

3 组常见马源性成分鉴定引物特异性和灵敏度比较

夏慧丽¹, 马新宇², 潘映秋¹, 黄雅芳², 管 峰^{2*}

(1. 台州市食品检验检测中心, 台州 318000; 2. 中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 目的 比较筛选基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的马源性成分鉴定方法中高灵敏度和特异性引物。**方法** 选取来自国标法、专利和文献报道的 3 组马源性成分鉴定引物, 比较其灵敏度和特异性, 筛选高灵敏度和特异性引物。**结果** 3 组引物的灵敏度和特异性存在差异, 以线粒体 DNA 为靶标的 II 组马源性成分鉴定引物的特异性和灵敏度优于分别以线粒体和核基因组 DNA 为靶标的马驴通用鉴定引物, 检出最低限度均满足检测需求。**结论** 通过比较马源性成分鉴定的 3 组 PCR 引物, 以线粒体 DNA 为靶标的 II 组马源性成分特异性鉴定引物可作为马成分鉴定的首选, 线粒体和核基因组靶标联合可提高马成分鉴定的准确性并可用于杂交种鉴定, 为马源性成分及产制品鉴定提供了一定基础。

关键词: 马源性成分; 真伪鉴定; 引物; 特异性; 灵敏度

Comparison of specificity and sensitivity of common primers for identification of horse derived components in 3 groups

XIA Hui-Li¹, MA Xin-Yu², PAN Ying-Qiu¹, HUANG Ya-Fang², GUAN Feng^{2*}

(1. Taizhou Food Inspection and Testing Center, Taizhou 318000, China; 2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: Objective To compare and screen the highly sensitive and specific primers in polymerase chain reaction (PCR) based methods for identification of horse derived components. **Methods** Three groups of primers for identification of horse derived components from Chinese national standard method, invention patent and literature report were selected, and the sensitivity and specificity were further compared to screen highly sensitive and specific primers. **Results** The sensitivity and specificity of the 3 groups of primers were different. In addition, the specificity and sensitivity of the primers group II for horse specific identification with mitochondrial DNA as targets were better than those of other 2 pairs of primers, which were universal primers for identification of donkey and horse with mitochondrial and nuclear genomic DNA as targets, respectively. The limits of detection for all the primers met the market detection demands. **Conclusion** The specific primers of group II using for horse derived components identification targeting mitochondrial DNA can be used as the first choice for identification of horse components by

基金项目: 浙江省市场监管局“雏鹰计划”培育项目(2021[CY2022112])、浙江省公益技术应用项目(2021[LGC22C060001])、浙江省药品监督管理局科技计划项目(2021[2022010])

Fund: Supported by the Zhejiang Market Supervision Bureau Project (2021[CY2022112]), the Zhejiang Public Welfare Technology Application Research Project (2021[LGC22C060001]), and the Science and Technology Plan Project of Zhejiang Drug Administration (2021[2022010])

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

*Corresponding author: GUAN Feng, Ph.D, Associate Professor, China Jiliang University, No.258, Xueyuan Street, Xiasha Higher Education Region, Hangzhou 310018, China. E-mail: guanfengzgjl@163.com

comparing 3 groups of PCR primers. Furthermore, the combination of mitochondrial and nuclear genome targets can improve the accuracy of horse components identification, which can be used for hybrid identification. These results provide a basis for the identification of horse derived components and products.

KEY WORDS: horse derived component; authenticity identification; primers; specificity; sensitivity

0 引言

食品安全问题一直以来都备受关注,在2000年第53届日内瓦世界卫生大会上被列为世界卫生组织工作的重中之重。2013年欧洲爆发“马肉风波”引起了世界范围内对于食品掺假问题的严重关切和讨论^[1-3]。近年来,全球范围内屡屡曝光的肉类食品掺假和食品安全问题,给整个行业造成了巨大经济损失和安全信任危机,加强食品安全监管尤其是动物源性成分的真伪鉴定成为食品监测领域的一项重要任务。随着马在农业生产中地位的改变和人们消费的多样化,马肉及加工产品逐渐进入大众消费市场^[4-5]。另一方面,同为马属动物的驴不仅是大众消费肉类的来源,更是阿胶等高价值产品的原料来源,在消费市场比马具有更高的附加值。加上马和驴有着较近的亲缘关系,马源性成分成为冒充驴成分尤其是驴皮阿胶的重要掺伪来源,因此无论从技术上还是诸多产品中都需要二者的鉴定^[6-9],马源性成分成为市场监管中重要的检测对象^[10-14]。

针对国内外出现的涉及马和驴产制品掺伪相关问题,传统鉴定肉类掺假及物种成分的方法如感官鉴定和理化鉴定等,其准确度和检测效率及检测技术标准方面都不能满足如今市场监管的需要^[10,15-19]。生化分析技术如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等也因仪器昂贵或检测需要特定抗体等,存在样品鉴定费用高、技术优化烦琐等问题而难以普遍推广应用^[20]。分子鉴定技术由于具有检测速度快、重复性好、灵敏度高和特异性强等优点,成为物种鉴定领域中马属动物鉴定广泛应用的方法^[12,21-23],国家标准方法 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》和团体标准 T/CAAA 060—2021《驴肉及其制品中马源性成分测定实时荧光 PCR 法》就是其中之一。另外,还有发明专利技术和文献报道,都为马属动物鉴定提供了重要技术参考^[24-27]。近年来发展起来的用于未知成分鉴定的 DNA 条形码技术在马属动物成分鉴定中也发挥了重要作用^[28-31]。一方面,这些基于普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术平台开发的鉴定方法都具有适用范围广和易于推广应用等优点;另一方面,这些检测引物和靶标更是开发高通量检测以及定量检测技术的重要物质基础,但是这些报道材料中诸多引物组合和不同检测靶标让技术人员难以抉择。为了从中筛选高灵敏和特异性更好的引物并深入发掘马成分鉴定特异性靶基

因,本研究比较筛选来自国家标准方法、专利和最近文献的3组马源性成分鉴定引物,其分别具有强制性、实用性和新颖性的特点,目的在于选出特异性和灵敏度最优的鉴定引物和靶基因,为后续建立多重鉴定方法和定量检测提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3份马(*Equus caballus*)血样于2019年采自新疆, DNA提取后冷冻保存;马肉7份和马肠3份为2021年收检产品;肉牛(*Bos taurus*)、奶牛(*Bos taurus*)、山羊(*Capra aegagrus hircus*)、绵羊(*Ovis aries*)、驴(*Equus asinus*)、狼(*Canis lupus*)、岩羊(*Pseudois nayaur*)、鸡(*Gallus gallus*)和鸭(*Anas gracilis*)肌肉组织为实验室保存样品。

动物组织DNA提取试剂盒(货号4005050,杭州新景生物技术有限公司);蛋白酶K(20 mg/mL)、核酸染料 Gelred (10000x)(杭州新景生物技术有限公司);Taq 酶(5 U/μL,美国 Thermo Scientific Fisher 公司);琼脂糖[分析纯,生工(上海)生物技术有限公司]。

1.2 仪器与设备

PTC 200 PCR 仪(美国 MJ Research 公司);Mini-Sub Cell GT 水平电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);Nanodrop2000 微量核酸蛋白分析仪(美国 Thermo Scientific Fisher 公司)。

1.3 引物来源

用于本研究测试的3组马源性成分鉴定引物分别来自 GB/T 21107—2007、发明专利^[24]和文献^[32]。3组引物都是基于普通 PCR 平台的方法,前两者以线粒体 DNA (mtDNA)为靶标,后者基于马驴细胞核保守基因肌肉肌酸激酶(muscle creatine kinase, MCK)为靶标,其扩增产物大小分别为294、456和217 bp。另外,还使用一组包含4条引物用于本研究样品鉴定的 DNA 条形码^[31]。其全部引物序列如表1所示。

1.4 方法

1.4.1 样品 DNA 提取和质量检测

血液和肌肉组织样本 DNA 提取使用动物组织 DNA 试剂盒,参照说明书进行 DNA 提取。马肠样品则横切后剪取肌肉、血块和其他不同组织填充物适量,混匀后取适量,用生理盐水浸泡冲洗2~3次后进行 DNA 提取,最后用试剂盒中 TE 缓冲液溶解 DNA,使用核酸分析仪检测 DNA 质量,置于4.0℃保存备用。

1.4.2 待测样品物种的 DNA 条形码检测

为验证 DNA 来源样品物种成分是否与记录名称一致,对所有提取样品的 DNA 参照文献[31]使用通用 DNA 条形码进行鉴定。产物送至杭州擎科生物科技有限公司直接双向测序,测序结果编辑校正,通过 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)的 BLAST 工具进行对比,相似度大于 98.0%即为鉴定到种^[33-34]。

1.4.3 3 组引物 PCR 优化及特异性和灵敏度分析

本研究在使用相同试剂和仪器的前提下,对测试引物进行温度梯度优化,并在最优温度下测试比较各组引物的特异性和灵敏度。依据文献设定马I、马II和 MCK 基因引物的退火温度区间,设置温度梯度,通过比较琼脂糖凝胶电泳扩增产物的亮度和预期条带大小,判定最适退火温度。PCR 程序和温度梯度设置详见表 2,在梯度范围内 PCR 仪自动分配为 8 个梯度。

PCR 反应以 20.0 μL 为基本体系,组分包括: 10 $\times$ buffer 2.0 μL 、25 mmol/L 的 dNTP mixture 1.6 μL 、25 mmol/L 的 MgCl_2 2.0 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 1.0 μL 、5 U/ μL

的 *Taq* 酶 0.4 μL 、模板 DNA 3.0 μL , 补充 ddH₂O 至 20.0 μL 。

取 5 份经鉴定的马 DNA 等量混合,混匀后进行浓度测定,用于引物特异性和灵敏度测试。PCR 特异性测试以肉牛、奶牛、山羊、绵羊、驴、狼、岩羊和鸡鸭 DNA 为对照。同时,对浓度测定后的混合样本连续 10 倍梯度稀释至 0.00636 ng/ μL ,进行 PCR 灵敏度测试。电泳结果以阳性 PCR 产物在相同含量 Gelred 染料的 2.0%琼脂糖凝胶成像系统的亮度和条带有无判定特异性和灵敏度。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取和条形码鉴定结果

对所有提取样品 DNA 在 24 h 后进行质量检测,测得 OD_{260/280} 值在 1.73~2.21 之间,平均 1.96 $\pm$ 0.24,表明 DNA 质量满足进一步 PCR 分析的需要。对样本 DNA 使用 DNA 条形码引物进行 PCR 扩增,产物大小与预期长度 680 bp 一致(图 1),适于测序分析。

表 1 马属动物鉴定的引物信息
Table 1 Primers information for identification of equine species

引物名称	序列(5'-3')	产物/bp
国标法I组	TGCCACAGTTGGATACATCAAC ATTGAGATTAGGCGATTGTT	294
专利II组	CACAGCCCTGGTAGTCGTACA TGTCGCCGATTTCATGTTAGT	456
MCK 基因	TCATCGTAGCATCGAGGGGA AGCAGAGCAGGAAGGGAGT	217
Fish F2-t1	TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	680
Fish R2-t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
F2-t1	TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	
FR1d-t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCC	

表 2 3 对引物的 PCR 程序
Table 2 PCR procedures for 3 sets of primers

引物	温度梯度/ $^{\circ}\text{C}$	PCR 程序
马I	55 $\pm$ 12	94.0 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 退火 60 s, 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环。72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min
马II	55 $\pm$ 14	94.0 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环。72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6min
MCK 基因	55 $\pm$ 12	94.0 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环。72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min

注: 温度梯度设置以 55 $^{\circ}\text{C}$ 为基准, 设置浮动温度后, 默认自动分配的温度。



注: 泳道 M 为 DNA 标准物, 下同; 泳道 1~3 为马血; 泳道 4~6 为马血; 7~9 泳道为马肉; 泳道 10 为驴。

图 1 马属动物样本的 DNA 条形码检测

Fig.1 DNA barcoding results of equine samples

将电泳检测的马来源样本的阳性 PCR 产物进行直接双向测序, 结果表明测序峰值图分型清晰, 无杂峰和双峰, 部分结果如图 2 所示, 测序结果编辑查验后进行 BLAST 比对。

根据比对序列的覆盖率和相似度, 13 个样品实际测序得到片段长度在 650~718 bp 之间, 对比结果显示匹配度和覆盖率分别大于 99.3%和 98.0%, 且相似率 $\geq$ 98.3%的样品有 10 个, 均为马血和马肉, 对应 JQ340135.1、GU734785.1、MK449357.1、JN398453.1、HQ439450.1 和 EF597514.1, 6 个匹配序列均为马基因组序列; 3 个马肠样品的匹配度分别为 97.1%、95.7%和 96.6%, 覆盖率在 85.12%~93.24%

之间, 相似率分别为 95.2%、92.2%和 96.8%, 对应序列也均为马属动物。根据样品成分分析结果, 推测马肠样品匹配度较低的原因可能是马肠中含有的其他非肉类填充成分, 在使用 DNA 条形码引物扩增时受到其他 DNA 竞争或抑制剂影响, 造成匹配率和覆盖率降低, 在测序结果中部分区段产生双峰, 也可能由于马肠样品脂肪含量较高, 提取的 DNA 中存在较多蛋白类 PCR 抑制剂影响扩增给对比带来不利影响。

2.2 温度优化结果

依据温度梯度 PCR 产物电泳结果, 3 组引物马I、马II 和 MCK 基因引物均获得预期大小的 PCR 产物, 分别对应 在 Marker 分子量的 300、500 和 200 bp 附近(图 3)。由图 3 可知, 引物马I的退火温度在 51.5 和 54.0℃时电泳条带明亮清晰, 选取退火温度 54.0℃进一步分析。

引物马II的退火温度为 50.5 和 53.7℃时电泳条带明亮, 选取退火温度 53.7℃进一步分析。引物 MCK 基因引物的

PCR 适宜退火温度为 59.5 至 62.1℃时电泳条带明亮, 选取退火温度 60.0℃进一步分析。

2.3 引物特异性分析

在确定最佳退火温度后, 使用肉牛、奶牛、山羊、绵羊、驴、狼、岩羊和鸡鸭 DNA 进行特异性测试, 马 DNA 为阳性对照。使用上述 3 对引物分别对测试物种 DNA 进行 PCR 扩增。

引物马I扩增产物电泳结果显示, 驴和马样品 DNA 均能扩增出明亮特异性条带, 而其他物种均未扩增出条带, 说明引物对马属动物具有良好的特异性, 结果见图 4。

使用引物马II的 PCR 产物电泳结果显示, 只有马样品 DNA 扩增出明亮特异性条带, 而驴 DNA 样品扩增出多条非特异性产物且均小于马 DNA 扩增产物及预期 456 bp 条带, 而其他物种均未扩增出条带, 说明马II引物不但具有较好的特异性还能特异性区分马源性成分, 结果见图 5。

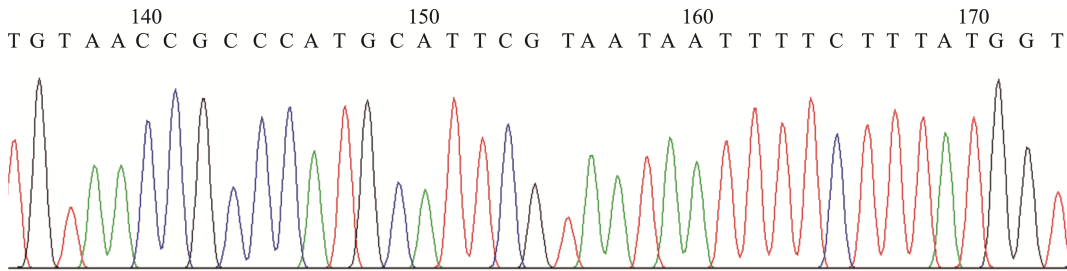


图 2 测序峰值图
Fig.2 Sequencing figure of peak chart

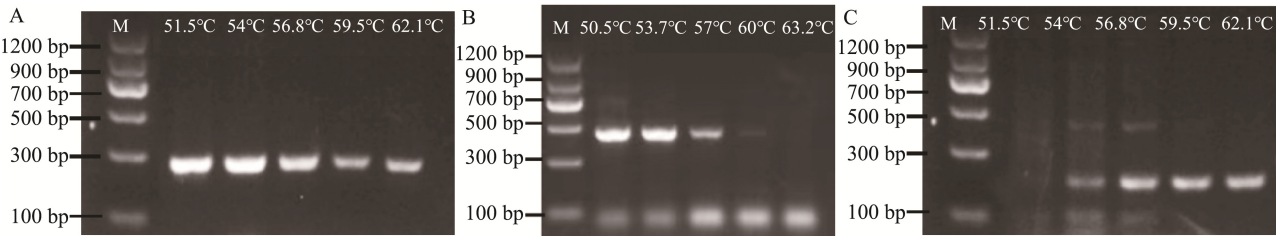


图 3 引物马I(A)、马II(B)和 MCK (C)温度梯度电泳结果
Fig.3 Electrophoresis results of primer horse I (A), horse II (B) and MCK (C) temperature gradient

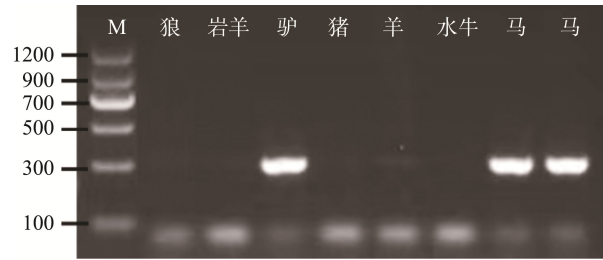


图 4 引物马I特异性检测电泳结果
Fig.4 Electrophoresis results of primer horse I specific detection

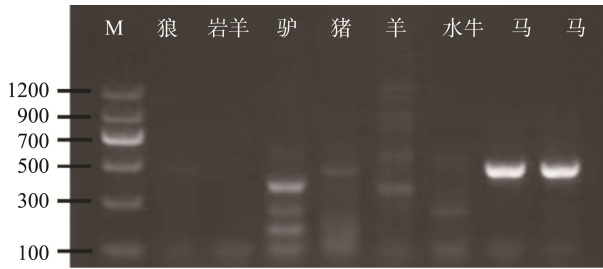


图 5 引物II特异性检测电泳结果
Fig.5 Electrophoresis results of primer II specific detection

使用 MCK 基因引物扩增的 PCR 产物电泳结果显示, 驴、猪、羊和驴的 DNA 均能被扩增出条带, 马和驴 DNA 扩增产物与预期 217 bp 大小一致, 但猪和羊 DNA 扩增产物明显为非特异性扩增, 说明该引物特异性不高, 电泳结果见图 6。

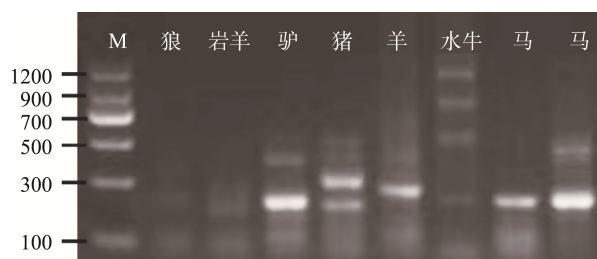


图 6 引物 MCK 特异性检测电泳条带

Fig.6 Electrophoresis bands of primer MCK specific amplification

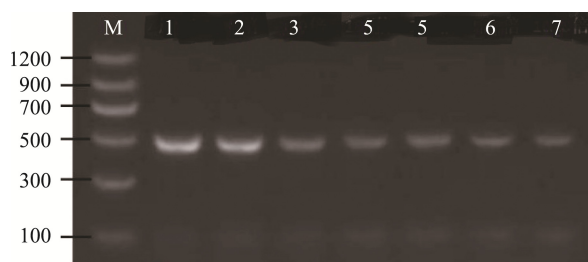
综上所述, 3 对用于马属动物鉴定的引物中, 引物马I可以特异性的鉴定马和驴, 无其他物种的非特异性扩增, 但是不能区分马和驴; 引物马II可以特异性扩增马 DNA 样品及非特异性扩增驴 DNA, 未检测到其他非特异性扩增, 可以从产物大小及有无区分马和驴成分; 而 MCK 基因引物除了特异性扩增马和驴 DNA 外, 还能非特异性扩增猪、羊等物种。本部分测试中, 尽管引物马I具有高度特异性, 但本组引物基于马驴通用物种设计, 不能区分两个物种, 而引物马II则可实现二者的差异鉴定, 在物种鉴定方面更具优势。另一方面, 这两组引物均为母系遗传物质 mtDNA 引物, 实际鉴定中不能鉴定杂交种(骡)的父本来源。

2.4 灵敏度分析

依据 3 对引物的特异性分析结果, 优先选取引物马I和II组引物进行灵敏度测试。连续梯度稀释的混合 DNA 样品扩增结果显示, 在 2% 琼脂糖凝胶中, 梯度稀释的 DNA 模板 PCR 扩增产物亮度呈现连续变化, 当稀释至 PCR 反应体系中 DNA 质量浓度 0.0636 ng/μL 时马II组引物仍可见能判定结果的条带, 而引物马I的检测限度在 PCR 体系中的质量浓度在 0.0636~0.00636 ng/μL 之间, 而 MCK 基因引物质量浓度在 0.0636 ng/μL 时凝胶成像系统已无可见电泳条带。引物马I和II组无论从 PCR 体系中 DNA 总量还是质量浓度计算, 均能满足 DNA 检出限为 0.1% 的要求, 引物马II组灵敏度检测结果见图 7。引物I和引物II的灵敏度均高于细胞核基因 MCK, 这可能与肉类来源的基因组中 mtDNA 的拷贝数远高于核基因拷贝数以及在加工产品中前者稳定性更好有关^[35-36]。

3 讨论与结论

食品掺伪由来已久, 中国自古就有“挂羊头卖狗肉”的说法。而自古对食品掺伪的检测监督也应运而生, 从较早的



注: 泳道 M 为 DNA markerC, 泳道 1~7 位连续稀释 DNA 产物。

图 7 引物II浓度梯度电泳结果

Fig.7 Electrophoresis results of primer II concentration gradient

感官检验到理化鉴定再到基于物种特异性 DNA 分子的鉴定, 检测技术与食品掺伪手段形成螺旋式上升的发展趋势。如今, 分子检测鉴定成为当前食品真伪检测鉴定的主要技术, 并且不断发展创新, 衍生出诸多基于 DNA 检测的联合应用技术, 如结合 DNA 扩增的双拖尾重组聚合酶恒温扩增与核酸杂交试纸条联合的马源性成分检测技术^[23], 以及团体标准 T/CAAA 060—2021 和其他物种的同类检测技术等。一方面, 这些基于 DNA 分析的物种鉴定技术多以 PCR 技术为基础, 选用 mtDNA 靶标开展鉴定研究, 经过多方面体系优化和靶标具有的多拷贝和热稳定性优势, 形成了马属动物物种鉴定完整的技术体系。另一方面, 如本研究中选用的国标法和专利法均以 mtDNA 靶标为鉴定对象, 在与近源物种驴的鉴别中存在交叉反应, 同时存在难以鉴定马驴杂交种和无法定量及多物种同步检测的不足, 需要对这些检测靶标进一步优化并组建多重检测体系。在选择这些同类技术作为参考时又给研究人员带来困惑, 对诸多引物的特异性和灵敏度不清而难以抉择。如今, 随着农牧业发展, 马属动物的应用价值逐步转向食品产业且成为国际贸易和食品安全监管中重要的物种鉴定对象之一。同时, 与驴较近的亲缘关系以及杂交种群的存在, 使得马也成为保健品掺假防控中重要的监管对象^[6-7,20,32]。近年来, 尽管已有诸多马属动物的物种鉴定研究报道^[6-7,9,37], 也有如 SN/T 3730.5—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 5 部分: 马成分检测实时荧光 PCR 法》和 SN/T 3730.4—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 4 部分: 驴成分检测实时荧光 PCR 法》等标准, 但伴随着市场监管需求和掺伪手段的不断变化, 针对马属动物源性成分的检测技术方法也在不断革新, 如基于 PCR 平台发展起来的更为高效的多重 PCR 及灵敏度更高的微流控芯片结合检测技术等^[7,32,38], 都为马属动物鉴定提供了技术参考。因此, 比较筛选马鉴定 PCR 引物的特异性和灵敏度是该物种检测技术优化和革新的重要基础, 本研究对组建多重 PCR 体系以及靶标筛选仍具有一定意义和应用价值。

鉴于不断发展的分子检测技术和未来定量检测掺伪的需要, 本研究选择具有代表性的 3 组马属动物检测普通

PCR 引物并比较测试灵敏度和特异性。结果表明,以线粒体基因组 DNA 为靶标的II组马源性成分特异性鉴定引物具有较好的灵敏度和特异性,可作为马物种特异性鉴定的首选和建立多重鉴定技术的靶标。但线粒体靶标也存在拷贝数高和不能确定父系来源的不足^[31,39],其在肌肉细胞中不确定的拷贝数和不同产品加工工艺使得其在定量检测中难以和肌肉质量建立固定的相关关系^[40-41],相比之下具有单拷贝的核基因在物种定量鉴定中具有一定的优势^[42]。因此,基于不同需求的马源性成分鉴定需要线粒体和核基因组靶标联合应用,以提高鉴定的准确性和灵敏度。

参考文献

- [1] NAU JY. Horse meat: First lessons of a scandal [J]. Rev Med Suisse, 2013, 9(376): 532-533.
- [2] 胡谦, 陈颖, 倪凯, 等. 肉制品异源基因检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 275-282.
- HU Q, CHEN Y, NI K, et al. A review of recent progress in detection of heterologous genes in meat products [J]. Food Sci, 2018, 39(15): 275-282.
- [3] WALKER MJ, BURNS MA, BURNS DT. Horse meat in beef products-species substitution 2013 [J]. J Ass Public Anal, 2014, (41): 67-106.
- [4] 杨艳歌, 李莉, 王丹丹, 等. 多重 real-time PCR 技术快速鉴别特种乳中的乳源动物成分[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 312-321.
- YANG YG, LI L, WANG DD, et al. Multiple real-time polymerase chain reaction for identification of animal-derived ingredients in milk products from minor dairy species [J]. Food Sci, 2021, 42(16): 312-321.
- [5] 于文杰. 基于微流控芯片的特色乳多重鉴别技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- YU WJ. Multiple authentications of featured milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [6] 刘艳艳, 张全芳, 卞如如, 等. 利用多重荧光定量 PCR 检测阿胶原料驴、马、驴骡和马骡皮张的源性[J]. 药学研究, 2016, 35(10): 569-574, 578.
- LIU YY, ZHANG QF, BIAN RR, et al. The detection of donkeys, horses, hinny and mule hides derived materials in ass-hide gelatin products by multiple fluorescent quantitative PCR [J]. J Pharm Res, 2016, 35(10): 569-574, 578.
- [7] 湛阳, 王文君, 付明, 等. 基于核质遗传原理建立多重 PCR 检测方法鉴定阿胶中马、驴源性成分及皮张种源[J]. 遗传, 2020, 42(10): 1028-1035.
- ZHAN Y, WANG WJ, FU M, et al. A multiplex PCR method based on nuclear and cytoplasmic inheritance to identify the horse and donkey-derived components of Asini *Colla corii* and the hide [J]. Hereditas, 2020, 42(10): 1028-1035.
- [8] 张余, 何立言, 张莉莉, 等. 犀牛角及其仿制品的鉴定特征[J]. 宝石和宝石学杂志(中英文), 2021, 23(1): 48-54.
- ZHANG Y, HE LY, ZHANG LL, et al. Identification characteristic of rhinoceros horn and its imitation [J]. J Gems Gemol, 2021, 23(1): 48-54.
- [9] 赵云冬, 王天添, 陈思秀, 等. 阿胶真伪鉴定方法的建立与应用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 140-146.
- ZHAO YD, WANG TT, CHEN SX, et al. Establishment and application of *Colla corii* identification method [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(12): 140-146.
- [10] 沈维力, 张洪伟, 陈学. 关于肉品卫生检验中牛、马肉简易识别法[J]. 中国动物检疫, 1999, (2): 21.
- SHEN WL, ZHANG HW, CHEN X. Simple identification of cattle and horse meat in meat hygiene inspection [J]. China Anim Health Inspect, 1999, (2): 21.
- [11] SAFDAR M, JUNEJO Y, ARMAN K, et al. A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: Development and validation [J]. Meat Sci, 2014, 98(2): 296-300.
- [12] CHEN Y, WANG Y, XIAO M, et al. Polymerase chain reaction with lateral flow sensor assay for the identification of horse meat in raw and processed meat products [J]. Food Chem, 2021, 345: 128840.
- [13] 李丹, 王守伟, 臧明伍, 等. 国内外经济利益驱动型食品掺假防控体系研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 320-325.
- LI D, WANG SW, ZANG MW, et al. Progress in prevention and control systems against economically motivated food adulteration prevention and control system of food in china and abroad [J]. Food Sci, 2018, 39(1): 320-325.
- [14] 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. Progress of molecular identification techniques used in meat and meat products [J]. J Food Saf Qual, 2015, (2): 405-409.
- [15] 李海霞, 徐继艳. 牛、马肉的识别[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (7): 108.
- LI HX, XU JY. The identification of cattle, horse meat [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2006, (7): 108.
- [16] 金玉子, 沈承知. 牛肉与马肉的鉴别[J]. 肉品卫生, 2004, (8): 46.
- JIN YZ, SHEN CZ. Identification of beef and horse meat [J]. Meat Hyg, 2004, (8): 46.
- [17] 孙英慧, 王守云, 冯雪松, 等. 超高效液相串联质谱法检测牛肉中的马肉[J]. 化学研究, 2019, 30(6): 612-618.
- SUN YH, WANG SY, FENG XS, et al. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse meat in beef [J]. Chem Res, 2019, 30(6): 612-618.
- [18] 刘莉敏, 郭军, 木其尔, 等. 蒙古马肉常规营养成分和脂肪酸分析评价[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(1): 64-68.
- LIU LM, GUO J, MU QER, et al. Analysis and evaluation of nutrients and fatty acids of Mongolian horse meat [J]. Food Nutr China, 2017, 23(1): 64-68.
- [19] MADKOUR FA, ABDELSABOUR-KHALAF M. Scanning electron microscopy of the nasal skin in different animal species as a method for forensic identification [J]. Microsc Res Technol, 2022, 85(5): 1643-1653.
- [20] ZHANG J, WU M, MA Z, et al. Species-specific identification of donkey-hide gelatin and its adulterants using marker peptides [J]. PLoS One, 2022, 17(8): e0273021.
- [21] 励炯, 吴琼, 扈明洁, 等. 基于细胞色素 C 氧化酶亚基 I 序列的 DNA 条形码技术鉴别 11 种生鲜肉制品掺假的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(1): 52-59.
- LI J, WU Q, HU MJ, et al. Identification of adulteration in 11 fresh meat products by DNA mini-barcoding methods based on cytochrome C oxidase subunit I (COI) sequence [J]. J Zhejiang Univ (Agric Life Sci),

- 2021, 47(1): 52–59.
- [22] 袁淑辉, 蔡军, 王忠才, 等. 4种肉类成分多重PCR的鉴定方法[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(11): 65–69.
- YUAN SH, CAI J, WANG ZC, *et al.* A Multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients [J]. Chin J Vet Med, 2020, 56(11): 65–69.
- [23] 陈阳, 任星彤, 贾世龙, 等. 基于双拖尾重组聚合酶恒温扩增技术的核酸杂交试纸条快速检测驴肉中的马源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(11): 3467–3474.
- CHEN Y, REN XT, JIA SL, *et al.* Rapid determination of horse-derived components in donkey meat by nucleic acid hybridization strip based on double trailing recombinant polymerase constant temperature amplification technology [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(11): 3467–3474.
- [24] 苏州市红冠庄国药饮品有限公司. 鹿猪牛羊马驴兔鸡的PCR鉴定用引物体系: 中国, CN102876805A[P]. 2013-01-16.
- Suzhou Hongguanzhuang Chinese Medicine Co., Ltd.. Deer, pigs, cattle and sheep horse donkey rabbit chicken with primer PCR identification system: China, CN102876805A [P]. 2013-01-16.
- [25] 聂凌云, 魏迪, 程东庆, 等. 一种检测食品中马肉成分的方法: 中国, CN104293899A[P]. 2015-01-21.
- NIE LY, WEI D, CHENG DQ, *et al.* A method of testing horse meat in food ingredients: China, CN104293899A [P]. 2015-01-21.
- [26] 齐鹏飞, 张伟, 朱曼玲, 等. 一种快速鉴定驴、马源成分及制品中驴、马源成分的试剂盒及其应用: 中国, CN111763714A[P]. 2020-10-13.
- QI PF, ZHANG W, ZHU ML, *et al.* A kit for rapid identification of donkey and horse source components and products and its application: China, CN111763714A [P]. 2020-10-13.
- [27] 苏州市红冠庄国药饮品有限公司. 鹿牛羊马驴猪动物皮组织DNA的PCR鉴定用引物体系: 中国, CN104152558A[P]. 2014-11-19.
- Suzhou Hongguanzhuang Chinese Medicine Co., Ltd.. Primer system for PCR identification of deer, cattle, sheep, horses, donkeys, pigs, animal skin tissues: China, CN104152558A [P]. 2014-11-19.
- [28] 王冬亮, 王文智, 王玉水, 等. DNA条形码技术在牛肉干鉴定中的应用[J]. 食品科技, 2015, 40(12): 90–95.
- WANG DL, WANG WZ, WANG YS, *et al.* DNA barcoding reveals fraud of commercial beef jerky products [J]. Food Sci Technol, 2015, 40(12): 90–95.
- [29] PINTO AD, 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.
- [30] YU Z, LI Q, KONG L, *et al.* Utility of DNA barcoding for tellinoidea: A comparison of distance, coalescent and character-based methods on multiple genes [J]. Mar Biotechnol (NY), 2014, 17(1): 55–65.
- [31] WU Y, YANG Y, LIU M, *et al.* Applying COI barcode to identify animal origin of food [J]. J Food Sci, 2019, 84(6): 1256–1265.
- [32] WANG D, WANG L, XUE C, *et al.* Detection of meat from horse, donkey and their hybrids (mule/hinny) by duplex real-time fluorescent PCR [J]. PLoS One, 2020, 15(12): e0237077.
- [33] RATNASINGHAM S, HEBERTPDN. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>) [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(3): 355–364.
- [34] PINTO AD, MARCHETTI P, MOTTOLA A, *et al.* Species identification in fish fillet products using DNA barcoding [J]. Fish Res, 2015, 170: 9–13.
- [35] RASTOGI G, DHARNE MS, WALUJKAR S, *et al.* Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers [J]. Meat Sci, 2007, 76(4): 666–674.
- [36] 阿迪力·艾合麦提, 阿依努尔·阿卜杜艾尼, 布威海丽且姆·阿巴拜科日, 等. DNA条形码技术在野生哺乳动物物种鉴定中的可行性[J]. 野生动物学报, 2019, 40(1): 5–10.
- ADILI AIHMT, AYINVER ABDAIN, BUWEIHAILIQIEMU ABBKR, *et al.* Feasibility of using DNA barcode technology in wild mammal species identification [J]. Chin J Wildlife, 2019, 40(1): 5–10.
- [37] 宗卉, 曾少灵, 林庆燕, 等. 饲料中马、驴源性成分的分子生物学检测技术[J]. 中国草食动物, 2005, 25(5): 3–6.
- ZONG H, ZENG SL, LIN QY, *et al.* Molecular biology techniques for identification of horse and donkey materials in feedstuff [J]. Chin Herb, 2005, 25(5): 3–6.
- [38] CHEN Y, WANG Y, XIAO M, *et al.* Polymerase chain reaction with lateral flow sensor assay for the identification of horse meat in raw and processed meat products [J]. Food Chem, 2021, 345: 128840.
- [39] 胡馨予, 黄朱梁, 汤海凤, 等. 基于PCR技术的肉类成分溯源鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3385–3390.
- HU XY, HUANG ZL, TANG HF, *et al.* Research progress in species identification methods of meat ingredients based on PCR technology [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(11): 3385–3390.
- [40] YAO Z, LI J, ZHANG Z, *et al.* The relationship between MFN1 copy number variation and growth traits of beef cattle [J]. Gene, 2022, 811: 146071.
- [41] CHENG K, WANG T, LI S, *et al.* Effects of early resveratrol intervention on skeletal muscle mitochondrial function and redox status in neonatal piglets with or without intrauterine growth retardation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4858975.
- [42] SOPEZKI MDS, MONSERRAT JM, YUNES JS, *et al.* Validation of housekeeping genes as internal controls for the study of the effects of microcystin-Lr in zebrafish by real-time PCR [J]. Zebrafish, 2018, 15(5): 454–459.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

作者简介



夏慧丽, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全与鉴定研究。
E-mail: 64463403@qq.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