

微针辅助快速DNA提取联合LAMP技术用于三文鱼的鉴别

曹书菡, 宁雯秋, 张芮宁, 刘丽婷, 杨雨婷, 孟凡达*

山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所), 山东 济南

收稿日期: 2025年8月13日; 录用日期: 2025年9月3日; 发布日期: 2025年9月12日

摘要

目的: 开发一种基于微针贴片提取DNA并联合LAMP技术识别特定DNA的方法, 实现特殊样本的快速采集与鉴别, 为市场监管、企业自检提供便携化解决方案。方法: 构建一种微针贴片以快速提取组织间液并采用吹打的方式洗脱DNA, 利用可视化LAMP比色法实现三文鱼的DNA鉴别。结果: 我们构筑的微针具有良好的外观表型、穿刺能力、抗形变能力与汲取能力, 能够辅助快速DNA提取联合可视化LAMP比色法, 可以在1 h内完成三文鱼的鉴别。结论: 本方法构建的微针能够实现DNA快速提取, 联合可视化LAMP比色法可快速实现对特定食品的鉴别, 为食品的市场监管提供科学依据。

关键词

微针提取, DNA鉴别, LAMP可视化检测

Microneedle-Assisted Rapid DNA Extraction Coupled with LAMP for Salmon Authentication

Shuhan Cao, Wenqiu Ning, Ruining Zhang, Liting Liu, Yuting Yang, Fanda Meng*

School of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan Shandong

Received: Aug. 13th, 2025; accepted: Sep. 3rd, 2025; published: Sep. 12th, 2025

Abstract

Objective: To develop a microneedle patch that could rapidly extract DNA and combine it with loop-

*通讯作者。

文章引用: 曹书菡, 宁雯秋, 张芮宁, 刘丽婷, 杨雨婷, 孟凡达. 微针辅助快速 DNA 提取联合 LAMP 技术用于三文鱼的鉴别[J]. 生物医学, 2025, 15(5): 967-974. DOI: 10.12677/hjbm.2025.155103

mediated isothermal amplification (LAMP) for the on-site identification of specific DNA, which enabled rapid collection and authentication of challenging samples and providing a portable tool for market surveillance and in-house quality control. Methods: A microneedle patch was constructed to collect interstitial fluid within minutes. The DNA was eluted by simple pipetting and immediately subjected to a visual LAMP assay designed to discriminate salmon DNA via colorimetric readout. Results: The optimized microneedle patch exhibited excellent structural integrity, high mechanical robustness, and efficient fluid uptake capacity. Combined with the colorimetric LAMP assay, it enabled unambiguous salmon authentication within one hour. Conclusion: The microneedle constructed by this method can achieve rapid DNA extraction, and combined with the visual LAMP colorimetric method, it can quickly identify specific foods, providing a scientific basis for food market supervision.

Keywords

Microneedle Extraction, DNA Identification, LAMP Visual Detection

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

食品真伪鉴别是强化市场监管效能、筑牢食品安全防线的关键技术支撑。三文鱼与虹鳟鱼因其外观高度趋同且价格差异显著,导致掺假问题频发。由于虹鳟鱼携带大量可寄生人体的寄生虫,生食风险高,因此,实现二者的精准鉴别至关重要。目前,针对三文鱼的真伪鉴别方法主要包括免疫学方法、分子方法、质谱法等[1],但各方法均存有一定局限。免疫学方法简便但灵敏度和特异性较低[1];分子方法(包括DNA条形码技术[2][3]和实时荧光聚合酶链反应技术[4][5]等)和质谱法[6]-[8]虽然存在准确性高的优点,但操作繁琐、耗时,需要专业设备和人员,限制了现场快速检测(Point-of-Care Testing, POCT)的应用。

为构建更高效、适配现场应用的三文鱼-虹鳟鱼精准鉴别技术体系,研究以样本提取与预处理的精准化优化为切入点,这是鉴别过程中最核心的环节。传统DNA提取方法涉及多步移液、离心步骤,存在耗时长,操作复杂等问题[9]-[12],难以满足POCT对“简便、快速、便携”的核心需求,成为制约分子鉴别技术向现场场景延伸的关键因素。相较于传统方法,基于微针的DNA快速提取技术作为一种新型样本处理方法,凭借其“原位取样-高效富集-快速释放”的一体化优势,有望替代传统DNA提取试剂盒,为食品质量安全现场快速检测技术的开发提供新路径[13]。

然而,现有基于微针提取技术的检测方式多采用聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)进行后续分析,该技术虽具备高特异性、高灵敏度及高分辨率等优势[14],但由于依赖复杂的实验室设备及专业操作人员且操作繁琐[15][16],仍难以满足POCT需求[17]。相比之下,环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)作为一种等温核酸扩增技术,不需要复杂的温度循环设备[18],操作简单,成本低廉,在POCT领域展示出显著优势。其中LAMP比色法,向反应体系添加特异性显色剂,可实现结果可视化:阳性样本呈现特定颜色变化,阴性样本保持初始颜色,无需专业设备即可实现判读。该方法不仅继承LAMP的高灵敏度特性,还具有宽样本适用性(兼容微针提取的多种水产样本DNA)及实时可视化能力,有效解决了传统核酸检测结果判读依赖专业设备的痛点,在食品质量安全现场检测领域具有广阔的前景[19]。

基于以上讨论,本研究创新性地采用微针快速提取DNA样本并联合LAMP比色技术识别特定DNA

的方法,开发了一种高效、高特异性的三文鱼与虹鳟鱼 POCT 鉴别体系,为鱼类物种鉴别提供了新思路。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

虹鳟鱼、三文鱼均来源于网购且拥有鉴定报告。

无水柠檬酸(CA)、碳酸钙(CaCO_3)、二氯甲烷(分析纯)购自上海沪试实验室器材股份有限公司;聚乙烯醇(PVA, 31000)、壳聚糖(CS, 200-400)、聚乳酸(PLA, 60000)、N,N-二甲基甲酰胺(分析纯)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;LAMP 目视法试剂盒购自深圳易致生物科技有限公司。

2.2. 实验仪器

恒温金属浴(DB100-2P, 群安科学仪器(浙江)有限公司);离心机(TGIBWS, 长沙湘智离心机仪器有限公司);可调式混匀仪(MX-S, 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司);真空抽气泵(GM-0.33A, 天津市津腾试验设备有限公司);鼓风干燥箱(DHG-9055A, 上海一恒科学仪器有限公司);PDMS 模板(中科微针(北京)科技有限公司赠送);微针强度测试仪(DT612W, 济南德天机电技术有限公司);体视显微镜(SMZ1270, 日本尼康公司)。

2.3. 实验方法

整个实验流程分为三个部分,依次为微针制备、微针性能测试、LAMP 可视化检测。在微针制备中我们选用聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)作为微针基材,并以浸涂法负载聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)涂层,成功制备了涂层微针。针对所制备的微针,通过力学性能检测、外观表型观察和提取性能评估进行了系统的性能表征。为验证微针快速提取 DNA 结合 LAMP 可视化检测的可行性,将微针提取的鱼肉样本 DNA 洗脱液与 LAMP pH 比色法联用开展实验。整体实验流程详见图 1。

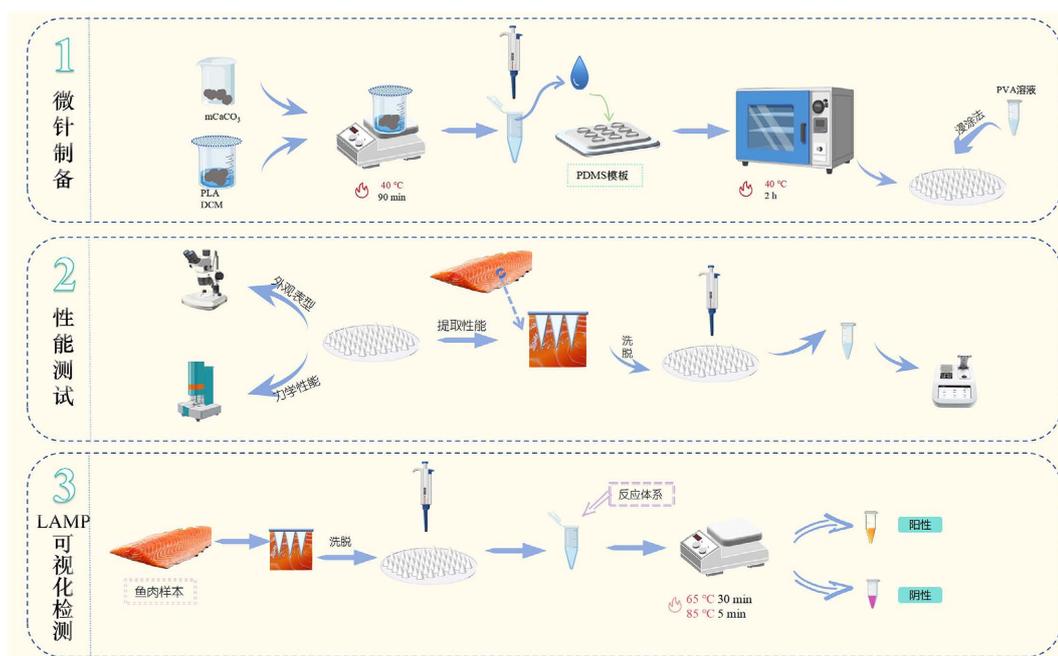


Figure 1. Overall experimental flow chart

图 1. 整体实验流程图

2.3.1. 微针制备

1) 针体制备

称取 1.25 g 的碳酸钙于烧杯，加入 10 mL N,N-二甲基甲酰胺和 0.625 g 柠檬酸，用培养皿盖住形成相对密封环境，放至 150℃ 恒温金属浴上加热 60 min。溶剂挥干后，将所得产物用蒸馏水洗涤，再置于室温下彻底干燥得到粉末状固体为 $m\text{CaCO}_3$ ，留存备用。

在含有 0.25 g 聚乳酸的烧杯中加入 27 mL 二氯甲烷溶液，并加入 0.14 g $m\text{CaCO}_3$ 形成 2 wt% $m\text{CaCO}_3$ 溶液以达到最佳力学强度。用培养皿盖住烧杯形成相对密封环境并将其置于恒温金属浴 40℃ 加热搅拌 90 min。随后立即用 200 μL 量程的移液枪将烧杯内的悬浊液加至微针 PDMS 模板中，并将模板放至负压抽气泵排气 1 h 使浊液充分填充针尖，然后将模板放至鼓风干燥箱中 40℃ 烘干 2 h 并于室温下放至一夜充分晾干，留存备用。

2) 涂层制备

称取 1 g PVA 溶于 4 mL 去离子水，80℃ 加热溶解制备 20 wt% PVA 溶液作为涂层。采用浸涂法将涂层覆于微针上，并于 40℃ 烘干 30 min，重复两次，将所制得的微针留存备用。

2.3.2. 微针性能评价

1) 形貌观察

将微针放于体视显微镜下不同倍数放大以观察微针形貌，评价微针针形是否良好、是否破损、胶黏、有翘边等。

2) 力学性能测试

利用力学检测仪，测试形变程度为 50% 时整片针的最大承受力并计算单根针的承受力，计算见式(1)。

$$N_{\text{单}} = N_{\text{总}}/n \quad (1)$$

式中： $N_{\text{单}}$ 为单根针在形变 50% 时最大承受力； $N_{\text{总}}$ 为形变 50% 时整片针最大承受力； n 为整片针的针数。

3) 提取能力评价

将微针刺入三文鱼与虹鳟鱼，汲取组织液 10 min 后取出。用移液枪吸取 100 μL 纯净水，反复吹打 8~10 次洗脱微针汲取的样本 DNA，收集洗脱液留存备用。使用超微量分光光度计测定提取样本溶液中 DNA 的含量。

2.3.3. 引物设计

我们采取三文鱼的(MN 850430.1) COI 序列并使用 LAMP Primer Explor 5.0 设计引物，引物序列如表 1 所示。

Table 1. Design primer sequences

表 1. 设计引物序列

| 引物 | 序列 |
|-----|--|
| F3 | CCCTTCTGGGAGATGACCAA |
| B3 | GGCTTCAACTCCAGATGAGG |
| LB | GACATAGCATTCCCCCGAATG |
| FIP | AGTTTCCAAAGCCGCGATCAT-ATTGTTACAGCCCATGCCTT |
| BIP | TCCTCTTATAATCGGGGCCCC-AAGGAGGGAGGGAGAAGTC |

2.3.4. 引物特异性检测及可视化 LAMP 可行性检测

1) 裂解法提取 DNA

分别称取三文鱼和虹鳟鱼的样品 30 mg, 放入装有 100 μL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH= 7.4)的离心管中, 使用金属浴 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 离心后上清液为提取到的基因组 DNA, 放置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱留存备用。

2) 可视化检测

在 PCR 管依次加入 12.5 μL 反应缓冲液、1 μL 混合反应液、3 μL 混合引物、2.5 μL 三文鱼或虹鳟鱼 DNA 提取液、6 μL 纯净水, 振荡混匀后, 将配制好的反应体系放于金属浴中 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min 终止反应, 取出冷却, 观察颜色变化, 根据颜色变化判定实验结果。

2.3.5. 实际样品检测

将微针隔着保鲜膜刺入三文鱼和虹鳟鱼样本, 保持 10 min 后取出。用移液枪吸取 100 μL 纯净水, 反复吹打微针 8~10 次, 洗脱样本 DNA 并收集洗脱液留存备用。在 PCR 管分别加入 12.5 μL 反应缓冲液、1 μL 混合反应液、3 μL 混合引物、2.5 μL 样本待测液、6 μL 纯净水, 振荡混匀后, 将配制好的反应体系放于金属浴中 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min 终止反应, 取出冷却, 观察颜色变化, 根据颜色变化判定实验结果。

3. 结果与分析

3.1. 微针性能评价结果

3.1.1. 形貌评价

通过体视显微镜观察微针外观, 结果如图 2 所示。整片针的针数为 522 根, 弯曲折断数目为 3 根。整体针形呈现出规则的锥形结构, 使得微针能更好地刺入鱼肉, 实现提取 DNA 的目的; 涂层均匀覆盖于微针表面, 无明显团聚、开裂或脱落现象, 表明该涂层与微针结合紧密, 可有效提高微针的提取性能; 此外, 微针阵列的基底平整度良好, 无明显翘边或缺损情况, 针体高度为 500 μm , 且针体高度均一性偏差小于 2%。这表明所制备微针具有良好的形貌特征, 其规整的阵列排布与高度的结构一致性, 为 DNA 提取过程的均一性提供了可靠保障。微针变形程度为 50% 时, 仍存有部分完好针尖, 并结合力学性能表明所制备微针具有较强的机械性能和抗形变性能。

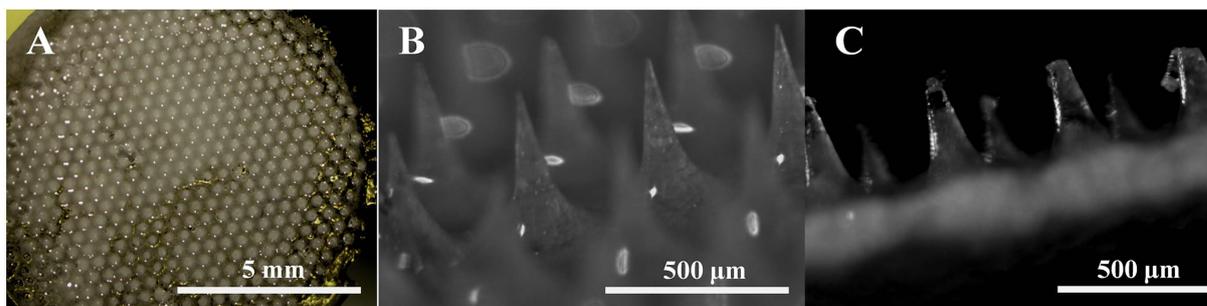


Figure 2. Overall appearance of microneedle patch before destruction (A) and the details of microneedles before (B) and after (C) destruction at a deformation degree of 50%

图 2. 微针破坏前整体外观表型(A) 微针破坏前(B) 以及变形程度为 50% 时的细节展示(C)

3.1.2. 力学性能评价

根据微针强度测试仪的数据显示(图 3), 当形变程度为 50% 时, 整片针的最大承受力为 41.18 N, 单根针能承受的力为 0.08 N。这表明该微针在可控形变范围内既能抵抗外力导致的结构性失效, 又能实现高效经皮穿刺。综上, 该微针阵列具备优异的抗形变能力与靶向穿刺性能, 满足经皮提取的力学性能指标要求。

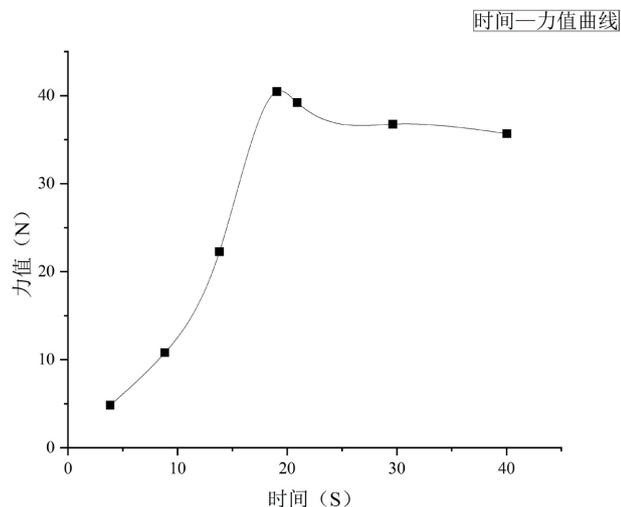


Figure 3. Time-force curve of microneedles when the deformation degree is 50%

图 3. 微针变形程度为 50% 时的时间 - 力值曲线

3.1.3. 提取性能评价

经过超微量紫外分光光度仪的测量(图 4), 虹鳟的浓度曲线的表明浓度值为 208.05 ng/ μ L, 浓度较高, 且 A260/A280 的比值为 2.299, 比值较高, 表明纯度较好; 三文鱼样品的核酸浓度为 215.00 ng/ μ L, 浓度较高; A260/A280 比值为 2.268, 样品纯度较高; 表明微针能够高效地从样品中提取到浓度高、纯度高的 DNA, 为后续的 LAMP 反应提供了高质量的 DNA 样本, 确保了实验结果的准确性和可靠性。

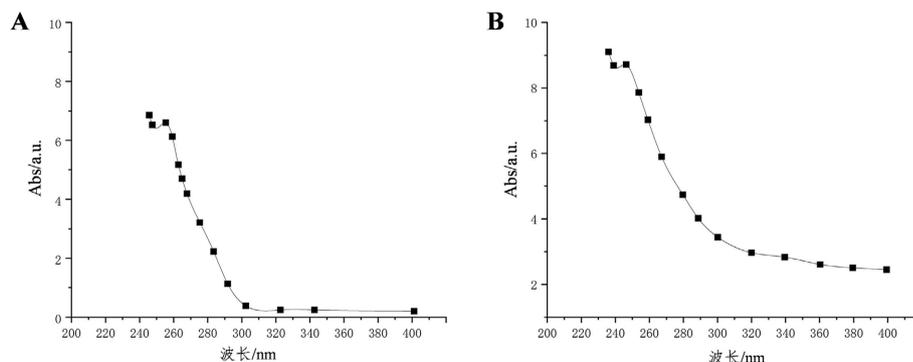


Figure 4. The nucleic acid curve diagram of rainbow trout (A) and salmon (B)

图 4. 虹鳟(A)和三文鱼(B)提取 DNA 曲线图

3.2. 检测结果

当靶标核酸存在(阳性反应)时, LAMP 扩增过程中会产生大量焦磷酸根离子, 与反应体系中的镁离子结合形成焦磷酸镁沉淀, 导致体系 pH 值下降, 此时试剂盒中的 pH 指示剂会由初始的洋红色转变为黄色; 而在非靶标核酸的情况下, 扩增反应未发生, 体系 pH 值保持近中性或弱碱性, 指示剂则维持初始的洋红色。以去离子水、裂解法提取到的三文鱼和虹鳟鱼的 DNA 以及微针提取到三文鱼和虹鳟鱼的 DNA 作为模板, 利用三文鱼 COI 基因的特异性引物进行 LAMP 扩增, 结果如图 5 所示。空白模板是指加 LAMP 检测试剂和去离子水; 标准阳性对照是指加入 LAMP 检测试剂和裂解法提取的三文鱼 DNA; 标准阴性对照是指加入 LAMP 检测试剂和裂解法提取的虹鳟的 DNA。扩增反应完成后, 可以明显看出, 标准阳性对

照呈现黄色, 标准阴性对照和空白模板都呈现洋红色, 能明显区分出靶标和非靶标之间的阳性和阴性之分。这表明该引物具有特异性, 能够有效区分靶标和非靶标, 显示出阳性和阴性结果, 从而验证了基于三文鱼 COI 基因设计的引物可用于三文鱼的 LAMP 可视化检测。此外, 微针提取的三文鱼 DNA (图 5(D)) 和标准阳性对照的颜色一致呈现黄色, 微针提取的虹鳟 DNA (图 5(E)) 和标准阴性对照的颜色一致呈现洋红色, 这表明微针提取 DNA 联合 LAMP 技术可用于实际的三文鱼鉴别中。

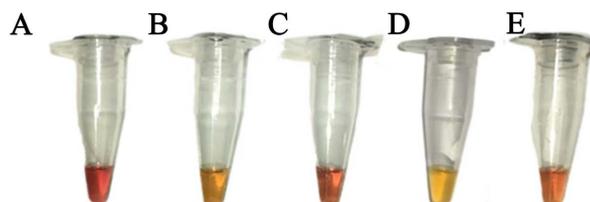


Figure 5. The visual LAMP results of blank template (A), standard positive control (B), standard negative control (C), microneedle-extracted salmon DNA detection (D) and microneedle-extracted rainbow trout DNA detection (E)

图 5. 可视化实验结果空白模板(A)、标准阳性对照(B)、标准阴性对照(C)、微针提取三文鱼 DNA 检测(D)、微针提取虹鳟 DNA 检测(E)

4. 讨论与结论

本研究证实, 涂层微针能够成功提取虹鳟鱼与三文鱼的 DNA, 其提取浓度分别可达 208 ng/ μ L 和 215 ng/ μ L, 这表明所制备的微针具备优异的 DNA 提取能力, 这一成果为实现 1 h 内完成从样本采集到结果判读的快速检测流程提供了科学依据。本研究结合 LAMP 比色法作为检测手段, 在结果判读中高效便捷, 结果表明通过微针快速提取 DNA 并联合 LAMP 比色法能够为三文鱼的 POCT 体系构建提供了创新性技术路径。本研究选用三文鱼的特异性引物, 实现了三文鱼与虹鳟鱼的精准鉴别, 还可拓展应用于其他鲑科鱼类与三文鱼的鉴别。因此, 微针辅助 DNA 快速提取联合 LAMP 技术不仅为三文鱼的 POCT 提供了全新方法, 还为其他物种 DNA 鉴别研究提供了新的思路。

为了进一步摆脱实验室条件的限制, 针对 LAMP pH 比色法存在的易受气溶胶污染、反应体系稳定性不足及易形成引物二聚体等局限性, 可以通过使用液体石蜡、设计密闭仪器避免开盖操作以减轻气溶胶污染, 优化引物的浓度比例, 添加有机添加剂、氧化石墨烯、尿嘧啶-DNA-糖基化酶、金纳米粒子减轻 LAMP 反应体系中的非特异性扩增, 使得反应体系更加满足现场便捷检测的需求。

未来, 我们期望开发出更为稳定的反应体系以突破 LAMP 反应的局限性, 以实现 DNA 的快速、稳定鉴别, 从而彻底摆脱对实验室设备的依赖, 最终达成“采样-提取-检测”一体化操作的目标。同时, 探索更适宜的样本储存方案与低成本原材料, 以期推动该技术的商业化转化与普及应用, 进而促进 DNA 鉴别技术的推广, 有效遏制食品假冒伪劣现象, 为食品安全保障体系的构建奠定坚实基础。

基金项目

山东省自然科学基金项目(ZR2022QB14), 山东第一医科大学教育教学改革研究项目(XM2023016)。

参考文献

- [1] 刘岑杰. 三文鱼品种快速鉴定的研究[J]. 品牌与标准化, 2025(4): 182-184.
- [2] 李蓉, 温瑞丹, 李晓环, 甘钰子纯, 保蕊, 王宁, 范丽仙. 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.
- [3] Bemis, K.E., Girard, M.G., Santos, M.D., Carpenter, K.E., Deeds, J.R., Pitassy, D.E., *et al.* (2023) Biodiversity of

- Philippine Marine Fishes: A DNA Barcode Reference Library Based on Voucher Specimens. *Scientific Data*, **10**, Article No. 411. <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02306-9>
- [4] 王坤, 林霖, 吴佳辉, 朱成杰, 余灏, 张世伟, 杨国武. 水产品及其制品中大西洋鲑鱼实时荧光 PCR 检测方法建立[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 298-302.
- [5] Wang, S., Xiong, X., Song, H., Wang, T., Li, Y. and Wang, L. (2024) 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. *Molecules*, **29**, Article 4904. <https://doi.org/10.3390/molecules29204904>
- [6] 陈伟娇. 质谱技术筛选生物标志物应用于鱼类种类识别[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2024.
- [7] Hong, Y., Birse, N., Quinn, B., Li, Y., Jia, W., van Ruth, S., et al. (2024) MALDI-ToF MS and Chemometric Analysis as a Tool for Identifying Wild and Farmed Salmon. *Food Chemistry*, **432**, Article 137279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137279>
- [8] 康超娣, 王守伟, 张颖颖, 张明悦, 赵文涛, 古瑾, 李莹莹. 液相色谱-串联质谱法对牛肉中掺假成分的相对定量分析[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 270-276.
- [9] 胡笛, 赵密, 李春宇, 于宁, 邓婷婷, 陈颖. 适用于现场即时检测的核酸快速提取新方法研究进展[J/OL]. 中国食品学报, 2025: 1-13. <https://link.cnki.net/urlid/11.4528.TS.20250429.1444.004>, 2025-04-29.
- [10] 张向向, 丁颖, 王小慧, 李红阳, 郜彦彦, 娄向弟. 不同前处理方法提取食源性病原菌基因组 DNA 的对比[J]. 食品工业, 2025, 46(5): 303-307.
- [11] 魏晓雅, 陈健, 李婷婷, 刘德星, 岳巧云. 不同加工方法对猪源性肉类基因组 DNA 提取效果影响的比较研究[J]. 质量与安全检验检疫, 2021, 31(4): 4-8.
- [12] 张丽, 王小会, 杨瑶, 方莹, 王海英. 食品质量与安全专业探究性试验教学的实践——以肉制品基因组 DNA 提取为例[J]. 食品工业, 2022, 43(12): 107-112.
- [13] Li, H., Feng, J., Wang, Y., Liu, G., Chen, X. and Fu, L. (2021) Instant and Multiple DNA Extraction Method by Microneedle Patch for Rapid and On-Site Detection of Food Allergen-Encoding Genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**, 6879-6887. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01077>
- [14] Escobar, D., Pérez, F., Ortiz, B. and Fontecha, G. (2023) PCR-RFLP Assays for the Identification of Anopheles (Diptera: Culicidae) Species Circulating in Honduras. *Malaria Journal*, **22**, Article No. 57. <https://doi.org/10.1186/s12936-023-04494-6>
- [15] 郭雨湄, 贾振军, 樊宇航, 刘瑞. 实时荧光定量聚合酶链式反应与微滴式数字聚合酶链式反应结合在肉类掺假定量检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 167-173.
- [16] 谭波. 牛肉制品中牛源性成分半定量检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2024.
- [17] Leonardo, S., Toldrà, A. and Campàs, M. (2021) Biosensors Based on Isothermal DNA Amplification for Bacterial Detection in Food Safety and Environmental Monitoring. *Sensors*, **21**, Article 602. <https://doi.org/10.3390/s21020602>
- [18] Novi, V.T., Meher, A.K. and Abbas, A. (2025) Visualization Methods for Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays. *The Analyst*, **150**, 588-599. <https://doi.org/10.1039/d4an01287a>
- [19] Tanner, N.A., Zhang, Y. and Evans, T.C. (2015) Visual Detection of Isothermal Nucleic Acid Amplification Using Ph-Sensitive Dyes. *BioTechniques*, **58**, 59-68. <https://doi.org/10.2144/000114253>