

基于 PCR 多物种鉴定技术及其在肉类鉴定中的应用

薛超波¹, 王萍亚¹, 李素芳², 管峰^{2*}

(1. 舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316021; 2. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 国内外的肉类掺假由来已久, 法律上监管部门对此采取了严格监管措施, 技术上应用了感官、显微检测和免疫学等相应的检测技术。近几年来, PCR 及其衍生技术的快速发展大大推动了肉类鉴定技术的快速发展, 尤其在多物种鉴定技术领域建立了如多重 PCR、通用单引物多重 PCR、通用引物特异性 PCR 和 PCR-RFLP 等多项技术。这些技术的发展为肉类及其制品的检测提供了重要手段, 代表了检测技术领域发展的方向, 但其也各有其优缺点。本文介绍了上述 4 种多物种鉴定技术及其在肉类鉴定中的应用, 并分析了其优缺点, 旨在为物种鉴定方法选择及其研究提供参考。

关键词: 物种鉴定; 肉类鉴定; 多物种; PCR

PCR-based multiple species identification and its application in meat identification

XUE Chao-Bo¹, WANG Ping-Ya¹, LI Su-Fang², GUAN Feng^{2*}

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

ABSTRACT: Adulteration of meat and its products has a long history at home and abroad. Regulators have taken strict control and supervision measures in laws. And analysis technologies are used in the meat control procedure, such as sensory examination, microscopic examination and immunological assay. In recent years, meat identification technologies have made a great advance with the development of PCR technology. There are several multiplex species identification methods developed and utilized in practice, such as multiple PCR, common single primer multiplex PCR, universal primer specific PCR and PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). These technologies provide identification methods for meat and meat products, and represent the direction of the development of the species identification technology, although each has its own advantages and disadvantages. In this paper, the principles, advantages and disadvantages and the applications of these 4 technologies were reviewed, in order to provide references for the selection and research of species identification technology.

KEY WORDS: species identification; meat identification; multiple species identification; PCR

基金项目: 浙江省食品药品监督管理局项目(2014020)

Fund: Supported by the the Science and Technology Project of Zhejiang Food and Drug Administration (2014020)

*通讯作者: 管峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为动物生物技术。E-mail: guanfengzgj@163.com

*Corresponding author: GUAN Feng, Associate Professor, College of Life Sciences, China Jiliang University, NO.258, Xueyuan Street, Xiasha high Education Region, Hangzhou 310018, China. E-mail: guanfengzgj@163.com

1 引言

食品掺假,尤其是肉类掺假已经成为一个国际性问题,中国也很早就有“挂羊头卖狗肉”的说法。肉类掺假不仅是一个经济问题,还可能损害消费者健康甚至带来一系列宗教问题。因此,建立快速高效的检测技术是打击肉品掺假犯罪和市场监管执法的共同需求。

由于肉类的营养价值高,已经成为人们日常食物消费的重要组成部分,但是相对价格较高。因此,在利益驱动下肉类成为食品掺假的重要对象。使用一种或多种廉价肉品混入价格较高的肉品中进行的肉类掺假现象较早报道于1997年^[1],其或发生于更早时间。随着现代食品工业的快速发展和食品种类的多样化,掺假对象也从原来的冷鲜肉和简单加工肉品渗入到多个种类的产品,尤其是现代深加工肉品,掺假手段方法也更加多样^[2]。总之,现代肉类食品工业的发展也给掺假制假者带来了可乘之机,掺假手段更加隐蔽,难以通过食品的外观判断其成分。另一方面,为了打击这些食品掺假犯罪,维护消费者权益,监管部门和研究人员对掺假鉴定技术也在不断发展和完善。早期肉类的鉴别主要依赖于感官和形态学检验,但这些检验方法受仪器、人员经验和肉类处理过程等诸多因素的影响,且局限性大、准确性低,对于深加工肉类以及饲料中添加的动物源性成分难以鉴别^[3,4]。随着分子生物学的发展,基于DNA分析的PCR技术在肉类和物种鉴定应用中得到了快速发展,成为肉类成分分析的主要技术^[2,4-6]。随着基因组学和生物信息学的发展,PCR检测靶标也从细胞核DNA转向更加丰富稳定的线粒体DNA(mtDNA)。mtDNA由于稳定性好,拷贝数多,无组织特异性等优点,成为物种鉴定和“DNA条形码”技术发展的首选靶标^[6,7]。如今,以mtDNA为靶标建立多物种同步检测的PCR技术成为物种和肉类鉴定技术发展的趋势,如多重PCR、通用单引物多重PCR、通用引物特异性PCR和PCR-RFLP技术等。本文就目前这些技术的发展和概况做一综述和分析,旨在为肉类鉴定研究提供参考。

2 多重PCR技术

多重PCR(multiplex PCR)指在同一PCR反应中使用2对及以上的引物扩增2个及多个目的DNA序列的PCR技术^[8]。反应中所有引物组合利用PCR体系中的相同条件,因此需要对每对引物进行优化以找到共同反应条件,同时PCR产物应尽量可以依据片段大小能够区分。随着多重PCR技术的发展,目前认为使用3条及以上引物的复合PCR扩增通常都被称为多重PCR。多重PCR技术最早应用在人类杜氏肌营养不良和苗族硫酸酯酶相关的基因突变检测中^[9,10],这项技术的应用大大提高了检测效率。多重PCR一次可以检测多个特异性目的基因,可以针对不同物

种的特异性建立多重PCR方法,被广泛应用于常见肉类鉴定以及掺假物种的检测。宗卉等^[11]利用含有一对参照引物的三重PCR成功鉴定牛羊两个物种;Dalmaso等^[12]用四重PCR鉴定反刍动物、猪、鱼和禽。随着生物信息学和基因组学的发展,设计的引物特异性越来越高,多重PCR也依据不同需求发展了分别能同时检测鸡、鸭、鹅或山羊、绵羊、狐狸的三重PCR^[13,14],之后还相继发展了四重^[12,15,16]、五重^[7,17,18]和六重^[19,20]甚至七重PCR^[21,22],检测物种数量也逐步增多,目前检测物种数量达6种以上。这些检测物种不仅同时包含了牛、羊、鹿等反刍动物和猪、禽、兔、鸡、马等常见肉类动物,还包括了猫、狗、大鼠、狐狸和鸵鸟等系列物种,大大扩大了检测范围,该技术在肉类动物性别^[23]和动物饲料成分鉴定中也得到应用。同时,多重PCR基于常规PCR发展而来,所需设备简单、试剂成本低,适于大部分实验室和检测单位使用,是较为通用的多物种检测技术。检测人员还可以根据检测物种的种类和数量组合不同的多重PCR体系,大大提高了检测效率和工作的便捷性。多重PCR和其他分子检测技术的结合已发展出多种多重PCR技术,如无需DNA提取的直接多重PCR^[19]、荧光定量多重PCR^[16,24]和通用单引物多重PCR^[17]等,使得该技术在快速检测、定量检测和灵敏度方面的优势大大提高。但多重PCR也存在不足,由于PCR体系中引物数量多,因此PCR反应条件优化难度大、相对灵敏度低、引物和模板配对效率低,检测物种数量受限等^[25-27],一般来说检测物种数量在4~5个为宜^[28]。尽管已有多个不同物种组合及多种多重PCR鉴定技术,但是这些方法都基于DNA提取过程为前提,仍无法满足当前快速检测的需求,同时对未知物种难以鉴定。

3 通用单引物多重PCR技术

通用单引物多重PCR(common single primer multiplex polymerase chain reaction, CSP-M-PCR)属于多重PCR技术的一种类型,基本原理与多重PCR技术相同,但引物设计原理不同。通用单引物多重PCR在多重PCR体系中不是两两配对的引物,而是有一条共同的上游或者下游引物,而对向引物则位于同一基因的不同位置,从而在PCR扩增中产生大小不同的片段。由于上下引物组合位于同一基因,引物设计尤为重要,通用引物为物种的保守引物,具有对多个物种扩增的通用性,而对向引物则为物种的特异性引物,靶标基因也多选择了高变异度的线粒体DNA序列,而线粒体细胞色素b(Cytb)和12S rRNA成为该技术应用最广泛的靶标基因。Matsunaga等^[29]在Cytb基因保守区域设计了一条通用上游引物,在种属特异区域设计下游引物并建立了六重PCR(7条引物),常规电泳分离产物,可以同时鉴别山羊、绵羊、猪、鸡、牛和马等6种动物源性成分。Fajardo等^[30]利用12S rRNA基因通用下游引物和特异性上游引物,

建立了红鹿、黇鹿和狍 3 个近缘物种的鉴定方法。我国科研人员也先后建立了多个物种组合的通用单引物多重 PCR 检测方法, 检测物种组合包括鸡、牛、羊和猪^[31,32], 甚至可以同时检测山羊、绵羊、猪、鸡、牛、牦牛和马等 7 种动物^[22]。通用单引物多重 PCR 相比普通多重 PCR 技术减少了引物的使用, 相对节约费用, 充分利用物种之间的保守性和特异性, 提高了检测灵敏度, 但 PCR 体系中引物比例需要优化^[22, 30], 相应增加了工作量。同时, 对亲缘物种如牦牛和牛的检测灵敏度较低(2.5 ng 基因组 DNA)^[22]。

4 通用引物特异性 PCR 技术

通用引物特异性 PCR(universal primer specific PCR)用于物种鉴定的基本原理在于常见肉类动物及诸多高等哺乳类动物间的基因序列既有物种之间的保守性, 也有变异性。因此, 充分利用物种之间特有的差异序列以及保守序列分别用于物种识别和通用引物设计, 这种情况下用一对引物即可扩增多个物种的目的基因^[33,34], 依据序列差异分析技术对 PCR 产物进行分析即可进行物种的鉴定^[35]。因此, 通用引物特异性 PCR 技术是基于普通 PCR 技术发展起来的多基因扩增技术, 从这一意义来说该技术是限制性酶切片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术和当今 DNA 条形码技术的前身, 但是在 PCR 产物检测的便捷性来说又优于 DNA 条形码技术。在通用引物特异性 PCR 设计之初, 设计者充分利用了扩增产物中物种的特异性序列来鉴定物种, 而序列长度差异是最简单的 PCR 产物分析方法, 如 Bottero 等^[35]设计了 1 对可以扩增多个物种 16S rRNA 基因的通用引物, 依据各物种间产物大小不同, 可以鉴定牛、羊、猪、马、兔、鸡、沙丁鱼和虹鳟。后来, Kitano 等^[36]分别以 12S 和 16S rRNA 基因为靶标分别设计通用特异性引物, 组成双重 PCR, 同时结合 PCR 产物直接测序的方法, 成功鉴别哺乳类、鸟类、两栖类和鱼类。Tobe 等^[37]把通用引物特异性 PCR 与荧光多重 PCR 结合, 可以鉴定欧洲 18 种哺乳动物, 包括了常见的牛、狗、狐狸、鼠、鹿、马、人、猪、兔、鹿和绵羊等。Pereira 等^[38]则充分利用了基因组学信息以及自己构建的数据库分析平台, 以通用引物特异性 PCR 实现了对真核生物种群 18 个类群中 93.3% 的物种的鉴定, 为野生未知动物物种鉴定提供了重要方法。但通用引物 PCR 方法也存在局限性, 由于检测鉴别靶标来自物种的基因序列差异, 引物设计必须依靠大量基因组信息分析结果, 对一些物种基因信息了解较少或缺乏相应的基因组信息限制了这一技术的发展应用。例如, Bottero 等^[35]扩增的不同物种 16S rRNA 基因用于鉴定物种的 PCR 产物大小差别不明显(234~262 bp), 很难用普通琼脂糖电泳把大小相近的片段分开, 其他分型技术带来不便的同时也增加了费用, 受到实验条件的制约。Tobe 等^[37]在鉴定欧洲 18 种哺乳动物方法中, 用遗传分析仪对 PCR 产物进行片段差异分析,

昂贵的仪器限制了普通实验室对本技术的开展应用。Pereira 等^[38]建立的模型和数据库等方法也难以对牛和水牛等近缘物种进行鉴别。尽管通用引物特异性 PCR 在应用中具有一定的局限性, 但 DNA 测序技术的发展为其注入了生机和活力, 并在此基础上诞生了 DNA 条形码技术。如今, 这项检测技术有逐渐被 DNA 条形码取代的发展趋势, 但是其通用引物在多物种间高通量检测的优越性已经被广泛用作物种鉴定研究的参照基因^[32, 39-41], 在检测中仍然发挥着重要作用。

5 PCR-RFLP 技术

PCR-RFLP(PCR restriction fragment length polymorphism)是较早发展起来的基因多态性分析方法, 即基因扩增后利用限制性酶切使之产生多态性片段, 利用片段大小和数量分析基因多态性, 也被广泛用于物种鉴定领域。Sun 等^[42]利用通用引物扩增猪、牛和羊的 12S rRNA 基因片段, 然后进行酶切, 进而区分 3 种动物。Pfeiffer 等^[43]利用通用引物特异性扩增牛、山羊、绵羊、鹿和狍的 *Cytb* 基因后对 PCR 产物进行酶切, 使之产生大小和数量不同的片段, 用于 4 种动物的鉴定。冯海永等^[44]以 *Cytb* 为检测靶标建立了羊肉和鸭肉的 PCR-RFLP 鉴定方法。Girish 等^[45]利用一对通用引物特异扩增了禽类 12S rRNA 基因后进行酶切, 使之能够鉴别鸡、鸭、火鸡、雉和鹌鹑。随着对动物基因组学研究的不断深入和更多内切酶的发现、引物标记物荧光制剂及商业化应用, 也推动了 RFLP 技术的发展。Wang 等^[46]把荧光标记引物检测和多种酶的酶切 RFLP 技术结合, 成功鉴定了猪、狗、牛、山羊、绵羊、马、鸡、鼠、三文鱼和鹿等 12 种常见物种, 大大提高了鉴定的效率。Kumar 等^[47]也以 *Cytb* 为检测靶标建立了牛、水牛、绵羊、山羊和猪的 PCR-RFLP 鉴定方法, 使之在常见肉类掺假检测中更具有实用性。近些年来, PCR-RFLP 技术对常见肉类物种的鉴定也被应用到了鱼类和贝类产品的鉴定中^[48-50], 扩大了肉食品的鉴定应用领域, 同时也应用到影响食品安全的微生物鉴定中^[51]。PCR-RFLP 技术被认为是一种可靠性高、重复性好且简便易行的物种鉴定技术, 但其受到当前已知内切酶的种类和识别位点及其是否具有专一性的限制, 有时候对亲缘关系较近的物种用 1 种内切酶难以鉴别^[49], PCR-RFLP 过程中需要使用 2 种或以上的内切酶进行酶切^[44,48], 加上一些稀有的内切酶价格昂贵, 无疑增加了检测成本和时间。由于 PCR-RFLP 通过酶切使各物种的 PCR 产物产生不同片段加以鉴定, 当检测样品为两种或多种混合肉类时, 该方法难以通过酶切片段来区分混合样品的种类^[52], 往往需要更为复杂的过程如选用多重 PCR 及多种酶同时酶切^[53], 这不但降低了对掺假肉类鉴定的可靠性还大大增加了检测费用, 费时费力。同时, 酶切后产物的分析也对整个方法的准确性和效率产生影响, 难以通过

普通电泳等方法分开的酶切片段往往需要结合高分辨率的荧光技术、毛细管电泳和 DNA 芯片等 PCR 产物鉴定技术^[46,48], 对实验设备要求较高, 因而降低了推广价值。随着对现有物种基因多态性的研究以及更多内切酶的开发, 这一技术在灵敏度和可靠性方面仍具有诸多优势, 在动物微生物^[51,54]和植物^[55]等其他物种鉴定领域的应用也显示其具有良好的应用前景。

6 小结与展望

基于 PCR 技术发展起来的多物种鉴定技术方法的建立和应用在肉类鉴定中大大提高了检测效率, 节约了人力物力和检测成本, 这些技术成为当今物种鉴定技术的重要方向。但另一方面, 这些技术也难以摒弃 PCR 技术的局限性, 如需要对其反应体系优化、PCR 产物检测需要其他仪器辅助、耗时长以及对有些物种灵敏度不高等。不过, 随着分子生物学技术的发展, 这些 PCR 技术都结合了相应的技术来弥补自身的不足, 如结合荧光技术提高灵敏度, 结合直接 PCR 缩短检测时间, 结合毛细管电泳和 DNA 芯片提高 PCR 产物检测的精准度等等, PCR 与其他检测技术的联合应用使得其在实际检测应用中发挥着举足轻重的作用, 同时也代表了未来 DNA 检测技术的发展趋势。因此, 在实际应用中需综合考虑检测对象、实验条件和耗材成本以及工作效率等多方面因素, 综合选择适宜的方法。

参考文献

- [1] Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(1):148–152.
- [2] 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.
- [3] 高敬, 魏迪, 张葵荣, 等. 常见肉类鉴别技术研究进展 [J]. *食品科学*, 2014, 35(11):356–360.
Gao J, Wei D, Zhang KR, *et al.* Recent progress on commonly used techniques for identification of meat species [J]. *Food Sci*, 2014, 35(11):356–360.
- [4] 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 on analytical technologies for meat adulteration [J]. *Food Mach*, 2013, 29(4):237–240.
- [5] 朱雨薇. 肉类掺假检测鉴定技术的研究进展 [J]. *食品工业*, 2014, 35(11): 2442–248.
Zhu YW. The development trend of the meat adulteration detection and authentication technology [J]. *Food Ind*, 2014, 35(11): 2442–248.
- [6] Kumar A, Kumar RR, Sharma BD, *et al.* Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(10):1340–1351.
- [7] Di Pinto A, Bottaro M, Bonerba E, *et al.* Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(4):2479–2484.
- [8] Burgart LJ, Robinson RA, Heller MJ, *et al.* Multiplex polymerase chain reaction [J]. *Mod Pathol*, 1992, 5(3):320–3.
- [9] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23):11141–11156.
- [10] Ballabio A, Ranier JE, Chamberlain JS, *et al.* Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification [J]. *Hum Genet*, 1990, 84(6):571–573.
- [11] 宗卉, 范万红, 温燕辉. 应用多重 PCR 同时检测牛羊源性成分 [J]. *中国草食动物*, 2006, 26(6): 21–23.
Zong R, Fan WH, Wen YH. Appliosously multiplex PCR simultaneously to examine the bovine and sheep derived materials [J]. *Chin Herb*, 2006, 26(6): 21–23.
- [12] Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, *et al.* A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs [J]. *Mol Cell Prob*, 2004, 18(2):81–87.
- [13] 张全芳, 马德源, 刘艳艳, 等. 利用多重 PCR 技术检测羊肉中掺杂狐狸肉的方法研究 [J]. *山东农业科学*, 2014, 46(12): 4–6.
Zhang QF, Ma DY, Liu YY, *et al.* Study on method for identification of mutton mixed with fox meat by multiplex PCR [J]. *Shandong Agric Sci*, 2014, 46(12): 4–6.
- [14] Hou B, Meng X, Zhang L, *et al.* Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products [J]. *Meat Sci*, 2015, 101: 90–94.
- [15] Köppel R, Ruf J, Rentsch J. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232(1): 151–155.
- [16] Agrimonti C, Pirondini A, Marmiroli M, *et al.* A quadruplex PCR (qxPCR) assay for adulteration in dairy products [J]. *Food Chem*, 2015, 187: 58–64.
- [17] Hanapi UK, Desa MN, Ismail A, *et al.* A higher sensitivity and efficiency of common primer multiplex PCR assay in identification of meat origin using NADH dehydrogenase subunit 4 gene [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(7): 4166–4175.
- [18] Ali ME, Razzak MA, Hamid SB, *et al.* Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [J]. *Food Chem*, 2015, 177: 214–224.
- [19] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products [J]. *Food Chem*, 2014, 163: 77–82.
- [20] Safdar M, Junejo Y. The development of a hexaplex-conventional PCR for identification of six animal and plant species in foodstuffs [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 745–749.
- [21] Dai Z, Qiao J, Yang S, *et al.* Species Authentication of Common Meat Based on PCR Analysis of the Mitochondrial COI Gene [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(6): 1770–1780.
- [22] 冯海永, 韩建林. 羊肉产品中若干动物源性成分的七重 PCR 检测技术应用研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 85–90.
Feng HY, Han JL. Application of septenary multiplex PCR detection for some animal components in sheep and goat meat products [J]. *Chian Anim Husb Vet Med*, 2010, 37(9): 85–90.
- [23] Herrero B, Royo LJ, Lago FC, *et al.* Authentication of male beef by multiplex fast real-time PCR [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal*

- Control Expo Risk Assess, 2013, 30(2): 218–225.
- [24] Iwobi A, Sebah D, Kraemer I, *et al.* A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat [J]. Food Chem, 2015, 169: 305–313.
- [25] Pan W, Byrne-Steele M, Wang C, *et al.* DNA polymerase preference determines PCR priming efficiency [J]. BMC Biotechnol, 2014, 14: 10.
- [26] Wang X, Seo DJ, Lee MH, *et al.* Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 557–563.
- [27] Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications [J]. PCR Methods Appl, 1994, 3(4): S65–75.
- [28] Bottero MT, Dalmaso A. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods [J]. Vet J, 2011, 190(1): 34–38.
- [29] Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, *et al.* A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay [J]. Meat Sci, 1999, 51(2): 143–148.
- [30] Fajardo V, Gonzalez I, Lopez-Calleja I, *et al.* Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene [J]. Meat Sci, 2007, 76(2): 234–240.
- [31] 商颖, 许文涛, 元延芳, 等. 一种检测肉品的新型通用单引物多重 PCR 技术 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(09):416–419.
- Shang Y, Xu WT, Yuan YF, *et al.* Novel common single primer multiplex PCR for detecting various meat species simultaneously [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(09): 416–419.
- [32] 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.* A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products [J]. Sci Agric Sin, 2012, 45(9): 1873–1880.
- [33] Sharma P, Kobayashi T. Are "universal" DNA primers really universal? [J]. J Appl Genet, 2014, 55(4): 485–496.
- [34] Che J, Chen HM, Yang JX, *et al.* Universal COI primers for DNA barcoding amphibians [J]. Mol Ecol Resour, 2012, 12(2): 247–58.
- [35] Bottero MT, Civera T, Nucera D, *et al.* Design of universal primers for the detection of animal tissues in feedstuff [J]. Vet Res Commun, 2003, 27(Suppl 1): 667–669.
- [36] Kitano T, Umetsu K, Tian W, *et al.* Two universal primer sets for species identification among vertebrates [J]. Int J Legal Med, 2007, 121(5): 423–427.
- [37] Tobe SS, Linacre AM. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene [J]. Electrophoresis, 2008, 29(2): 340–347.
- [38] Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, *et al.* Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(22): e203.
- [39] 蔡其刚, 王戈平, 马利青. 四种主要肉源动物肌肉组织 16S rRNA 基因的扩增及序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 3(5): 19–21.
- Cai QG, Wang GP, Ma LQ. Amplification and sequence analysis of the 16S rRNA genes in the muscle tissue from the four main meat animals [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2015, 3(5): 19–21.
- [40] Cawthorn DM, Steinman HA, Withuhn RC. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa [J]. Gene, 2012, 491(1): 40–48.
- [41] 叶懿, 吴谨, 罗海波, 等. 线粒体 16SrRNA 和 Cytb 基因复合扩增进行种属鉴定[J]. 法医学杂志, 2008, 24(4): 259–261.
- Ye Y, Wu J, Luo HB, *et al.* Multiple amplification of 16S rRNA gene and Cytb gene in mitochondrial DNA for species identification [J]. J Forens Med, 2008, 24(4): 259–261.
- [42] Sun YL, Lin CS. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(7): 1771–1776.
- [43] Pfeiffer I, Burger J, Brenig B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP [J]. BMC Genet, 2004, 5: 30.
- [44] 冯海永, 刘丑生, 何建文, 等. 利用线粒体 DNA Cyt b 基因 PCR-RFLP 分析方法鉴别羊肉和鸭肉[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 319–321.
- Feng HY, Liu CS, He JW, *et al.* Identification of mutton from duck meat by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA Cytb gene [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(13): 319–321.
- [45] Girish PS, Anjaneyulu AS, Viswas KN, *et al.* Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species [J]. Vet Res Commun, 2007, 31(4): 447–455.
- [46] Wang Q, Zhang X, Zhang HY, *et al.* Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene [J]. Meat Sci, 2010, 85(2): 265–269.
- [47] Kumar D, Singh SP, Karabasanavar NS, *et al.* Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cytb gene [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(11): 3458–3463.
- [48] 陈双雅, 陈文炳, 张津, 等. 应用 PCR-RFLP 和芯片生物分析系统鉴别河豚鱼品种[J]. 食品科学, 2012, 33(22):200–202.
- Chen SY, ChenWB, Zhang J, *et al.* Identification of puffer species by PCR-RFLP analysis and chip bio-analysis system [J]. Food Sci, 2012, 33(22): 200–202.
- [49] 庄怡, 刘必谦, 唐杰. 利用 PCR-RFLP 技术对鲫鱼 6 个不同品系的鉴定 [J]. 生物技术通报, 2012, (11): 144–149.
- Zhuang Y, Liu BQ, Tang J. Identifying six strains of *carassius auratus* by PCR-RFLP on mtDNA ND3/ND4L/ND4 gene [J]. Biotechnol Bull, 2012, (11): 144–149.
- [50] 王师, 包振民, 张玲玲, 等. 应用 PCR-RFLP 技术鉴别区分中国沿海四种主要养殖扇贝[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 210–214.
- Wang S, Bao ZM, Zhang LL, *et al.* Species identification of four scallop species mainly cultured in China with application of PCR-RFLP technique [J]. Food Sci, 2006, 27(7): 210–214.
- [51] 郭书林, 陈信忠, 龚艳清, 等. PCR-RFLP 方法检测和鉴别五种李斯特菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2):504–508.
- Guo SL, Chen XZ, Gong YQ, *et al.* Rapid detection and identification of five listeria species by PCR-RFLP [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(2): 504–508.
- [52] Mahajan MV, Gadekar YP, Dighe VD, *et al.* Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene [J]. Meat Sci, 2011, 88(1):

23-27.

- [53] 韩铮竹, 李欣南, 苏崑艺, 等. 利用多重 PCR-RFLP 同时检测羊肉及掺杂其中的肉类[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(14):87-90.

Han JZ, Li XN, SU WY, *et al.* Using duplex PCR-RFLP technology to detect mutton and other meat adulteration [J]. Food Res Devel, 2014, 35(14): 87-90.

- [54] Tian Z, Du J, Yang J, *et al.* A PCR-RFLP Assay targeting RPS8 gene for the discrimination between bovine Babesia and Theileria species in China [J]. Paras Vect, 2015, 8: 475.

- [55] Huang X, Zhou X, Lin Q, *et al.* PCR-RFLP technique for species identification of molted feathers in six species of co-occurring Ardeids [J]. Conserv Genet Res, 2013, 5(3): 817-819.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



薛超波, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测技术。

E-mail: xuechaobo2001@163.com



管峰, 博士, 副教授, 主要研究方向为动物生物技术。

E-mail: guanfengzgj@163.com