DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251217001
**引用格式**: 易仕春, 燕姿颖, 王刚, 等. 双重实时荧光聚合酶链反应法快速鉴定羊肉制品中鸭源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 110–118.
YI SC, YAN ZY, WANG G, *et al*. Rapid identification of duck-derived components in mutton products by duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 110–118. (in Chinese with English abstract).

# 双重实时荧光聚合酶链反应法快速鉴定羊肉制品中鸭源性成分

易仕春[1], 燕姿颖[1], 王 刚[2], 邢福国[2], 张陈川[3], 李红飞[3], 李二峰[1*]
(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300392; 2. 中国农业科学院农产品加工所, 北京 100193;
3. 张家界市农业农村局, 张家界 427000)

**摘 要: 目的** 建立双重实时荧光聚合酶链反应法(duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction, dRT-PCR)快速鉴定羊肉中鸭源性成分的方法。**方法** 首先使用响应面法优化快速提取动物组织 DNA 的各项条件, 随后根据羊线粒体细胞色素 b 基因(*CYTB*)和鸭细胞色素 c 氧化酶亚基III (*COX3*)的差异设计多组特异性引物, 使用快速提取的动物组织 DNA 进行 dRT-PCR 实验, 通过分析熔解曲线, 根据出峰温度差异以定性识别羊、鸭源成分。**结果** 优化后的动物组织 DNA 粗提方法可在 5 min 内从 20 mg 动物组织中提取出 586 ng/μL 适用于物种检测所用的 DNA, 羊源基因产物和鸭源基因产物分别在 84.79 ℃和 81.66 ℃时产生熔解峰, 且对非目标物种无特异性扩增。可在 1 h 内快速检出 0.01 ng/μL 以上鸭粗提 DNA。**结论** 该方法操作简单, 成本低廉, 具有较高灵敏度, 为羊肉制品掺假鉴定提供了有效技术支持。

**关键词:** 羊肉制品; 鸭源性成分; DNA 粗提; 响应面法; 双重实时荧光聚合酶链反应法

## Rapid identification of duck-derived components in mutton products by duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction

YI Shi-Chun[1], YAN Zi-Ying[1], WANG Gang[2], XING Fu-Guo[2], ZHANG Chen-Chuan[3], LI Hong-Fei[3], LI Er-Feng[1*]
(1. *College of Horticulture and Landscape Architecture*, *Tianjin Agricultural University*, *Tianjin* 300392, *China*; 2. *Institute of Food Science and Technology*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*; 3. *Zhangjiajie Bureau of Agriculture and Rural Affairs*, *Zhangjiajie* 427000, *China*)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the rapid identification of duck-derived components in mutton by duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction (dRT-PCR). **Methods** First, the response surface methodology was used to optimize various conditions for the rapid extraction of DNA from animal tissues.

**收稿日期:** 2025-12-17
**基金项目:** 天津市自然科学基金项目(25JCYBJC00720)
**第一作者:** 易仕春(1999—), 男, 硕士, 主要研究方向为分子生物以及食品安全。E-mail: 1658813943@qq.com
***通信作者:** 李二峰(1986—), 女, 副教授, 主要研究方向为分子植物病理学。E-mail: lef143@126.com

Subsequently, multiple sets of specific primers were designed based on the differences between the sheep mitochondrial cytochrome b gene (*CYTB*) and the duck cytochrome c oxidase subunit III (*COX3*). The dRT-PCR experiment was conducted using the rapidly extracted animal tissue DNA. By analyzing the melting curve, the sheep and duck-derived components were qualitatively identified according to the differences in peak temperature. **Results** The optimized method for crude extraction of animal tissue DNA could extract 586 ng/μL of DNA suitable for species detection from 20 mg of animal tissue within 5 minutes. The sheep-derived gene products and duck-derived gene products produce melting peaks at 84.79 ℃ and 81.66 ℃ respectively, with no specific amplification for non-target species. It could quickly detect more than 0.01 ng/μL of crude duck DNA within 1 hour. **Conclusion** This method is simple to operate, low in cost, and has high sensitivity, providing effective technical support for the identification of adulteration in mutton products.

**KEY WORDS:** mutton products; duck-derived components; crude DNA extraction; response surface methodology; duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction

## 0　引　言

羊肉富含蛋白质、矿物质及多种维生素[1], 且因其独特的风味和营养价值, 在我国居民膳食结构中的消费量与日俱增[2]。随着生活水平的提高和消费观念的转变, 人们对优质羊肉制品的需求日益旺盛, 推动了羊肉市场价格持续高于猪肉、禽肉等主要肉类[3]。然而, 正是这种显著的价格差异, 使得羊肉成为了肉类食品掺假造假的主要目标之一, 以期非法牟取暴利[4]。

在诸多用于掺假的原料肉中, 鸭肉因其色泽与羊肉相近、成本低廉、来源广泛, 且自身风味特征相对不突出、易于通过调味料进行掩饰, 成为了掺假者的首选[5]。这种恶意掺假行为不仅严重侵害了消费者的合法权益, 构成商业欺诈, 更可能带来潜在的食品安全与宗教饮食禁忌风险[6]。因此, 建立一种快速、准确、灵敏的检测方法, 用于鉴定羊肉制品中的鸭源性成分, 对于保障食品安全、维护市场秩序、保护消费者权益具有极其重要的现实意义[7]。

近年来肉类掺假检测技术发展迅速, 开发了基于分子生物学[8–10]、蛋白质组学[11–12]、形态学[13–14]、代谢组学[15–16]等的检测方法。但是使用上述肉类掺假检测方法具有耗时、设备昂贵、操作复杂等缺点[17]。相比之下, DNA 分子检测技术因 DNA 在加工过程中稳定性更高、种属特异性强, 成为肉类掺假鉴定的核心技术[18]。传统的实时荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定肉类掺假技术操作复杂且耗费时间长[19], 多重实时荧光 PCR 能够在一次反应里进行多个物种的检测, 与传统荧光 PCR 技术相比, 检测成本显著降低[20], 双重实时荧光聚合酶链反应法(duplex real-time fluorescence polymerase chain reaction, dRT-PCR)通过针对物种特异性基因序列设计引物, 添加荧光染料, 能够实现对目标物种 DNA 的精准识别与定量分析[21–22]。但 dRT-PCR 仍存在一定的局限性, 比如多对引物添加到同一反应中容易产生二聚体, 这对引物设计提出较高要求[9], 同时不同的 DNA 提取方法导致扩增效率的降低, 对少量样本的检测效果不佳[23–24], 而且提取 DNA 过程中可能接触有毒试剂与操作复杂给多重实时荧光 PCR 技术带来一定的限制。碱裂解法在适宜条件下可以在几分钟内快速提取动物组织中的 DNA[25], 所需的试剂与仪器简单, 这可以显著节省肉类掺假的鉴定时间[21]。

本研究旨在建立一种基于 dRT-PCR 的检测方法, 在常见的线粒体基因上设计特异性引物: 羊线粒体细胞色素 b 基因(*CYTB*)和鸭细胞色素 c 氧化酶亚基III(*COX3*), 结合碱裂解法提取动物组织 DNA 的优势, 用于快速定性鉴定羊肉制品中掺杂的鸭源性成分, 并对方法的特异性、灵敏度和重复性进行系统验证, 为市场监管部门提供一种强有力的技术工具, 为打击肉类掺假、净化市场环境、保障羊肉制品的真实性和安全性提供可靠的技术支撑。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与试剂

绵羊肉、家鸭肉、西门塔尔牛、家猪肉、家鸡肉、黑鱼肉等样品购于北京某超市。

乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、氯化钠(NaCl)、双蒸水($ddH_2O$)、乙酸铵($CH_3COONH_4$)、氢氧化钠(NaOH)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 分析纯, 安格斯化学公司); 染料法荧光定量 PCR 预混液(北京全式金生物技术有限公司)。

### 1.2　仪器与设备

YP-3002 电子天平(精度 0.0001 g, 上海越平科学仪器有限公司); Q5000 超微量紫外分光光度计(美国科维公司); DK-8D 三孔电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司); StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司); Sigma-14 小型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限

公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

称取 20 mg 切碎肉样至离心管中, 加入 0.5 mL NaOH 溶液, 在 60 ℃条件下裂解 5 min 之后加入 1 mL 由 10 mmol Tris、2 mmol EDTA、0.2 mol NaCl 和 4 mol $CH_3COONH_4$ 组成的 pH 为 8.0 的缓冲液。在离心机中以 10000 r/min 离心 60 s, 收集上清液, 使用超微量紫外分光光度计在波长 260 nm 处测量 DNA 浓度, 蛋白质残留是影响后续 PCR 扩增的主要杂质, 因此实验选定 *A*260/*A*280 作为纯度判定指标。

1.3.2 单因素实验

固定裂解温度为 60 ℃, 提取时间为 5 min, 分别在 NaOH 浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L 进行肉类组织 DNA 提取, 以 DNA 浓度为指标, 考察 NaOH 浓度对粗提 DNA 浓度的影响。

固定 NaOH 浓度为 0.5 mol/L, 提取时间为 5 min, 分别在提取温度为 20、40、60、80、100 ℃进行肉类组织 DNA 提取, 以 DNA 浓度为指标, 考察提取温度对粗提 DNA 浓度的影响。

固定 NaOH 浓度为 0.5 mol/L, 提取温度为 60 ℃, 分别在提取时间为 1、3、5、7、9 min 进行肉类组织 DNA 提取, 以 DNA 浓度为指标, 考察提取时间对粗提 DNA 浓度的影响。

1.3.3 响应面法优化 DNA 提取条件

在单因素实验基础上, 以 DNA 浓度为响应值(*Y*), NaOH 浓度(*A*)、提取温度(*B*)、提取时间(*C*)作为自变量, 利用软件 Design Expert 11 中 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 设计三因素三水平的响应面优化实验, 因素水平见表 1, 通过响应面分析获取最佳工艺参数并进行验证实验。

**表 1 响应面实验设计因素水平**

**Table 1 Factors and levels of response surface test**

| 水平 | 因素 | | |
|---|---|---|---|
| | *A*: NaOH 浓度 /(mol/L) | *B*: 提取温度 /℃ | *C*: 提取时间 /min |
| –1 | 0.3 | 40 | 3 |
| 0 | 0.5 | 60 | 5 |
| 1 | 0.7 | 80 | 7 |

1.3.4 引物设计

使用软件 Primer Premier 6 分别在羊 *CYTB* 基因(GenBank 登录号: OM869781.1)和鸭 *COX3* 基因(GenBank 登录号: NC_009684.1)上设计特异性引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

1.3.5 双重实时荧光聚合酶链反应法反应体系以及扩增条件

dRT-PCR 反应体系为: 预混液 10 μL, 鸭引物(S-CYTB-F、S-CYTB-R, 10 μmol/L)各 0.2 μL, 羊引物(D-COX3-F、D-COX3-R, 10 μmol/L)各 0.2 μL, 鸭粗提 DNA 1 μL (100 ng/μL), 羊粗提 DNA 1 μL (100 ng/μL), 用 $ddH_2O$ 补足体系至 20 μL。dRT-PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 30 s; 94 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 20 s, 35 个循环; 熔解曲线制作: 95 ℃、1 min, 60 ℃、1 min, 以 0.3 ℃/s 速率升温至 95 ℃, 同时连续检测荧光强度; 降温: 40 ℃、60 s。

**表 2 羊、鸭特异性引物**

**Table 2 Specific primer of sheep and ducks**

| 物种 | 引物名称 | 引物序列 | 扩增片段大小 /bp |
|---|---|---|---|
| 羊 | S-CYTB-F | CGGAGACCCAGACAACTACACC | 142 |
| | S-CYTB-R | TGAGAGGATTAGGGCGAGGACT | |
| 鸭 | D-COX3-F | CCACCACAGCATCACAGAAGGA | 219 |
| | D-COX3-R | AGGAGGCAGACGGTTAGGAAGG | |

1.3.6 方法的特异性研究

使用优化后的 DNA 提取方法分别提取牛、猪、鸡、肉等肉样的粗 DNA, 以羊鸭肉混合质量比为 1:1 比例提取的 DNA 为阳性对照, 将 DNA 替换为 $ddH_2O$ 为阴性对照, 按照 1.3.5 中的方法加入反应体系并进行扩增。

1.3.7 方法的灵敏性研究

使用 $ddH_2O$ 梯度稀释鸭 DNA 质量浓度至 100.00、10.00、1.00、0.10、0.01 ng/μL, 吸取 1 μL 作为扩增模板, 经过 dRT-PCR 扩增后, 以稀释浓度的对数作为横坐标(*X*), 扩增产生的 CT 值作为纵坐标(*Y*)作出回归曲线方程并分析相关系数。

1.3.8 市售样品检测

使用本方法对从北京地区的某 3 家超市、4 家烧烤店以及 3 家快餐店购买的共 10 个羊肉制品进行检测, 以在(81.66±0.30) ℃有产生熔解曲线峰为代表检出鸭源成分, 以在(84.79±0.30) ℃有产生熔解曲线峰为代表检出羊源成分。

### 1.4 数据处理

每组数据 3 个平行, 采用平均值±标准偏差表示。数据记录与统计分析使用 Microsoft Excel 2019, 使用 Origin 2023 绘制图表, Design Expert 11 进行响应面分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

2.1.1 NaOH 浓度对粗提 DNA 浓度影响

由图 1(A)可以看出, 随着 NaOH 浓度的变化, 提取得到的 DNA 浓度呈现出先上升后下降的趋势。当 NaOH 浓度从 0.1 mol/L 增加到 0.5 mol/L 时, DNA 浓度逐步升高, 在 NaOH 浓度为 0.5 mol/L 时, DNA 浓度达到最高值。这是因为在一定范围内, 适当提高 NaOH 浓度能更有效地裂解细

胞, 使细胞内的 DNA 充分释放出来, 从而提高 DNA 的提取量。当 NaOH 浓度超过 0.5 mol/L 后, 继续增加 NaOH 浓度, DNA 浓度开始下降。这可能是由于过高的 NaOH 会对 DNA 的结构产生破坏作用, 如导致 DNA 的磷酸二酯键断裂, 进而使 DNA 发生降解[26], 最终使得提取得到的 DNA 浓度降低。因此选择 NaOH 浓度为 0.3、0.5、0.7 mol/L 设计响应面实验。

2.1.2　裂解温度对粗提 DNA 浓度影响

由图 1(B)可知, 随着温度的提高, 提取得到的 DNA 浓度呈现出先上升后下降的趋势。当温度从 20 ℃升高到 60 ℃时, DNA 浓度逐渐提高, 在 60 ℃时达到最高。这可能是因为在 60 ℃以下时, 随着温度升高, 动能增大, 更容易裂解动物组织细胞, 释放 DNA, 而温度过高会破坏 DNA 分子结构, 造成 DNA 降解, 使 DNA 提取率降低[27]。因此, 选择温度为 40、60、80 ℃设计响应面实验。

2.1.3　裂解时间对粗提 DNA 浓度的影响

由图 1(C)可知, 随着裂解时间的延长, DNA 浓度呈现出先上升后下降的趋势。当裂解时间从 1 min 增加到 5 min 时, DNA 浓度逐步升高, 在 5 min 时达到峰值。当裂解时间超过 5 min 后, 继续延长时间, DNA 浓度逐渐下降。这可能是因为动物组织中 DNA 的溶出是一个缓慢的动态过程, 在一定时间后到达动态平衡状态, 随着裂解时间的继续延长反而造成 DNA 的降解。因此, 选择时间 3、5、7 min 设计响应面实验。

## 2.2　响应面法优化 DNA 提取条件

2.2.1　DNA 提取浓度回归模型的建立和显著性检验

以 NaOH 浓度、提取温度以及提取时间作为自变量, DNA 浓度作为响应值, 使用软件 Design Expert 11 中 Box-Behnken 进行实验设计以及多项式拟 合回归分析, 根据软件得出的 17 个实验点进行实验, 方案及结果如表 3 所示。

在 Expert 11 软件中对实验结果进行回归方程方差分析, 结果如表 4 所示, 并建立 DNA 质量浓度($Y$)对 NaOH ($A$) 、温度 ($B$) 、时间 ($C$) 的三元二次回归方程: $Y$=665.96+18.16$A$+5.38$B$+28.39$C$+5.27$AB$–17.00$AC$–9.52$BC$ –81.46$A^2$–68.78$B^2$–114.65$C^2$

对回归模型进行方差分析, 结果如表 4 所示, 模型的 $P$<0.0001, 表明方程的拟合回归程度较好, 模型是显著的, 具有实际应用意义, 失拟项 $P$ 为 0.5200, 说明实验的随机误差对优化试验结果影响不显著。

2.2.2　各因素两两交互作用

对 DNA 提取率的影响各因素两两交互作用对 DNA

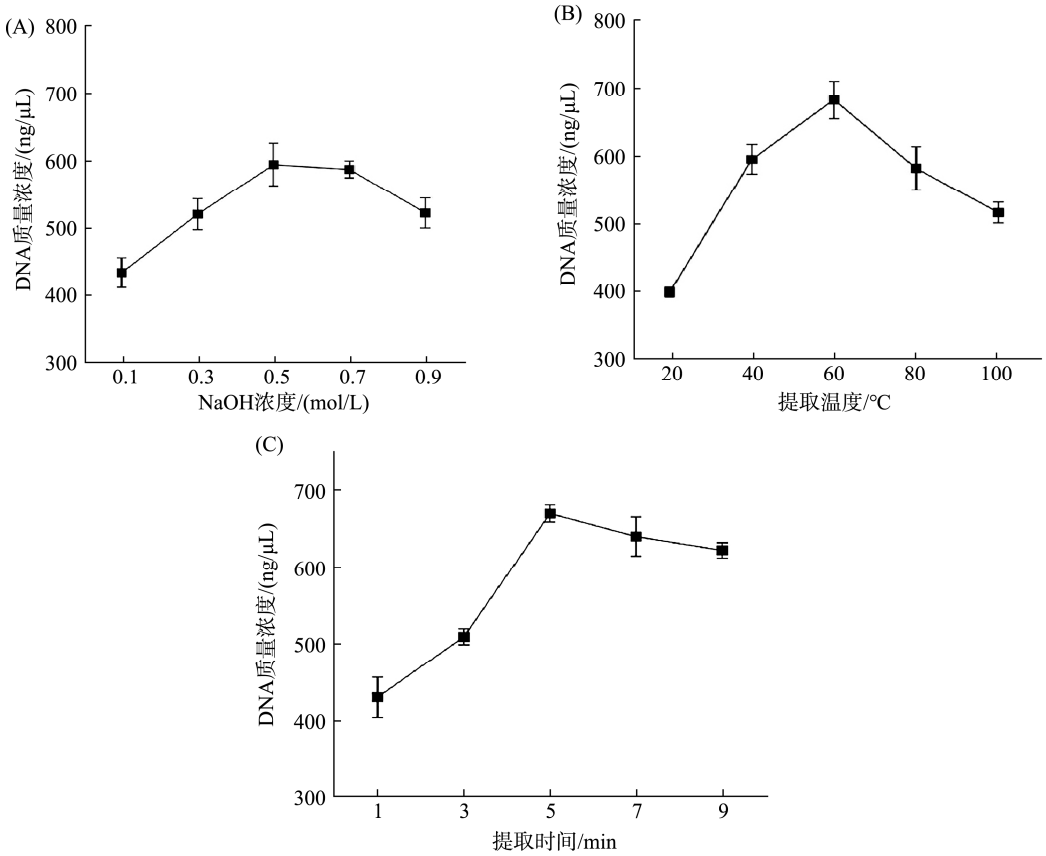



图 1　NaOH 浓度(A)、提取温度(B)和提取时间(C)对粗提 DNA 质量浓度影响($n$=3)

Fig.1　Effects of NaOH concentration (A), extraction temperature (B) and extraction time (C) on crude DNA mass concentration ($n$=3)

表 3 响应面实验分析方案及结果

Table 3 Analysis scheme and results of response surface experiments

| 编号 | *A*: NaOH 浓度/(mol/L) | *B*: 提取温度/℃ | *C*: 提取时间/min | DNA 质量浓度/(ng/μL) | *A*260/*A*280 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.7 | 80 | 5 | 538.4 | 2.189 |
| 2 | 0.5 | 60 | 5 | 678.0 | 1.988 |
| 3 | 0.7 | 40 | 5 | 521.3 | 2.084 |
| 4 | 0.5 | 60 | 5 | 672.3 | 2.065 |
| 5 | 0.3 | 60 | 7 | 490.5 | 2.154 |
| 6 | 0.7 | 60 | 7 | 500.9 | 1.913 |
| 7 | 0.5 | 40 | 3 | 434.6 | 2.205 |
| 8 | 0.3 | 80 | 5 | 499.6 | 2.274 |
| 9 | 0.5 | 60 | 5 | 657.0 | 1.997 |
| 10 | 0.5 | 60 | 5 | 658.5 | 2.362 |
| 11 | 0.5 | 80 | 7 | 511.4 | 2.003 |
| 12 | 0.5 | 40 | 7 | 515.5 | 1.583 |
| 13 | 0.5 | 60 | 5 | 664.0 | 1.956 |
| 14 | 0.3 | 40 | 5 | 503.6 | 1.575 |
| 15 | 0.5 | 80 | 3 | 468.6 | 2.096 |
| 16 | 0.7 | 60 | 3 | 483.2 | 2.054 |
| 17 | 0.3 | 60 | 3 | 404.8 | 1.649 |

提取率的影响根据回归模型分析结果，将建立的回归模型中任意因素固定在零水平，得到两个因素的交互作用结果，作出二次回归方程的响应曲面。NaOH 浓度(*A*)与提取温度(*B*)交互作用的响应曲面最陡峭、等高线最密集，提取温度(*B*)与提取时间(*C*)其次，NaOH (*A*)与提取时间(*C*)交互作用的响应曲面最平滑、等高线最分散(图 2)，说明交互作用的显著性顺序为 *AC*>*BC*>*AB*，这与方差分析结果一致。

2.2.3 最优条件、模型预测值与实测值对比

根据图 2，软件预测提取 DNA 最优工艺为 NaOH 浓度 0.40 mol/L、裂解温度 46 ℃、裂解时间 4.50 min，代入方程计算得到模型理论预测 DNA 浓度为 672.58 ng/μL；采用上述最优参数开展 3 组平行验证试验，实测平均 DNA 浓度为 586.00 ng/μL。实测值与模型预测值相对偏差为 12.87%，偏差在合理试验误差范围内，表明所建立的二次回归模型拟合效果良好，利用该模型优化得到的提取工艺参数可靠，可用于肉类 DNA 快速提取。

由表 3 中 *A*260/*A*280 数据可见，各组试验样品比值集中在 1.575~2.362 之间；最优条件下样品 *A*260/*A*280 为 1.99，处于高纯 DNA 标准区间(1.8~2.0)，说明本优化工艺提取 DNA 蛋白杂质少，纯度满足后续 dRT-PCR 扩增试验要求。

## 2.3 通过熔解曲线定性识别肉样源性成分

通过分析熔解曲线的出峰位置，可以定性识别提取的肉样源性成分。dRT-PCR 扩增羊源 DNA 所产生的熔解曲线在 84.79 ℃出现单一的峰(图 3)，扩增鸭源 DNA 所产生的熔解曲线在 81.66 ℃出现单一的峰(图 4)。

表 4 回归方程方差分析结果

Table 4 Analysis of variance results of the regression equation

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | *F* | *P* | 显著性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | 125500.00 | 9.00 | 13944.72 | 180.05 | <0.0001 | ** |
| *A* | 2639.01 | 1.00 | 2639.01 | 34.07 | 0.0006 | ** |
| *B* | 231.13 | 1.00 | 231.13 | 2.98 | 0.1277 | |
| *C* | 6446.80 | 1.00 | 6446.80 | 83.24 | <0.0001 | ** |
| *AB* | 111.30 | 1.00 | 111.30 | 1.44 | 0.2696 | |
| *AC* | 1156.00 | 1.00 | 1156.00 | 14.93 | 0.0062 | ** |
| *BC* | 362.90 | 1.00 | 362.90 | 4.69 | 0.0671 | |
| $A^2$ | 27936.49 | 1.00 | 27936.49 | 360.71 | <0.0001 | ** |
| $B^2$ | 19918.69 | 1.00 | 19918.69 | 257.19 | <0.0001 | ** |
| $C^2$ | 55350.61 | 1.00 | 55350.61 | 714.68 | <0.0001 | ** |
| 残差 | 542.13 | 7.00 | 77.45 | | | |
| 失拟项 | 217.20 | 3.00 | 72.40 | 0.89 | 0.5200 | |
| 绝对误差 | 324.93 | 4.00 | 81.23 | | | |

注: **表示差异极显著, $P$<0.01。

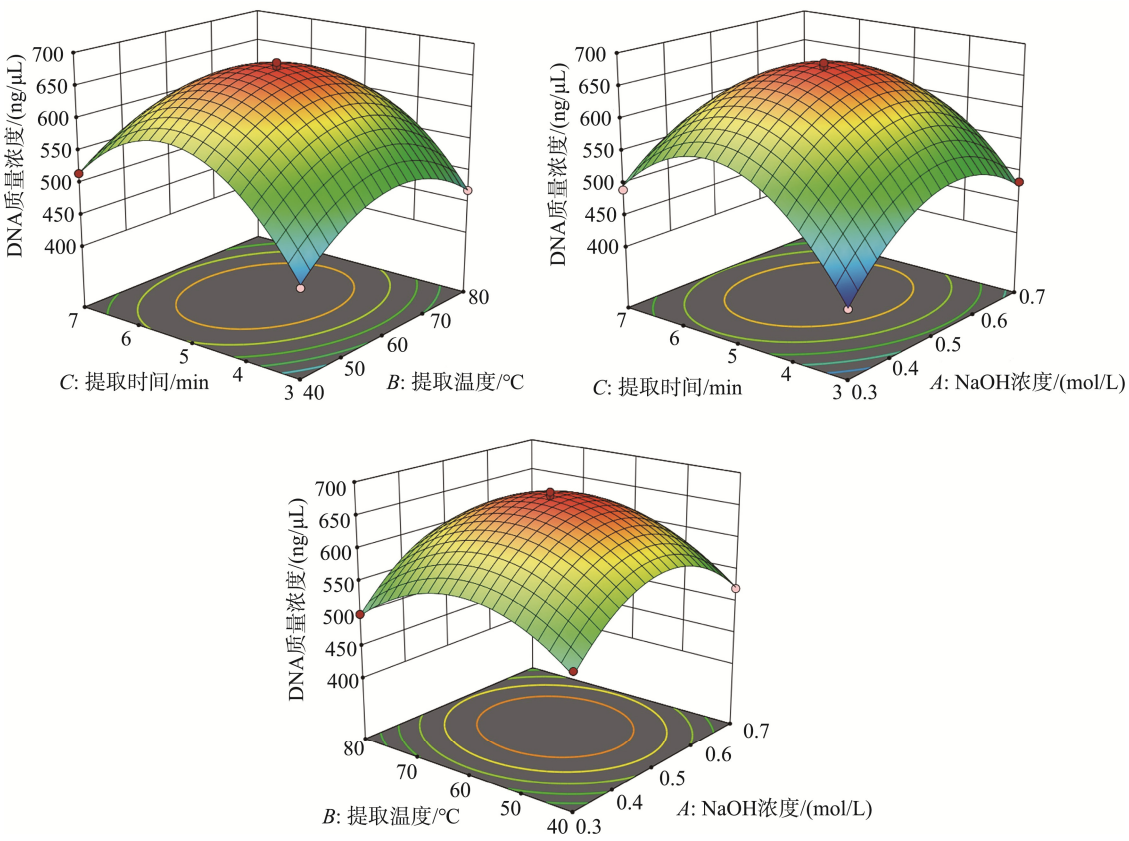



图 2　NaOH 浓度、提取温度和提取时间交互作用对 DNA 提取率的影响

Fig.2　Effects of NaOH concentration, extraction temperature and extraction time on DNA extraction yield

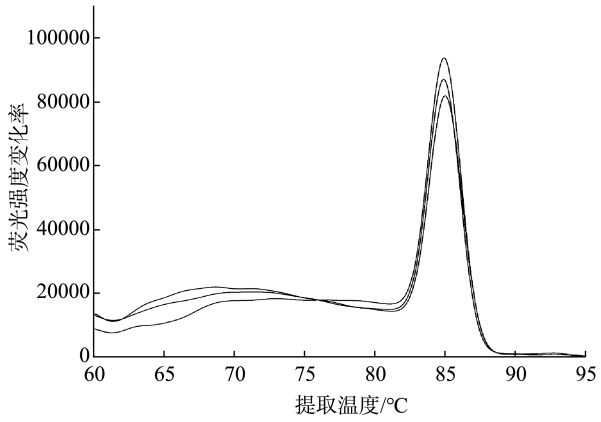



图 3　dRT-PCR 测定羊组织 DNA 的熔解曲线

Fig.3　Melting curve of sheep tissue DNA determined by dRT-PCR

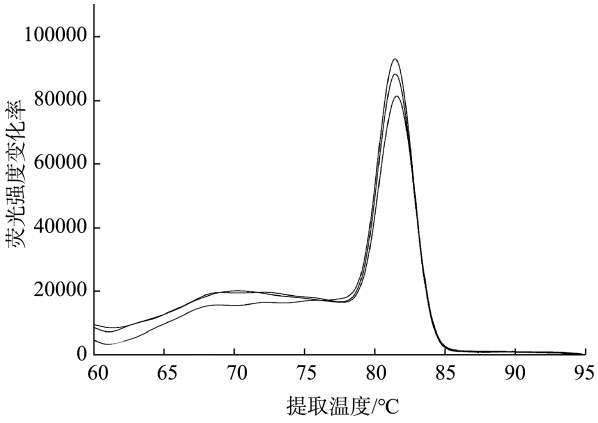



图 4　dRT-PCR 测定鸭组织 DNA 的熔解曲线

Fig.4　Melting curve of duck tissue DNA determined by dRT-PCR

## 2.4　方法特异性检测结果

扩增以 1:1 比例加入的羊鸭粗提 DNA 所产生的熔解曲线则在 84.79 ℃和 81.66 ℃同时出现两个峰，而扩增牛、猪、鸡、鱼等肉源 DNA 以及无模板时则未出现扩增曲线(图 5)，这表明了本方法对羊、鸭源 DNA 的特异性高，不受到其他干扰。

## 2.5　方法灵敏度检测结果

以稀释浓度的对数作为 $X$ 值，扩增产生的 CT 值作为 $Y$ 值作出回归曲线线性标准方程(图 6)为 $Y$=–344917$X$+20.575，决定系数为 $R^2$=0.9994。结果表明，鸭源成分的检出临界值为 0.01 ng/μL，标准曲线呈现良好的线性关系，图 7 中 81.66 ℃附近特异的熔解峰表明对鸭源 DNA 产生特异性扩增，证明该方法对粗提的鸭 DNA 的检

测灵敏度为 0.01 ng/μL, 可满足羊肉制品微量鸭源性掺假实际检测需求。

### 2.6 市售羊肉制品的检测结果

使用本研究建立的检测方法检测市售羊肉制品结果显示: 在某快餐店获取的 3 号羊肉制品在 81.66 ℃附近的熔解曲线产生了特征峰(图 8), 表明了鸭源成分的存在, 在 84.79 ℃附近不出现峰, 这表明在 3 号样品中没有检测到羊源成分。除了 3 号样品外, 其余的 9 个样品都在 84.79 ℃附近出现了特征峰, 这表明了羊源成分被检出。

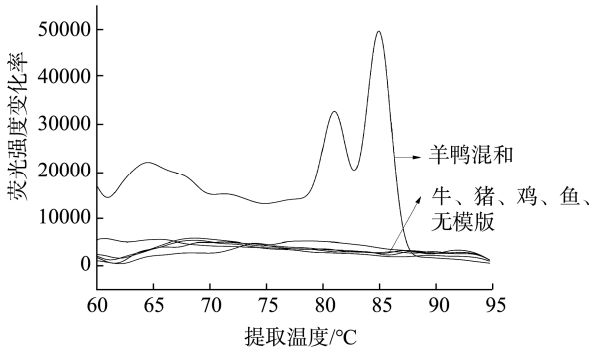



图 5 dRT-PCR 测定羊、鸭混合 DNA 以及其他 5 种肉样的熔解曲线

Fig.5 Melting curves of mixed sheep-duck DNA and DNA from other 5 kinds of meat samples determined by dRT-PCR

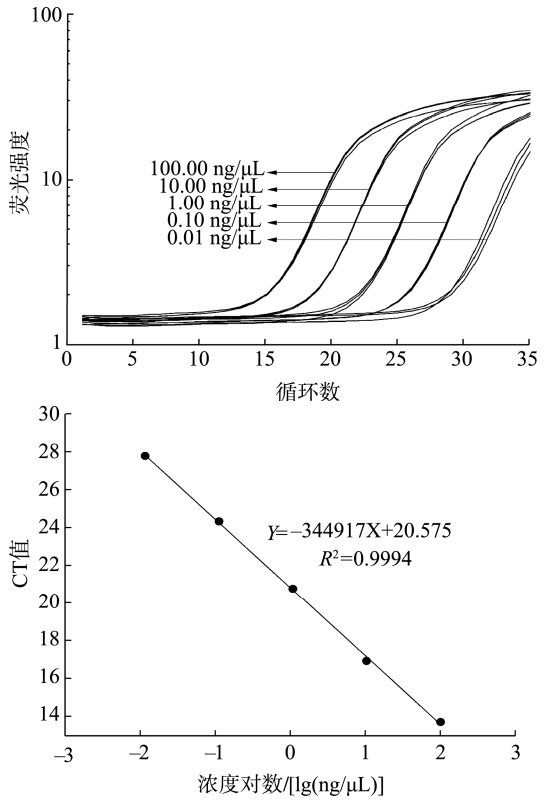



图 6 dRT-PCR 体系对鸭源 DNA 灵敏度检测

Fig.6 Sensitivity test of duck-derived DNA by dRT-PCR assay

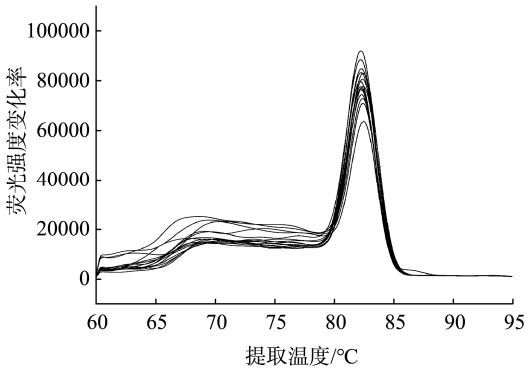



图 7 dRT-PCR 扩增不同浓度鸭源 DNA 产生的特征峰

Fig.7 Characteristic peaks generated by dRT-PCR amplification of duck-derived DNA at different concentrations

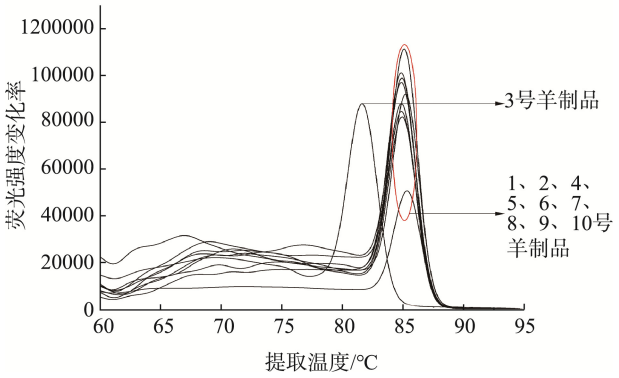



图 8 检测市售羊肉制品的熔解曲线

Fig.8 Melting curves of commercially available sheep products for detection

## 3 讨论与结论

本研究建立的 dRT-PCR 方法, 通过响应面法优化碱裂解法提取动物组织 DNA, 并基于物种线粒体基因设计特异性引物, 实现了羊肉制品中鸭源性成分的快速鉴定。

在 DNA 快速提取工艺优化方面, 本研究以 NaOH 浓度、提取温度、提取时间为关键变量, 通过 Box-Behnken 设计获得最佳提取条件(NaOH, 0.4 mol/L、46 ℃、4.5 min), 5 min 内即可获得 586 ng/μL 的 DNA 用于后续实验, 较传统酚-氯仿提取法以及试剂盒提取法(耗时 30 min 以上)效率显著提升[28–29]。方法对鸭成分 DNA 检出限为 0.01%, 可满足痕量掺假检测需求。探针法实时荧光 PCR 需要多出设计探针的一个步骤, 引物设计复杂, 合成探针昂贵[14], 本研究通过设计特异性的 dRT-PCR 引物, 在检测羊、鸭两种源性成分的同时, 不产生非特异性扩增。相较于其他研究, 本方法使用的粗提 DNA 的检出限与使用试剂盒提取 DNA 的检出限接近[30]。方法全程耗时小于 1 h, 成本仅涉及常规化学试剂与普通荧光 PCR 仪, 单个样品测试成本小于 1 元, 相比传统的检测掺假肉类方法相比[31], 检测时间与成本都

显著降低。对市售的羊肉制品的检测结果表明大部分的市售羊肉制品没有检测出鸭源成分, 只有 1 个在快餐店取样的羊肉制品检出了鸭源成分, 这也可能是菜品制作过程中肉类混杂所造成的检出。因此, 对于羊肉制品中的鸭源成分进行定量分析是后续研究工作的方向之一。

本研究建立的方法在时效性、灵敏度与成本方面优势显著。不仅为市场监管部门打击羊肉掺假行为提供了可靠的技术支撑, 也为其他肉类物种掺假鉴定方法的开发提供了参考思路。后续可进一步拓展引物设计范围, 实现对羊肉中猪、马等多种掺假肉类的同时检测; 同时探索该方法在深加工羊肉制品(如羊肉干、羊肉酱)中的适用性, 通过优化 DNA 提取缓冲液成分以消除加工过程中蛋白质、脂肪等杂质对 PCR 扩增的抑制, 进一步提升方法的实际应用价值。

## 参考文献


[1] 费雨婕, 许芳瑞, 廖锐, 等. 羊肉及其制品特征挥发性风味物质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(24): 201–207.
FEI YJ, XU FR, LIAO R, *et al*. Research progress on characteristic volatile flavor substances in mutton and its products [J]. Food Research and Development, 2023, 44(24): 201–207.

[2] 薛莉, 朱宁. 城镇居民家庭畜产品消费影响因素分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(5): 231–240.
XUE L, ZHU N. Analysis of influencing factors of livestock product consumption in urban households [J]. Journal of China Agricultural University, 2024, 29(5): 231–240.

[3] YANG YL, XU J, YU L. Spatiotemporal evolution and linkage analysis of mutton price in Xinjiang [J]. Journal of Systems Science and Information, 2024, 12(5): 667–689.

[4] HOSSAIN MAM, ZAINAL-ABIDIN SAS, BUJANG A, *et al*. TaqMan multiplex qPCR for detecting animal species in meat and meat products [J]. Food Control, 2023, 150: 109761.

[5] 邓霖. 熟制羊肉制品中鸭源性成分检测方法的建立及筛选[D]. 成都: 四川农业大学, 2023.
DENG L. Establishment and screening of detection methods for duck-derived components in cooked mutton products [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2023.

[6] WANG SC, FAN BB, HUANG ZT, *et al*. Development and application of a low-cost and portable multi-channel spectral detection system for mutton adulteration [J]. Biosystems Engineering, 2024, 247: 13–25.

[7] 孙珈立. 肉及肉制品真伪鉴别技术研究进展[J]. 食品安全导刊, 2024(17): 190–192.
SUN JL. Research progress in the authenticity identification technology of meat and meat products [J]. China Food Safety Magazine, 2024(17): 190–192.

[8] 谢海桃, 陈曦, 金净, 等. TaqMan 探针-实时荧光聚合酶链式反应技术检测羊肉卷中鸭源性成分及其相对含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(18): 274–281.
XIE HT, CHEN X, JIN J, *et al*. Determination of duck derived components and relative content in mutton rolls by TaqMan probe-real-time fluorescent polymerase chain reaction technique [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(18): 274–281.

[9] 翁琴云, 陈佳璐. 羊肉中五种动物源性成分能力验证检测与分析[J]. 质量安全与检验检测, 2025, 35(2): 69–73.
WENG QY, CHEN JL. Detection and analysis of proficiency testing for five animal-derived components in mutton [J]. Quality Safety Inspection and Testing, 2025, 35(2): 69–73.

[10] 柳海宾, 张海鑫, 宋腾飞, 等. 环介导等温扩增结合免疫层析试纸条快速检测羊肉及其制品中的鸭源成分[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 238–242, 251.
LIU HB, ZHANG HX, SONG TF, *et al*. Rapid detection of duck-derived components in mutton and mutton products by loop-mediated isothermal amplification combined with immunochromatographic test strip [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 238–242, 251.

[11] RAGUCCI S, LANDI N, DI-MARO A. Myoglobin as a molecular biomarker for meat authentication and traceability [J]. Food Chemistry, 2024, 458: 140326.

[12] LI YJ, LIU JJ, FAN SF, *et al*. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay for beef and lamb contents in cooked meat [J]. Journal of Future Foods, 2024, 4(11): 91–96.

[13] EDWARDS K, MANLEY M, HOFFMAN LC, *et al*. Non-destructive spectroscopic and imaging techniques for the detection of processed meat fraud [J]. Foods, 2021, 10(2): 448.

[14] 许文娟, 赵晗, 孔彩霞, 等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类工业, 2021(7): 44–49.
XU WJ, ZHAO H, KONG CX, *et al*. Research progress on adulterant identification technology of meat and meat products [J]. Meat Industry, 2021(7): 44–49.

[15] 黄昌全. 基于电子鼻的肉类掺假定量检测方法研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2022.
HUANG CQ. Study on quantitative detection method of adulterated meat based on electronic nose [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2022.

[16] 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.

[17] XING RR, HU RR, HAN JX, *et al*. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: A case study involving the Chinese market [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125653.

[18] 邵博宇, 徐宁, 迟凯月. 基于多重 PCR 定性鉴别鹿肉掺假[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 281–287.
SHAO BY, XU N, CHI KY. Qualitative identification of venison adulteration based on multiplex PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(24): 281–287.

[19] LIU WW, WANG XA, TAO J, *et al*. A multiplex PCR assay mediated by universal primers for the detection of adulterated meat in mutton [J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(2): 325–330.

[20] 任瑞娟. 实时荧光定量 PCR 技术在食品检测中的应用进展[J]. 中国食品, 2024(18): 79–81.
REN RJ. Application progress of quantitative real-time PCR technology in food detection [J]. China Food, 2024(18): 79–81.

[21] 杨冬燕, 杨永存, 李浩, 等. 双重 PCR 鉴别牛、羊肉掺假[J]. 中国卫生

检验杂志, 2014, 24(23): 3379–3382
YANG DY, YANG YC, LI H, *et al*. Identification of adulteration in mutton and cattle by duplex PCR [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(23): 3379–3382.

[22] 李婷婷, 张桂兰, 王之莹, 等. 羊肉掺假鉴别快速荧光定量 PCR 芯片制备及应用研究[J]. 生物技术进展, 2018, 8(6): 522–529
LI TT, ZHANG GL, WANG ZY, *et al*. Chip preparation and application research with real-time PCR for rapid identification of mutton adulteration [J]. Current Biotechnology, 2018, 8(6): 522–529.

[23] 李婷婷, 张桂兰, 王之莹, 等. 快速提取肉类基因组 DNA 的裂解液的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(17): 4755–4758.
LI TT, ZHANG GL, WANG ZY, *et al*. Study on rapid extraction lysate of meat genomic DNA [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(17): 4755–4758.

[24] LI JC, LI JP, 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.

[25] 李爱强, 赵兴春, 张艳霞, 等. 生物检材 DNA 碱性裂解提取法的优化与改良[J]. 中国法医学杂志, 2011, 26(4): 301–304.
LI AIQ, ZHAO XC, ZHANG YX, *et al*. Optimization and improvement of the alkaline lysis method for the extraction of DNA from forensic biological samples [J]. Chinese Journal of Forensic Sciences, 2011, 26(4): 301–304.

[26] BIVEHED E, HELLMAN B, FAN Y, *et al*. Dna integrity under alkaline conditions: An investigation of factors affecting the comet assay [J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2023, 891: 503680.

[27] HAO RJ, LI XY, WANG N, *et al*. Optimized plasmid extraction through controlled temperature, prolonged alkaline lysis, and gentle mixing [J]. Journal of Chromatography B, 2025, 1262: 124646.

[28] GIRISH PS, BARBUDHE SB, KUMARI A, *et al*. Rapid detection of pork using alkaline lysis-loop mediated isothermal amplification (AL-LAMP) technique [J]. Food Control, 2022, 110: 107015.

[29] 余卉茹, 纪艺, 彭城. 肉类掺假检测技术研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 213–221.
YU HR, JI Y, PENG C. Research progress on detection technology of meat adulteration [J]. Current Biotechnology, 2022, 12(2): 213–221.

[30] 张从党, 王均华, 吴海晶, 等. 鸭血制品中猪、鸡、鸭源性成分的多重实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法建立与应用[J]. 肉类研究, 2026, 40(3): 62–68.
ZHANG CD, WANG JH, WU HJ, *et al*. Establishment and application of multiplex real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction for detection of porcine, chicken and duck derived components in duck blood products [J]. Meat Research, 2026, 40(3): 62–68.

[31] THANAKIATKRAI P, KITPIPIT T. Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting [J]. Food Chemistry, 2017, 233: 144–150.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)