DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251128005
引用格式: 刘倩倩, 蓝航镇, 潘道东, 等. 多重聚合酶链式反应技术在热加工肉制品真实性检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 99–109.
LIU QQ, LAN HZ, PAN DD, *et al*. Application of multiplex polymerase chain reaction technology in the authenticity detection of heat-processed meat products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 99–109. (in Chinese with English abstract).

多重聚合酶链式反应技术在热加工肉制品真实性检测中的应用

刘倩倩[1], 蓝航镇[2], 潘道东[2*], 蔡振东[2*]

(1. 淮北师范大学化学与化工学院, 淮北 235000;
2. 宁波大学浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 宁波 315800)

摘 要: 目的 建立多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术在单一反应体系中同时鉴别多种肉类的高效检测方法。**方法** 基于动物线粒体基因序列的物种特异性差异, 采用多软件协同设计与筛选引物, 构建八重 PCR 体系, 实现对羊肉、鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉 8 种肉类来源的同步检测。通过条件优化和 DNA 测序验证扩增结果的特异性, 并在多物种 DNA 混合模板及掺假模型肉样中对方法的灵敏度与适用性进行评价。**结果** 多重 PCR 可在单一反应管内稳定扩增 8 种目标物种 DNA, 未发现非特异性扩增; 测序结果与对应物种一致。灵敏度结果表明, 在生肉及热加工肉样品中, 各目标物种 DNA 的最低检出限为 0.01~0.05 ng, 在掺假样品中目标肉类含量低至 0.10%仍可检出。**结论** 所建立的多重 PCR 方法可成功应用于市售肉制品样品的真实性检测, 能够实现多种肉类来源的快速、准确鉴别, 具有良好的实际应用价值, 可为食品安全监测与市场监管提供技术支撑。

关键词: 多重聚合酶链式反应; 物种鉴定; 灵敏度; 掺假检测; 肉制品

Application of multiplex polymerase chain reaction technology in the authenticity detection of heat-processed meat products

LIU Qian-Qian[1], LAN Hang-Zhen[2], PAN Dao-Dong[2*], CAI Zhen-Dong[2*]

(1. *School of Chemistry and Chemical Engineering*, *Huaibei Normal University*, *Huaibei* 235000, *China*;
2. *Key Laboratory of Animal Protein Deep Processing Technology of Zhejiang Province*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315800, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish n method for simultaneously identifying multiple meat species within a single reaction system by efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) technology. **Methods** Based on

收稿日期: 2025-11-28
基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究项目(2023AH050322); 技术研发横向项目(2025340603000228)
第一作者: 刘倩倩(1987—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为分析化学与食品安全检测。E-mail: liuqq@chnu.edu.cn
***通信作者:** 潘道东(1964—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为畜产品加工。E-mail: daodongpan@163.com
蔡振东(1985—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为畜产品加工。E-mail: caizhendong@nbu.edu.cn

species-specific variations in animal mitochondrial gene sequences, primers were designed and screened using multiple bioinformatics tools, and an octuple PCR assay was developed for the simultaneous detection of 8 kinds of meat species, namely mutton, chicken, rabbit, pigeon, goose, turkey, ostrich and dog. The specificity of the amplification products was confirmed through reaction condition optimization and DNA sequencing. The sensitivity and applicability of the method were further evaluated by multi-species DNA mixtures and adulterated meat model samples. **Results** The octuple PCR assay enabled stable and simultaneous amplification of DNA from all 8 kinds of target species in a single reaction tube, with no nonspecific amplification observed. Sequencing results were consistent with the corresponding target species. Sensitivity analysis showed that, in both raw and heat-processed meat samples, the limits of detection for the target species ranged from 0.01 to 0.05 ng of genomic DNA. In adulterated samples, target meat components were detectable at levels as low as 0.10%. **Conclusion** The established octuple PCR method can be successfully applied to the authenticity assessment of commercially available meat products, allowing rapid and accurate identification of multiple meat species. This method demonstrates good practical applicability and provides effective technical support for food safety surveillance and market regulation.

KEY WORDS: multiplex polymerase chain reaction; species identification; sensitivity; adulteration detection; meat products

0 引 言

肉制品的真实性已成为食品安全与质量监管领域关注的重点问题之一[1]。由于不同肉类物种在市场价格和消费需求方面存在显著差异，一些不法经营者受经济利益驱动，通过掺假或虚假标示等方式非法牟利[2]，从而损害消费者权益并扰乱市场秩序。尽管各国已相继制定并实施较为严格的食品标签和监管法规，肉制品掺假现象仍时有发生。尽管各国已制定并实施相关食品标签和监管法规，肉制品掺假现象仍时有发生，2013 年欧盟马肉掺假事件即为典型案例[3]。在实际市场中，牛肉、羊肉等高价值肉制品在原料采购及加工过程中更易发生掺假行为，因此，建立准确、可靠的肉类物种鉴定技术对于保障肉制品真实性和促进食品行业规范化发展具有重要意义。

肉制品通常需要经过绞碎、加热、腌制等多种加工过程，这在一定程度上削弱了其原有的形态特征，为掺假行为提供了更多空间，尤其是在使用价格较低或来源不明物种的情况下[4−6]。因此，用于肉制品真实性检测的技术手段必须具备在复杂加工条件下准确识别肉类来源的能力。DNA 分析技术因其在高温、压力及化学处理条件下仍具有较高稳定性，已成为肉制品真实性检测中最为常用和可靠的方法之一。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)在动物细胞中拷贝数高，具有种内保守性和种间差异性明显等特点，因而被广泛选作肉类物种鉴定的分子靶标[7−9]。已有研究表明，物种特异性聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、多重 PCR、实时 PCR、PCR-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)以及 DNA 条形码技术已广泛应用于肉类来源检测[1]。其中，多重 PCR 因其简单、高效、低成本，特别适用于肉类来源鉴定。

然而，在多重 PCR 技术中，随着检测物种数量的增加，引物之间潜在的交叉反应风险及反应体系优化难度显著提高，使得体系构建更加复杂。因此，目前能够在单一反应管中稳定鉴定 8 种及以上动物物种的研究仍较为有限。基于上述技术挑战，本研究以细胞色素 b、细胞色素 c 氧化酶亚基I、II、III (COI、COII、COIII)、NADH 脱氢酶亚基 4 (ND4)和 12S rRNA 等 *mtDNA* 基因为靶标，设计并筛选了针对羊肉、鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉 8 种物种的特异性引物。通过对引物交叉反应性、特异性、灵敏性和体系稳健性的系统评价，结合 PCR 反应条件优化，构建八重 PCR 检测方法，可同时用于原料肉及加工肉制品中多种肉类来源的鉴定。图 1 展示了八重 PCR 技术在肉类物种鉴定中的整体实验流程和关键步骤。本研究为多重 PCR 技术在肉制品来源追溯与真实性检测中的应用提供了技术支撑，也为今后将多重 PCR 方法拓展至更多物种的联合检测奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

新鲜的羊肉、鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉均购自中国宁波当地市场。所有样品均由商家明确标注来源物种。商业肉制品样品包括肉丸(5 个)、肉片(10 片)、烤肉串(5 串)、干肉(10 块)、干咸肉(10 块)、炸肉饼(5 块)和鸡胸肉(5 块)，购自线下市场和线上超市平台。

所有样品在冰上运输，并于–80 ℃下保存以防 DNA 降解。本研究所用肉类样品均为市场流通食品，仅用于基因组 DNA 提取及分子检测分析，不涉及动物饲养、处置或活体实验操作，因此不属于动物实验伦理审查范围。

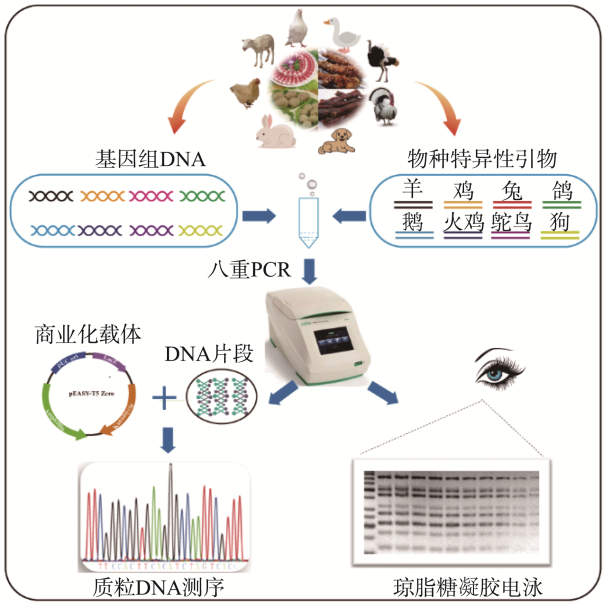


图 1　八重 PCR 技术在肉类物种鉴定中的整体流程示意图
Fig.1　Schematic diagram of the overall workflow of the octuple PCR technology in meat species identification

1.2　试剂与仪器

PCR 扩增所用引物、DiaSpin DNA 凝胶提取试剂盒、DNA Marker (50~1031 bp)、4S GelRed 核酸染料(10000×)[生工生物工程(上海)股份有限公司]；EasyTaq DNA 聚合酶、pEASY®-T5 克隆载体(北京全式金生物技术有限公司)；DNA Marker (50~1000 bp)(福州 Phygene 生物科技有限公司)。

PowerPac™ HC 核酸电泳电源、T100™ PCR 热循环仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)；NanoDrop™ ND-2000 微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)；DYY-6C 凝胶电泳仪(北京市六一仪器厂)；JY5002 电子天平(精度 0.01 g，上海舜宇恒平科学仪器有限公司)；SG-4059C 数显恒温水浴锅(上海硕光电子科技有限公司)；FE20 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.3　物种特异性引物设计

根据动物物种的差异性和保守性，选择线粒体基因作为引物设计的靶标。从美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库提取了羊(细胞色素 b 基因，GenBank 登录号：KP702285.1)、鸡(COI，MK163565.1)、兔(ND4，MH985853.1)、鸽(12S rRNA 基因，KP168712.1)、鹅(COII，KJ124555.1)、火鸡(COIII，EF153719.1)、鸵鸟(ND4，Y12025.1)、狗(COIII，MN181404.1)等物种的基因序列。使用 Oligo 7.0 软件和 BLAST 程序，根据交叉反应性、熔解温度、自互补性及二级结构等物理参数设计了靶标引物。为了验证引物的特异性，将每对引物与羊、狗、马、鸡、鸭、火鸡、鸽、骆驼、兔、鸵鸟、牛、猫、鹅和猪等物种的基因组 DNA 进行比对，比对工作通过 ClustalW 和 MEGA 6 软件完成。进一步通过单重 PCR 实验检查了目标引物与所有物种的交叉反应性。引物组合的详细信息见表 1。

1.4　单重和多重 PCR 实验

为验证所设计引物的可用性，采用 EasyPure® Genomic DNA 试剂盒提取各物种基因组 DNA，并严格按照厂家说明书操作。DNA 浓度通过 NanoDrop 2000 分光光度计测定[11]。首先进行单重 PCR 扩增实验以验证各引物对的特异性[12]。

单重 PCR 反应体系(25 μL)包括：10×EasyTaq® Buffer (2.5 μL)、dNTPs (2.5 mmol/L，每种 0.2 mmol/L，2 μL)、EasyTaq® DNA 聚合酶(5 U/μL，0.5 μL)、每对引物(10 μmol/L，各 0.5 μL)、模板 DNA 以及 ddH_2O 补足至 25 μL。所用 EasyTaq® Buffer 中已预混 Mg^{2+}，因此反应体系中未额外添加 Mg^{2+}。

PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；随后进行 34 个循环：94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s；最后于 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物在 5%琼脂糖凝胶上电泳检测，并通过凝胶成像系统观察结果。

在单重 PCR 已验证各引物特异性和扩增效率的基础上，在相同扩增程序条件下建立八重 PCR 体系。多重 PCR 反应体系(25 μL)中，各引物浓度经预实验比较后统一设定为 10 μmol/L(各 0.5 μL)，以保证不同靶标扩增条带强度相对均衡；其余反应组分及 PCR 扩增程序与单重 PCR 实验保持一致。模板为 8 种物种等量混合的基因组 DNA，ddH_2O 补足至 25 μL。PCR 产物经 5%琼脂糖凝胶电泳分离，使用 4S GelRed 核酸染料染色，并通过 Gel Doc™XR+凝胶成像系统结合 Image Lab™软件进行可视化分析[13]。

1.5　PCR 产物的测序

PCR 产物从琼脂糖凝胶中分离后，使用 DiaSpin DNA 凝胶提取试剂盒纯化。纯化后的 PCR 片段通过商业化的 pEASY®-T5 克隆载体进行克隆。提取质粒 DNA 后，使用载体引物 M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')和 M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')进行 PCR 扩增，并通过自动 DNA 测序仪进行测序。通过 BLAST 搜索 NCBI 数据库，确定序列的 DNA 碱基组成。

表 1 本研究中用于肉类物种鉴定的寡核苷酸引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for meat species identification in this study

引物	基因	序列(5'-3')	扩增产物/bp	来源
羊	细胞色素 b	CGGACACAGATAAAATTCCCT CTGGGTCTCCGAGTAAGTCAGGC	123	本研究
鸡	*COI*	ACTCATCACTAGATATTGCCCTT ATATTACTCCGAAATGTGCCTT	174	本研究
兔	*ND4*	CATCGCTGGCTCAATAGTCCTG ATTACTAGGGCTATGTGGCTCA	222	本研究
鸽	*12S rRNA*	AGTGTAAATGCCCTTGACTCCT AGCTCAGTTGCGTTTTGACC	279	本研究
鹅	*COII*	AAAACTCTCGTCCAATGCTGT CGTCTCCTGCAGTAATGATCAC	329	本研究
火鸡	*COIII*	CAGCCGCAGCACTATTAACCACA AGAGCGTGAATAGCCTGCTT	427	本研究
鸵鸟	*ND4*	TACAGCCTCTTGATTGCCACCA ATCCAGATAGGGTTCCGGTTCA	502	本研究
狗	*COIII*	CCAAGCCCATGACCGCTGA ACAAGAATAGCCAGACTACATCA	721	本研究
真核生物	*12S rRNA*	CAACTGGGATTAGATACCCCACTAT GAGGGTGACGGGCGGTGTGT	456	[10]
真核生物	*16S rRNA*	AAGACGAGAAGACCCTATGGA GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA	240	[10]
真核生物	*18S rRNA*	AGGATCCATTGGAGGGCAAGT TCCAACTACGAGCTTTTTAACTGCA	99	[10]

1.6 引物的特异性、灵敏度和可重复性

通过 PCR 扩增验证引物的特异性，模板 DNA 来自羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗等物种。单重和多重 PCR 结果在 5%琼脂糖凝胶上进行电泳实验，以确认扩增的正确性。为确定多重 PCR 的灵敏度，采用不同浓度梯度的混合模板 DNA (10.00 ng 至 0.01 ng)进行扩增，并通过琼脂糖凝胶电泳分析其检出限和动态范围。为模拟不同掺假比例，将鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗的原始肉组织按 0.10%、0.25%、0.50%、1.00%、2.5%、5.00%和 10.00% (*m*/*m*)的比例混合并充分均质，以避免交叉污染。为评价引物在热加工条件下的可重复性，采用经不同热处理方式处理后的肉类样品基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增分析。

1.7 热加工样品的处理方法

新鲜肉样品去除可见脂肪和结缔组织后切碎并充分混匀，分别采用水煮和微波两种方式进行热加工处理。水煮处理时，将切碎的肉样品置于耐热容器中，加入适量去离子水使样品完全浸没，于恒温水浴锅中加热至沸腾状态(97~99 ℃)，并保持 30 min。微波处理时，将等量切碎肉样品置于耐热容器中，使用家用微波炉在 750 W 功率下加热 10 min。所有热处理完成后，样品自然冷却至室温，并立即用于基因组 DNA 的提取。所得 DNA 作为模板用于后续 PCR 扩增分析[14]。

1.8 数据处理

PCR 扩增结果通过琼脂糖凝胶电泳进行定性分析，凝胶图像由 Gel Doc™ XR+凝胶成像系统采集并使用 Image Lab™软件记录。阳性扩增产物经克隆并测序确认其物种特异性。所有 PCR 实验均至少独立重复 3 次。

2 结果与分析

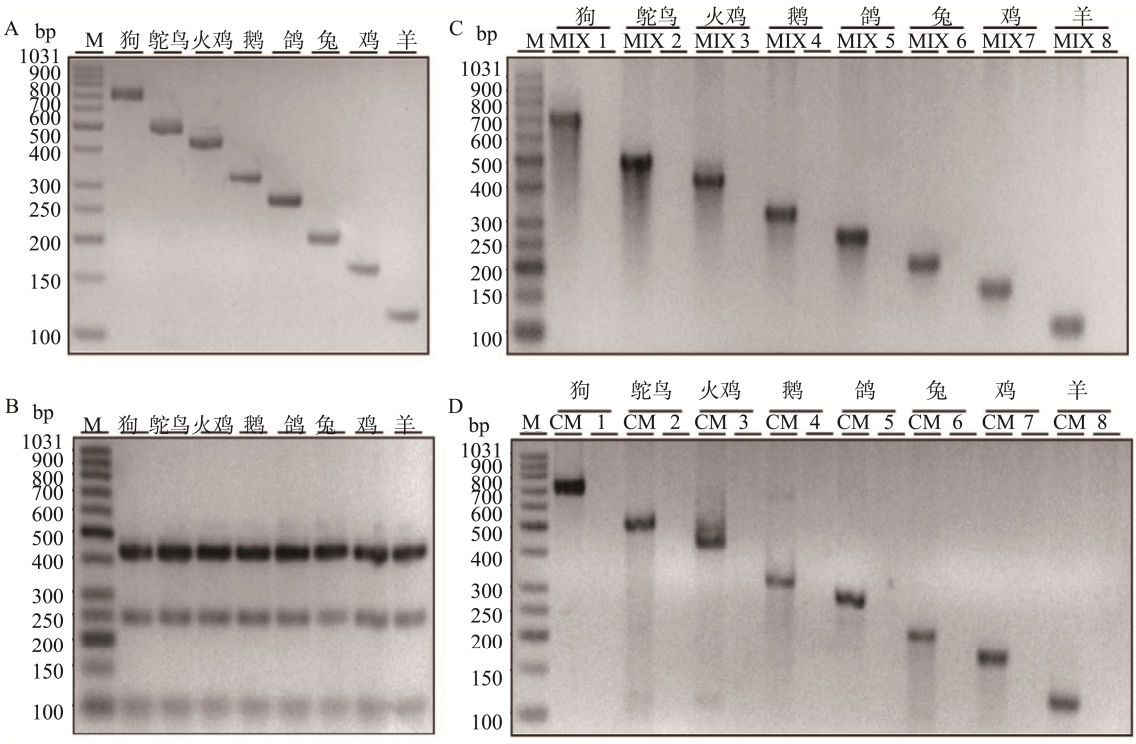
2.1 设计引物的特异性检测

为获得物种特异性引物，设计了候选引物并评估其

扩增特异性。最终, 每个物种的特异性引物列于表 1 中。如预期所示, 使用物种特异性引物成功扩增了羊肉、鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉的靶标条带, 条带大小分别为 123、174、222、279、329、427、502 和 721 bp(图 2A)。同时, 使用 3 对通用真核引物作为阳性对照[11]。如图 2B 所示, 所有肉类样品均产生了 99、240 和 456 bp 的条带, 表明样品中存在相同质量的模板 DNA, 确保后续多重 PCR 实验的准确性。使用单一物种模板 DNA 进行 PCR 扩增时, 所有 8 对引物都能在对应的模板中成功扩增靶标条带, 而 7 对非靶引物未能扩增条带(图 2C)。同时, 每组物种特异性引物也能在 8 种肉类物种的 DNA 混合物中成功扩增靶标条带, 而在 7 种非靶物种的 DNA 混合物中未检测到扩增(图 2D)。为进一步验证 PCR 扩增的准确性, 图 2D 中的所有扩增产物均被克隆并测序, 通过与 NCBI 核酸数据库的 BLAST 比对, 确认了目标物种的 100%准确性。综上所述, 所设计的物种特异性引物均表现出准确可靠的扩增特异性, 为后续多重 PCR 体系在肉类真实性检测中的应用奠定了基础。

2.2　多重 PCR 检测的灵敏度

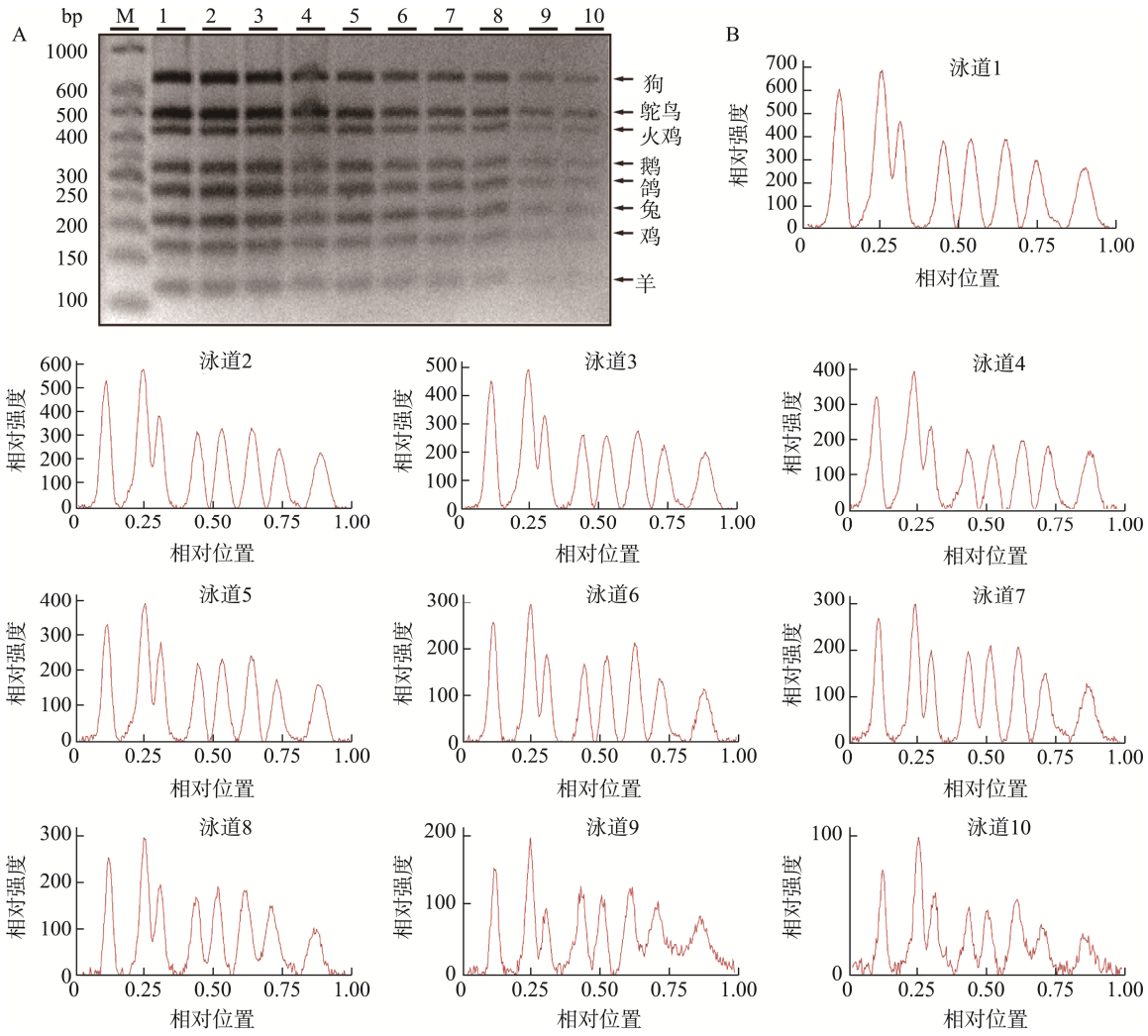
在优化单重 PCR 系统后, 逐步构建了双重、三重、四重、五重和七重 PCR, 最终开发了包含 8 组靶标引物的八重 PCR 方法。为了确定此方法的检出限(limit of detection, LOD)和动态范围, 使用不同浓度的每种物种 DNA 进行 PCR 扩增。如图 3A 所示, 在所有指示的 DNA 浓度范围(10.00~0.01 ng)内, 6 条条带(代表狗、鸵鸟、火鸡、鹅、鸽和兔)清晰可见。相比之下, 鸡和羊的条带(第 7 和第 8 条), 尤其是羊, 在 0.010 ng 和 0.025 ng 模板 DNA 条件下显示较弱的条带。通过使用 Image Lab^{TM} 软件分析电泳图谱, 发现随着模板浓度的降低, 峰值强度显著下降, 在 0.010 ng 和 0.025 ng 的条件下, 鸡和羊的峰几乎消失(图 3B)。综合分析表明, 此八重 PCR 方法的 LOD 为狗、鸵鸟、火鸡、鸽和兔为 0.010 ng DNA, 而鸡和羊为 0.050 ng DNA。此外, 将羊肉与鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉 7 种肉类按 0.10%、0.25%、0.50%、1.00%、2.50%、5.00%和 10.00%的比例混合后进行多重 PCR 检测。即使目标肉类的占比为 0.10%, 每种物种的特异性扩增产物仍能清晰显示(图 4A 和图 4B)。



注: A. 采用羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗的物种特异性引物进行单重 PCR 检测, 并分别以相应物种的基因组 DNA 为模板。B. 分别对各肉类物种样品使用预混的真核生物通用引物(*12S rRNA*、*16S rRNA* 和 *18S rRNA* 基因)进行 PCR 扩增。C. 分别以羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗的单一物种基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。MIX 表示包含羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗 8 种物种的 8 对引物混合物; 1~8 表示由 7 种非靶物种的 7 对引物组成的引物混合物。D. 采用羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗的物种特异性引物进行 PCR 扩增。CM 表示包含羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗的 8 种物种完整 DNA 混合物; 1~8 表示除目标物种外其余 7 种肉类物种的完整 DNA 混合物。M 泳道为 DNA 分子量标准(Marker), 下同。

图 2　通过传统单重 PCR 验证引物特异性

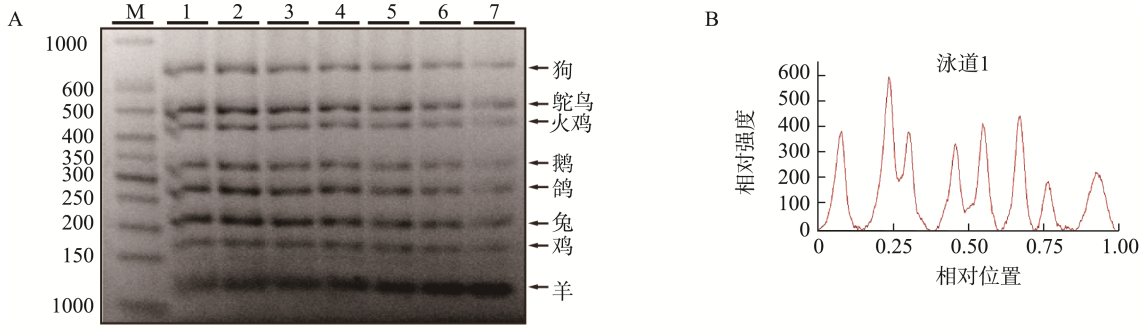
Fig.2　Validation of primer specificity by traditional singleplex PCR



注: A. 使用预混合的 8 种物种 DNA 模板(1~10 表示每种物种 DNA 分别以 10.000、5.000、2.500、1.000、0.500、0.250、0.100、0.050、0.025 和 0.010 ng 等量混合)作为模板进行单管八重 PCR 反应, 图示为琼脂糖凝胶电泳结果; B. 对应电泳图谱, 展示了羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗在不同浓度下的检测结果, 泳道 1~10 对应(A)中的不同 DNA 浓度, 图 5、6 同。横坐标为相对于凝胶顶部的相对位置, 纵坐标为 DNA 结合染料的荧光强度, 使用 4S GelRed 核酸染料, 下同。

图 3 生肉样品中多重 PCR 检测灵敏度检验

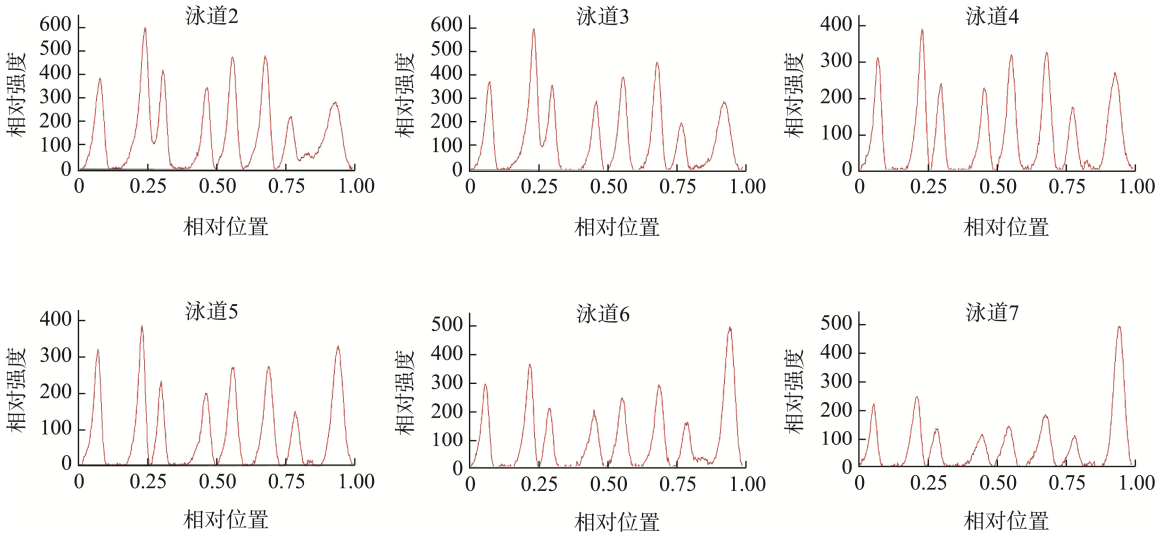
Fig.3 Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in raw meat samples



注: A. 使用 8 种肉类物种的物种特异性引物, 1~7 表示在单管八重 PCR 中, 按 10.00%、5.00%、2.50%、1.00%、0.50%、0.25%和 0.10%的比例, 将鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉与羊肉混合进行 PCR 扩增, 图示为琼脂糖凝胶电泳结果; B. 对应电泳图谱, 展示了羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗在不同浓度下的检测结果, 泳道 1~7 对应(A)中的不同比例。

图 4 肉类模型混合物中多重 PCR 检测灵敏度检验

Fig.4 Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in meat model mixtures



注: A. 使用 8 种肉类物种的物种特异性引物, 1~7 表示在单管八重 PCR 中, 按 10.00%、5.00%、2.50%、1.00%、0.50%、0.25%和 0.10%的比例, 将鸡肉、兔肉、鸽肉、鹅肉、火鸡肉、鸵鸟肉和狗肉与羊肉混合进行 PCR 扩增, 图示为琼脂糖凝胶电泳结果; B. 对应电泳图谱, 展示了羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟和狗在不同浓度下的检测结果, 泳道 1~7 对应(A)中的不同比例。

图 4(续)　肉类模型混合物中多重 PCR 检测灵敏度检验

Fig.4　Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in meat model mixtures

2.3　热处理肉类中多重 PCR 检测的可重复性

为评估该技术是否适用于热处理肉类的动物来源检测, 分别对生肉样品进行煮沸和微波加热处理。对水煮肉样品提取基因组 DNA, 并使用多重 PCR 技术进行检测。如图 5A 和图 5B 所示, 在 0.050~10.000 ng DNA 范围内, 8 个肉类物种的条带清晰可见, 且在 1~8 条泳道中观察到完整的峰图。然而, 在第 9 和第 10 条泳道中, 只有狗、鸵鸟、火鸡、鸽和兔 5 种肉类能够有效检测到, 而鹅、鸡和羊则未能检测到, 表明煮沸处理肉类样品的 LOD 为 0.010~0.050 ng DNA。随后, 对微波加热处理肉类样品进行了 DNA 提取, 并评估了该方法的灵敏度。结果显示, 微波加热处理肉类样品的 LOD 也为 0.010~0.050 ng DNA(图 6A 和图 6B)。结合煮沸和微波加热处理数据, 热处理肉类的区分阈值大约为 0.010~0.050 ng DNA, 表明该多重 PCR 技术能够有效用于实际肉制品中的动物物种检测。

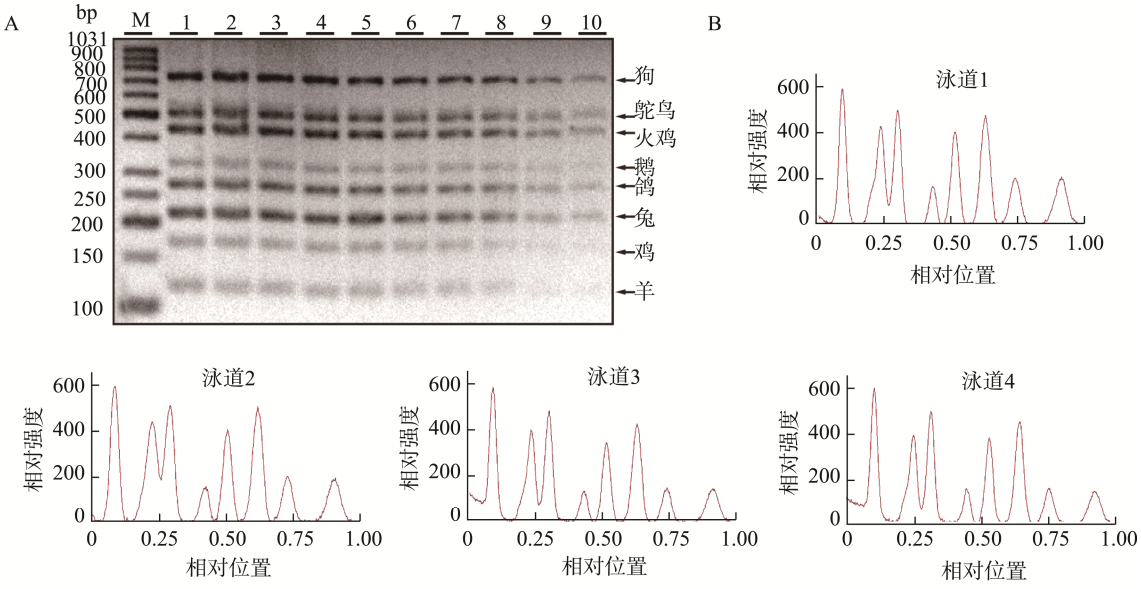


图 5　水煮肉类样品中多重 PCR 检测灵敏度检验

Fig.5　Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in boiled meat samples

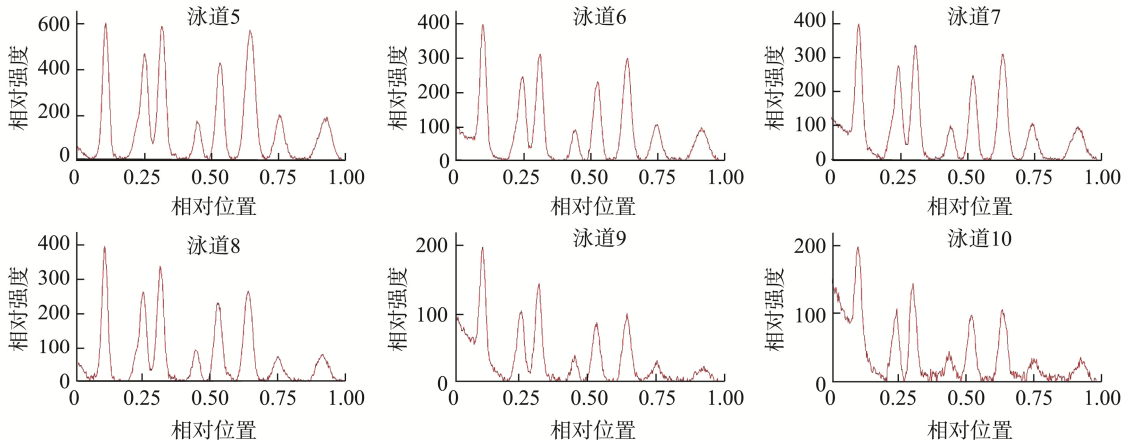


图 5(续) 水煮肉类样品中多重 PCR 检测灵敏度检验

Fig.5 Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in boiled meat samples

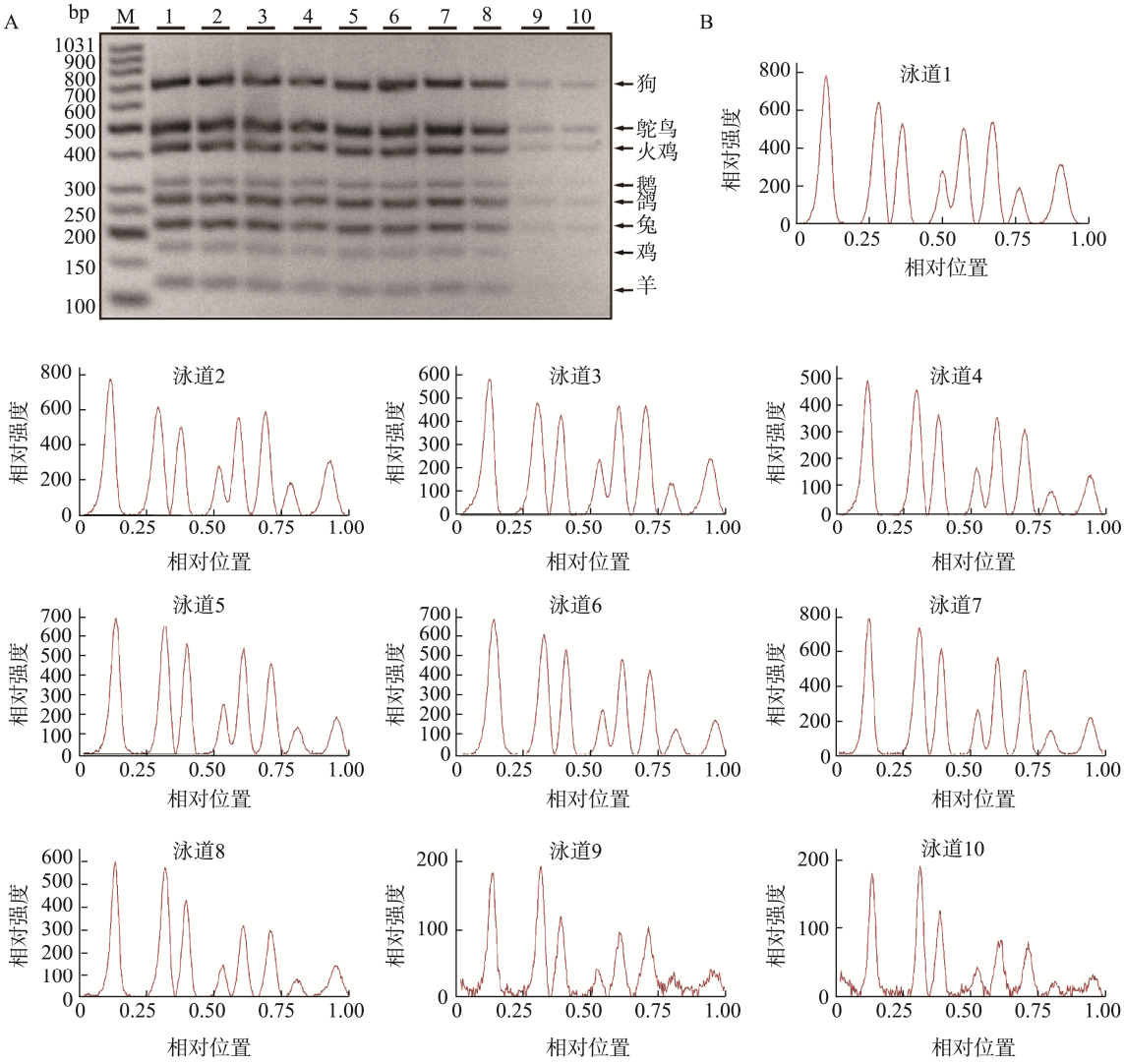


图 6 微波加热肉类样品中多重 PCR 检测灵敏度检验

Fig. 6 Test of detection sensitivity of the multiplex PCR in microwave-heated meat samples

2.4　多重 PCR 方法在商业肉制品中的应用

肉丸、肉片、烤肉串、干咸肉和干肉是常见的消费食品, 本研究选择这些食品来评估该方法在肉类真实性检测中的应用。如表 2 所示, 大多数商业产品的肉类成分与文献描述一致。然而, 一些样品包含了未标注的额外成分。标明为 100%纯肉的样品中, 15 个羊肉样品中有 5 个(33.3%)、10 个兔肉样品中有 3 个(30.0%)、10 个鸵鸟样品中有 2 个(20.0%)和 15 个火鸡样品中有 2 个(13.3%)存在掺假。调查结果表明, 肉类掺假现象仍然普遍, 尤其是禽类肉类作为主要掺假成分, 尽管已有法规监管食品质量和安全。最重要的是, 本研究进一步验证了该多重 PCR 方法在监督肉类欺诈中的有效性, 确保了食品质量和安全。

表 2　多重 PCR 方法在商业肉制品中的检测结果

Table 2　Detection results of the multiplex PCR method in commercial meat products

产品类型	数量	标签	检测物种								掺假情况
			羊	鸡	兔	鸽	鹅	火鸡	鸵鸟	狗	
羊	15										5 (33.3%)
羊肉丸	5	羊	5/5	1/5[a], 1/5[b]	1/5[a]	—	1/5[b]	—	—	—	
羊肉片	5	羊	5/5	1/5[a]	—	—	—	1/5[a]	—	—	
羊肉串	5	羊	5/5	1/5[a]	—	—	—	—	1/5[b]	—	
兔	10										3 (30.0%)
兔肉干	5	兔	—	1/5[a]	5/5	1/5[a]	—	—	—	—	
腌兔肉	5	兔	—	1/5[a]	5/5	—	1/5[b]	—	—	—	
鸵鸟	10										2 (20.0%)
鸵鸟罐头	5	鸵鸟	—	—	—	—	—	1/5[a]	5/5	—	
鸵鸟肉干	5	鸵鸟	—	1/5[a]	—	—	—	—	5/5	—	
火鸡	15										2 (13.3%)
火鸡肉排	5	火鸡		1/5[a]	—	—	—	5/5	—	—	
火鸡肠	5	火鸡		—	—	—	1/5[b]	5/5	—	—	
火鸡胸肉	5	火鸡		—	—	—	—	5/5	—	—	

注: —表示未检测到相应物种 DNA。同行相同字母表示是同一样品, 不同字母表示不是同一样品。

3　讨　论

近年来, 一些商业肉制品通过巧妙掺假在外观形态和理化特性上与纯肉制品高度相似, 给肉类来源鉴定带来了较大挑战。因此, 肉类来源鉴定技术不断发展, 逐渐涵盖生物学、物理学、化学及免疫学等多种分析方法[15–18]。多重 PCR 技术能够在单一反应体系中同时检测多个靶标, 显著降低分析成本并缩短检测时间, 已成为肉类掺假检测领域中一种重要且实用的方法[11,19]。然而, 随着检测物种数量的增加及 PCR 反应体系复杂性的提高, 引物之间的相互干扰可能导致扩增效率下降, 甚至引起多重 PCR 扩增失败, 这也是多重 PCR 方法进一步应用时面临的主要技术挑战之一[20]。

已有研究表明, 多重 PCR 通常在一个反应体系中可同时鉴定的肉类物种数量相对有限。尽管已有研究报道通过两管多重 PCR 方法可检测 10、12 甚至 14 种动物物种, 但这些研究均依赖多管体系完成[18–22]。仅有一项研究借助通用引物在单管多重 PCR 反应中实现了对 8 种肉类成分的识别[22]。与上述研究不同, 本研究通过合理设计 8 组高度特异性的物种特异性引物, 在无需额外通用引物的情况下, 成功构建了一种单管八重 PCR 方法, 实现了对 8 种常见动物性肉类来源的同时检测。

在方法性能方面, 不同多重 PCR 方法在 LOD 方面存在一定差异(表 3)。与已有多重 PCR 方法相比, 本研究建立的多重 PCR 方法在不同肉类样品中的 LOD 约为 0.01~0.05 ng DNA, 而现有多重 PCR 方法的 LOD 范围通常为 1 pg 至 0.32 ng DNA。该方法不仅适用于原始肉样, 在煮沸处理和微波加热处理的肉样中同样保持良好的检测性能, 表明热加工处理并未显著影响目标 DNA 的检测能力, 验证了物种特异性引物在热加工肉类样品中的稳定性和良好可重复性。

此外, 通过克隆测序及序列比对分析, 本研究中所有物种特异性 PCR 扩增产物均表现出 100%的鉴定准确性, 进一步证明了引物设计的高度特异性。这一结果对于避免外源 DNA 污染或非特异性扩增引起的误判具有重要意义[32]。综合来看, 本研究提出的单管多重 PCR 方法在灵敏度、准确性以及对热加工肉制品的适用性方面均表现出良好的综合性能, 能够满足商业肉制品来源鉴定的实际需求。

表 3 基于凝胶电泳检测的多重 PCR 方法在肉类物种来源鉴别中的比较

Table 3 Comparison of the multiplex PCR method based on gel electrophoresis detection in meat species origin identification

多重 PCR	数量	检测种类	LOD	来源
八重 PCR	8	羊、鸡、兔、鸽、鹅、火鸡、鸵鸟、狗	0.05 ng DNA 或 0.1%(混合样)	本研究
多重 PCR	2	牛、水牛	2.23~2.31 ng/μL DNA	[23]
多重 PCR	2	牛、马	0.05 ng DNA	[5]
多重 PCR	3	鸡、鸭、鹅	0.05 ng DNA 或 1%(混合样)	[24]
四重 PCR	4	牛、猪、羊、鸭	0.1 ng DNA	[25]
多重 PCR	4	猪、鸡、鸭、牛	0.1%(混合样)	[26]
多重 PCR	4	水牛、牛、猪、鸭	1 pg DNA; 0.1%(混合样)	[27]
四重 PCR	4	牛或羊被掺入狐狸、貂或浣熊肉	1%(混合样)	[28]
五重 PCR	5	狗、鸭、水牛、山羊、绵羊	0.1~0.32 ng DNA	[9]
多重 PCR	5	羊/山羊、牛、鸡、鸭、猪	0.5 ng	[18]
六重 PCR	6	鸡、牛/水牛、羊/山羊、马/驴、猪、狗	0.03~0.05 ng	[29]
多重 PCR	6	山羊、鸡、牛、羊、猪、马	0.25 ng	[30]
多重 PCR	6	羊、猪、鸭、鸡、马、猫	9.1%(混合样)	[31]
七重 PCR	7	火鸡、鹅、猪、羊、牛、鸡、鸭	0.01~0.05 ng DNA	[10]
多重 PCR (双管)	10	牛、羊、猪、鸡、火鸡、猫、狗、鼠、兔、人	30 pg DNA	[12]
多重 PCR (双管)	12	马、鸽、骆驼、兔、鸵鸟、牛、猪、狗、鸡、鸭、猫、鹅	0.05~0.1 ng DNA	[21]

4 结 论

本研究成功建立了一种基于物种特异性引物的单管多重 PCR 方法, 可在一个反应体系中同时、准确地区分 8 种常见动物性肉类来源。该方法具有操作简便、检测快速、灵敏度高和成本较低等优点, 并在煮沸和微波加热等热加工肉类样品中表现出良好的稳定性和可重复性。综上所述, 该多重 PCR 方法适用于商业肉制品来源鉴定, 可为肉类掺假监管和食品真实性评价提供一种可靠的技术手段, 在肉制品质量安全监管和消费者保护方面具有良好的应用前景。

参考文献

[1] LI YC, LIU SY, MENG FB, *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.

[2] SHEARS P. Food fraud-a current issue but an old problem [J]. British Food Journal, 2010, 112(2): 198–213.

[3] PREMANANDH J. Horse meat scandal–A wake-up call for regulatory authorities [J]. Food Control, 2013, 34(2): 568–569.

[4] KAMAL USM, MOTALIB HMA, ZAMAN CZ, *et al.* Detection and discrimination of seven highly consumed meat species simultaneously in food products using heptaplex PCR-RFLP assay [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 100: 103938.

[5] WANG WJ, LIU JJ, ZHANG QD, *et al.* Multiplex PCR assay for identification and quantification of bovine and equine in minced meats using novel specific nuclear DNA sequences [J]. Food Control, 2019, 105: 29–37.

[6] LI JC, LI JQ, LIU RX, *et al.* Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis [J]. Food Control, 2021, 121: 107599.

[7] 柳梦思, 时国强, 卢鑫, 等. 基于全自动核酸提取的荧光定量 PCR 鉴别羊肉制品真伪[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3148–3155.
LIU MS, SHI GQ, LU X, *et al.* Identification of mutton products by flourescence quationtitative PCR based on automatic nucleic acid extraction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(10): 3148–3155.

[8] 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.

[9] THANAKIATKRAI P, DECHNAKARIN J, NGASAMAN R, *et al.* Direct pentaplex PCR assay: An adjunct panel for meat species identification in Asian food products [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 767–772.

[10] WANG WJ, WANG XK, ZHANG QD, *et al.* A multiplex PCR method for detection of five animal species in processed meat products using novel species-specific nuclear DNA sequences [J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(7): 1351–1360.

[11] MANSOURI M, KHALILZADEH B, BARZEGARI A, *et al.* Design a highly specific sequence for electrochemical evaluation of meat adulteration in cooked sausages [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 150: 111916.

[12] CHENG Y, WANG S, JU SL, *et al.* Heat-treated meat origin tracing and authenticity through a practical multiplex polymerase chain reaction approach [J]. Nutrients, 2022, 14(22): 4727.

[13] YAMAN BN, ÇELIK PA, MUTLU MB, *et al.* A combinational analysis of acidophilic bacterial diversity of an iron-rich environment [J]. Geomicrobiology Journal, 2020, 37(10): 877–889.

[14] PRUSAKOVA OV, GLUKHOVA XA, AFANAS'EVA GV, *et al.* A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species [J]. Meat Science, 2018, 137: 34–40.

[15] CHUNG SM, HELLBERG RS. Effects of poor sanitation procedures on cross-contamination of animal species in ground meat products [J]. Food Control, 2020, 109: 106927.

[16] FILHO PADC, COBUCCIO L, MAINALI D, *et al.* Rapid analysis of food raw materials adulteration using laser direct infrared spectroscopy and imaging [J]. Food Control, 2020, 113: 107114.

[17] BARBIN DF, BADARO AT, HONORATO DCB, *et al.* Identification of turkey meat and processed products using near infrared spectroscopy [J]. Food Control, 2020, 107: 106816.

[18] LENG T, LI F, XIONG LA, *et al.* Quantitative detection of binary and ternary adulteration of minced beef meat with pork and duck meat by NIR combined with chemometrics [J]. Food Control, 2020, 113: 107203.

[19] 谷蒙林，肖付刚，王德国，等. 核酸检测技术检测肉类种源研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7514–7519.
GU ML, XIAO FG, WANG DG, *et al.* Research progress on detection of meat provenance by nucleic acid detection technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(19): 7514–7519.

[20] LI JC, LI JP, XU SG, *et al.* A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes [J]. Food Chemistry, 2019, 295: 395–402.

[21] CAI ZD, ZHONG GW, LIU QQ, *et al.* Molecular authentication of twelve meat species through a promising two-tube hexaplex polymerase chain reaction technique [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 813962.

[22] LIU W, TAO J, XUE M, *et al.* A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products [J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(11): 2385–2392.

[23] VASCONCELOS DV, FERREIRA CGV, COSTA AWS, *et al.* Application of a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay to detect fraud by substitution of bovine meat cuts with water buffalo meat in Northern Brazil [J]. CyTA-Journal of Food, 2019, 17(1): 790–795.

[24] HOU B, MENG XR, ZHANG LY, *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 Science, 2015, 101: 90–94.

[25] NING HH, XIA H, SHENG FY, *et al.* Application of quadruple multiplex PCR detection for beef, duck, mutton and pork in mixed meat [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2015, 3(6): 392–398.

[26] ZHAO G, SHEN X, LIU YL, *et al.* Direct lysis-multiplex polymerase chain reaction assay for beef fraud substitution with chicken, pork and duck [J]. Food Control, 2021, 129: 108252.

[27] PING WL, RU HX, QING GR. Molecular detection of adulteration in commercial buffalo meat products by multiplex PCR assay [J]. Food Science and Technology, 2019, 39(2): 344–348.

[28] LI XN, GUAN YF. Specific identification of the adulterated components in beef or mutton meats using multiplex PCR [J]. Journal of AOAC International, 2019, 102(4): 1181–1185.

[29] IQBAL M, SALEEM MS, IMRAN M, *et al.* Single tube multiplex PCR assay for the identification of banned meat species [J]. Food Additives & Contaminants Part B, Surveillance, 2020, 13(4): 284–291.

[30] 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 Science, 1999, 51(2): 143–148.

[31] XU J, ZHAO W, ZHU MR, *et al.* Molecular identification of adulteration in mutton based on mitochondrial 16S rRNA gene [J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(1): 628–632.

[32] ABBAS D, PAYAM GD, EBRAHIM R. Molecular assay to fraud identification of meat products [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(1): 148–152.

(责任编辑：韩晓红　蔡世佳)