DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250906001
引用格式: 何名扬, 张伊动, 冀威昊, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应技术检测食品中动物源性成分单拷贝核基因靶标[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 64–72.
HE MY, ZHANG YD, JI WH, *et al*. Determination of single-copy nuclear gene targets of animal-derived components in food by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 64–72. (in Chinese with English abstract).

实时荧光定量聚合酶链反应技术检测食品中动物源性成分单拷贝核基因靶标

何名扬[1,2,3,4], 张伊动[1,2,3,4], 冀威昊[1,2,3,4], 吴亦萱[1,2,3,4], 付文雯[1,2,3,4], 刘 艳[1,2,3,4], 林 津[1,2,3,4], 万旭刚[1,2,3,4], 周陶鸿[1,2,3,4*]

[1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 武汉 430075; 3. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 武汉 430075; 4. 湖北时珍实验室, 武汉 430065]

摘 要: 目的 建立针对食品中动物源性成分单拷贝核基因靶标的实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测方法。**方法** 以食品中常见动物源性成分特异性核基因为靶标设计 qPCR 引物及 Taqman 探针, 验证及确认方法的特异性、灵敏度, 采用模拟及实际市售动物源性食品检测方法的适用性及稳定性, 并同胞质线粒体基因靶标 qPCR 扩增检测值比较分析。**结果** 单拷贝核基因靶标的 qPCR 引物探针特异性良好, 其最低检出限可达 0.1 ng/μL DNA 质量浓度, 核基因靶标能够准确识别 0.10%(质量比)的最低掺假成分含量; 核基因靶标扩增反应的扩增循环数(cycle threshold, Ct)值大于胞质靶基因 Ct 值, 胞质靶基因可识别更低 0.01%(质量比)的掺假含量; 在对模拟及实际市售样品检测中, 核基因 qPCR 反应可以准确、有效检测出掺有不同源性成分的动物源样品, 且不易检出鸡精配料及生产线其他源性污染成分。**结论** 本研究结果表明基于单拷贝核基因靶标建立的 qPCR 扩增体系对食品中常见动物源性成分检测的特异性强, 灵敏度高, 同胞质靶基因扩增结果相比, 其检测结果不易受配料代入和加工过程中交叉污染的影响, 可快速准确检测动物源性成分掺假情况, 利于市场监管及风险研判。

关键词: 动物源性食品; 实时荧光定量聚合酶链反应法; 核基因

Determination of single-copy nuclear gene targets of animal-derived components in food by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction technology

HE Ming-Yang[1,2,3,4], ZHANG Yi-Dong[1,2,3,4], JI Wei-Hao[1,2,3,4], WU Yi-Xuan[1,2,3,4], FU Wen-Wen[1,2,3,4], LIU YAN[1,2,3,4], LIN Jin[1,2,3,4], WAN Xu-Gang[1,2,3,4], ZHOU Tao-Hong[1,2,3,4*]

收稿日期: 2025-09-06
基金项目: 湖北省食品质量安全监督检验研究院自主立项项目(ZZLX2025003)
第一作者: 何名扬(1992—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 365428337@qq.com
***通信作者:** 周陶鸿(1981—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 343266920@qq.com

(1. *Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test*, *Wuhan* 430075, *China*; 2. *Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food*, *State Administration for Market Regulation*, *Wuhan* 430075, *China*; 3. *Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test*, *Wuhan* 430075, *China*; 4. *Hubei Shizhen Laboratory*, *Wuhan* 430065, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for determination of single-copy nuclear gene targets of animal-derived components in food by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Methods**　qPCR primers and Taqman probes were designed to target the specific nuclear genes of common animal-derived components in food to verify and confirm the specificity and sensitivity of the method. The applicability and stability of simulated and actual commercially available animal-derived food detection methods were adopted, and the qPCR detection values were compared and analyzed with those of mitochondrial cytoplasmic gene target detection. **Results**　The qPCR primer probe for single-copy nuclear gene targets had good specificity, with a minimum limit of detection of 0.1 ng/μL DNA mass concentration, nuclear genes could accurately identify the minimum adulteration component content of 0.1% (mass ratio). The cycle threshold (Ct) value of the nuclear genes amplification reactions were all greater than that of the cytoplasmic target gene, and the amplification reactions of cytoplasmic genes could recognize a lower adulteration content of 0.01% (mass ratio). In the testing of simulated and actual commercially available samples, the nuclear gene qPCR reaction could accurately and effectively detect animal-derived samples mixed with different source components, and it was not easy to detect chicken essence ingredients and other source contamination components from the production line. **Conclusion**　The research results of this paper show that the qPCR amplification system established based on single-copy nuclear gene targets has strong specificity and high sensitivity for the detection of common animal-derived components in food. Compared with the amplification results of mitochondria genes, the nuclear genes' detection method is less affected by the substitution of ingredients and the cross-contamination on the production line, and can quickly and accurately detect animal-derived component in food, which make it conducive to market supervision and risk assessment.

KEY WORDS: animal-derived food; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; nuclear gene

0　引　言

动物源性食品是指以猪、牛、羊、鸡、鸭等家畜家禽以及各类水产品为原料, 经加工制成的可供人类食用的肉类、乳制品、蛋类及其制品和副产品[1–6]。随着现代食品工业的快速发展和加工技术的不断创新, 动物源性食品的供应链日益复杂, 其食品安全问题也呈现出多元化与隐蔽化的趋势。在此背景下, 动物源性食品掺假造假事件频繁发生, 不仅严重侵害了消费者的合法权益, 也对公共卫生安全构成潜在威胁, 已成为当前食品安全监管领域亟待解决的关键问题。

目前, 可用于动物源性食品掺假成分检测的技术手段正处于不断开发与拓展之中, 涵盖光谱分析、质谱分析、免疫学技术及分子生物学方法等多种先进方法[7–12]。其中, 实时荧光定量聚合酶链反应技术(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)因其高灵敏度、强特异性等优势, 已成为当前动物源性食品源性成分鉴别的主流检测方法, 广泛应用于市场监管、食品安全抽检和进出口检验等领域[2,6,13–14]。现行实施的标准检测方法主要选择线粒体 *COX1*、*ND1*、*ATP8* 等胞质基因作为 qPCR 方法的检测靶标[14–16]。由于线粒体基因具有良好的物种特异性, 且在一个细胞中拷贝数众多, 而食品样本 DNA 往往高度碎片化, 因此, 采用线粒体基因进行食品掺假 PCR 技术鉴定, 可有效提升加工食品样品中源性成分的检测灵敏度[16–19], 然而, 不同组织及细胞内, 线粒体基因的拷贝数存在差异, 对其检测仅可判断源性成分的有无, 无法在基因层面比较目标源性成分的多少[19]。近年来, 随着动物源性食品抽检工作的深入推进, 在针对肉制品、餐饮食品等加工工艺复杂、配料组成多样的样品开展源性成分 qPCR 检测时, 配料带入或生产线交叉污染所引入的微量源性成分常常会导致掺假成分误判情况的出现[20–23]。这一问题的发生为市场监管工作带来了新的技术挑战与监管难题。因此, 科学筛选检测靶标基因对于保障动物源性成分检测结果的可靠性具有至关重要的意义。

本研究基于单拷贝核基因靶标, 设计并优化了一套适用于常见动物源性食品检测的 qPCR 引物与探针体系。相较于线粒体基因在不同物种及组织间拷贝数存在差异的特点, 单拷贝核基因在拷贝数上具有更高的稳定性和一致性, 因而在定量分析目标源性成分 DNA 含量方面更具优势[24–27]。此外, 线粒体基因通常为多拷贝, 检测灵敏度较

高，在判别由生产线污染或配料带入等原因导致的阳性结果时存在一定困难。为此，本研究建立了一种基于单拷贝核基因的动物源性成分 qPCR 检测方法，并将其与传统胞质基因靶标检测方法进行系统比较，评估二者在不同 DNA 含量及不同掺假比例条件下的检测灵敏度。在模拟掺假样品及市售动物源性食品的实际应用中，采用两种方法对同一样本进行平行检测，全面评价了两种靶标基因在掺假鉴定中的适用性与准确性，并深入探讨了核基因靶标在鉴别掺假、配料带入及生产线污染等多种复杂情况下的可行性与技术优势。本研究旨在为动物源性食品掺假检测提供充分的实验依据与理论支持，并为相关市场监管工作提供更为有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有食品材料(包括纯猪、牛、羊、鸡、鸭、马、驴冷鲜肉、鸡精调味料)均购自于武汉市商超。

灵敏的探针法定量 PCR 检测试剂盒(AceQ qPCR Probe Master Mix)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)；通用基因组 DNA 提取试剂盒(MiniBEST Universal Genomic DNA)[宝日医生物技术(北京)有限公司]；无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)；蛋白酶 K[生工生物工程(上海)股份有限公司]；引物和探针由武汉奥科生物公司合成。

1.2 仪器与设备

Nanodrop ND-2000 超微量核酸蛋白检测仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；CFX 96 Deep Well PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)；LEGEND MICRO21 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)；Delta Plus 恒温混匀仪(德国 IKA 公司)；SMF2002 研磨仪(苏泊尔有限公司)；MSX(SD EE)分析天平(感量 0.001 g，德国 Sartorius 公司)；FD5-48 冻干机(美国 Gold-SIM 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理及 DNA 提取

取 20 g 不同动物肌肉部分，清洗干净后，–80 ℃预冻，进行真空干燥冻干，冻干样品经研磨机研磨均匀，得到粉末状样品。每种动物源性取 0.1 g 样品进行 DNA 提取。采用通用基因组 DNA 提取试剂盒对样品 DNA 进行提取，测得 DNA 浓度及纯度，调整 DNA 质量浓度为 100 ng/μL。梯度稀释 DNA 模版质量浓度，得到 100.00、10.00、1.00、0.10、0.01 ng/μL 不同质量浓度的 DNA 样本。

1.3.2 不同质量掺比掺假样品制备

将目标动物源性肉粉和掺假物种肉粉按照 10.00%、5.00%、1.00%、0.50%、0.10%、0.01%(掺假物种/目标物种)质量比混匀得到含有不同掺假比例的掺假样品，掺假样品主要包括 3 种，分别为 C1 鸡掺猪、C2 鸭掺羊、C3 猪掺牛用于灵敏度实验检测。

1.3.3 qPCR 检测体系及程序

参考 GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法实时荧光 PCR 法》、SN/T 3730—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法》、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》等标准及文献[17-18,24-25]中的 PCR 检测程序及体系，并结合引物探针退火温度对不同目标成分开展 qPCR 检测。PCR 反应体系为 25 μL：上、下游引物及探针 1 μL (10 nmol/L)，AceQ qPCR Probe Master Mix 12.5 μL，DNA 模板 1 μL，加 ddH_2O 至 25 μL。PCR 程序为：95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，55 ℃ 60 s，40 个循环。

1.3.4 模拟样品及市售样品的检测

模拟样品 M1~M8 为不同动物组织按照一定质量比制备而成样品(M1: 75%牛+25%鸭、M2: 75%鸭+25%牛、M3: 65%牛+35%猪、M4: 85%牛+15%鸡、M5: 20%牛+40%猪+40%鸭、M6: 1%羊+99%鸭、M7: 50%猪+50%鸭、M8: 90%驴+10%马)，M9 为经过鸡精调味腌制的牛肉样品，M10 为猪肉经牛骨汤共同调味熬制样品。市售样品均购自武汉商超及当地餐饮店，包括肉制品(S1~S5)、餐饮食品(S6~S10)、血制品(S11~S14)、乳粉(S15~S20)等常见动物源性食品。模拟样品及市售样品除乳粉外均按照 1.3.1 中样品处理方法及 DNA 提取方法提取核酸，乳粉样品直接进行 DNA 提取。上述样品的 DNA 质量浓度保证在 5~20 ng/μL，用于检测，每次上样 DNA 量为 50 ng，每个样品检测 3 次。

1.4 数据处理

利用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件得到荧光扩增曲线图和目标待测物的扩增循环数(cycle threshold, Ct)值，扩增曲线有无表明是否产生扩增反应，Ct≤40 表示未检出。统计检测结果的 Ct 值；每个样品检测重复 3 次，取 3 次检测结果 Ct 值的平均值，结果用四舍五入法取整数，并采用 Excel 2007 对数据进行统计、比较及分析；采用 Adobe Illustrator CC Vesion 17.0.0 软件绘制荧光扩增曲线图。

2 结果与分析

2.1 核基因靶标引物探针设计及特异性验证

本研究选择 7 种常见食品中动物源性成分(猪、牛、羊、鸡、鸭、马、驴)作为检测目标。基于各待测源性成分的种间特异性单拷贝核基因序列设计引物探针，引物探针序列见表 1。为验证所设计引物探针序列的特异性，采用包括上述 7 种源性成分在内的多种动物源性 DNA 分别验证引物探针的特异性，并以无菌双蒸水作为空白对照，如图 1 显示，只有为目标待测源性的 DNA 模板时，出现特异性扩增曲线，其他物种均无荧光信号值的增加。证明所设计的引物对食品中常见的动物源检测有良好的特异性，不会扩增出其他非目标源性成分。

表 1　常见食品中动物源性成分核基因引物探针序列

Table 1　Nuclear gene primer probe sequences of animal-derived components in common foods

名称	序列(5'→3')	靶基因
牛-F	GCACCCAGCACAATGAAGAT	*ACTB*[28]
牛-R	CGCGATGATCTGGAGAGAGA	
牛-P	FAM-CCCAGCCGTAGCCGGACGGT-BHQ1	
羊-F	AGTGGCTGACACACGGGACA	*RPA1*[29]
羊-R	GTGGTCCATGTGGGTCCATGTTTAGC	
羊-P	FAM-TGTCGCCTAAGCCAGCCTTGTGCGTGTG-BHQ1	
猪-F	CTCGGAGTGTGTATCCCGTAG	*ACTB*[30]
猪-R	AGCCGTGTTCCTTGCACTCTCTGCAT	
猪-P	FAM-TAGGTCTGACGTGACTCCCCGACCTG-BHQ1	
鸭-F	GCAACAGGAACTGGCTGAGTG	*RPA1*[29]
鸭-R	AATTACTGTTCCTCTTGTGTCAGAAA	
鸭-P	FAM-AGTCAGCAGCTCCAACGCATGCTG-BHQ1	
鸡-F	CAGAACCACACTCAACCTGTCTGA	*RPA1*[29]
鸡-R	TCGGGGAAATGTCTTACTGCAAG	
鸡-P	FAM-CTCCTAGCAGCCTGTGCCAAGGCCA-BHQ1	
驴-F	CTGTCCTGATGGAAGAGAACTTGG	*LOC106835644*[31]
驴-R	GGTGGTGCTGCAAATTCCACTTTA	
驴-P	FAM-CTGCAGATGGTTCTGCTTTAGTGAAGCTGG-TAMRA	
马-F	TGAGCCGAGCTGCGCTGA	*OBSCN*[31]
马-R	TCCCGACGGCTCAGCGAGA	
马-P	FAM-GGAGAGCGGGAAGCCGGGCT-TAMRA	

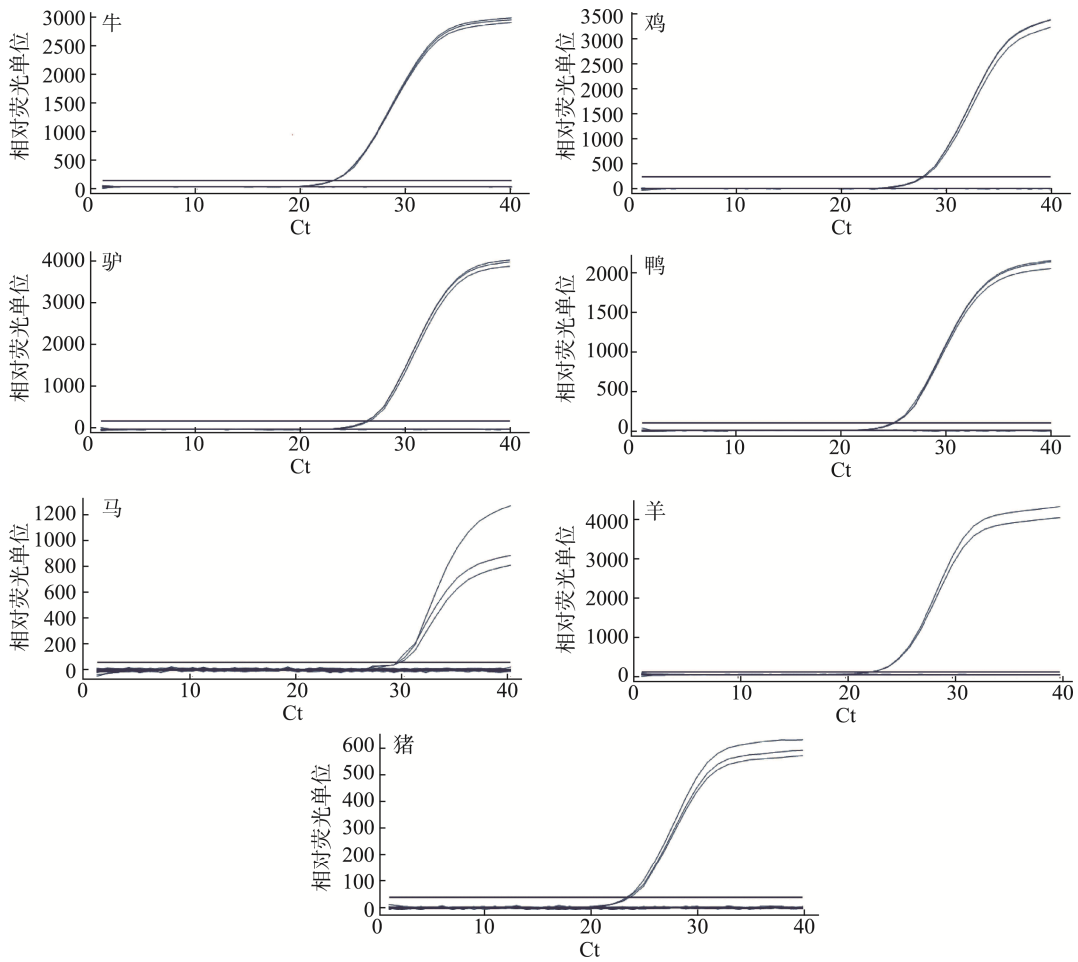


图 1　核基因靶标引物探针特异性实验

Fig.1　Specificity experiment of nuclear gene target primer probe

2.2 核基因引物探针对不同 DNA 浓度检测灵敏度验证

为确认 7 种动物源性成分的单拷贝核基因引物探针组对模板 DNA 浓度检测的灵敏度情况, 本研究对梯度稀释的目标成分 DNA 模版分别进行 qPCR 扩增, 参照 GB/T 38164—2019、SN/T 3730—2013 等标准中的结果判定方法, qPCR 扩增 Ct>40 表示未检出, Ct<40, 且出现典型扩增曲线表示检出。qPCR 检测结果显示, 如图 2, 上述 7 种引物探针组在 DNA 质量浓度为 0.1 ng/μL 时均可以检出目标成分, 其中鸡源性成分可检测的最低 DNA 浓度甚至可达 0.01 ng/μL。此外, 为比较本研究设计的核靶标基因扩增引物同现有标准中采用的胞质靶标基因扩增引物在 qPCR 反应中对目标源性成分检出限的差异, 采用胞质基因扩增引物组对梯度稀释的模版 DNA 进行平行检测试验。通过比较检测 Ct 发现, 在模版 DNA 质量浓度高于 0.1 ng/μL 的情况下, 目标源性成分均可被两组扩增引物检测到, 扩增 Ct<40, 但是采用胞质基因作为靶标基因设计的引物组, 其 qPCR 反应的 Ct 比采用核基因作为靶标设计的引物的循环数小, 这是因为食品样品 DNA 碎片化严重, 胞质基因在细胞内存在多重拷贝, 更易被检出。

2.3 核基因引物探针对不同质量掺比掺假样品的检出限验证

本研究制得含有不同掺假比例(质量)的样品, 提取 DNA 后, 采用设计获得的单拷贝核基因靶标扩增体系及胞质靶标基因扩增体系分别对目标源性成分进行检测。检测结果表明, 见表 2, 在目标成分质量占比为 1.00%时, 两种检测体系均可检出目标成分, 而当目标成分质量占比为 0.10%时, 胞质靶标基因扩增体系仍可检出目标成分, 但核基因靶标扩增体系存在部分目标成分未检出的情况(C3 0.01%猪组)。考虑到实际动物源掺假样品的掺假物质量比相对较高, 7 种动物源性成分单拷贝核基因靶标 qPCR 检测体系可应用于动物源性食品的掺假成分检测。

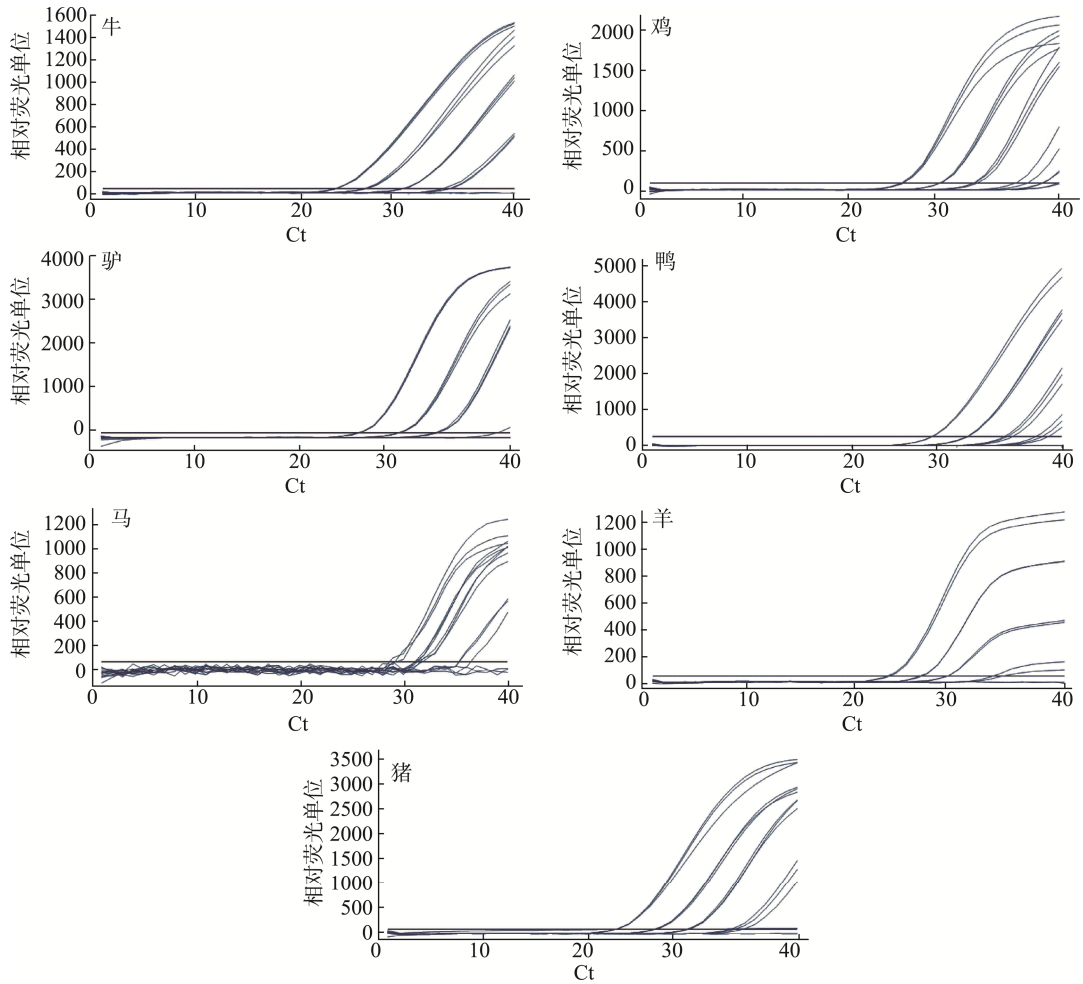


图 2 核基因引物探针对不同 DNA 浓度检测灵敏度实验

Fig.2 Detection sensitivity of nuclear gene geophysical prospecting for different DNA concentrations

表 2　核基因引物探针对不同掺比掺假样品的检出限

Table 2　Limits of detection of nuclear gene primers and probes for samples adulterated with different mixing ratios

掺假浓度/%	C1(鸡掺猪)		C2(鸭掺羊)		C3(猪掺牛)	
	N	C	N	C	N	C
10.00	27	20	31	19	27	19
5.00	28	20	31	18	28	20
1.00	29	22	33	20	31	22
0.50	30	24	35	21	31	22
0.10	32	26	37	24	35	26
0.01	35	30	39	27	-	30

注: C 表示胞质基因靶标检测结果(Ct); N 表示核基因靶标检测结果(Ct); -表示未检出。表 4 同。

2.4　模拟样品及市售样品检测结果比较与分析

2.4.1　模拟掺假样品检测结果与分析

为进一步探究单拷贝核基因靶标扩增体系对动物源性食品的检测情况, 本研究制备获得了 10 种模拟样品, 采用单拷贝核基因靶标扩增体系对模拟样品的源性成分进行检测, 同时采用胞质靶标基因扩增引物一同检测比较分析。检测结果显示(表 3): 除 M9、M10 外, 所有模拟样品中的源性成分情况均可以在 40 个 PCR 循环内被两组引物扩增检测到荧光信号值; M9~M10 中的鸡源性成分仅在胞质靶标基因扩增引物扩增时检测得到, 且 Ct 均大于 35。上述结果说明, 单拷贝核基因靶标扩增体系能够有效检测出掺有不同源性成分的动物源样品, 但对于鸡精等配料中微量添加的源性成分, 该方法的检测能力较为有限。

2.4.2　市售动物源性样品的检测结果分析

实际市售动物源性食品其食品基质、加工工艺及配料成分复杂, 为进一步验证单拷贝核基因靶标扩增体系在实际市售动物源性食品的检测情况。本研究对 20 种市售动物源性食品(S1~S20)开展了源性成分检测分析, 20 种动物源性食品包括常见动物源性成分掺假的肉制品、餐饮食品、血制品及奶制品。对实际样品的检测结果证实单拷贝核基因靶标扩增体系能够成功检测出 20 种动物源性食品中的主要源性成分(表 4); 然而, 在对部分因配料带入或加工过程中存在交叉污染的食品样品(如 S3、S4、S7、S9、S11、S15 等)进行分析时, 该方法未能有效检出相应的源性成分。S20 驼奶粉在核基因及胞质基因两组引物扩增体系中均可以检出掺假源性成分, 为牛源性成分、羊源性成分。上述结果说明单拷贝核基因靶标扩增体系可以对实际市售动物源性食品中的目标成分和掺假成分进行检测, 而由食品配料或加工生产交叉污染等带入的源性成分并不能完全检测出来。

表 3　模拟动物源性样品 qPCR 结果

Table 3　qPCR results of simulated animal-derived samples

模拟样品	源性成分检测(Ct)													
	牛		羊		猪		鸡		鸭		马		驴	
	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
M1	17	26	/	/	/	/	/	/	17	26	/	/	/	/
M2	20	28	/	/	/	/	/	/	16	27	/	/	/	/
M3	17	26	/	/	18	27	/	/	/	/	/	/	/	/
M4	17	25	/	/	/	/	20	27	/	/	/	/	/	/
M5	20	28	/	/	19	28	/	/	17	28	/	/	/	/
M6	/	/	27	33	/	/	/	/	19	30	/	/	/	/
M7	/	/	/	/	19	27	/	/	19	30	/	/	/	/
M8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	26	31	23	30
M9	17	24	/	/	/	/	37	/	/	/	/	/	/	/
M10	23	32	/	/	18	26	37	/	/	/	/	/	/	/

注: /表示此项未检测。下同。

表 4 市售动物源性食品 qPCR 检测结果

Table 4 qPCR test results of animal-derived foods available on the market

市售样品		源性成分检测值(Ct)													
类别	编号	牛		羊		猪		鸡		鸭		马		驴	
		C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
肉制品	S1	16	26	/	/	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/
	S2	17	33	/	/	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/
	S3	15	24	/	/	39	-	36	39	31	-	/	/	/	/
	S4	16	24	/	/	35	-	34	-	35	-	/	/	/	/
	S5	21	31	/	/	-	-	35	37	36	-	/	/	/	/
餐饮食品	S6	/	/	/	/	17	28	36	38	36	-	-	-	16	28
	S7	18	26	/	/	33	-	33	37	37	-	/	/	/	/
	S8	/	/	23	29	31	-	32	37	12	23	/	/	/	/
	S9	34	-	/	/	-	-	38	-	15	25	/	/	/	/
	S10	/	/	/	/	33	-	34	-	21	30	/	/	/	/
血制品	S11	/	/	/	/	25	29	33	-	38	-	/	/	/	/
	S12	/	/	/	/	-	-	39	-	18	22	/	/	/	/
	S13	/	/	/	/	30	38	22	24	33	-	/	/	/	/
	S14	/	/	/	/	-	-	39	-	18	24	/	/	/	/
奶制品	S15	36	-	20	23	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S16	37	-	21	28	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S17	28	32	37	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S18	32	-	21	27	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S19	30	-	22	27	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	S20	23	27	28	33	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

3 讨论与结论

本研究基于动物源性成分的单拷贝核基因靶标设计特异性扩增引物，并与传统胞质线粒体靶基因扩增引物体系进行比较，系统评估其在动物源性食品检测中的应用差异。研究结果表明，本研究设计的单拷贝核基因扩增体系具有较高的检测灵敏度，其最低检出限可达 0.1 ng/μL DNA 浓度，且能够准确识别 0.10%(质量比)的最低掺假成分含量，满足动物源性食品掺假成分鉴别的检测需求。在对模拟和实际样品检测中，单拷贝核基因靶标检测方法可有效鉴别出待测动物源性食品中的目标源性成分和掺假源性成分，说明该方法的实际应用能力较强，市场应用潜力较大。在采用线粒体基因 qPCR 体系检测模拟及市售样品时，本研究发现动物源性食品生产线交叉，亦或是生产配料中存在鸡精调味品等情况均会导致相关动物源性成分的检出，检出 Ct 通常在 30~40 之间，这一结果将严重影响对动物源性食品掺假情况的判断，可能出现不同检测机构在掺假情况判定上不一致的现象，不利于市场对掺假问题食品的监管和风险研判。本研究建立的单拷贝核基因检测方法在预包装肉制品、餐饮食品、血制品、奶制品等常见动物源性食品检测时，不易受到配料带入和加工过程中交叉污染的影响，大部分带入源性成分不可检出，部分检出成分的 Ct 值均大于 35，在对非目标检出成分掺假和带入的判断上具有极大的优势。综上所述，在针对 DNA 较易获得的动物源性食品的掺假成分鉴别时，本研究建立的单拷贝核基因靶标 qPCR 技术可有效避免配料带入或生产交叉污染导致的非目标成分检出问题，更好反映食品生产的真实情况，为市场监管提供了重要的技术依据。此外，区别于线粒体基因在不同细胞中含量的差异，单拷贝核基因的含量稳定的特性，通过建立 DNA 含量与扩增信号的标准曲线，可用此方法对目标成分 DNA 含量进行准确的定量，进一步为掺假成分的定量检测提供新的技术手段，从而为判定动物源性食品是否掺假提供更加客观、可靠的量化数据支持。

参考文献

[1] 郭亚宁, 刘亚轩, 周剑, 等. 动物源性食品真实性鉴别技术研究进展[J]. 肉类研究, 2024, 38(11): 55–63.
GUO YN, LIU YX, ZHOU J, *et al*. Research progress on authenticity identification technology of animal-derived food [J]. Meat Research, 2024, 38(11): 55–63.

[2] 付莎莉, 王利刚, 张婧, 等. PCR 技术在动物源性成分检测中的应用[J]. 肉类工业, 2021(10): 49–54.
FU SL, WANG LG, ZHANG J, *et al*. Application of PCR technology in detection of animal-derived components [J]. Meat Industry, 2021(10): 49–54.

[3] ZHAO J, YANG W, CAI H, *et al*. Current progress and future trends of genomics-based techniques for food adulteration identification [J]. Foods, 2025, 14(7): 1116.

[4] 崔震昆, 周威, 胡梁斌, 等. 动物源性食品安全检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 314–319.
CUI ZK, ZHOU W, HU LB, *et al*. Research progress on safety detection technology of animal-derived food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(20): 314–319.

[5] LI Y, LIU S, MENG F, *et al*. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 2256–2296.

[6] 孟晓帅, 胡和智, 闫婷婷, 等. 核酸扩增技术在动物源性食品掺假中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(11): 298–305.
MENG XS, HU HZ, YAN TT, *et al*. Research progress of nucleic acid amplification technology in animal-derived food adulteration [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(11): 298–305.

[7] 职爱民, 余曼, 乔苗苗, 等. 免疫技术在动物源性食品快速检测中的研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(5): 60–66.
ZHI AIM, YU M, QIAO MM, *et al*. Research progress of immunological techniques in rapid detection of animal-derived foods [J]. Meat Research, 2019, 33(5): 60–66.

[8] 杨娜, 王向军, 乔晴, 等. 变性高效液相色谱技术鉴别猪牛源性成分的试验[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(6): 89–91.
YANG N, WANG XJ, QIAO Q, *et al*. Experiment on the identification of porcine and bovine derived components by denaturing high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(6): 89–91.

[9] TAI J, HU H, CAO X, *et al*. Identification of animal species of origin in meat based on glycopeptide analysis by UPLC-QTOF-MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2023, 415(29-30): 7235–7246.

[10] 牟晓晴. 驴肉掺假近红外定性定量方法及成分差异分析[D]. 保定: 河北大学, 2024.
MU XQ. Near-infrared qualitative and quantitative methods for adulteration of donkey meat and analysis of component differences [D]. Baoding: Hebei University, 2024.

[11] 姜玉榕, 马丽, 张维, 等. 应用胶体金免疫层析法检测肉类中多种动物源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 261–266.
JIANG YR, MA L, ZHANG W, *et al*. Detection of multiple animal-derived components in meat by colloidal gold immunochromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 16(8): 261–266.

[12] SONG D, DONG K, LIU S, *et al*. Research advances in detection of food adulteration and application of MALDI-TOF MS: A review [J]. Food Chemistry, 2024, 456: 140070.

[13] JIM YH, SE JK, JEE YL, *et al*. Identification of pork adulteration in processed meat products using the developed mitochondrial DNA-based primers [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(3): 464–468.

[14] 王恩辉, 张志然. 我国食品中动物源性成分检测标准研究进展[J]. 中国标准化, 2024(5): 206–210.
WANG ENH, ZHANG ZR. Research progress on detection standards for animal-derived components in food in China [J]. China Standardization, 2024(5): 206–210.

[15] 市场监管总局关于发布《食品中动物源性成分定性检测》等 13 项食品补充检验方法和 2 项修改单的公告(2024 年第 51 号)[J]. 中国食品安全, 2024(12): 75.
Announcement of the state administration for market regulation on the release of 13 supplementary inspection methods for food including *Qualitative detection of animal-derived components in food* and 2 amendments (No.51 of 2024) [J]. Food Safety in China, 2024(12): 75.

[16] 陈晨, 张岩, 李永波, 等. 微滴式数字 PCR 对肉制品中羊肉和猪肉定量分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 221–226, 194.
CHEN C, ZHANG Y, LI YB, *et al*. Mutton in droplet digital PCR for meat and pork quantitative analysis [J]. Journal of Modern Food Science and Technology, 2018: 221–226, 194.

[17] 陈睿赜. 一种利用线粒体 DNA 鉴别羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉的 PCR 检测方法[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
CHEN RH. A PCR detection method for identifying lamb, pork, chicken and duck meat using mitochondrial DNA [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2013.

[18] 唐修君, 樊艳凤, 贾晓旭, 等. 基于线粒体 16S rRNA 基因鉴别畜禽肉中 5 种动物源性成分[J]. 食品科技, 2015, 40(12): 86–89.
TANG XJ, FAN YF, JIA XX, *et al*. Identification of Five animal-derived components in livestock and poultry meat based on mitochondrial 16S rRNA gene [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(12): 86–89.

[19] SINGH-YADAV S, TARIQ R, KUMAR-PADHY P, *et al*. A multiplex DNA probe-based method for simultaneous identification of adulteration in meat samples [J]. Food Chemistry, 2024, 8: 100200.

[20] 李楠, 王佳慧, 沈青, 等. 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, *et al*. Investigation on duck, chicken and porcine derived components in beef and mutton slices in Beijing area [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(3): 227–232.

[21] 张雪茹, 付尚辰, 郑卫民, 等. 商品羊奶粉中 DNA 的质量评价及牛源性成分掺假检测[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 249–255.
ZHANG XR, FU SC, ZHENG WM, *et al*. Quality evaluation of DNA in commercial goat milk powder and detection of adulteration of bovine components [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(18): 249–255.

[22] 陈迪丽, 刘科成, 王丹纯, 等. 潮汕地区牛肉丸中猪肉和鸭肉的成分检

测与分析: 广东省食品学会. 药食同源与大健康学术研讨会暨 2023 年广东省食品学会年会论文集[C]. 广东: 韩山师范学院生命科学与食品工程学院, 2023: 101–107.

CHEN DL, LIU KC, WANG DC, *et al.* Detection and analysis of pork and duck components in beef balls in Chaoshan Area: Guangdong food science society. proceedings of the academic symposium on food and medicine sharing the same origin and great health and the 2023 annual conference of guangdong food science society [C]. Guangdong: College of Life Science and Food Engineering, Hanshan Normal University, 2023: 101–107.

[23] 覃蓝, 娄艳, 聂玉婷, 等. 速冻牛肉制品动物源性成分情况调查分析[J]. 现代食品, 2024, 30(15): 225–228.

QIN L, LOU Y, NIE YT, *et al.* Investigation and analysis of animal-derived components in frozen beef products [J]. Modern Food, 2024, 30(15): 225–228.

[24] 任怡菲. 基于动物核基因的实时荧光 PCR 法鉴定食品中哺乳类和鸟类成分[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.

REN YF. Identification of mammalian and avian components in food by real-time fluorescence PCR based on animal nuclear genes [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

[25] 赵新, 陈锐, 刘娜, 等. 基于单拷贝核基因的数字 PCR 定量检测肉制品中羊源性成分[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 260–264, 281.

ZHAN X, CHEN R, LIU N, *et al.* Quantitative detection of sheep-derived components in meat products by digital PCR based on single-copy nuclear genes [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(6): 260–264, 281.

[26] CHANG L, FU C, DENG M, *et al.* A multiplex real-time PCR for qualitative detection of mutton, pork, chicken, and duck in processed meat products [J]. Food Science & Nutrition, 2025, 13(7): e70590.

[27] LI T, WANG J, WANG Z, *et al.* Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR [J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128622.

[28] CHUAN H, LAN B, YI FC, *et al.* Detection and quantification of adulterated beef and mutton products by multiplex droplet digital PCR [J]. Foods, 2022, 11(19): 3034–3034.

[29] 任君安. 羊肉及其制品中掺假动物源性成分数字 PCR 技术精准定量研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.

REN JAN. Precise quantitative research on adulterated animal-derived components in mutton and its products by digital PCR technology [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.

[30] XU HI, MA XY,YE ZH, *et al.* A droplet digital pcr based approach for identification and quantification of porcine and chicken derivatives in beef [J]. Foods, 2022, 11(20): 3265–3265.

[31] 谌阳, 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.

CHEN Y, WANG WJ, FU M, *et al.* Based on the principle of nuclear cytoplasmic genetics, a multiplex PCR detection method was established to identify the horse and donkey derived components and the germplasm of the skin in donkey-hide gelatin [J]. Genetics, 2020, 42(10): 1028–1035.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)