DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250702001
引用格式: 庞祥艺, 李晓雨, 张廷华, 等. 基于双重实时荧光聚合酶链式反应的牦牛乳、犏牛乳真实性鉴别方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(5): 29–36.
PANG XY, LI XY, ZHANG TH, *et al*. Research on the identification method for authenticity of yak and yak-cattle milk based on duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(5): 29–36. (in Chinese with English abstract).

基于双重实时荧光聚合酶链式反应的牦牛乳、犏牛乳真实性鉴别方法研究

庞祥艺[1], 李晓雨[1], 张廷华[2], 陈理让波[2], 曲 崧[2,3], 陈爱亮[1], 税晓燕[3], 张 娟[1*]

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; 2. 四川菊乐食品股份有限公司, 成都 610041; 3. 红原牦牛乳业有限责任公司, 红原 624499)

摘 要: 目的 建立基于双重实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的牦牛乳、犏牛乳真实性鉴别方法。**方法** 以牦牛和黄牛种属特异性核染色体基因为靶标, 筛选实时荧光 PCR 引物探针, 优化双重实时荧光 PCR 体系, 实现对牦牛乳和犏牛乳中牦牛和黄牛源性成分的同时检测。**结果** 优化后的牦牛乳、犏牛乳的双重实时荧光 PCR 体系扩增标准曲线分别为 Y=–3.4015X+30.842 (r^2=0.9953)和 Y=–3.333X+30.035 (r^2=0.9984), 线性关系良好, 扩增效率分别为 96.78%和 99.54%; 与水牛、羊、驴、骆驼等乳源性成分无交叉反应, 特异性强; 在掺假乳检测方面, 最低能检测出牦牛乳中 10%的犏牛乳掺假; 17 份实际样品的检测结果表明了该方法具有良好的准确性。**结论** 该研究成功建立了一种基于核基因特异性序列的双重实时荧光 PCR 检测方法, 可准确识别乳品中的牦牛源性成分和犏牛源性成分, 为牦牛乳真实性鉴别提供了一种准确可靠的方法。

关键词: 犏牛乳; 牦牛乳; DNA; 双重检测; 实时荧光聚合酶链式反应法

Research on the identification method for authenticity of yak and yak-cattle milk based on duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction

PANG Xiang-Yi[1], LI Xiao-Yu[1], ZHANG Ting-Hua[2], CHEN Li-Rang-Bo[2], QU Song[2,3], CHEN Ai-Liang[1], SHUI Xiao-Yan[3], ZHANG Juan[1*]

(1. *Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100081, *China*; 2. *Sichuan Jule Food Co*., *Ltd*., *Chengdu* 610041, *China*; 3. *Hongyuan Yak Dairy Co*., *Ltd*., *Hongyuan* 624499, *China*)

ABSTRACT: Objective To develop of a duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR)-based method for the authentication of yak milk and yak-cattle milk. **Methods** Using species-specific nuclear chromosome genes of yak and cattle as targets, real-time PCR primers and probes were designed, and the duplex

收稿日期: 2025-07-02
基金项目: 四川省转移支付项目(R21ZYZF0003)
第一作者: 庞祥艺(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全控制技术。E-mail: pangxiangyi118@163.com
***通信作者:** 张娟(1991—), 女, 助理研究员, 主要研究方向为畜产品真实性识别与溯源技术研究。E-mail: 15110679191@yeah.net

real-time fluorescence PCR system was optimized to achieve simultaneous detection of yak- and cattle-derived components in yak milk and yak-cattle milk. **Results** The optimized duplex real-time fluorescence PCR system produced standard curves for yak milk (Y=–3.4015X+30.842, r^2=0.9953) and cattle-yak milk (Y=–3.333X+30.035, r^2=0.9984) showing excellent linearity, with amplification efficiencies of 96.78% and 99.54%, respectively. No cross-reactivity was observed with milk components from cattle, sheep, donkey, camel or other species, indicating strong specificity. In adulteration testing, the method successfully detected as low as 10% yak-cattle milk mixed into yak milk. Additionally, testing of 17 real samples confirmed the method's high accuracy. **Conclusion** A duplex real-time fluorescence PCR method based on species-specific nuclear gene sequences is successfully developed in this study. This method enables accurate detection of yak-derived and yak-cattle-derived components in dairy products, providing a reliable approach for the authenticity identification of yak milk.

KEY WORDS: yak-cattle milk; yak milk; DNA; duplex detection; real-time fluorescence polymerase chain reaction

0 引 言

牦牛主要分布在青藏高原及相邻的高山和亚高山地区，牦牛乳被称为天然浓缩奶[1]，含有丰富的蛋白质、脂肪、乳糖等营养成分，具有抗缺氧、抗疲劳、抗氧化等慢性功效[2]，是当地牧民的主要饮食成分和重要经济来源。然而牦牛受遗传及环境因素的影响，泌乳是季节性的，因此产乳量较低[3]。将牦牛与黄牛杂交获得杂种优势是提高产能的重要方法之一，杂交所得即为犏牛。在娟姗牛与牦牛杂交后代泌乳量和乳品质分析研究中，娟姗犏牛的挤奶量比甘南牦牛高 226%[4]，显著提高了泌乳量。犏牛乳虽产量较高，但蛋白、脂肪等营养成分含量较低，乳质较牦牛乳差，经济价值低于牦牛乳[5–8]。因此部分乳品商在收购牦牛原料乳过程中，面临着犏牛乳掺假的问题。为了有效识别和打击牦牛乳中犏牛乳掺假行为，需要建立一种快速、准确且高效的检测方法。

当前，许多检测技术已被应用于乳品的真实性检测，包括免疫学、电子鼻技术、光谱技术、质谱技术以及核酸分析技术等[9–16]。尽管这些方法在某些方面表现良好，但它们也存在一些局限性。例如，酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)虽然灵敏，但其特异性可能受到交叉反应的影响，所需抗体价格昂贵，并且通常需要较长的检测时间和复杂的操作程序[14,17–18]。电子鼻技术结合多元统计分析可以同时分析多种物种成分，但该方法适用性差，对工作环境要求苛刻，依赖大量数据构建模型和识别算法[16]。光谱技术可同时检测多种物种成分，有效提高检测效率，但乳中复杂的成分可能会影响光谱分析的精度，同时光谱检测结果容易受温度、湿度等环境因素的影响，需要在稳定的实验环境下进行检测[19–20]。质谱分析设备昂贵、操作复杂，且对样本的前处理要求较高，不适合现场快速检测[21]。核酸技术成为近年来鉴别食品物种来源的最主要技术，主要是利用物种特异性 DNA 片段进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及其衍生技术、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术[22–25]等扩增，实现食品物种源性成分的鉴别。目前物种特异性靶基因片段大多为线粒体基因，这是因为线粒体具有拷贝数高、结构简单且稳定性强等特点，例如 BAI 等[26]通过扩增线粒体 DNA 中 *ND1* 基因的靶序列，开发了一种基于 PCR 能够检测牦牛乳中黄牛乳掺假的检测方法。但是由于牦牛和犏牛母本均为牦牛，其线粒体基因相同，因此利用传统的基于线粒体基因靶标的 PCR 技术无法区分牦牛乳和犏牛乳。虽然当前对犏牛乳的研究已涵盖牦牛和犏牛乳功能成分差异、品质性状优势和改良策略等领域[7,27]，但尚未建立能够有效区分牦牛和犏牛乳鉴别技术。

本研究依据犏牛是由牦牛和黄牛杂交产生，其染色体基因同时包含牦牛核基因和黄牛核基因的特点[28–29]，分别设计了针对黄牛和牦牛的种属特异性核染色体基因引物探针，开发了一种基于双重实时荧光 PCR 技术的牦牛乳和犏牛乳真实性鉴别方法，以实现对牦牛乳或犏牛乳中牦牛和黄牛源性成分的同时检测，为牦牛乳掺假犏牛乳鉴别提供了一种准确可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304-03，北京天根生化科技有限公司)；硫酸镁($MgCl_2$，分析纯，国药集团化学试剂有限公司)；脱氧核糖核苷三磷酸、Taq DNA 聚合酶(美国纽英伦生物技术 New England Biolabs 公司)；无菌去离子水(北京索莱宝科技有限公司)。

本研究共采集 17 份牦牛乳和犏牛乳样品，所有样品均为新鲜原乳，取自四川省阿坝州红原县安曲镇下哈拉玛村，将采集样品置于干净的 50 mL 离心管中，保存于

–20 ℃, 待使用。

为了确定双重实时荧光 PCR 检测方法的特异性, 本研究分别收集了真实的黄牛乳、水牛乳、羊乳、驴乳、骆驼乳样品, 所有样品的真实性均通过 DNA 条形码技术进行了交叉验证。同样保存于–20 ℃。

1.2 仪　器

Legend Micro 21R 冷冻型微量台式离心机(德国 Eppendorf 公司); Gentier 96E 全自动医用 PCR 分析系统(西安天隆科技公司); Nanodrop 2000 超微分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 的提取

使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304), 根据说明, 从 6 mL 乳中提取 DNA 并富集。采用 Nanodrop-2000 超微分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, –20 ℃条件下长期保存。

1.3.2 引物探针的设计

犏牛是牦牛和普通黄牛杂交的一代种, 其染色体核基因一条来自牦牛, 而另一条来自黄牛, 本研究筛选两对分别针对黄牛和牦牛种属特异性核染色体基因的实时荧光引物探针(表 1), 用于鉴别牦牛乳和犏牛乳的真实性。引物探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.3 双重实时荧光 PCR 检测体系的建立与优化

双重实时荧光 PCR 反应在 25 μL 体系中进行, 包含以下组分: 12.5 μL 2×PCR 预混液[含 2 mmol/L $MgCl_2$、400 mmol/L 脱氧核苷酸三磷酸盐(deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs)和 50 U/mL Taq DNA 聚合酶], 不同浓度牦牛核基因引物探针组合, 不同黄牛核基因引物探针组合, 2 μL 提取的 DNA 模板, ddH_2O 补足。双重实时荧光 PCR 反应步骤为: 95 ℃预变性 10 min, 随后进行 40 个循环的扩增, 每个循环包括 95 ℃持续 15 s 和 60 ℃持续 1 min, 并在 60 ℃步骤时采集 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)和 VIC 荧光信号。

1.3.4 双重实时荧光 PCR 检测体系标准曲线的构建

分别提取黄牛乳和牦牛乳基因组 DNA, 利用核酸浓度测定仪测定核酸浓度, 然后分别进行梯度稀释, 经过双重实时荧光 PCR 检测体系进行检测并构建标准曲线。

1.3.5 灵敏度实验

向牦牛乳中添加犏牛乳, 配制犏牛乳含量分别为 1%、5%、10%、20%、50%、80%和 100%的样本, 随后提取各样本中的 DNA, 用于双重实时荧光 PCR 检测体系的灵敏度评估。

1.3.6 实际样品的检测

为了验证方法的有效性, 对 17 份牦牛乳或犏牛乳样品, 用优化的实时荧光 PCR 体系及程序进行检测。所有采集的样品提取 DNA 后使用实时荧光 PCR 进行扩增反应, 每组重复 3 次, 同时设置空白与阳性对照, 确保实验的有效性。同时, 对扩增产物利用 Sanger 测序方法进行确认。然后将检测结果与实际样品信息进行比较, 检验本方法的准确性。

1.4 数据处理

实时荧光采集通过西安天隆 Gentier 96E 型实时荧光 PCR 仪采集, 使用 Medtl System 导出实时荧光扩增数据, 使用 Excel (Office 2019)进行数据分析及图表格处理。实验至少重复 3 次测定。

2 结果与分析

2.1 双重实时荧光 PCR 体系特异性分析结果

根据最优条件配备实时荧光 PCR 检测体系, 向体系中分别加入黄牛、牦牛、犏牛、水牛、羊、驴、骆驼 DNA, 同时设置空白组进行扩增。观察其他物种是否有扩增曲线。

实验结果如图 1 所示, 经过 40 个 PCR 循环, 其中黄牛乳、牦牛乳分别针对各自核基因出现特异性扩增曲线, 而犏牛乳则同时出现了黄牛和牦牛两条特异性扩增曲线, 所有扩增曲线 Ct 值在 26~28 范围, 而其他非靶动物的 DNA 在 40 个循环内均未出现扩增。结果表明, 本研究设计的引物和探针未与非靶种发生交叉反应。说明该检测方法特异性好, 且能够有效区分犏牛乳与牛乳和牦牛乳。

表 1　牦牛、黄牛核基因引物探针序列

Table 1　Primer and probe sequences for yak and cattle nuclear genes

物种	目的基因	引物序列(5'-3')	扩增子大小/bp	来源
牦牛	锌指蛋白 280B	5'-CCATAAATCCCATGTGATCATG-3' 5'-CCATGAACTGCAGCCCACCA-3' 5'-VIC-TGTTGAGGATGTTTGCCTCTAT-BHQ1-3'	174	[30]
黄牛	生长激素基因	5'-GCAGGCATGCTGGGGATG-3' 5'-CTAAGAACCAGGAGCGTGGACAG-3' 5'-FAM-TACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGG-BHQ1-3'	135	T/CNHFA 002—2022 《乳及乳制品中牛(家牛、牦牛和水牛)和羊(山羊和绵羊)源性成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法》

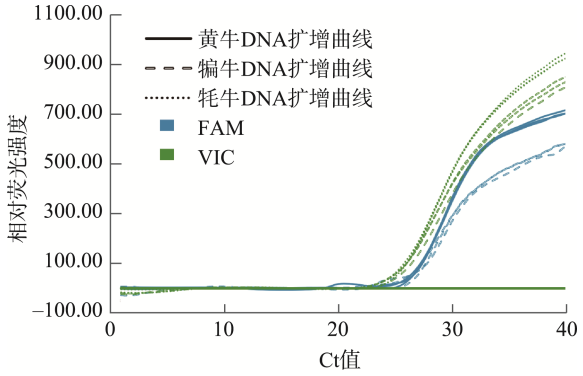


图 1 双重实时荧光 PCR 体系特异性扩增结果

Fig.1 Specific amplification results of the duplex real-time fluorescence PCR system

2.2 双重实时荧光 PCR 检测体系的优化结果

检测体系中引物浓度对实时荧光 PCR 反应有着至关重要的影响: 引物浓度过低, 会降低整个扩增反应速率, 从而影响反应进程; 引物浓度过高会导致扩增产生引物二聚体, 造成假阳性结果, 从而影响对真正扩增产物的判别。针对该双重体系, 本研究对两种核基因引物探针设置不同的引物组合。如图 2 结果所示, 黄牛核基因 3 个组合扩增 Ct 值均相差不大, 当引物探针终浓度为 0.8 μmol/L、0.4 μmol/L 时荧光值虽然最高, 但是扩增效率稍差, 引物终浓度为 0.4 μmol/L、探针终浓度为 0.2 μmol/L 或者 0.1 μmol/L 时扩增效果最好; 牦牛核基因 3 个组合扩增 Ct 值相差较大, 当引物探针终浓度分别为 0.8 μmol/L、0.4 μmol/L 时, 扩增效率最好, 荧光值最高, 因此最终选择黄牛核基因检测用引物、探针浓度分别为 0.4 μmol/L、0.1 μmol/L, 牦牛核基因检测用引物、探针浓度分别为 0.8 μmol/L、0.4 μmol/L。

2.3 双重实时荧光 PCR 检测体系的标准曲线

本研究采用经优化的双重实时荧光 PCR 检测体系, 分别对梯度稀释的黄牛乳基因组 DNA(质量浓度范围 11.00~0.69 ng/μL)、牦牛乳基因组 DNA(质量浓度范围 3.60~0.23 ng/μL)进行检测, 并建立标准曲线。实验结果表明: 各浓度梯度的扩增曲线间隔均匀, 表明扩增效率稳定(图 3)。

进一步以模板浓度对数(Log 10)为横坐标(X)、Ct 值为纵坐标(Y)构建标准曲线, 黄牛乳基因组 DNA 构建的标准曲线方程为 Y=–3.4015X+30.842, 相关系数 r^2 为 0.9953, 扩增效率为 96.78%, 表明质量浓度在 0.69~11.00 ng/μL 范围内, 黄牛乳基因组 DNA 浓度对数(Log 10)与 Ct 值具有极强的线性关系, 牦牛乳基因组 DNA 构建的标准曲线方程为 Y=–3.333X+30.035, 相关系数 r^2 为 0.9984, 扩增效率为 99.54%, 表明质量浓度在 0.23~3.60 ng/μL 范围内, 牦牛乳基因组 DNA 浓度对数(Log 10)与 Ct 值具有极强的线性关系[31]。

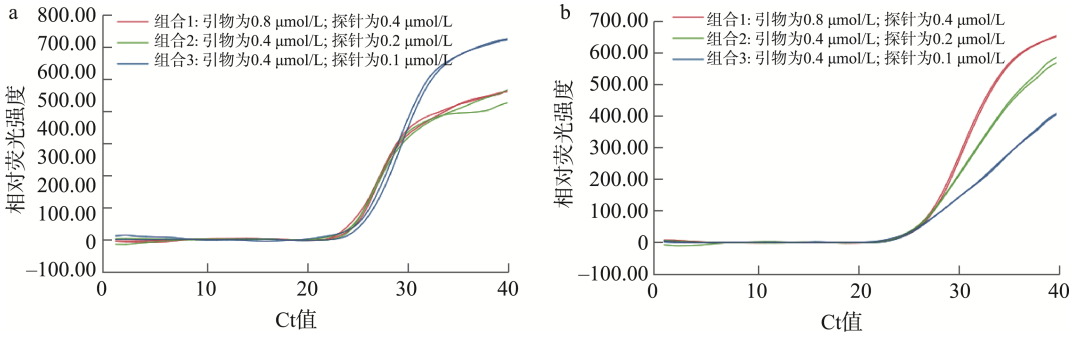
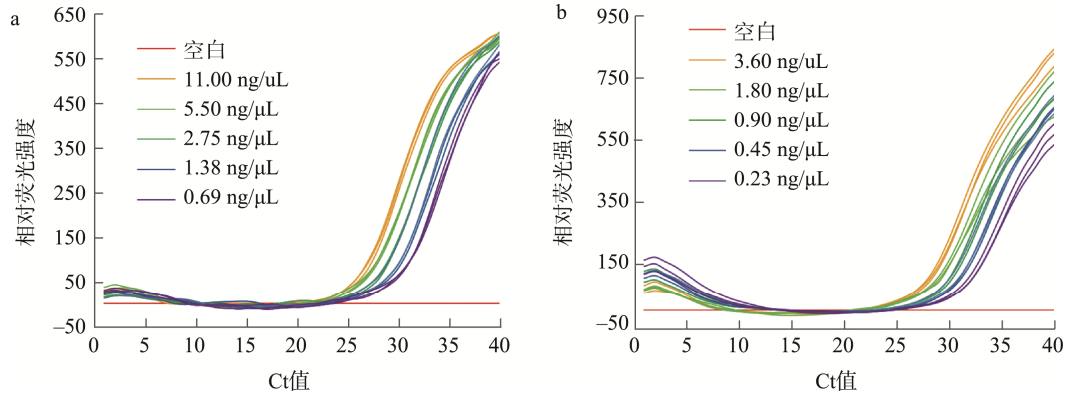


图 2 黄牛(a)和牦牛(b)不同引物探针组合扩增结果

Fig.2 Amplification results of different primer-probe combinations for cattle (a) and yak (b)



注: a. 以不同浓度的黄牛乳样本为模板的实时荧光扩增曲线; b. 以不同浓度的牦牛乳样本为模板的实时荧光扩增曲线。

图 3 双重实时荧光 PCR 体系的标准曲线

Fig.3 Standard curve for duplex real-time fluorescence PCR system

综上，所建立的双重实时荧光 PCR 体系在指定浓度范围内具备良好的线性响应与扩增效率，适用于后续对牦牛乳和犏牛乳样本的鉴别分析。

2.4　双重实时荧光 PCR 体系的灵敏度检测结果

为了验证检测牦牛乳中犏牛乳掺假的灵敏度，将犏牛乳与牦牛乳按 0%、1%、5%、10%、20%、50%、80%、100%比例进行混合，提取 DNA 并进行扩增。

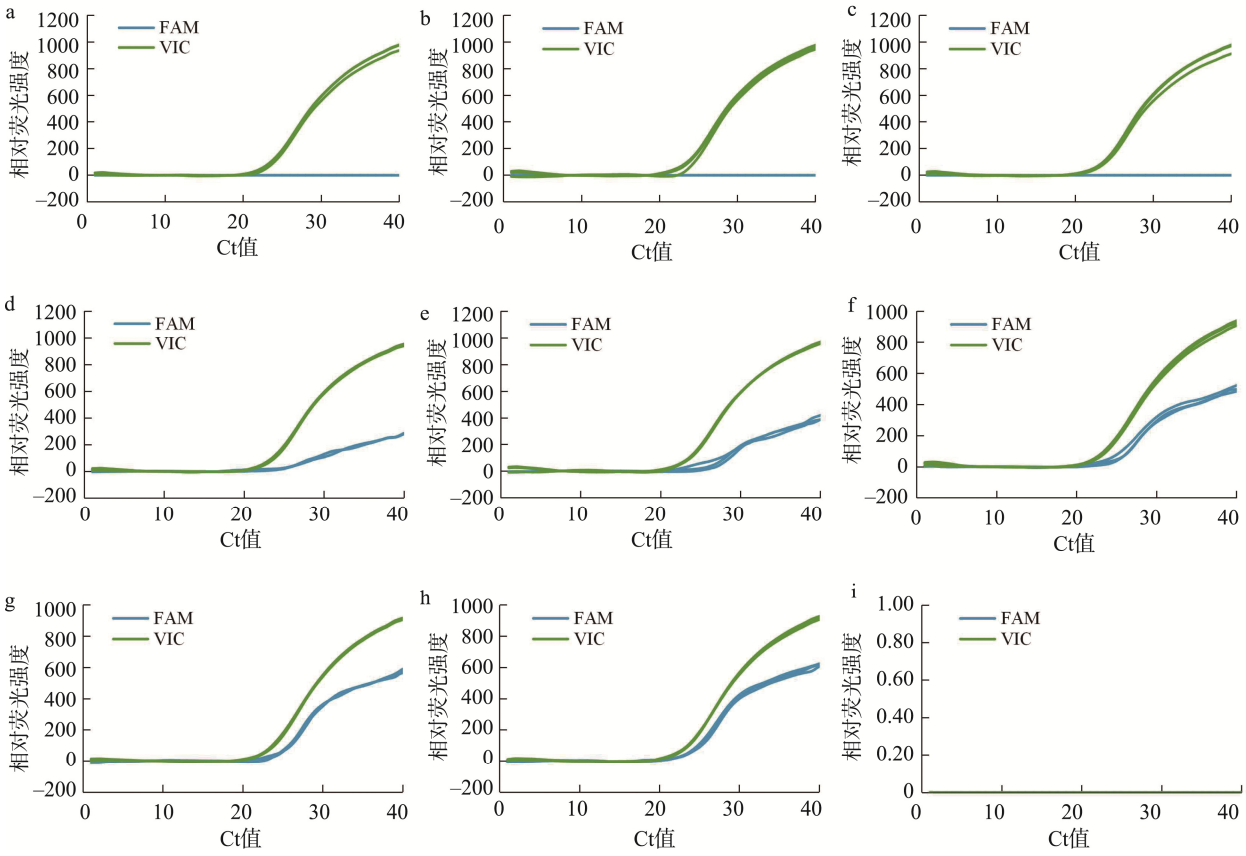
扩增结果如表 2、图 4、所示，当牦牛乳中犏牛乳的添加量达到 10%时，40 个循环内黄牛核基因可稳定扩增，即犏牛乳掺假检出限为 10%。

表 2　双重实时荧光 PCR 体系的灵敏度检测结果(*n*=3)

Table 2　Sensitivity detection results of the duplex real-time fluorescence PCR system (*n*=3)

牦牛乳中犏牛乳掺入比例/%	黄牛源性成分检测 Ct 值		牦牛源性成分检测 Ct	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
0	–	–	24.08	0.23
1	–	–	24.30	0.43
5	–	–	24.17	0.20
10	27.70	0.34	24.08	0.18
20	27.17	1.04	24.01	0.11
50	25.60	0.65	24.00	0.18
80	25.23	0.13	24.17	0.14
100	24.19	0.25	24.17	0.30

注：– 表示无扩增。



注: a~h. 依次为犏牛乳含量分别为 0%、1%、5%、10%、20%、50%、80%、100%的实时荧光 PCR 扩增结果；i. 空白对照实时荧光 PCR 扩增结果。

图 4　双重实时荧光 PCR 体系的灵敏度检测结果

Fig.4　Sensitivity detection results of the duplex real-time fluorescence PCR system

2.5 实际样品检测结果

为评估所建立的双重实时荧光 PCR 体系对实际样品中的检测能力，本研究对安曲镇下哈拉玛村采集的 17 份实际样品进行了检测。结果显示(表 3)，所有样品牦牛核染色体基因均成功扩增，且扩增产物 Sanger 测序验证结果与 Genobank 中登录号为 CP027085.1 的参考序列完全一致(图 5)。其中，12 个样品黄牛核基因稳定扩增 3 次，且扩增产物 Sanger 测序验证结果亦与 Genobank 中登录号为 M57764.1 的参考序列完全一致(图 5)，据此判定为犏牛乳样品。本研究开发的双重实时荧光 PCR 体系的检测结果与采样信息一致，表明该方法在真实场景中具备高度的准确性与可靠性。

表 3 实际样品双重实时荧光 PCR 检测结果(*n*=3)

Table 3 Results of duplex real-time fluorescence PCR detection of actual samples (*n*=3)

序号	样品编号	黄牛源性成分检测结果			牦牛源性成分检测结果			判读结果
		平均 Ct 值	标准差	定性结果	平均 Ct 值	标准差	定性结果	
1	犏牛乳 1	27.89	0.26	+	28.76	0.20	+	犏牛乳
2	犏牛乳 2	30.71	0.62	+	30.50	0.29	+	犏牛乳
3	牦牛乳 1	NA	NA	−	23.99	0.25	+	牦牛乳
4	西门塔尔牛乳 4	27.97	0.71	+	27.70	0.28	+	犏牛乳
5	黑白花牛乳 5	29.54	0.34	+	28.79	0.24	+	犏牛乳
6	改良牛乳 2	28.99	0.37	+	28.58	0.37	+	犏牛乳
7	犏牛乳 25	29.34	0.21	+	30.12	0.10	+	犏牛乳
8	犏牛乳 27	26.32	0.26	+	25.10	0.09	+	犏牛乳
9	犏牛乳 30	27.77	0.71	+	24.69	0.10	+	犏牛乳
10	犏牛乳 32	NA	NA	−	26.77	0.35	+	牦牛乳
11	犏牛乳 34	NA	NA	−	25.62	0.35	+	牦牛乳
12	犏牛乳 40	NA	NA	−	25.94	0.50	+	牦牛乳
13	犏牛乳 45	NA	NA	−	25.98	0.57	+	牦牛乳
14	犏牛乳 46	21.61	0.22	+	21.70	0.11	+	犏牛乳
15	犏牛乳 50	26.61	0.75	+	26.37	0.33	+	犏牛乳
16	犏牛乳 56	23.33	0.13	+	23.92	0.15	+	犏牛乳
17	犏牛乳 58	22.89	0.52	+	23.34	0.29	+	犏牛乳

注: +表示阳性; − 表示阴性; NA 表示未有相关数值。

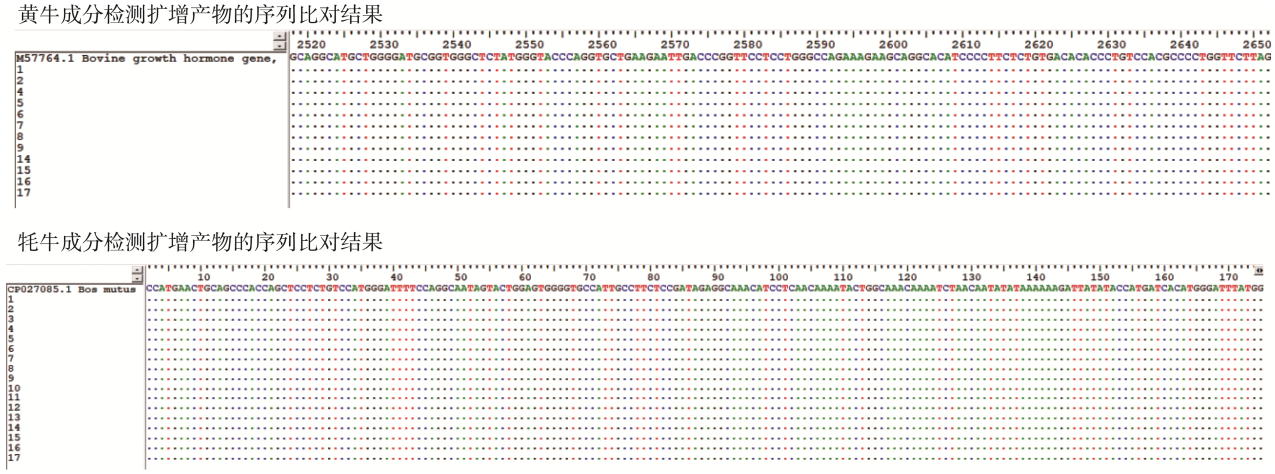


图 5 扩增产物 Sanger 测序验证结果

Fig.5 Verification results of the amplification products by Sanger sequencing

3　讨论与结论

本研究采用黄牛与牦牛种属特异性核基因引物探针开发了一种基于双重实时荧光 PCR 技术的牦牛乳、犏牛乳真实性检测方法。该方法通过对乳样中的核基因进行检测, 可以精准区分牦牛乳与犏牛乳。研究结果显示, 该方法具有高度的灵敏度和特异性, 在纯乳样和掺假乳样的检测中均表现出优异的性能。

在模拟掺假乳样的检测中, 本研究能够快速、准确地检测到低至牦牛乳中 10%犏牛乳的掺假比例, 由于经济利益驱动的市场中乳品中掺假成分往往不低于 10%, 因此本方法能够满足市场对牦牛乳掺假行为检测的需求, 具有良好的应用前景和实际操作价值。尤其是在生产商、质量控制部门和监管机构面临乳品源性掺假问题时, 这一检测方法能够为其提供准确的技术支持。当然, 本研究也存在一定的局限性, 无法区分是犏牛乳的单一靶标, 还是牦牛乳和黄牛乳的混合靶标。未来的研究会考虑探索增加线粒体分子标记, 用于同时区分黄牛、牦牛以及犏牛乳的掺假。

综上, 本研究建立的基于双重实时荧光 PCR 的牦牛乳、犏牛乳真实性鉴别方法, 具有操作简便、灵敏度高、特异性强等优点, 为牦牛乳行业提供了一种有效的质量控制手段, 具有较强的推广价值和应用前景。

参考文献

[1] LI HM, MA Y, LI QM, *et al*. The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (Maiwa) milk [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(8): 4885–4895.

[2] LI AL, LIU C, HAN XT, *et al*. Tibetan Plateau yak milk: A comprehensive review of nutritional values, health benefits, and processing technology [J]. Food Chemistry-X, 2023, 20: ARTN 100919.

[3] REN QR, ZHANG H, GUO HY, *et al*. Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(10): 6000–6006.

[4] 吴晓云, 刘东花, 梁春年, 等. 娟珊牛与牦牛杂交后代泌乳量和乳品质分析[J]. 中国草食动物科学, 2023, 43(1): 19–21.
WU XY, LIU DH, LIANG CN, *et al*. Analysis on the milk yield and quality of the hybrid offspring of jersey cattle and yak [J]. China Herbivore Science, 2023, 43(1): 19–21.

[5] 李升升, 张燕, 赵立柱, 等. 牦牛、犏牛和黄牛乳的营养及加工特性[J]. 食品工业, 2022, 43(4): 343–346.
LI SS, ZHANG Y, ZHAO LZ, *et al*. Nutrition and processing properties of yak milk, cattle-yak milk and cattle milk [J]. The Food Industry, 2022, 43: 343–346.

[6] 赵梦波. 牦牛和犏牛乳的比较生物化学研究[D]. 成都: 西南民族大学, 2022.
ZHAO MB. Comparative biochemical study of yak and cattle-yak [D]. Chengdu: Southwest Minzu University, 2022.

[7] 谭冬飞, 张芳春, 邹攀, 等. 牦牛及犏牛乳品质性状与功能成分研究[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(9): 61–67.
TANG DF, ZHANG FC, ZOU P, *et al*. Research on milk quality and milk nutritional components between cattle-yaks and yaks [J]. China Dairy Industry, 2025, 53(9): 61–67.

[8] CHEN X, ZHANG J, LIU C, *et al*. Proteomics-based study for evaluation crossbreeding advantages of cattle-yak milk [J]. Food Chemistry, 2025, 494: 146188.

[9] 刘瑞, 陈巧玲, 白李薇薇. 光谱技术在奶制品掺假检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 52–62.
LIU R, CHEN QL, BAI LWW. Application of spectroscopy in the detection of dairy adulteration detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 52–62.

[10] 庞祥艺, 张娟, 王楠, 等. 驼乳中牛乳掺假快速检测双重胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科技, 2024, 49(12): 281–287.
PANG XY, ZHANG J, WANG N, *et al*. Development of duplex colloidal gold immunochromatographic test strips for rapid detection of cow's milk adulteration in camel milk [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(12): 281–287.

[11] MAFRA I, HONRADO M, AMARAL JS. Animal species authentication in dairy products [J]. Foods, 2022, 11(8): ARTN 1124.

[12] PIZZANO R, NICOLAI MA, MANZO C, *et al*. Authentication of dairy products by immunochemical methods: A review [J]. Dairy Science & Technology, 2011, 91(2): 77–95.

[13] VELIOGLU SD, ERCIOGLU E, BOYACI IH. Rapid discrimination between buffalo and cow milk and detection of adulteration of buffalo milk with cow milk using synchronous fluorescence spectroscopy in combination with multivariate methods [J]. Journal of Dairy Research, 2017, 84(2): 214–219.

[14] NAGRAIK R, SHARMA A, KUMAR D, *et al*. Milk adulterant detection: Conventional and biosensor based approaches: A review [J]. Sensing and Bio-Sensing Research, 2021, 33: ARTN 100433.

[15] 张佳琳, 常巧英, 祝永祥, 等. 多元素分析结合化学计量学方法鉴别富平山羊乳[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 40–49.
ZHANG JL, CHANG QY, ZHU YX, *et al*. Identification of fuping goat milk by multi-element analysis combined with chemometrics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 40–49.

[16] 龙鸣. 基于指纹图谱技术的甘南牦牛乳品质评价研究[D]. 成都: 西北民族大学, 2021.
LONG M. Study on evaluation of gannan yak milk quality based on fingerprint technology [D]. Chengdu: Northwest Minzu University, 2021.

[17] PIZZANO R, SALIMEI E. Isoelectric focusing and ELISA for detecting adulteration of donkey milk with cow milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5853–5858.

[18] BHARDWAJ H, RAJES H, SUMANA G. Recent advances in nanomaterials integrated immunosensors for food toxin detection [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2022, 59(1): 12–33.

[19] KAROUI R, BLECKER C. Fluorescence spectroscopy measurement for

quality assessment of food systems-A review [J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(3): 364–338.

[20] SMAOUI S, TARAPOULOUZI M, AGRIOPOULOU S, *et al*. Current state of milk, dairy products, meat and meat products, eggs, fish and fishery products authentication and chemometrics [J]. Foods, 2023, 12(23): ARTN 4254.

[21] AHUJA V, SINGH A, PAUL D, *et al*. Recent advances in the detection of food toxins using mass spectrometry [J]. Chemical Research in Toxicology, 2023, 36(12): 1834–1863.

[22] WANG N, ZHANG J, XIAO B, *et al*. Integration of in-cassette lysis, purification, and lateral flow strips-based sensor for rapid and on-site detection of yak milk adulteration [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 394: 134309.

[23] WANG N, ZHANG J, XIAO B, *et al*. Disposable and instrument-free nucleic acid lateral flow cassette for rapid and on-site identification of adulterated goat milk [J]. Talanta, 2024, 267: 125205.

[24] 张娟, 于文杰, 王楠, 等. 基于扩增阻滞突变系统-聚合酶链式反应法的 A1/A2 牛奶鉴别试剂盒的开发及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(7): 133–140.
ZHANG J, YU WJ, WANG N, *et al*. Development and application of A1/A2 milk identification kits based on amplification refractory mutation system polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(7): 133–140.

[25] WANG Z, LI T, YU W, *et al*. A low-cost novel lateral flow nucleic acid assay (LFNAA) for yak milk authentication [J]. LWT, 2020, 122: 109038.

[26] BAI WL, YIN RH, ZHAO SJ, *et al*. Rapid detection of bovine milk in yak milk using a polymerase chain reaction technique [J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(4): 1354–1360.

[27] 路畅, 文勇立, 王永, 等. 5 种犏牛乳品质的 PCA 综合评价及营养成分预测模型的建立[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(10): 50–53.
LU C, WEN YL, WANG Y, *et al*. PCA comprehensive evaluation of 5 kinds of cattle-yak milk and establishment of a prediction model for nutritional components [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 46(10): 50–53.

[28] LI YF, LI SJ, ZHAO XW, *et al*. Novel insights into whey protein among yak, yellow cattle, and cattle-yak milk [J]. Food Chemistry-X, 2024, 22: ARTN101384.

[29] LI HQ, WANG HB, GAO YQ, *et al*. Bacterial community structure and metabolomic profiles of yak milk and cattle-yak milk during refrigeration in Gannan region: Analysis of interspecific differences in milk spoilage [J]. Food Chemistry, 2025, 463: ARTN 141022.

[30] 赵睿骁, 韩斐, 江明锋, 等. PCR-膜芯片技术在牦牛及犏牛肉制品的真假鉴定中的应用[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 202–208.
ZHAO RX, HAN F, JIANG MF, *et al*. Application of PCR-membrane chip technology in the identification of yak and yak-cattle meat [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 202–208.

[31] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, *et al*. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611–622.

(责任编辑: 韩晓红 冯东慧)