

基于 PCR 技术的肉类成分溯源鉴定方法研究进展

胡馨予¹, 黄朱梁², 汤海凤², 金雨婷¹, 管峰¹, 王萍亚^{2*}

(1. 中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 3160211)

摘要: 近几年屡屡曝光的食品安全事故引起了社会的广泛关注, 食品安全已经成为社会共同关注的问题, 肉类掺假造假现象更是层出不穷, 其中用低价鸡肉、鸭肉、猪肉等掺入、冒充牛羊肉成为主要的掺假方式。国内外进行肉类掺假鉴定主要以核酸作为靶标, 核酸鉴定也是物种鉴别最常用、最核心的方法, 以 DNA 检测为基础建立起来的 DNA 条形码、多重 PCR、荧光定量 PCR、荧光探针等技术也得到空前发展和广泛应用。我国针对动物源性成分检测也制定了相关国家标准和行业标准, 但大多现行标准中基于 DNA 检测建立的 PCR 技术只能检测单一物种, 滞后于技术的发展。目前, 基于 PCR 发展起来的衍生技术凭借其高灵敏度、强特异性和高通量等优势在动物源性成分检测工作中显示出巨大潜力, 也是肉类成分鉴定未来的重要方向。本文综述了 PCR 技术在肉类检测中的研究概况和现行标准的技术概况, 以期肉类成分鉴定研究提供信息。

关键词: 肉类; 食品掺假; DNA 检测; PCR 技术

Research progress in species identification methods of meat ingredients based on PCR technology

HU Xin-Yu¹, HUANG Zhu-Liang², TANG Hai-Feng², JIN Yu-Ting¹, GUAN Feng¹ WANG Ping-Ya^{2*}

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Zhoushan Institute for Food and Drug Inspection and Testing, Zhoushan 316021, China)

ABSTRACT: In recently, many food safety accidents that have been exposed repeatedly have attracted wide attention of the society, and food safety has become a common concern of the society. Meat adulteration and counterfeiting are emerging in an endless stream, using cheap chicken, duck and pork as adulterants and pretending to be beef and mutton is the main way of adulteration. The main target of animal species identification is nucleic acid in the meat adulteration identification, whether at home or abroad. Species identification based on nucleic acid is also the most common and core method to identify animal species. Many assays such as DNA barcoding, multiplex PCR, fluorescence quantitative PCR and fluorescence probe and others have been developed and applied widely in this field. China has also formulated relevant national standards and industry standards for the detection of many animal derived ingredients, but only a single species can be identified in most current standards, and these standards are almost not suitable for food ingredients. PCR derived technologies have advantages with high sensitivity and high specificity and widely used in the study of animal species identification, which would be important methods in future. This paper reviewed the research situation of PCR technology in meat detection and the current standard technology,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672394)、舟山市科技计划项目(2019C31041)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672394), Projects of Science and Technology Program of Zhoushan (2019C31041)

***通讯作者:** 王萍亚, 教授级高级工程师, 主要研究方向为生物制品安全。E-mail: zswpy666@sina.com

***Corresponding author:** WANG Ping-Ya, Professor Level Senior Engineer, Zhoushan Institute for Food and Drug Inspection and Testing, Zhoushan 316021, China. E-mail: zswpy666@sina.com

in order to provide information for the identification of meat composition.

KEY WORDS: meat food, food adulteration; DNA analysis; PCR methods

1 引言

“民以食为天”，食品质量安全关系到每一个人，也是关系着国计民生、社会安全的头等大事。随着人们对于食品的高质量追求，从有肉吃到选营养、选品质已经成为现代生活个性化消费的方向。目前，肉类食品成为人们日常消费品，其总体需求量以及高质量产品的需求都在日益增加，因此市场上牛羊肉价格优势明显。在这种情况下，有部分不法企业和个人为提升利益空间，使用劣质肉、猪肉和其他如鸡鸭肉做原材料以次充好、假冒牛羊肉产品，还有用猪肉浸泡加工后冒充牛羊肉，使用鸡鸭肉甚至于狐狸肉和老鼠肉加入冷冻牛羊肉中或者制作牛肉包、肠等食品掺假销售，给消费者带来健康危害和经济损失。2013 年一项对杭州农贸市场、晚间大排档、路边烧烤店和卤味店等随机调查中，被检测的 8 份牛肉制品中，5 份牛肉成分含量为 0，且 8 份检测样品全部含有猪肉成分。这意味着被检测的牛肉产品全部涉假，这种现象严重削弱了消费者的信心，影响了社会正常消费秩序。

目前，市场上用不同肉类进行食品掺假、欺瞒消费者的现象仍层出不穷，掺假手段也变化多端，更加隐蔽。对于动物源性食品中的肉类，最常见的掺假方式是掺入其他种类的肉或者加工后刻意改造外观颜色、气味，从而冒充价格更高的肉制品。近期，在媒体和诸多检查部门的督查下频频曝光的各类掺假现象严重损害了公众对于食用肉类消费的信心。我国在不断对食品肉品安全加大监测和监管力度，但是由于掺假隐蔽性强，假冒产品在监管力度不足的城郊结合部和农村市场销售，仍存在潜在安全隐患并损害消费者的经济利益。在欧美等国家，尽管食品监管程序相对比较完善，但是由于利益的巨大驱使，近几年肉品掺假事件也时有发生。一项关于近千种肉制品的调查监测结果显示，国外加工肉品中有近 20% 的产品存在标示与实际成分不符的现象^[1]。2013 年 1 月，“马肉风波”席卷欧洲多个国家，在部分牛肉制品中掺入了马肉，引发消费者反感。2013 年 2 月欧盟委员会拟订方案，要求所有成员国对加工牛肉开展 DNA 抽检，以消除“马肉风波”忧虑，恢复消费者信心。2013 年瑞典宜家餐厅在鹿肉制品中掺猪肉导致 17600 盒鹿肉制品被封存需鉴定后重新标明成分销售。这些严重的食品掺假事件不仅对社会公众的健康和正常的消费秩序构成了一定的威胁，引起了社会反感，还严重影响食品行业经济发展，阻滞正常销售和出口，一定程度上损坏了国家形象。因此，通过监测监管来保证食品质量和安全，是保证人们生活安全、建立良好社会市场秩序的重要

手段，也是维护肉类产制品企业贸易和个人消费者经济利益的工具，具有重要的社会和经济意义。本文综述了 PCR 技术在肉类检测中的研究概况和现行标准的技术概况，以期肉类成分鉴定研究提供信息。

2 肉类鉴定技术研究概况

随着我国在食品行业监管的加强，当前肉类掺假手段也变得更加隐蔽，更多肉类产品经过加工后外观和气味发生了改变，因此，传统的依靠感官和经验进行检测的手段已经不能满足对上述掺假肉制品进行监管的需求。在诸多肉类掺假鉴定技术中，感官检验因为准确性低且重复性差，同时还受到技术人员的经验差异而无法开展应用。其次，酶标免疫测定(enzyme-labeled immunoassay, ELISA)技术由于过程复杂、耗材和所需仪器较贵且需要特异性抗原或抗体，不但实验条件要求和成本高且难以鉴定未知物种来源的肉类^[2]，存在不足。因此，必须寻求一种快速高效、准确便捷的物种鉴定技术。随着对肉类鉴定技术的研究，现行方法和标准也有了一定程度的变化，掺假、鉴定以及标准和法规的制定推行是一个螺旋式上升的过程。

肉类掺假鉴定方法研究伴随着生物进化研究和生物信息分析等多学科的发展，基本确立了以特征性的蛋白、核酸作为物种特异性进行肉类掺假检验的基本思路^[3,4]。但另一方面，当肉类经高温烹调处理后，蛋白质变性降解导致蛋白鉴定技术的难度加大，准确性降低。而与蛋白质分子相比，DNA 分子除了具有种内保守性高、种间特异性强的优点外还具有比蛋白质更好的热稳定性，其核苷酸序列不会受到环境和加工条件影响而发生改变，核酸鉴定在准确性、稳定性和重复性方面凸显出更好的优越性^[5-7]。国内外目前实行的一系列动物源性产品中各种动物来源如猪、牛、羊、兔、马、驴、狗和鹿成分的鉴定均采用了 DNA 检测技术。

基于核酸检测发展起来的肉类鉴定技术主要是 PCR 及其衍生技术，由于反应时间短，具有较高的灵敏性和特异性，成为肉类鉴定中最常用的也是最核心的方法^[1,3,8,9]，并且在此技术上不断革新，开发了一系列先进的多重 PCR 和直接 PCR 等鉴定技术^[10-14]。基本理论基础是，根据不同物种基因序列的差异设计特异性引物或通用引物，利用 PCR 反应扩增特异基因片段进行检测，继而判断可能的物种来源。在目前报道的这些基于 DNA 检测技术中基本思路有 3 种，其一是依据每个物种各自的特异性序列设计引物分别进行扩增，得到大小不同的片段，依据产物大小和有无判定待测物种；其次是依据相近或同属物种保守序列

设计一端引物, 对向引物采用物种各自特异区域设计的策略, 依据各物种 PCR 产物大小和有无判定物种; 其三是在上述基础上加上探针或使用荧光定量 PCR 技术, 依据 DNA 的特异性鉴定物种。这些鉴定方法的共同点就是利用 PCR 反应实现目标基因片段的扩增, 继而通过电泳或荧光信号检测等方法来鉴别物种来源。PCR 鉴定物种来源的技术初衷是用于动物饲料中牛羊成分的检测, 以达到降低通过饲料传播疯牛病的风险^[15,16]。随着技术发展逐步结合多重 PCR、荧光定量 PCR、荧光探针等技术, 其在肉类和物种鉴别领域发挥着不同优势, 在此基础上形成了一系列鉴定规范化的标准。

首先, 以普通 PCR 为基础的鉴定方法, 其具有简单快速和低成本的优势, 对实验仪器和实验操作人员要求不高, 便于推广使用, 对于肉类鉴定也从单一成分增加到一次可以鉴定牛、羊、猪和鸡、鸭等多种成分, 但是自动化程度低。张弛等^[17]以线粒体 DNA(mtDNA)为检测靶标, 分别对牛和猪的细胞色素 B 区域设计引物实现了普通 PCR 技术对牛和猪肉成分及其产品的鉴定, 鉴定灵敏度达到提取 DNA 的纳克级。田金辉等^[18]同样以 mtDNA 为靶标, PCR 扩增 COI 基因序列后再进行限制性酶切, 即 PCR-RFLP 检测技术, 建立了对牛羊猪成分的鉴定方法。沙才华等^[19]通过对现有国家标准中牛和猪源性成分的鉴定方法优化, 实现了对食品中牛肉和猪肉成分的多重 PCR 检测, 灵敏度达到模板至 0.01 ng/ μ L, 总模板量 0.02 ng 的 DNA 仍能实现检测。此类方法已有大量报道且也在我国在行的技术标准中应用, 如《动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 法》^[20]和《饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法》^[21], 不过这些方法指定的适用范围是动物源性饲料的检测, 在样品处理方法和检测灵敏度与食品存在一定差异, 因此需要进一步研究确定食品肉类相应的处理方法、具体试剂并优化相关引物。

通用引物 PCR 是一种以物种间保守序列设计的引物, 该引物可以对多个物种进行基因片段的 PCR 扩增, 依据扩增区域间 PCR 产物的长度多态性进行物种鉴定。通用引物 PCR 会产生不同长度的产物, 每个产物对应特定的物种^[22,23]。通用引物 PCR 也多以线粒体 DNA 为靶标, 包括 16S rRNA 基因和 CytB 基因等, 已经用于常见物种如猪、牛、羊和鸡的鉴定^[24-26]。但限于线粒体 DNA 序列的保守性和引物设计的特殊性, 该技术在物种鉴定中也存在不足, 往往难以找到合适引物而造成扩增产物大小差异不明显, 难以用简便便宜的琼脂糖电泳区分长度差异较小的片段, 有时候需要耗时更长的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行鉴别, 或者引物的灵敏度不高而导致无法扩增出所需片段^[22,27]。Xue 等^[23]设计了牛、牦牛、水牛、绵羊、山羊、猪、骆驼和鹿共 8 种动物的通用引物, 实现了一对引物对多种动物的同时鉴定, 大大提高了该技术的检测通用性

和效率。该技术关键在于能够寻找到多个物种的通用引物并进行体系的优化。

DNA 条形码是在生物信息技术和基因序列数据库全面发展的基础上发展而来的以 PCR 为核心的物种鉴定技术, 目前已经成为物种鉴定中最广泛应用的技术, 其优势在于能对未知物种进行鉴定^[28,29]。但同时由于 DNA 条形码技术的核心是线粒体 DNA 的特异性序列和通用引物, 而在常见肉类动物如猪、牛、羊和禽类中, 线粒体 DNA 同源性较高, 靶标 DNA 同源性较高会导致难以鉴定到具体种类, DNA 条形码用于鱼类和无脊椎动物鉴定较多, 而常见肉用动物的鉴定较少^[29-31]。相比之下, DNA 条形码技术也存在不足, 如果待测样品中为两种或以上的物种混合肉类时, PCR 产物为非单一序列, 往往造成测序信息错误而导致无法判定具体物种^[30,32]。宏 DNA 条形码(DNA metabarcoding)技术则弥补了上述的不足, 可以同时检测多个物种, 还具有成本低、通量高、速度快等诸多优点^[31,33], 展示了 DNA 条形码技术的强大潜力。

其次, 实时荧光定量 PCR 用于肉类和动物源性成分的鉴定使该技术进一步提升了灵敏度和特异性, 提高效率的同时还可以实现高通量甚至定量检测, 已经广泛用于饲料和生物制品如明胶等动物源性成分的检测鉴定^[11,34-36]。我国也已经建立了一系列基于荧光定量 PCR 技术监测的国家标准和行业标准, 但是该方法相对成本高、仪器昂贵。王建昌等^[37]参照国标法分别设计了牛、羊和鸭的参照引物以及鸭的特异性引物和探针, 建立了鸭肉冒充羊肉的荧光定量 PCR 鉴定方法。2008 年颁布的适用于食品中牛羊猪源性成分监测的行业标准 SN/T 2051-2008 也采用了实时 PCR 法^[38]。国外也建立了从多种动物成分中监测猪肉、鸡肉等可能存在掺假情况的实时 PCR 方法^[39-41], 使得该技术在动物源性成分检测领域得到了推广。

最后, 以探针杂交、恒温扩增 [(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和 RCA 技术]和基因芯片以及 DNA 测序为核心的检测技术方法虽然具有快速灵敏以及高自动化检测的特点, 但是检测所需成本高、仪器要求高、价格昂贵, 同时可能还有假阳性率高的问题, 尚未在监管部门得到推广使用。

3 肉类检测靶基因的选择

以 DNA 为基础的肉类 PCR 检测技术发展已有 20 多年的历史, 相应发展并建立了诸多 PCR 技术, 在此基础上结合荧光定量、探针以及免疫学技术, 大大提高了检测的效率和灵敏度。在以 DNA 为靶标的检测方法中, mtDNA 由于具有分子量小、总长 16 kb 左右、拷贝数多、种间高度变异性、热稳定好等优势成为物种检测最具潜力的靶标^[8,10]。mtDNA 大量存在于所有组织细胞中, 无组织特异性, 在 D-loop 区段内还具有动物区别于植物所独有的部分

编码基因,加上种内变异少而种间变异大的遗传特征使之适于做物种鉴定^[39],其中 mtDNA 的 CytB、16S rRNA 和 12S rRNA 以及 D-loop 区成为物种鉴定的常用基因。由于 mtDNA 的稳定性和特异性,同时还具有 DNA 分析的便捷性、不受组织类别限制等诸多优点。研究还显示,当肉加热到 100 °C 时 DNA 片段锐减到 1100 bp 左右,当温度 120 °C 时减至 600 bp 以下,而线粒体 DNA 则具有更好的稳定性^[10],因此 mtDNA 是一个比较理想的、用于物种检测的靶标。

4 国内现行检测标准分析

目前我国在行国家标准中还很少有针对肉类食品溯源检测的通用标准,目前主要依据《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法实时 PCR 法》^[38]和一些相关标准,如国标《饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法》^[21]、《动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法实时荧光 PCR 方法》^[43]、《动物源性饲料中鹿源性成分定性检测方法 PCR 方法》^[44]、《动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR 方法》^[45]、《动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 方法》^[20]、《动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法 PCR 方法》^[46]和行业标准《进出口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR 方法》^[47]等。上述在行标准检测方法中,首先对样品进行总 DNA 提取,之后利用待检动物的特异性引物进行 PCR 扩增,扩增特定片段 DNA,继而后用琼脂糖凝胶电泳检测或荧光信号检测。这些标准方法经过了严格的设计和验证,具有很好的稳定性^[48],但是这些标准方法也存在各自的优缺点,首先《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法实时 PCR 法》^[38]中,采用 TaqMan 探针实时荧光多通道检测,在对牛羊成分同时检测时需要使用三种荧光材料,还需探针。另外,检测过程需要使用指定公司的牛、羊、猪或者牛羊源性成分实时荧光 PCR 试剂盒。这些技术的使用不但需要荧光定量 PCR 检测系统,还要依赖于公司的试剂盒,该方法无论实验室仪器还是检测成本都会提高。《动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 法》^[20]中单单是针对猪成分的检测,还需要对 PCR 产物进行酶切验证,因此检测效率不能满足当前检测要求。《饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法》^[21]中也不能实现一次反应对牛羊的同时检测,也需要酶切验证步骤,而且后两者主要使用范围是动物性饲料,在样品处理中与肉食品处理存在差异。

检索我国当前对于食品中肉品成分的鉴定标准,发现目前适用于食品中牛羊源性成分鉴定的标准主要是 2008 年颁布的行业标准《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法实时 PCR 法》^[38],同时在检测中也参照 2006 和 2007 年先后颁布的关于动物源性成分的检测

标准^[48],检测对象主要是饲料中动物源性成分,检测物种包括猪、牛、羊、兔、马、驴、狗和鹿,而检测技术包括了普通 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR 和探针检测等,这些方法多数只能检测单一物种,另外这些方法还在 PCR 技术上结合了多重 PCR、酶切鉴定技术、二次 PCR 或者荧光定量技术,这些附加过程无疑延长了检测时间还增加了实验设备的要求,也相应增加人力物力,因此需要建立更为简单快捷的鉴定技术来满足市场各类肉制品成分检测的需要。综上所述不难看出,这些方法都存在一定的优缺点,需要技术革新来更好地满足检测单位对市场监管的需求。因此,需要对上述方法进行优化或者推行简单易行的 PCR 检测技术来满足当前市场检测的需求。

5 小结与展望

现代分子分析方法和信息技术的结合为肉类掺假鉴定技术的发展提供了广阔的平台。蛋白分析和 DNA 分析技术都可以在一定条件下进行肉类掺假鉴定分析。基于 DNA 检测发展起来的 PCR 技术具有特异性好、不受样品限制的特点,已经成为国内外肉类掺假检测的主流方法,许多国家建立并执行了多个 PCR 技术相关的检测标准。我国也一直同步国际动物产制品中动物源性成分的检测和肉品中掺假检测技术,相应建立了国家标准和行业标准。但是,我国目前肉类掺假问题多发于小企业、小作坊、农贸市场和夜市,因此基层食品监管对肉类掺假检验能力的需求日益强烈,而现有国家标准和技术不能很好的满足对市场的检测需求。因此,首先需要完善现有 PCR 检测技术,使之更加灵敏稳定;其次研发一些成本较低、耗时短、高通量的检测方法,如直接 PCR 技术和多重 PCR 检测体系的结合^[49,50],使之形成快速筛查与结果确证互补的检验体系,是未来市场需求和肉类掺假、物种鉴定技术的发展趋势和方向;最后,积极推进高效便捷的检测技术新标准,相关部门和组织加大监察监管力度促使相关技术标准的推广。

参考文献

- [1] He WL, Huang M, Zhang C. Recent technological advances for identification of meat species in food products [J]. Food Sci, 2012, 33(3): 304-307.
- [2] Singh VP, Pathak V, Nayak NK, et al. Recent developments in meat species speciation—a review [J]. J Livestock Sci, 2014, 5: 49-64.
- [3] 王金斌,李文,白蓝,等.基于核酸分子学方法的肉类成分鉴别技术研究进展[J].食品科学,2017,(11): 318-327.
Wang JB, Li W, Bai L, et al. Advances in meat ingredient identification techniques based on nucleic acid molecular methods [J]. Food Sci, 2017, (11): 318-327.
- [4] 王冬亮,何锦林,王文智,等.分子生物学技术在肉制品鉴别的研究进展[J].食品工业,2016,(2): 223-226.

- Wang DL, He JL, Wang WZ, *et al.* Advances in molecular biology in the identification of meat products [J]. *Food Ind*, 2016, (2): 223–226.
- [5] 吕冬梅, 黄原, 文慧, 等. DNA 条形码技术在食品鉴定中的应用[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 248–254.
- Lv DM, Huang Y, Weng H, *et al.* Application of DNA barcoding in food identification [J]. *Food Sci*, 2015, 36(9): 248–254.
- [6] 王守云, 袁明美, 封聪, 等. 肉类掺假鉴别技术研究进展[J]. *肉类研究*, 2017, (4): 56–61.
- Wang SY, Yuan MM, Feng C, *et al.* Advances in meat adulteration identification technology [J]. *Meat Res*, 2017, (4): 56–61.
- [7] 李宗梦, 赵良娟, 王永芳, 等. 肉及肉制品分子生物学鉴别技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, (2): 405–409.
- Li ZM, Zhao LJ, Wang YF, *et al.* Advances in molecular biological identification of meat and meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (2): 405–409.
- [8] 薛超波, 王萍亚, 李素芳, 等. 基于 PCR 多物种鉴定技术及其在肉类鉴定中的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 561–566.
- Xue CB, Wang PY, Li SF, *et al.* Advances in multispecies identification based on PCR and its application in meat identification [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(2): 561–566.
- [9] 刘帅帅, 李宏, 罗世芝, 等. PCR 技术在肉类掺假检验中的应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2011, 2(6): 280–284.
- Liu SS, Li H, Luo SZ, *et al.* Advances in the application of PCR technology in meat adulteration testing [J]. *J Food Saf Qual*, 2011, 2(6): 280–284.
- [10] 罗家琴, 王加启, 卜登攀, 等. 饲料中牛、羊、猪、鸡源性成分的 PCR 检测方法及其应用[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2112–2119.
- Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, *et al.* PCR method for determination of bovine, sheep, pig and chicken derived components in feed and its application [J]. *Chin Agric Sci*, 2008, 41(7): 2112–2119.
- [11] 冯永巍, 王琴. 肉类掺假检验技术研究进展[J]. *食品与机械*, 2013, 29(4): 237–240.
- Feng YW, Wang Q. Advances in meat adulteration inspection technology [J]. *Food Mach*, 2013, 29(4): 237–240.
- [12] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct–multiplex PCR assay for meat species identification in food products [J]. *Food Chem*, 2014, 163: 77–82.
- [13] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex–direct PCR assay for meat identification [J]. *Forensic Sci Int: Genet Suppl Ser*, 2013, 4(1): e33–e34.
- [14] Song KY, Wang HJ, Kim JH. Ultra–fast DNA–based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on–site applications [J]. *Food Chem*, 2017, 229: 341.
- [15] 刘炬, 郑文杰, 赵卫东, 等. 饲料中六种动物源性成分多重 PCR 快速检测方法[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 141–144.
- Liu X, Zheng WJ, Zhao WD, *et al.* Rapid detection of six animal–derived components in feed by multiple PCR [J]. *Food Res Dev*, 2009, 30(3): 141–144.
- [16] 陈颖, 吴亚, 君徐宝, 等. 进出口动物源性产品中牛羊成分的检测方法[J]. *食品工业科技*, 2004, (8): 144–146.
- Chen Y, Wu Y, Jun XB, *et al.* Methods for the determination of bovine and sheep components in imported and exported animal products [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2004, (8): 144–146.
- [17] 张弛, 杨军, 王晓丽. 基于线粒体编码基因差异对食品中牛肉与猪肉成分的鉴别[J]. *食品科技*, 2011, 36(1): 84–88.
- Zhang C, Yang J, Wang XL. Identification of beef and pork components in food based on mitochondrial coding gene differences [J]. *Food Sci Technol*, 2011, 36(1): 84–88.
- [18] 田金辉, 尉婷媛, 周占琴, 等. 3 种动物性食品的分子生物学鉴定方法研究[J]. *西北农林科技大学学报*, 2011, 39(1): 199–203.
- Tian JH, Wei TY, Zhou ZQ, *et al.* Study on molecular biological identification of three kinds of animal food [J]. *J Northwest A & F Univ*, 2011, 39(1): 199–203.
- [19] 沙才华, 杨素, 廖秀云, 等. 应用三重 PCR 方法鉴别肉制品中猪和牛源性成分[J]. *检验检疫*, 2011, 272(12): 52–53.
- Sha CH, Yang S, Liao XY, *et al.* Triple PCR was used to identify porcine and bovine components in meat products [J]. *Insp Quar*, 2011, 272(12): 52–53.
- [20] GB/T 21101–2007 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 方法[S].
- GB/T 21101–2007 Method for qualitative determination of porcine components in animal feed – PCR method [S].
- [21] GB/T 20190–2006 饲料中牛羊源性成分的定性检测: 定性聚合酶链式反应(PCR)法[S].
- GB/T 20190–2006 Qualitative determination of bovine and sheep derived components in feed: qualitative polymerase chain reaction (PCR) method [S].
- [22] Horreo JL, Ardura A, Pola IG, *et al.* Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(2): 354–361.
- [23] Xue C, Wang P, Zhao J, *et al.* Development and validation of a universal primer pair for the simultaneous detection of eight animal species [J]. *Food Chem*, 2017, 221: 790–796.
- [24] 薛超波, 王萍亚, 李素芳, 等. 一对同时鉴定 8 种动物源性成分的通用引物及应用[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(6): 271–275.
- Xue CB, Wang PY, Li SF, *et al.* A pair of universal primers for simultaneous identification of eight animal–derived ingredients [J]. *Mod Food Technol*, 2017, 33(6): 271–275.
- [25] 柳楠, 刘积凤, 赵金山, 等. 基于线粒体 16SrRNA 基因扩增检测动物源性成分的方法研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(15): 74–78.
- Liu N, Liu JF, Zhao JS, *et al.* A method for the detection of animal–derived components based on mitochondrial 16SrRNA gene amplification [J]. *Chin J Animal Sci*, 2016, 52(15): 74–78.
- [26] 步迅, 张全芳, 刘艳艳. 一种同时鉴定山羊、绵羊、猪和鸭肉源性的荧光标记基因复合扩增方法, 中国, CN201310368498.2 [P]. 2013.
- Bu X, Zhang QF, Liu YY. A fluorescent marker gene compound amplification method for simultaneous identification of goat, sheep, pig and duck origin, China, CN201310368498.2 [P]. 2013.
- [27] Ben–Amar A, Oueslati S, Mliki A. Universal direct PCR amplification system: a time– and cost–effective tool for high–throughput applications [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(4): 246.
- [28] 凌胜男, 吴亚君, 韩建勋, 等. DNA 条形码技术在深加工动物制品源性成分鉴定中的应用研究进展[J]. *肉类研究*. 2017, 31(1): 48–54.
- Ling SN, Wu YJ, Han JX, *et al.* Advances in the application of DNA barcoding technology in the identification of source components of

- processed animal products [J]. *Meat Res*, 2017, 31(1): 48–54.
- [29] 张伟, 黄涛, 孙彩霞, 等. DNA 条形码技术在肉类鉴别中的应用研究进展[J]. *中国草食动物科学*, 2016, (2): 53–57, 74.
Zhang W, Huang T, Sun CX, *et al*. Advances in the application of DNA barcoding in meat identification [J]. *Chin Herbivore Sci*, 2016, (2): 53–57, 74.
- [30] 姚鹏程, 安梅. DNA 条形码的研究现状概述[J]. *生物学教学*, 2016, (10): 9–11.
Yao PC, An M. Overview of the research status of DNA barcoding [J]. *Biol Teach*, 2016, (10): 9–11.
- [31] Staats M, Arulandhu AJ, Gravendeel B, *et al*. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(17): 4615–30.
- [32] Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, *et al*. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes) [J]. *Mol Ecol Resour*, 2015, 15(4): 945–52.
- [33] 肖家光, 张少秋, 高天翔, 等. 浙江近海鳕属鱼类形态描述及中国鳕属鱼类分子系统发育分析[J]. *水生生物学报*, 2018, (1): 99–105.
Xiao JG, Zhang SQ, Gao TX, *et al*. Zhejiang offshore Xi fish shape description and molecular phylogenetic analysis [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2018, (1): 99–105.
- [34] 郭凤柳, 熊蕊, 刘晓慧, 等. 应用 PCR 技术检测掺假肉类[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(2): 541–545.
Guo FL, Xiong R, Liu XH, *et al*. Detection of adulterated meat by PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 541–545.
- [35] 任君安, 黄文胜, 葛毅强, 等. 肉制品真伪鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 247–257.
Ren JA, Huang WS, Ge YQ, *et al*. Advances in the identification of meat products [J]. *Food Sci*, 2016, 37(1): 247–257.
- [36] GB/T 25165–2010 明胶中牛、羊、猪源性成分定性检测方法实时荧光 PCR 法[S].
GB/T 25165–2010 Qualitative determination of bovine, sheep and pig-derived components in gelatin by real-time fluorescence PCR [S].
- [37] 王建昌, 王金凤, 陈瑞春, 等. 鸭肉冒充羊肉的分子生物学检测[J]. *肉类研究*. 2012, 26(6): 20–23.
Wang JC, Wang JF, Chen RC, *et al*. Molecular biological detection of duck meat masquerading as beef and mutton [J]. *Meat Res*, 2012, 26(6): 20–23.
- [38] SN/T 2051–2008 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法: 实时 PCR 法[S].
SN/T 2051–2008 Method for determination of bovine, sheep and pig derived components in food, cosmetics and feed: real-time PCR method [S].
- [39] Abdulmawjood A, Krischek C, Wicke M, *et al*. Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real time-PCR [J]. *Meat Sci*, 2012, 91(3): 272–276.
- [40] Kesmen Z, Yetiman AE, Sahin F, *et al*. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(2): 167–173.
- [41] Safdar M, Abasiyanik MF. Simultaneous identification of pork and poultry origins in pet foods by a quick multiplex real-time PCR assay using EvaGreen fluorescence dye [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(7): 1855–64.
- [42] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. *中国农业科学*. 2012, 45(9): 1873–1880.
He WL, Zhang C, Yang J, *et al*. Rapid identification of four meat components in food by multiple PCR [J]. *Chin Agric Sci*, 2012, 45(9): 1873–1880.
- [43] GB/T 21103–2007 动物源性饲料中哺乳动物源性成分检测方法实时荧光 PCR[S].
GB/T 21103–2007 Methods real-time PCR was used to detect mammalian derived components in animal feed [S].
- [44] GB/T 21106–2007 动物源性饲料中鹿源性成分定性检测方法 PCR 方法[S].
GB/T 21106–2007 Methods for qualitative determination of deer – derived components in animal – derived feed [S].
- [45] GB/T 21107–2007 动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR 方法[S].
GB/T 21107–2007 Method for qualitative determination of horse and donkey derived components in animal feed – PCR method [S].
- [46] GB/T 21104–2007 动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法 PCR 方法[S].
GB/T 21104–2007 Qualitative determination of ruminant derived components (cattle, sheep, deer) in animal feed – PCR method [S].
- [47] SN/T 1119–2002 进出口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR 方法[S].
SN/T 1119–2002 Methods for the determination of bovine and sheep components in imported and exported animal feed – PCR method [S].
- [48] 张明, 王冬妍, 杨文奇, 等. 牛羊肉中猪源性成分检测能力验证研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(5): 1605–1609.
Zhang M, Wang DY, Yang WQ, *et al*. Study on the ability of detecting porcine components in beef and mutton [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(5): 1605–1609.
- [49] Tagliavia M, Nicosia A, Salamone M, *et al*. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 375–378.
- [50] Alexander L. Rapid, effective DNA isolation from osmanthus via modified alkaline lysis [J]. *J Biomol Technol*, 2016, 27(2): 1–8.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



胡馨予, 硕士, 主要研究方向为生化分子生物学。

E-mail: 1124415784@qq.com



王萍亚, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验检测技术。

E-mail: zswpy666@sina.com