

SB/T 10923—2012 掺假肉类 DNA 检测方法的改进与评价

胡思玉*, 林晓娟, 杨秋玲

(南平市食品药品检验检测中心, 南平 353000)

摘要: 目的 对 SB/T 10923—2012《肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法》检测方法进行改进, 评价其应用于掺假肉 DNA 鉴定的价值。**方法** 评价改进后方法的特异性和掺假比例检测能力, 并用 7 份预包装生鲜冷冻肉制品考察实际检验效能。**结果** 改进后的方法在 Cq 阈值为 30 时, 能够有效区分 20 ng/反应的特异模板, 最低可检出 0.5% (w:w) 的掺假比例。对 7 份样品共进行 24 个肉源成分检测, 与标签符合率为 95.8% (23/24)。有 1 种鸭源性成分未检出, 可能和混样不均匀有关。**结论** 改进后的方法可快速、特异、简便地用于掺假肉常规检测。

关键词: 实时荧光 PCR; 猪肉; 牛肉; 羊肉; 鸡肉; 鸭肉

Improved and evaluation of SB/T 10923—2012 DNA detection method for adulterated meat

HU Si-Yu*, LIN Xiao-Juan, YANG Qiu-Ling

(Nanping Institute for Food and Drug Control, Nanping 353000, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the value of the improved SB/T 10923—2012 *Identification of animal derived materials in meat and meat products-real-time PCR methods* in DNA detection of adulteration meat. **Methods** The specificity and adulteration ratio detection ability of the improved method were evaluated, and the actual inspection efficiency was investigated with 7 pre-packaged fresh frozen meat products. **Results** When the Cq threshold was 30, the improved method could effectively distinguish the specific template at 20 ng/reaction, and the lowest detectable ratio of adulteration was 0.5% (w:w). A total of 24 meat-derived components were detected from 7 samples, and the coincidence rate with the label was 95.8% (23/24). One duck-derived component was not detected, which might be related to uneven sample mixing. **Conclusion** The improved method could be rapidly, specifically and conveniently used for routine detection of adulterated meat.

KEY WORDS: real-time PCR; pork; beef; sheep; chicken; duck

0 引言

掺假肉问题一直是公众关注的焦点^[1-4], 它不仅损害了消费者利益, 也给食品安全带来潜在风险。最常见的掺

假方式是用鸡鸭猪等可食用肉类掺到牛羊肉中, 常见 3 种以上的肉类掺杂^[5-8]。因此, 亟需能同时检测猪、牛、羊、鸡和鸭等常见动物源性成分的食品检验标准。此类国家标准和行业标准近年陆续发布, 包括 GB/T 35917—2018《常

*通信作者: 胡思玉, 博士, 主管药师, 主要研究方向为实时 PCR 技术。E-mail: 2928242485@qq.com

*Corresponding author: HU Si-Yu, Ph.D, Pharmacist, Nanping Institute for Food and Drug Control, Nanping 353000, China. E-mail: 2928242485@qq.com

见动物源性成分快速测定 膜芯片法》、GB/T 35918—2018《动物制品中动物源性检测基因条码技术 Sanger 测序法》、GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》、SB/T 10923—2012《肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法》和 NY/T 3309—2018《肉类源性成分鉴定 实时荧光定性 PCR 法》等。前两者采用膜芯片法和 Sanger 测序法, 仪器设备昂贵、操作烦琐, 而且容易有 PCR 后处理污染问题。后三者采用实时荧光 PCR 方法, 快速准确, 是目前最为通用的基因检测方法。但是, GB/T 38164—2019 不能用一个 PCR 反应程序同时检测猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉这 5 种动物源性成分, 而 NY/T 3309—2018 不能直接使用成熟方便的商业化 DNA 提取试剂盒提取, 费时费力。相比之下, SB/T 10923—2012 不仅可以用一个 PCR 反应程序同时检测上述 5 种成分, 而且可以采用商业化 DNA 提取试剂盒, 用于日常检验较为便利。

为了避免交叉污染和提高检验适用性, 本研究对 SB/T 10923—2012 的核酸提取、PCR 反应体系、程序和阈值判定等方面进行优化改进, 考察改进体系的特异性和掺假检测能力, 用实际样品评价体系的检测能力, 以期建立准确、便捷、实用的通用检测方法, 为掺假肉日常检验提供技术支持, 也为物种鉴定的标准编制和研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

AR2140 电子分析天平(美国奥豪斯公司); GeneReady Standard 生物样品快速制备系统(杭州遂真生物技术有限公司); CHB-T2-B 恒温金属浴(杭州博日科技股份有限公司); ND-ONE-W 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CFX96 Touch™实时 PCR 仪(美国伯乐公司); Centrifuge 5418 台式离心机(德国艾本德公司)。

1.2 试剂

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化试剂(北京)有限公司]; GeneReady 动物组织试剂盒 P1 研磨管(杭州遂真生物技术有限公司); Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 引物探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 样品

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉及 7 份预包装冷冻食品样品均购自超市。猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉和鸭肉均为 0.5~2 kg 的整块新鲜肉块, 用保鲜袋独立包装, 冷冻运输。

1.4 DNA 提取

PCR 检测体系设立目标动物肉样的阳性对照和非目

标动物肉样的阴性对照。每份样品、阳性对照和阴性对照各取 50 mg。将采集的样品和对照, 分别放入研磨管, 加入 300 μL 缓冲液 GA 和 30 μL Proteinase K。研磨管置生物样品快速制备系统均质 1 min 成细胞悬液, 研磨管置于恒温金属浴中 60 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min, 再于 10000 r/min 离心 1 min 后, 吸取 200 μL 离心后上清至 1.5 mL 离心管。离心管中加入 200 μL 缓冲液 GB, 并按 DNA 提取试剂盒说明书进行后续提取步骤, 最后用 100 μL TE buffer 洗脱。

用超微量分光光度计对提取的 DNA 进行测定。DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 1.8~2.0 之间, 且浓度在 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上, 可用于 DNA 扩增。样品和对照 DNA 均稀释成 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 作为扩增模板, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.5 掺假比例

用研磨均质后的细胞悬液体积比例代表混合肉样重量比, 混合成总体积 200 μL 的样品, 按表 1 混匀并提取 DNA。其中, 牛肉的细胞悬液分别掺猪肉、鸡肉和鸭肉的细胞悬液, 羊肉的细胞悬液也分别掺猪肉、鸡肉和鸭肉的细胞悬液, 模拟重量比的肉样。

表 1 掺假比例
Table 1 Adulteration proportion

混合肉样	掺假比例 /%	猪/鸡/鸭 细胞悬液/ μL	牛/羊 细胞悬液/ μL
	75	150	50
牛肉/羊肉	50	100	100
掺猪肉	5	10	190
	0.5	1	199
	75	150	50
牛肉/羊肉	50	100	100
掺鸡肉	5	10	190
	0.5	1	199
	75	150	50
牛肉/羊肉	50	100	100
掺鸭肉	5	10	190
	0.5	1	199

1.6 PCR 扩增

引物探针序列按 SB/T 10923—2012 合成。按检测基因分别配制 PCR 反应液, 样品设 3 个平行, 同时设立空白对照、目标动物 DNA 阳性对照和非目标动物 DNA 阴性对照各 2 个平行。25 μL PCR 反应体系包括 12.5 μL 2 \times Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)、0.2 μL 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上游引物 F、0.2 μL 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 下游引物 R、0.1 μL 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 探针、2 μL 模板 DNA。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$

30 s 40 个循环, 在每次循环退火时收集羧基荧光素试剂(carboxyfluorescein, FAM)荧光。检测结束后, 以 C_q 平均值计算结果, 引物探针序列见表 2。

1.7 统计分析

使用 Excel 进行统计分析, 置信度为 95%。

2 结果与分析

2.1 特异性

用猪、牛、羊、鸡、鸭扩增检测体系分别扩增猪、牛、羊、鸡、鸭 DNA, 模板量为 20 ng/反应。结果如表 3 和图

1 所示, 特异信号 C_q 值均在 18.7~22.5 之间。在非特异信号中, 除猪体系中鸡 C_q 值为 30.9±0.02 外, 其余非特异 C_q 值均大于 33.0±0.05。由此可见, 猪、牛、羊、鸡、鸭体系在 C_q 值<30.9 时, 对非同源动物均无交叉反应。

2.2 掺假比例

牛肉或羊肉中掺猪肉、鸡肉和鸭肉的比例(w:w)分别为 75%、50%、5%和 0.5%时, 检测结果见表 4、图 2 和图 3。各个掺假比例均得到很好的扩增, r² 在 0.982 以上, 线性关系良好。这说明, 掺假肉中牛羊肉的含量对猪肉、鸡肉和鸭肉的掺假比例定量没有影响。

表 2 引物探针序列
Table 2 Sequences of primer and probe

物种	序列
猪	引物 F: 5'-CGACAAAGCAACCCTCACAC-3'
	引物 R: 5'-TGCGAGGGCGGTAATGAT-3'
	探针 5'-FAM-CTTCGCCTTCCACTTTATCTGCCATTC-TAMRA-3'
牛	引物 F: 5'-CTCCTCGGAGACCCAGATAAC-3'
	引物 R: 5'-AGAAGTATCACTCGGGTTTG-3'
	探针 5'-FAM-CCAGCCAATCCACTCAACACACCC-TAMRA-3'
羊	引物 F: 5'-CAGCCCTCGCCATAGTTCAC-3'
	引物 R: 5'-AGGGTGGAAGGGAATTTTATCTG-3'
	探针 5'-FAM-TCTTCCTCCACGAAACAGGATCCAACA-TAMRA-3'
鸡	引物 F: 5'-CGACAACCCAACCCTTACC-3'
	引物 R: 5'-AGGAAGGTGAGGTGGATGATA-3'
	探针 5'-FAM-ACACTTCTCCTCCCCTTTGCAATCGC-TAMRA-3'
鸭	引物 F: 5'-GGCCACACAAATCCTCACAG-3'
	引物 R: 5'-TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA-3'
	探针 5'-FAM-CCTACTGGCTATGCACTACCCGACAGAC-TAMRA-3'

表 3 猪、牛、羊、鸡、鸭实时 PCR 体系特异性
Table 3 Specificity of real-time PCR assay for pork, beef, sheep, chicken and duck

成分	C _q 值(mean±SD)				
	猪体系	牛体系	羊体系	鸡体系	鸭体系
猪	20.9±0.17*	38.3,- [△]	N/A	38.6,- [△]	38.8±0.10
牛	38.5,- [△]	22.5±0.10*	N/A	39.0,- [△]	36.6±0.28
羊	N/A	N/A	21.2±0.05*	36.3,- [△]	38.0±0.34
鸡	30.9±0.02	35.1±0.01	N/A	18.7±0*	33.0±0.05
鸭	N/A	N/A	N/A	37.0,- [△]	20.3±0.20*

注: *: 目标动物 C_q 值; -[△]: 3 个平行管仅有 1 管出现荧光值; N/A: 未检测到荧光值, 下同。

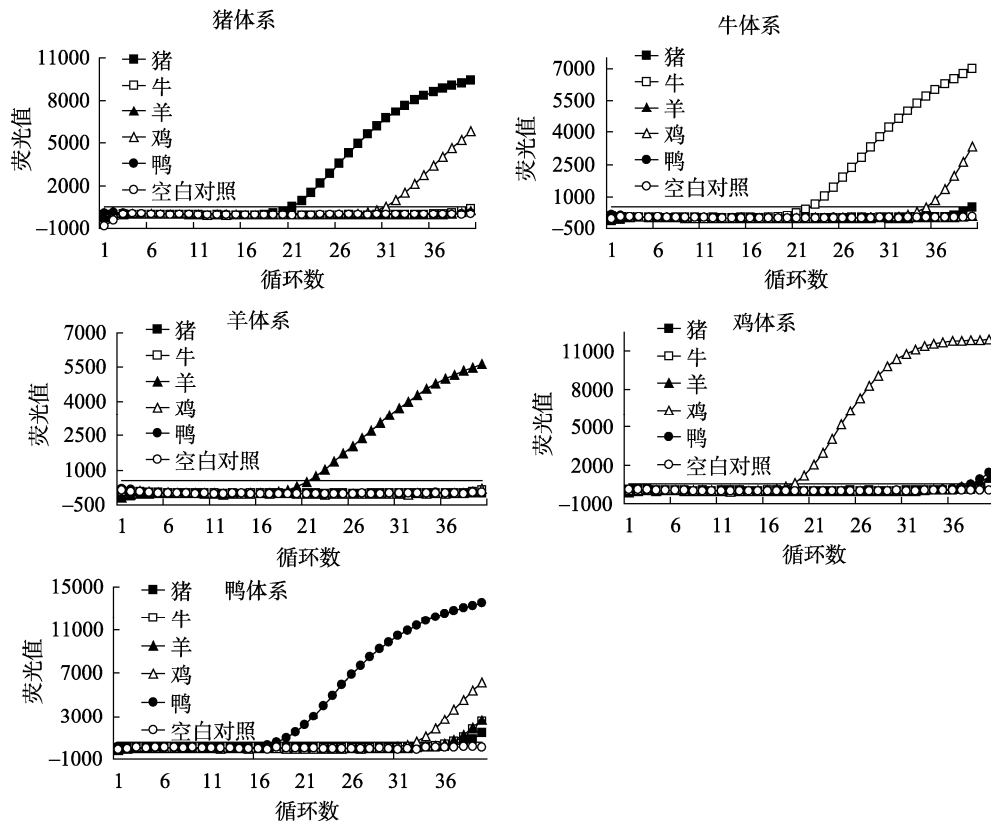


图 1 猪、牛、羊、鸡和鸭的实时 PCR 体系特异性

Fig.1 Specificity of real-time PCR assay for pork, beef, sheep, chicken and duck

2.3 检测阈值设定

PCR 反应体系的 DNA 模板量为 20 ng 时, 在特异性实验中, 非特异信号 Cq 值均 ≥ 30.9 ; 而在掺假比例实验中, 猪、鸡和鸭掺假比例从 0.5% 到 100% 时, 特异信号 Cq 值均 ≤ 28.4 (95% 置信区间, 28.1~28.7), 与最低非特异性信号的 ΔCq 值相差在 2.5 以上。

因此, 在确保体系特异性情况下, Cq 检测阈值设为 30, 最低可以检出 0.5% (w:w) 的掺假比例。

2.4 样品检测

对超市购买的 7 种预包装冷冻食品共进行 24 个动物源性成分检测。结果见表 5, 除海霸王爆汁牛肉风味丸未能检出鸭成分 (Cq 值为 35.2) 外, 其余 23 个成分均与包装标示一致, 符合率为 95.8% (23/24)。

3 结论与讨论

实时荧光 PCR 基因检测技术操作简便, 可以系统地搭建掺假肉检测平台。本研究评价改进后的 SB/T 10923—2012, 以期建立方便快捷的掺假肉实时 PCR 常规检测方法。

SB/T 10923—2012 采用开放式方法均质肉样, 即用组

织捣碎机捣碎后, 再用液氮研磨成粉末状。类似的方法还有均质器匀浆、料理机剪碎、烘烤干燥后再研磨等^[3,9-12]。这些方法操作烦琐, 而且使用非一次性均质器皿容易引起样品间交叉污染。本研究采用研磨管闭管操作, 不仅操作简便, 避免了气溶胶引起交叉污染的问题^[13], 今后还可直接用于肉干等坚硬肉类研磨, 不需要先复水再消化或过夜消化^[11]。此外, 本研究把 DNA 提取试剂盒的裂解温度从 56 °C 提高到 60 °C, 裂解时间从 1~3 h 缩短到 30 min, 可在 3 h 内完成从核酸提取到结果检测, 大大方便了日常检验操作。

本研究同时参考了 SB/T 10923—2012 和 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》对 DNA 模板量的要求。前者的 DNA 模板量为 12~120 ng/反应。后者为 1~100 ng/反应, 阳性对照为 10 ng/反应。为了统一模板量, 方便体系特异性和掺假比例检测能力评价, 故设定 DNA 模板量为 20 ng/反应。

有研究发现, 随着样品热处理温度上升, 掺假比例越低, 单拷贝基因检测结果的偏差就越大^[4]。因此, SB/T 10923—2012 采用多拷贝的线粒体 *cytB* 基因为靶基因, 有助于检测体系的应用范围从生鲜(冻)肉制品扩展到熟肉制品。

表 4 牛肉和羊肉中掺假比例检测结果
Table 4 Detection results of adulteration proportion in beef and sheep

序号	掺假比例(w:w)	Cq 值(mean±SD)											
		牛掺猪		牛掺鸡		牛掺鸭		羊掺猪		羊掺鸡		羊掺鸭	
		猪体系	牛体系	鸡体系	牛体系	鸭体系	牛体系	猪体系	羊体系	鸡体系	羊体系	鸭体系	羊体系
1	100%	21.6±0.11	/	19.6±0.07	/	18.6±0.04	/	20.4±0.06	/	19.1±0.08	/	19.3±0.08	/
2	75%	21.7±0.04	22.9±0.03	20.2±0.03	23.0±0.13	19.4±0.03	23.3±0.13	20.8±0.20	23.0±0.03	19.8±0.08	22.5±0.05	18.9±0.05	23.9±0.40
3	50%	22.1±0.04	21.5±0.10	20.7±0.05	21.9±0.07	19.7±0.05	22.0±0.03	22.0±0.04	22.2±0.27	20.2±0.20	22.0±0.02	19.2±0	22.4±0.01
4	5%	24.3±0.03	19.9±0.01	24.2±0.03	20.6±0.01	22.5±0.02	20.2±0.07	24.6±0.33	20.0±0.03	23.7±0.20	21.2±0.07	22.0±0.03	21.2±0.02
5	0.5%	28.4±0.22	20.8±0.05	26.7±0.05	20.3±0.04	25.3±0.05	20.2±0.07	27.1±0.27	21.3±0.08	26.2±0.02	20.2±0.03	24.0±0.06	21.3±0.09
6	0%	/	20.6±0.03	/	/	/	/	/	20.0±0.10	/	/	/	/

注: /: 未检测。

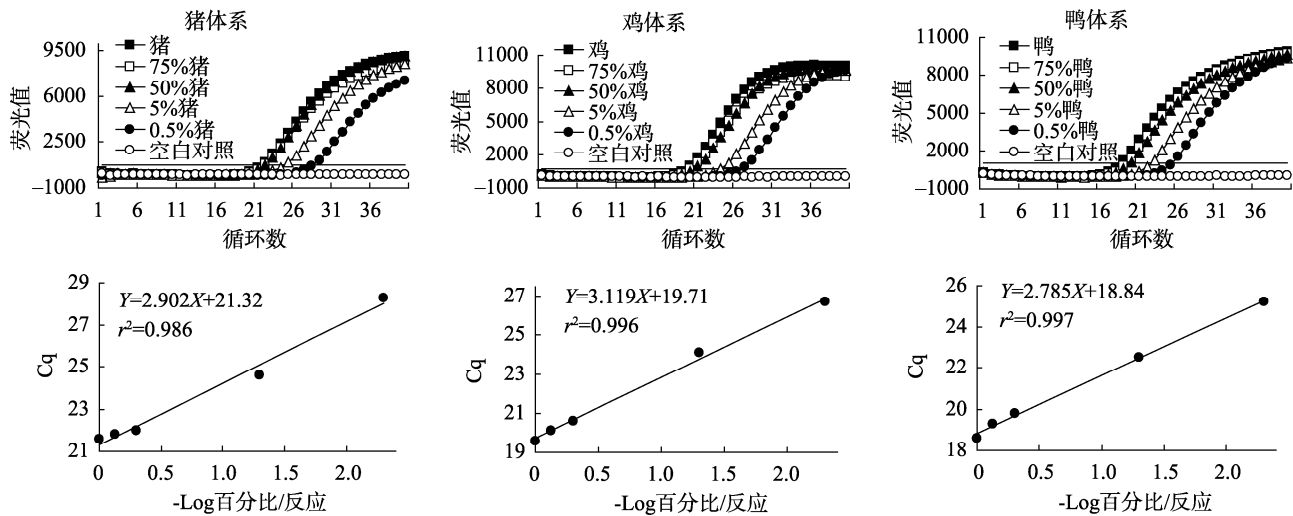


图2 牛肉中掺不同比例猪肉、鸡肉和鸭肉的实时 PCR 标准曲线

Fig.2 Real-time PCR standard curve of beef mixed with different proportions of pork, chicken and duck

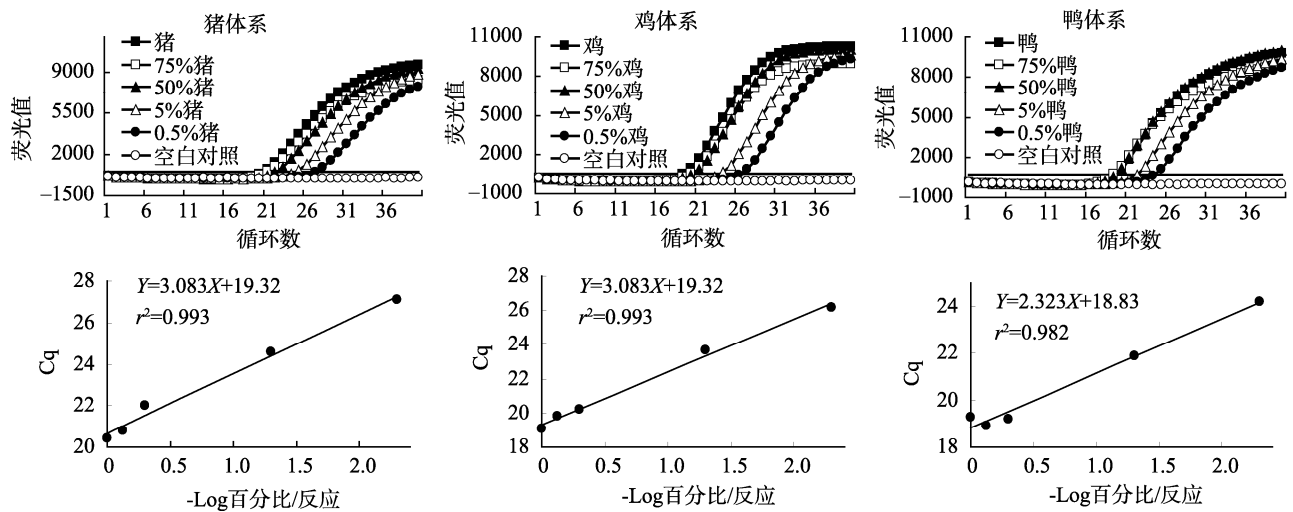


图3 羊肉中掺不同比例猪肉、鸡肉和鸭肉的实时 PCR 标准曲线

Fig.3 Real-time PCR standard curve of sheep mixed with different proportions of pork, chicken and duck

表5 预包装冷冻食品检测结果
Table 5 Results for prepackaged frozen foods detection

序号	样品名称	Cq 值					包装标示成分
		猪	牛	羊	鸡	鸭	
1	小尾羊六月嫩羔羊羊片	39.6, ^{-A}	/	21.0±0.21	N/A	37.8±0.48	羊肉
2	盛福祥雪花羔羊肉	32.0±0.06	/	22.8±0.15	38.5, ^{-A}	37.9±0.61	羊肉
3	海霸王牛筋风味丸	20.9±0.14	22.4±0.25	/	19.9±0.15	/	猪肉、牛脂肪、鸡肉
4	海霸王爆汁牛肉风味丸	29.2±0.15	25.7±0.10	/	19.3±0.18	35.2±0.20	鸡肉、牛脂肪、猪肉、鸭皮
5	三全牛筋丸	25.7±0.56	22.6±0.54	/	20.1±0.30	21.5±0.05	牛肉、牛筋、猪肉、鸡肉、鸭肉
6	三全开花牛肉丸	25.1±0.24	23.5±0.07	/	20.2±0.10	22.2±0.10	牛肉、猪肉、鸡肉、鸭肉
7	安井丸之尊亲亲肠	21.1±0.20	/	/	/	/	猪肉、猪肥膘

注: /: 未检测。

由于不同物种和组织间细胞大小和线粒体数目差别很大^[14-15], 所以直接用 DNA 掺比不能反映真实的重量掺比。而取肌肉组织按重量掺比, 当掺比量分别为 5% 和 0.5% 时, 取样量仅为 2.5 mg 和 0.25 mg, 无法用分析天平取样。鉴于等重量的不同肉样, 用研磨管研磨后的细胞悬液体积也相等, 本研究改用细胞悬液体积比代表肉样重量比做掺假比例实验, 以解决微量样品无法取样的问题。我们所得到的结果表明, 在牛肉和羊肉样品中, 该方法均可检出 0.5% (w:w) 掺入的猪肉、鸡肉和鸭肉, 而且线性关系良好(r^2 在 0.982 以上), 与标准中掺假比例检出限一致, 检测能力可以满足实际需要。

本研究只选择最为常见的肌肉组织考察掺假比例, 其余组织类型暂未考察。考虑到实际样品的复杂性, 可能混有多种肉样和不同的组织, 其中最常见的是用鸭肉或猪肉掺羊油和羊脂肪的假羊肉卷、酱猪肉泡过牛肉膏变的牛肉^[2,10], 还有用同种动物内脏掺到肌肉中。所以样品检测和掺假比例定量难度很大, 单一方法难以完全满足实际要求, 可能要结合多种检测方法^[6,16-18]。

SB/T 10923—2012 规定, 猪、牛和羊的 Cq 值 < 35.0, 鸡和鸭的 Cq 值 < 30.0 时, 判断为阳性。本研究在特异性和掺假比例实验上进行定义, DNA 模板量为 20 ng/反应时, Cq 值 ≤ 30.0 判断为阳性, Cq 值 > 30.0 判断为阴性。对 7 份预包装样品进行 24 种肉源成分检测, 有 23 种与标签一致, 符合率为 95.8% (23/24), 其中海霸王爆汁牛肉风味丸检出鸡、牛、猪成分, 未检出鸭成分(Cq 值 > 30)。

海霸王爆汁牛肉风味丸的猪成分 Cq 值为 29.2±0.15, 大于 0.5% (w:w) 牛肉中掺猪肉的 Cq 值(28.3±0.31)。该产品配料表标明以鸡肉为主料, 添加淀粉和胶质, 最后再加上牛脂肪、猪肉和鸭皮。由此推测, 该产品未检出鸭成分以及检出的猪成分含量极低问题, 可能和产品中猪、鸭成分含量少, 混样不均匀有关。李楠等^[1]在检测牛、羊肉片时, 也发现一些样品 Cq 值接近 30, 相当于掺假 0.1% 以下。这种情况很难判断是人为掺入其他肉类冒充牛、羊肉出售, 还是目标成分是在加工或出售过程中沾染而混入。任君安等^[19]用微滴式数字 PCR 精确定量检测羊肉中掺猪肉, 也发现有的样品检出的猪肉含量(0.87%和 0.44%)低于方法定量低限, 他们推断可能是污染导致。因为公司的生产线也可能生产含有其他肉类成分的产品, 所以极有可能是产品污染其他肉类成分。由此可见, 明确的鉴定目标和单一未知品种肉容易检测, 而在混合肉中鉴定未知成分比较难, 因为肉类已经搅碎混合在一起, 取样时难免会疏漏某一种含量低的肉, 所以往往鉴别的结果中容易有遗漏。虽然这不会影响 SB/T 10923—2012 制订初衷, 即检测样品是否主要由低价肉取代高价肉, 造成消费欺诈。或者可以参考 BJS 201904《食品中多种动物源性成分检测 实时荧光 PCR 法》, 直接把动物源性成分含量低于 2% 的判定为污染。

本研究还对该标准的引物探针序列进行同源性分析, 发现鸭体系只能检测鸭科(Anatidae)鸭属(*Anas*)的绿头鸭及部分家鸭(北京鸭和绍兴鸭等), 不能检测鸭科栖鸭属(*Cairina*)的番鸭和半番鸭。北京鸭和中国番鸭(番鸭和半番鸭)是我国主要肉鸭品种, 而后者又主要分布在南方各省^[20]。因此, 要能检测大多数鸭肉样品, 标准需要同时覆盖北京鸭和中国番鸭。同时也发现, 该标准的牛体系只能检测黄牛, 不能检测水牛和牦牛; 羊体系只能检测绵羊, 不能检测山羊。因此, 要扩大检测体系的适用性, 还需要针对动物种间基因多态性差异进行设计, 以同时覆盖其他常见品种, 并设计为多重实时荧光 PCR 体系, 降低检测成本, 提高操作简便性。

在对照设立上, SB/T 10923—2012 采用纯肉块作为提取对照, 没有设立内对照; 而 GB/T 38164—2019 没有设立提取对照, 仅以质粒作为扩增对照, 以多拷贝的 18S rRNA 基因为内对照, 操作更便捷, 设计更合理。在平行管设立上, SB/T 10923—2012 采用 3 个平行管, GB/T 38164—2019 采用 2 个平行管, 更具可行性。

在掺假肉定量方面, 有研究指出, 把拷贝数转换成肉重量比, 受肉类加工方式(高温和高压)、物种(基因组大小、组织组成、细胞密度和靶基因拷贝数)、DNA 降解和提取效率的影响很大^[4], 有的甚至认为定量没有意义^[21]。

本研究评价改进后的 SB/T 10923—2012 在掺假肉 DNA 鉴定方面的应用价值。结果表明, 改进后的体系可以避免气溶胶造成的交叉污染问题, 能够便捷、特异、有效地检测掺假肉类, 适合系统性搭建掺假肉快速检测平台。

参考文献

- [1] 李楠, 王佳慧, 沈青. 北京地区牛、羊肉片中鸭、鸡、猪源性成分调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 227-232.
LI N, WANG JH, SHEN Q. Survey of duck, chicken and pork component in lamb or beef slices sold in Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(3): 227-232.
- [2] 顾文佳, 徐琼, 张奕南, 等. 应用荧光聚合酶链式反应检测冷冻羊肉卷中羊肉的含量[J]. 肉类研究, 2016, 30(7): 26-29.
GU WJ, XU Q, ZHANG YN, et al. Application of real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) for quantitative detection of lamb in frozen lamb rolls [J]. Meat Res, 2016, 30(7): 26-29.
- [3] CAI YC, LI X, LV R, et al. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. Biomed Res Int, 2014, (1): 1-6.
- [4] REN JA, DENG TT, HUANG WS, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173567.
- [5] 赵琳娜, 杨昕霆, 薛晨玉, 等. 一种同时检测 26 种动物源性成分的基因微流体芯片及其应用: 中国, 107245518A[P]. 2017-10-13.
ZHAO LN, YANG XT, XUE CY, et al. Gene microfluidic chip for simultaneously detecting 26 animal-derived components and application thereof: China, 107245518A [P]. 2017-10-13.
- [6] GALAL-KHALLAF A. Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing

- for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets [J]. *Gene*, 2021, 764: 145062.
- [7] QIN PZ, XU JG, YAO L, *et al.* Simultaneous and accurate visual identification of chicken, duck and pork components with the molecular amplification integrated lateral flow strip [J]. *Food Chem*, 2021, 339: 127891.
- [8] 刘立兵, 陈敏娜, 孙晓霞, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应对香肠制品中鸡、猪、牛源性成分的定量分析[J]. *肉类研究*, 2020, 34(8): 51–56.
LIU LB, CHEN MN, SUN XX, *et al.* Quantitative analysis of chicken, porcine and bovine-derived ingredients in sausage products by droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Meat Res*, 2020, 34(8): 51–56.
- [9] 李金春, 周彤, 李家鹏, 等. 一种同步检测肉或肉制品中 14 种动物源性成分的引物组合及其应用: 中国, 108330168A[P]. 2018-07-27.
LI JC, ZHOU T, LI JP, *et al.* A primer combination for simultaneous detection of 14 animal-derived materials in meat or meat products and its application: China, 108330168A [P]. 2018-07-27.
- [10] 周彤, 李家鹏, 田寒友, 等. 一种基于实时荧光聚合酶链式反应的肉及肉制品中猪源性成分含量测定[J]. *肉类研究*, 2013, 27(12): 11–15.
ZHOU T, LI JP, TIAN HY, *et al.* A RT-PCR method for quantitative determination of pork-derived ingredients in meat and meat products [J]. *Meat Res*, 2013, 27(12): 11–15.
- [11] 全伟建, 任秀. 大体积肉中 DNA 提取方法的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(12): 4966–4970.
TONG WJ, REN X. Optimization of DNA extraction method from large volume of meat [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(12): 4966–4970.
- [12] 刘立兵, 石蕊寒, 项佳林, 等. 应用微滴式数字聚合酶链式反应定量检测牛肉制品中的猪源性成分[J]. *肉类研究*, 2018, 32(9): 29–34.
LIU LB, SHI RH, XIANG JL, *et al.* Quantitative analysis of pork in adulterated beef products by droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Meat Res*, 2018, 32(9): 29–34.
- [13] 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): 1605–1610.
ZHANG M, WANG DY, YANG WQ, *et al.* Analysis on proficiency test of identification of porcine-derived materials in beef and mutton [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(5): 1605–1610.
- [14] ROBIN ED, WONG R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells [J]. *J Cell Physiol*, 1988, 136(3): 507–513.
- [15] FLOREN C, WIEDEMANN I, BREING B, *et al.* Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 1054–1058.
- [16] HU YX, ZOU L, HUANG XL, *et al.* Detection and quantification of offal content in ground beef meat using vibrational spectroscopic-based chemometric analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15162.
- [17] FENGOU LC, LIANOU A, TSAKANIKAS P, *et al.* Detection of meat adulteration using spectroscopy-based sensors [J]. *Foods*, 2021, 10(4): 861.
- [18] BLACK C, CHEVALLIEROP, COOPER KM, *et al.* Rapid detection and specific identification of offals within minced beef samples utilising ambient mass spectrometry [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 6295.
- [19] 任君安, 邓婷婷, 黄文胜, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 311–316.
REN JA, DENG TT, HUANG WS, *et al.* A precise quantitative assay for measuring pork incorporated into mutton products by droplet digital PCR [J]. *Food Sci*, 2017, 38(2): 311–316.
- [20] 苏瑛. 中国主要地方鸭品种分子系统发育的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
SU Y. Molecular phylogenetic analysis of duck in China [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2006.
- [21] BALLIN NZ, VOGENSEN FK, KARLSSON AH. Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration [J]. *Meat Sci*, 2009, 83(2): 165–174.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



胡思玉, 博士, 主管药师, 主要研究方向为实时 PCR 技术。
E-mail: 2928242485@qq.com