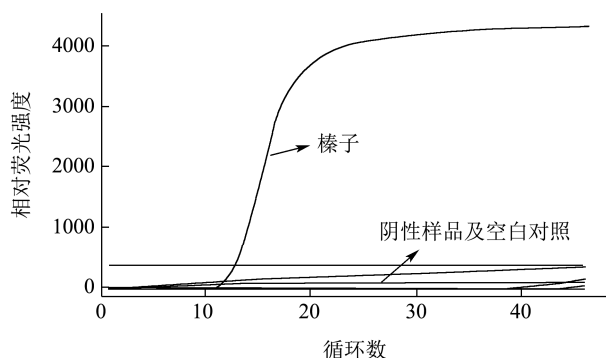


图2 榛子成分 LAMP 特异性扩结果

Fig.2 LAMP specific amplification results of hazelnut components

2.2 榛子成分 LAMP 扩增灵敏度实验

选取一定质量的榛子粉与绿豆粉进行相应比例混合, 分别制备成质量分数为 50.0%、10.0%、5.0%、0.5%、0.1%的榛子混合样品, 按照试剂盒法提取 DNA, 由于难以获得质量分数 0.01%的榛子混合样品, 将 0.1%混合样品 DNA 稀释 10 倍, 作为质量分数为 0.01%的榛子混合样品, 将以上样品提取 DNA, 并进行 LAMP 扩增, 扩增图谱见图 3。结果显示, 质量分数为 50.0%、10.0%、1.0%、0.5%、0.1%的榛子混合样品 DNA 能扩增得到典型的 S 型曲线, 质量分数为 0.01%的榛子 DNA 扩增结果为阴性, 因此, 该方法的检测灵敏度可定为 0.1% (以质量分数计)。魏晓璐等

^[9]建立检测核桃乳中花生、大豆成分 PCR 检测方法, 结果检测花生成分的灵敏度为 1%、检测大豆成分的灵敏度为 0.1%; 刘津等^[29]建立的巴西坚果的 LAMP 检测方法检测低限为 0.5%, 本研究检测方法灵敏度达到或优于现有同类方法。另外, 本研究选择以质量份数进行灵敏度的测试, 与 DNA 浓度^[2]或拷贝数^[30]相比, 更加准确反映样品中实际成分含量; 相对于直接对 DNA 进行稀释, 方法考虑了 DNA 提取质量影响, 且更能直接反映出对应的产品中成分的含量, 但实际固体样品混合有一定的操作极限, 本研究选择对 0.1% 混合样本提取 DNA 进行稀释, 更加准确可靠。

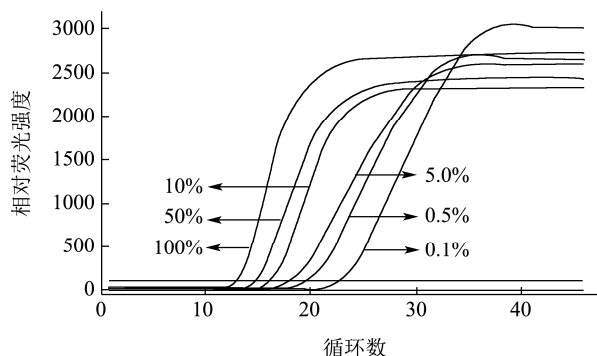


图3 榛子成分 LAMP 灵敏度检测结果

Fig.3 LAMP sensitivity test results of hazelnut components

2.3 榛子成分 LAMP 扩增稳定性实验

本方法选择质量分数为 0.1%榛子混合样品提取 DNA, 以此模板 DNA 进行 10 次重复 LAMP 扩增, 结果见图 4, 结果 Ct 值在 18.00~21.14 范围 (RSD=5.41%), Ct 值是 PCR 定性检测判断阴阳性结果的标识值, 较低的 RSD 值说明该方法稳定性较好, 对于 PCR 定量检测, 一般使用拷贝数进行稳定性评价, 本研究 RSD 值与杨硕等^[12]建立的微滴 PCR 方法得出的大豆和核桃拷贝数比值的相对标准偏差 (RSD=3.86%) 比较接近, 都属于较高的水平。

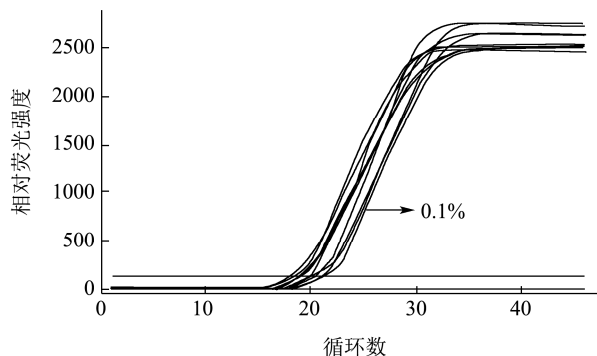


图4 榛子成分 LAMP 稳定性检测结果

Fig.4 LAMP stability test results of hazelnut components

表2 LAMP 和 Real-time PCR 检测 32 种植物蛋白饮料中榛子成分结果

Table 2 The test results of hazelnut components in 32 vegetable protein drinks by LAMP and Real-time PCR

| 序号 | 样品标签标示含有成分 | LAMP方法结果 | Real-time PCR方法结果 | 序号 | 样品标签标示含有成分 | LAMP方法结果 | Real-time PCR方法结果 |
|----|----------------|----------|-------------------|----|------------|----------|-------------------|
| 1 | 杏仁 | - | - | 17 | 榛子 | + | + |
| 2 | 杏仁 | - | - | 18 | 杏仁 | - | - |
| 3 | 大豆、花生、芝麻 | - | - | 19 | 花生 | - | - |
| 4 | 杏仁 | - | - | 20 | 大豆 | - | - |
| 5 | 大豆、杏仁、核桃、榛子、花生 | + | + | 21 | 大豆 | - | - |
| 6 | 核桃、花生 | - | - | 22 | 核桃、花生、芝麻 | - | - |
| 7 | 花生 | - | - | 23 | 核桃、花生、芝麻 | - | - |
| 8 | 核桃、花生 | - | - | 24 | 大豆 | - | - |
| 9 | 核桃 | - | - | 25 | 大豆、芝麻 | - | - |
| 10 | 大豆 | - | - | 26 | 杏仁 | - | - |
| 11 | 花生 | - | - | 27 | 榛子 | + | + |
| 12 | 大豆、芝麻 | - | - | 28 | 扁桃 | - | - |
| 13 | 大豆 | - | - | 29 | 巴旦木 | - | - |
| 14 | 核桃、榛子、花生 | + | + | 30 | 芝麻 | - | - |
| 15 | 花生 | - | - | 31 | 芝麻 | - | - |
| 16 | 大豆、核桃、花生、芝麻 | - | - | 32 | 大豆 | - | - |

注: +表示检出榛子成分, -表示未检出榛子成分。

2.4 植物蛋白饮料样本检测

表3 LAMP 和 Real-time PCR 检测植物蛋白饮料榛子成分数据统计分析结果

Table 3 The statistical analysis of hazelnut components in vegetable protein drinks by LAMP and Real-time PCR

| LAMP 荧光方法 | Real-time PCR 方法(参考方法) | | 合计 |
|-----------|------------------------|----------|---------|
| | 阳性数 | 阴性数 | |
| 阳性数 | 4 (真阳性) | 0 (假阳性) | 4 |
| 阴性数 | 0 (假阴性) | 28 (真阴性) | 28 |
| 合计 | 4 | 28 | 32 (总数) |

LAMP 技术主要是利用具有链置换特异性的 *Bst* DNA 聚合酶和 4 条能够特异性识别靶标序列上多个特异性区域的引物, 开启循环链置换反应, 从而实现等温条件下的连续快速反应^[31], 该技术具有特异性强、灵敏度高、检测成本低等优点。Real-time PCR 技术是在常规 PCR 的基础上添加荧光染料或荧光探针, 具有操作简便, 可实现对待测样品定性、定量分析^[32], 但是该技术需要的仪器设备较昂贵。本研究选择 32 个不同植物蛋白种类饮料产品验证 LAMP 扩增方法, 同时以 Real-time PCR^[27]为参照方法, 计算 LAMP 扩增方法的灵敏度、特异性、假阳性和假阴性。结果见表 2。采用本研究的 LAMP 方法检测榛子成分, 4 个标签含有榛子成分的样品检测结果均为阳性, 并以 Real-time

PCR 检测方法为参照, 两种方法的检测结果 100% 相符合。按照 1.3.7 统计方法, 依据表 3 数据结果, 得出本研究建立的植物蛋白饮料榛子成分 LAMP 扩增方法的灵敏度为 100%, 特异性为 100%, 假阳性率和假阴性率均为 0。在相似研究中, 刘津等^[29]建立的巴西坚果的 LAMP 检测方法使用 7 个样本进行适用性方法验证, 结果与实时荧光 PCR 方法完全一致, 魏晓璐等^[9]采用 22 种核桃乳作为建立检测方法的应用验证, 但未使用参比方法进行验证。本研究采用多批次不同种类植物蛋白饮品进行方法比对验证, 通过 McNemar's 检验^[27], 得出方法验证的指标, 结果均符合要求。

3 结论

本文选择欧洲榛子染色体 *Ca8* 基因设计 LAMP 的特异性引物, 构建优化 LAMP 反应体系, 经过 33 种不同类别的植物源性成分特异性验证试验, 除榛子 DNA 外, 其他成分 DNA 未获得阳性结果, 证实本方法具有较高的特异性。通过不同质量分数的榛子混合样品 DNA 扩增试验, 验证了方法的灵敏度可达 0.1%, 同时, 选择质量分数为 0.1% 榛子样品 DNA, 进行 10 次重复 LAMP 扩增, Ct 值 RSD 为 5.41%, 证实本研究 LAMP 扩增稳定性较好。另外, 以实时荧光 PCR 为参考方法, 使用 32 个批次含多种不同源性成分多种类型的植物蛋白饮料做应用性验证, 测试出本研究建

立的 LAMP 方法灵敏度和特异性均为 100%，无假阳性和假阴性，符合方法使用准确性要求，与其他方法相比，具有快速稳定、对仪器和操作要求较低的特点，从样品处理到最终结果可在 2 h 内完成，适用于在现场对不同基质植物蛋白饮品榛子成分的快速检测。该研究成果提供了一种植物蛋白饮料掺伪掺假快速筛查新型分子检测技术，为植物蛋白饮料行业良性发展保驾护航。

参考文献

- [1] 李延辉,郑凤荣,刘艳霞,等.野生榛子复合蛋白酸乳饮料的研制[J].食品研究与开发,2016,37(4):76-79
LI Yanhui, ZHENG Fengrong, LIU Yanxia, et al. Preparation of wild hazelnut protein compound yogurt beverage [J]. Food Res Dev, 2016, 37(4): 76-79
- [2] 孙敏,梁君妮,徐彪,等.实时荧光 PCR 法检测食物中榛子过敏原成分[J].食品工业科技,2011,32(1):293-295,299
SUN Min, LIANG Junni, XU Biao, et al. Detection of hazelnut allergens by real time PCR assay [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(1): 293-295, 299
- [3] 刘可心,马懿欧,董逸然,等.植物蛋白饮料市场分析及建议[J].现代食品,2021,6:31-33
LIU Kexin, MA Yiou, DONG Yiran, et al. Market analysis and suggestions of plant protein beverage [J]. Mod Food, 2021, 6: 31-33
- [4] 丁清龙,曾晓琮,周露,等.广东省植物源性饮料掺假情况摸底调查[J].食品安全质量检测学报,2018,9(12):2953-2957
DING Qinglong, ZENG Xiaozong, ZHOU Lu, et al. Investigation of plant-derived drinks adulteration in Guangdong [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 2953-2957
- [5] 张淑霞,祝伟霞,刘胜男,等.基于 HPLC-Q-Exactive 的 PRM 技术检测核桃露中核桃、杏仁、花生、大豆源性成分[J].食品科技,2020,45(9):273-280
ZHANG Shuxia, ZHU Weixia, LIU Shengnan, et al. Detection of walnut, almond, peanut and soybean derived ingredients in walnut drink based on HPLC-Q-Exactive with parallel reaction monitoring mode [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(9): 273-280
- [6] Heick J, Fischer M, Popping B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(7): 938-943
- [7] 张世伟,赖心田,王士峰,等.基于免疫分析的杏仁蛋白饮料中杏仁蛋白质定量方法研究[J].河南农业科学,2016,45(4): 145-149
ZHANG Shiwei, LAI Xintian, WANG Shifeng, et al. Quantitation of apricot kernel Protein in apricot kernel protein beverage based on immunoassay [J]. J Henan Agric Sci, 2016, 45(4): 145-149
- [8] 张晓东,宋佳兴,陈怡文,等.2 种用于检测市售核桃露(乳)饮品中花生、大豆成分方法的比较分析[J].食品安全质量检测学报,2020,11(17):6216-6220
ZHANG Xiaodong, SONG Jiaying, CHEN Yiwen, et al. Comparative analysis of 2 methods for detection of peanut and soybean in walnut dew (milk) drinks [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(17): 6216-6220
- [9] 魏晓璐,黄鑫,冯悦,等.核桃乳(露)饮品中花生、大豆成分的 PCR 检测方法[J].食品工业科技,2014,35(13):288-291,295
WEI Xiaolu, HUANG Xin, FENG Yue, et al. Detection of peanut and soybean in walnut milk using PCR [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(13): 288-291, 295
- [10] 姜广泽,陈成统,赵海莹,等.基于 DNA 条形码 *ITS2* 的高分辨率熔解曲线鉴定市售核桃乳真伪[J].核农学报,2021,35(4): 870-880
JIANG Guangze, CHEN Chengtong, ZHAO Haiying, et al. Identification of commercially available walnut milk authenticity based on high resolution melting curve of DNA barcode *ITS2* [J]. J Nucl Agric Sci, 2021, 35(4): 870-880
- [11] Cruz S, Lopez-C I M, Alcorer M, et al. TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products [J]. Food Contro, 2013, 33(5): 105-113
- [12] 杨硕,江丰,刘艳,等.多重微滴式数字 PCR 定量检测市售核桃乳中核桃、大豆源性成分[J].食品科学,2017,38(16):280-286
YANG Shuo, JIANG Feng, LIU Yan, et al. Duplex digital droplet PCR for the determination of walnut-derived and soybean-derived ingredients in walnut protein drink [J]. Food Sci, 2017, 38(16): 280-286
- [13] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63
- [14] 石磊,王曼,时国强,等.环介导等温扩增技术研究进展[J].河北大学学报(自然科学版),2021,41(5):565-571
SHI Lei, WANG Man, SHI Guoqiang, et al. Research progress of lppp-mediated isothermal amplification technology [J]. J Hebei Univ (Natural Science Edition), 2021, 41(5): 565-571
- [15] Chen H, Zhong C, Zhang T T, et al. Rapid and sensitive detection of viable but non-culturable *Salmonella* induced by

- low temperature from chicken using EMA-Rti-LAMP combined with BCAC [J]. *Food Anal Method*, 2020, 13(2): 313-324
- [16] Xu J, Hu Y, Guo J, et al. A loop-mediated isothermal amplification integrated g-quadruplex molecular beacon (LAMP-GMB) method for the detection of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Food Anal Method*, 2019, 12(2): 422-430
- [17] Wachiralurpan S, Sriyapai T, Areekit S, Thongchai, et al. Development of a rapid screening test for *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral flow dipstick (LFD) [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(11): 3763-3772
- [18] Wang H, Liu X, Zeng F, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of porcine *Circovirus 3* [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(9): 703-708
- [19] 黄旭春, 关丽梅, 况文东, 等. 可视化 LAMP 技术快速检测新冠病毒的方法 [J]. *江西科学*, 2021, 39(4): 593-596, 621
HUANG Xuchun, GUAN Limei, KUANG Wendong, et al. Rapid detection of SARS - CoV -2 by visual LAMP technology [J]. *Jiangxi Sci*, 2021, 39(4): 593-596, 621
- [20] 王稼璇, 胡昱萱, 吴海星, 等. 转 *cryIAb/c* 水稻环介导等温扩增快速检测方法 [J]. *食品工业*, 2020, 41(5): 215-219
WANG Jiakuan, HU Yuxuan, WU Haixing, et al. Rapid detection of *cryIAb/c* gene in transgenic insect-resistant rice using loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Food Ind*, 2020, 41(5): 215-219
- [21] Zhou D, Guo J, Xu L, et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cryIAc* transgenic sugarcane [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(1): 275-292
- [22] 韦涛, 黄继锦, 黄惠琳, 等. 环介导等温扩增与 qPCR 用于检测肉制品中狗源性成分的比较 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3060-3070
WEI Tao, HUANG Jijin, HUANG Huilin, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and qPCR used for the detection of the dog-derived ingredients in meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3060-3070
- [23] Wang J, Wan Y, Chen G, et al. Colorimetric detection of horse meat based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Food Anal Method*, 2019, 12(11): 2535-2541
- [24] Shi Y, Yan Feng Y, Xu C, et al. Loop-mediated isothermal amplification assays for the rapid identification of duck-derived ingredients in adulterated meat [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10(7): 2325-2331
- [25] 朱海, 汪奇志, 孙成松, 等. 淡水鱼华支睾吸虫囊蚴 LAMP 检测方法的建立 [J]. *热带病与寄生虫学*, 2021, 19(4): 181-184, 189
ZHU Hai, WANG Qizhi, SUN Chengsong, et al. Establishment of LAMP technique for detecting metacercariae in freshwater fish infected with *Clonorchis sinensis* [J]. *J Trop Dis Parasitol*, 2021, 19(4): 181-184, 189
- [26] 梁美丹, 肖剑, 陈楷, 等. 磁珠法提取植物蛋白饮料 DNA [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(13): 5363-5368
LIANG Meidan, XIAO Jian, CHEN Kai, et al. Extraction of plant protein beverage DNA by magnetic beads [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(13): 5363-5368
- [27] BJS201707, 国家食品药品监督管理总局食品补充检验方法植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定 [S]
BJS201707, The Supplementary Inspection Methods for Food of China Food and Drug Administration with the Plant-derived Ingredients Identification in the Vegetable Methods Released [S]
- [28] 李宏, 雷质文. 食品微生物检测方法确认和证实手册 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 13-24
LI Hong, LEI Zhiwen. Handbook of Validation and Confirmation of Food Microbiological Methods [M]. Beijing: China Standard Publishing House, 2013: 13-24
- [29] 刘津, 陈源树, 凌莉, 等. 食品过敏原巴西坚果环介导等温扩增检测方法的建立与应用 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(14): 76-80
LIU Jin, CHEN Yuanshu, LING Li, et al. Construction and application of loop-mediated isothermal amplification method for detection of Brazil nut as a food allergen [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(14): 76-80
- [30] 杨硕, 李诗瑶, 王鸣秋, 等. 市售椰子汁(植物蛋白饮料)中椰子、大豆、花生源性成分鉴定的分子生物学方法 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(10): 4511-4517
YANG Shuo, LI Shiyao, WANG Mingqiu, et al. Digital droplet PCR for the determination of peanut and soybean-derived component in coconut protein drink [J]. *Genom Appl Biol*, 2018, 37(10): 4511-4517
- [31] Kim M J, Kim H Y. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use [J]. *Food Chemistry*, 2018, 246: 26-31
- [32] 陈启明. 克罗诺杆菌免疫学和分子生物学检测方法研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 1-19
CHEN Qiming. Immunological and molecular biological detection of *Cronobacter* spp [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016: 1-19

