DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260311001
引用格式: 段庆梓, 尚柯, 任缘, 等. 12 种动物源性成分检测方法的建立及标准样品研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(14): 51–59.
Duan Qingzi, Shang Ke, Ren Yuan, et al. Establishment of detection methods for 12 kinds of animal-derived ingredients and development of reference materials [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(14): 51–59. (in Chinese with English abstract).

12 种动物源性成分检测方法的建立及标准样品研制

段庆梓[1,2,3], 尚 柯[1,2,3], 任 缘[1,2,3], 王 巍[1,2,3], 朱 宏[1,2,3], 陈蕾蕾[4], 张 敏[1,2,3], 陈代伟[1,2,3], 王 义[1,2,3], 赵红阳[1,2,3*]

[1. 成都市食品检验研究院, 成都 611130; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室(新食品原料监测与评价), 成都 611130; 3. 国家市场监督管理总局重点实验室(营养与健康化学计量及应用), 北京 100029; 4. 山东省农业科学院农产品加工与营养研究所, 济南 250100]

摘 要: 目的 建立一种可同时检测食品中猪、黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、鸡、鸭、鹅、驴、马、兔 12 种动物源性成分的高通量实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)方法, 并研制相应的标准样品。**方法** 以各动物源性成分的特异性靶基因构建引物和探针及反应体系, 评价其灵敏度、特异性, 同时研制相应的标准样品。**结果** 本研究构建的一套可同时检测 12 种动物源性成分的 qPCR 方法; 灵敏度均可达 0.01 ng/μL, 除相应源性成分外其他物种无扩增现象, 特异性良好; 该方法对生鲜肉中的不同源性成分的检出限为 0.1%。配套研制的标准样品, 均匀性和稳定性良好, 特性值为相应动物源性成分阳性, –18 ℃条件下冷冻有效期可达 36 个月。**结论** 本研究建立的方法具有特异性好、灵敏度高, 可有效提升检测效率, 降低检测成本; 制备的标准样品能够满足标准样品的要求, 可用于检测全程的质量保证等预期用途。

关键词: 肉及肉制品; 动物源性成分; 实时荧光定量聚合酶链式反应法; 标准样品
中图分类号: TS207.3 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)14–0051–09

Establishment of detection methods for 12 kinds of animal-derived ingredients and development of reference materials

DUAN Qing-Zi[1,2,3], SHANG Ke[1,2,3], REN Yuan[1,2,3], WANG Wei[1,2,3], ZHU Hong[1,2,3], CHEN Lei-Lei[4], ZHANG Min[1,2,3], CHEN Dai-Wei[1,2,3], WANG Yi[1,2,3], ZHAO Hong-Yang[1,2,3*]

(1. *Chengdu Institute of Food Inspection*, *Chengdu* 611130, *China*; 2. *Key Laboratory of Monitoring and Assessment on Novel Food Raw Materials*, *State Administration for Market Regulation*, *Chengdu* 611130, *China*; 3. *Key Laboratory of Chemical Metrology and Applications on Nutrition and Health*, *State Administration for Market Regulation*, *Beijing* 100029, *China*; 4. *Institute of Food & Nutrition Science and Technology*, *Shandong Academy of Agricultural Science*, *Ji'nan* 250100, *China*)

收稿日期: 2026-03-11
基金项目: 四川省科技计划项目(2024YFFK0431)
第一作者: 段庆梓(1984—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品真实性检测及方法开发。E-mail: dqzcell@163.com
***通信作者:** 赵红阳(1987—), 女, 副研究员, 主要研究方向为食品检测质量保证及标准物质/标准样品研发。E-mail: zhy8707@163.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous detection of 12 kinds of animal-derived ingredients in food, including *Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Bubalus bubalis*, *Bos grunniens*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos*, *Anser cygnoides*, *Equus asinus*, *Equus caballus*, *Oryctolagus cuniculus* by high-throughput quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), and develop corresponding reference materials. **Methods** Primers, probes and reaction system were designed based on specific target genes of each animal-derived ingredient. The sensitivity and specificity of the method were evaluated. Concurrently, corresponding reference materials were developed. **Results** A qPCR system for the simultaneous detection of 12 kinds of animal-derived ingredients was successfully established. The sensitivity for each ingredient was 0.01 ng/μL, and no amplification was observed in non-target species, demonstrating good specificity. The limit of detection of this method for different animal-derived components in fresh meat was 0.1%. The developed reference materials exhibited good homogeneity and stability, with the assigned value being positive for the corresponding animal-derived ingredients. The shelf life under frozen conditions at –18 °C is up to 36 months. **Conclusion** The established method exhibits good specificity and high sensitivity, effectively improving detection efficiency and reducing costs. The prepared reference materials meet the requirements for reference materials and can be used for intended purposes such as quality assurance throughout the detection process.

KEY WORDS: meat and meat products; animal-derived ingredients; quantitative real-time polymerase chain reaction; reference material

0 引 言

肉类作为人类膳食中重要的蛋白质来源，其真实性与安全性一直备受关注。受经济利益驱动，长期以来肉类产品中物种掺假、以次充好的现象屡见不鲜[1–6]，成为严峻的食品安全问题。这些行为不仅侵犯消费者权益，还可能引发过敏或未知的公共卫生风险[7–10]。因此，建立高效、准确的肉类源性成分检测技术，对加强肉制品质量监管、保障食品安全及维护市场公平具有重要意义。

近年来，肉类源性成分的检测技术主要分为基于核酸、蛋白质和光谱/质谱的分析方法[11–17]。基于核酸分析的实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)技术，因具有高灵敏度与强特异性且兼具定性与定量能力，成为了肉类源性成分检测的重要工具[18–23]。国家市场监督管理总局于 2019 年 1 月发布了 BJS 201904《食品中多种动物源性成分检测实时荧光 PCR 法》文件，适用于肉及肉制品中 6 种动物源性成分鉴定[24]；GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》尽管覆盖了大多数常见畜禽动物种类，但缺少马、驴两种源性成分的检测。为进一步优化检测效率和成本，满足国内外对多重 PCR 检测日益增长的需求，本研究拟建立一套覆盖 12 种常见肉类动物源性成分的多重实时荧光 PCR 方法，从而显著提升检测效率、覆盖范围与鉴定可靠性。

适用于多物种源性成分鉴定用标准样品的缺失，是制约方法标准化推广应用的关键因素[25–27]。为确保相关方法的正确实施和检测结果准确可靠，需要配套研制多种动物源性成分标准样品，以满足多种动物源性成分质量控制的需求，为检测实验室的方法验证、质量控制等提供有效的技术手段[28–30]。为此，本研究通过开发高通量动物源性肉类物种鉴定实时荧光定量法(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)与配套标准样品，旨在为肉制品源性成分检测及掺伪鉴别提供一套高效、准确、可标准化的技术解决方案，以助力食品安全监管与产业规范发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪、黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、鸡、鸭、鹅、驴、马、兔、海狸鼠、大鼠、小鼠、竹鼠、豚鼠、猫、狗、貂、鸽子、鹌鹑、草鱼和鲢鱼为市售生鲜肉，并经测序比对确认后备用。

细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司)；PCR 反应预混液(北京全式金生物技术股份有限公司)；测序引物、探针[生工生物工程(上海)有限公司]；无水乙醇(分析纯，广东光华科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

BSA223S 型电子天平[精度 1 mg，赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]；5427R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司)；DK-420 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司)；P330 核酸蛋白仪(德国 IMPLEN 公司)；CFX96 实时荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)；ZB600-2S 深凹型双室真空包装机(上海至奔包装机械有限公司)；S3-LA166(S)绞肉机(九阳股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理及 DNA 提取

使用无核酸污染的一次性刀片分别取 1.1 中经确认的 24 个物种的新鲜肌肉组织各 0.1 g，置于 2 mL 离心管中，

加入 500 μL 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethy lammonium bromide, CTAB)裂解液和 20 μL 蛋白酶 K, 振荡混匀, 60 ℃孵育 1~2 h, 期间每隔 10 min 振荡混匀; 待样品完全裂解后, 根据动物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取样品 DNA, –20 ℃保存备用。同法提取阳性对照、阴性对照及空白对照。

1.3.2　引物探针的设计与合成

本研究以线粒体基因中的细胞色素 b (cytochrome b, *cytb*)基因为物种鉴别的主要靶基因序列, 选择 Genbank 数据库中各物种信息作为基因比对序列, 运用生物学软件(MegAlign)进行序列比对分析。利用生物学软件(Primer Premier 5)对 1.3.1 中所述源性成分的上、下游引物和探针, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。各物种的基因登记号及引物探针序列见表 1。

表 1　各物种基因登记号及引物序列

Table 1　Gene registration numbers and primer sequences of various species

检测源性	登记号	引物与探针序列(5'-3')	扩增长度/bp
黄牛	MH714783.1	F: GTACT AGCCC TAGCC TTCTC T R: CAATA GGTCT GCTAC TAGGG C P: FAM-ATTCT TGCTC TAATC CCCCT ACTAC ACACC-BHQ1	129
水牛	MT182642.1	F: AGGGG TTCTA GCCCT AGTTC R: CTGAA TGGCC GGAAC ATCAT A P: FAM-CCTCA TTCTC ATGCC CCTGC TACAT ACAT-BHQ1	96
马	JF511458.1	F: TCAGG AATCC CATCC GATAT G R: CCGAG TTAGT AGGAG CAAGA TC P: FAM-CCCAT TCCAC CCATA TTATA CAATT AAAGA C-BHQ1	102
兔	AY292717.1	F: GAGTC CTGGC TCTGG TCCTA R: ATGGG TCGGA ATATC CTGCT A P: FAM-CCTTG TTCTA GCCTT CATCC CATTC CTTCA-BHQ1	91
鸡	KF954727.1	F: AGTAA TCCTC CTCCT CACAC TC R: GGTTT GTGAT AACGG TGGCC P: FAM-CACCG CCTTT GTGGG CTATG TTCTC C-BHQ1	98
鸭	EU755252.1	F: CTTCG CCATT CACTT CCTAC TA R: ATTTT GTCAC AGTCT GATAC AAGA P: FAM-TTTAA TCGCA GGAAT CACCC TAGTC CACTT-BHQ1	120
鹅	AY552163.1	F: TACAC CGCAG ACACT TCACT C R: GCAGA TAAAG AAGAG CGAAG CA P: FAM-CATGC CGAGA CGTCC AGTAC GGATG GC-BHQ1	117
猪	X56295.1	F: GCACT TTATC CTGCC ATTCA TCATT R: GTACA AGGAT TAGTA GGATT AGT P: FAM-CGCCC TCGCA GCCGT ACATC TCCTA-BHQ1	188
牦牛	AB542193.1	F: AACTT CGGCT CCATA GTAGG AGTA R: CGTCT CGGCA GATAT GGAC A P: FAM-CGGAG GAGAA TGCTG TTGTT GTATC GGAT GT-BHQ1	124
驴	JF718884.1	F: GCTAG CCTCA TTATC AGTAT R: GTGAT GAGGA TACGT GCT P: FAM-TCATA TCATC AATCC TCAAC ACCCA CA-BHQ1	82
山羊	EU130780.1	F: CTTTA TCCTC CCATT CATCA TCA R: GAATT CCTGT GGGGT TGTTC P: FAM-GCTCT CGCCA TAGTC CACCT GCTTT TC-BHQ1	89
绵羊	MW677369.1	F: CTCAT GCTAC TAGTA CTATT TACG R: GTACG CGAAT AGGAA GTATC AT P: FAM-TGACT TACTC GGAGA CCCAG ACAAC TACAC-BHQ1	120

注: F: 上游引物, R: 下游引物, P: 探针。

1.3.3 检测方法建立

(1)反应体系及条件

各源性成分 PCR 扩增均采用 25 μL 的反应体系: PCR 反应预混液(2×) 12.5 μL, 5'端、3'端引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 探针(10 μmol/L) 0.5 μL, DNA 模板(1~100 ng/μL) 2 μL, 用无菌双蒸水补足 25 μL。每个样品设置 2 个平行反应体系。PCR 扩增反应程序: 95 ℃ 3 min; 依据现行有效的 GB/T 38164—2019 和 BJS 201904 等相关国家标准或补充检验方法, 设定为 35 个循环(95 ℃ 15 s, 58 ℃ 1 min, 收集荧光)。

(2)灵敏度与特异性

对模板 DNA 进行倍比稀释, 作为反应模板进行扩增, 确定模板 DNA 浓度范围与 Ct 值的线性关系。模板 DNA 浓度设定: 10^{1}、10^{0}、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} ng/μL。每种源性成分重复测试 3 次。参照 RB/T 032—2020《基因扩增检测方法确认与验证指南》的要求, 各源性成分的标准曲线斜率应在–3.6 到–3.1 之间, 即扩增效率在 90%~110%。各源性成分线性范围内的决定系数(r^2) > 0.98。当扩增效率在 90%~110%之间时, 可满足检测要求, 并建立本方法的判定原则。

参照 GB/T 35918—2018《动物制品中动物源性检测基因条码技术 Sanger 测序法》, 提取不同物种源性 DNA 作为特异性试验的 DNA 模板, 用建立的实时荧光 PCR 方法进行试验, 评价各目标源性的特异性。检验过程采用含目标物种源性的 DNA 作为阳性对照, 不含目标物种源性的 DNA 作为阴性对照, 双蒸水(ddH_2O)作为空白对照。

(3)检出限

将待测目标物添加到非目标物的肌肉组织中充分混匀, 制成各源性成分含量为 1.00%、0.10%和 0.01%的样品, 每个检出限样品取不同点位各 0.1 g 提取基因组 DNA, 作为检测模板, 利用 1.3.3(1)中建立的 PCR 反应体系对各源性成分不同含量的样品进行检测。若 Ct 值小于等于 30.0, 则说明对应的源性成分含量下能准确检测, 即可确定其检出限。

1.3.4 多种动物源性成分标准样品制备

使用无核酸污染的一次性刀片剔除经确认的各原料肉中脂肪和筋膜, 仅取肌肉组织。将肌肉组织分别通过全新且专用的小型绞肉机进行绞碎, 制成均匀的肉糜。制备的肉糜按照质量比 1:1 进行混合, 充分搅拌均匀。分装到全新经确认的铝塑袋中, 2 g/袋, 抽真空密封包装, 共制备 500 份, –18 ℃冷冻储存。

1.3.5 样品均匀性和稳定性研究

(1)样品均匀性

按照 GB/T 15000.3—2023《标准样品工作导则 第 3 部分: 标准样品 定值和均匀性与稳定性评估》的要求, 采用随机数生成软件生成 10 个随机整数, 抽取相应编号的 10 个样品; 采用建立的方法对样品进行各源性成分检测, 每个样品重复检测 2 次。依据检测方法对检测结果进行判定是否检出对应肉类源性成分; 同时采用单因素方差分析对上述样品检测的 Ct 值进行分析, 根据自由度($f1$, $f2$)及给定的显著性水平 α (α=0.05), 查 F 表得到临界的 $F\alpha$ 值, 若 $F<F\alpha$, 则表明样品内和样品间无显著性差异, 样品是均匀的。

(2)长期稳定性

依次在 1、6、12、18、24、30、36 个月共 7 个时间点从保存的样品中随机抽取 3 份样品进行检测, 每个样品重复检测 2 次。由于样品中所有源性成分的性质一致, 故选择猪、牛、羊 3 种源性成分进行稳定性研究。检测方法和测试要求同均匀性检测; 依据检测方法对检测结果进行判定是否检出对应源性成分; Ct 值采用直线经验模型的趋势分析法进行评估, 若$|b_1|<t_{(0.05,n-2)}\times s(b_1)$, 则表明斜率不显著, 未观察到不稳定性, 样品是稳定的。

(3)短期稳定性

储存温度(–18 ℃)作为参考条件, 选择 25 ℃和 50 ℃温度点分别模拟样品运输的常温和高温条件; 在 25 ℃条件下, 分别在 1、7、15、30 d 时每天检测 3 份样品; 在 50 ℃条件下, 分别在 1、5、7、15 d 时每天检测 3 份样品。检测方法及分析方法与长期稳定性相同。

1.3.6 样品定值

参考 GB/T 15000.3—2023 的内容, 定值方式采用 8 家有能力的实验室联合定值, 向每个实验室发送 3 份样品, 依据建立的方法进行检测, 每个样品独立检测 3 次。结果依据所建立的方法进行判定。

1.4 数据处理

所有样品的检测结果由仪器软件(Bio-Rad CFX Manager 3.0)自动生成; 所有测序结果与美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)利用基于局部比对算法的搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行比对, 确定同源性; 灵敏度、特异性和检出限研究实验数据利用 Excel 2021 进行计算并绘图; 均匀性和稳定性研究采用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行数据分析计算。

2 结果与分析

2.1 灵敏度研究结果

灵敏度研究结果见表 2 和图 1。结果显示, 在 Ct 值小于等于 30 时, 不同源性成分的检测灵敏度均有典型扩增曲线, 其中驴源性成分的检测灵敏度可达到 10^{-3} ng/μL, 其他 11 种源性成分的检测灵敏度可达 10^{-2} ng/μL, 能够满

足方法对样品 DNA 浓度的要求。本方法在线性范围内均有良好的线性关系，决定系数(r^2)均大于 0.98；在线性范围内，各源性成分检测的扩增效率均在 90%~110%之间，灵敏度均可达 10^{-2} ng/μL，能够满足检测要求。

2.2　方法特异性研究结果

对各物种的测序比对结果见表 3，结果显示用于特异性试验的动物源性成分样品均为单一源性，且为相应源性成分的目标物种。方法特异性研究结果见图 2。结果显示，猪、黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、鸡、鸭、鹅、驴、马、兔源性成分均有典型扩增曲线，表明含有相应源性成分；而非目标源性成分均未出现荧光扩增曲线或Ct值大于等于 35.0。该结果表明不同源性成分的引物、探针特异性满足要求，对常见和近缘物种源性的特异性试验符合预期用途，方法的特异性能够满足检测要求。

表 2　不同源性成分灵敏度研究分析结果

Table 2　Sensitivity study and analysis results of components from different origins

源性成分	线性范围 /(ng/μL)	相关系数 (r^2)	扩增效率/%	灵敏度 /(ng/μL)
猪	10^{-3}~10^{1}	0.999	97.8	10^{-2}
黄牛	10^{-3}~10^{1}	0.993	98.4	10^{-2}
水牛	10^{-3}~10^{1}	0.997	97.6	10^{-2}
牦牛	10^{-3}~10^{1}	0.994	98.4	10^{-2}
山羊	10^{-4}~10^{1}	0.999	99.9	10^{-2}
绵羊	10^{-4}~10^{1}	0.998	105.5	10^{-2}
鸡	10^{-4}~10^{1}	0.994	102.7	10^{-2}
鸭	10^{-4}~10^{1}	0.999	101.1	10^{-2}
鹅	10^{-4}~10^{1}	0.998	101.1	10^{-2}
驴	10^{-4}~10^{1}	0.997	103.0	10^{-3}
马	10^{-3}~10^{1}	0.998	100.5	10^{-2}
兔	10^{-4}~10^{1}	0.997	105.2	10^{-2}

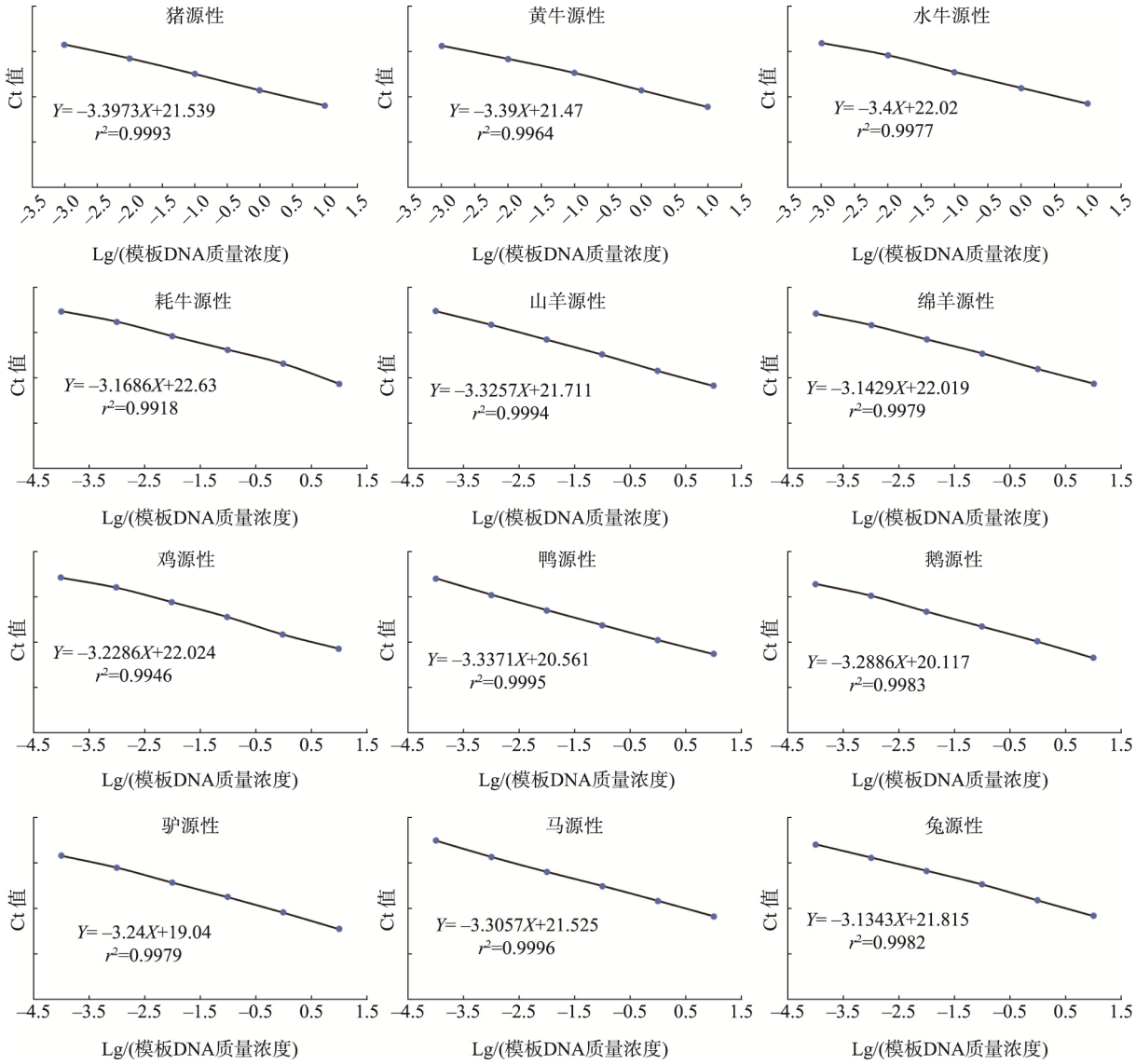


图 1　不同源性成分灵敏度检测扩增曲线及线性关系

Fig.1　Amplification curves and linear relationship of sensitivity detection for components of different origins

表 3 特异性试验样品测序比对结果

Table 3 Sequencing alignment results of specificity test samples

样品名称	匹配序列号	比对物种	样品名称	匹配序列号	比对物种
猪	KT279760.1	*Sus scrofa*	海狸鼠	JF318985.1	*Myocastor coypus*
黄牛	KU891850.1	*Bos taurus*	大鼠	KT279110.1	*Rattus norvegicus*
水牛	KR009128.1	*Bubalus bubalis*	小鼠	AP014941.1	*Mus musculus*
牦牛	KX232527.1	*Bos grunniens*	豚鼠	KJ742649.1	*Myoprocta acouchy*
山羊	KJ789954.1	*Capra hircus*	竹鼠	KC789518.1	*Rhizomys pruinosus*
绵羊	KF677301.1	*Ovis aries*	猫	KT626623.1	*Felis catus*
鸡	KX534431.1	*Gallus gallus*	狗	KU253531.1	*Canis lupus familiaris*
鸭	EU755252.1	*Anas platyrhynchos*	貂	MT888755.1	*Neogale vison*
鹅	KU211647.1	*Anser cygnoides*	鸽子	KC811463.1	*Columba livia*
驴	JX312730.1	*Equus hemionus*	鹌鹑	KX712089.1	*Coturnix japonica*
马	KT757742.1	*Equus caballus*	草鱼	MN923203.1	*Ctenopharyngodon idella*
兔	KT626640.1	*Oryctolagus cuniculus*	鲢鱼	MT002870.1	*Hypophthalmichthys molitrix*

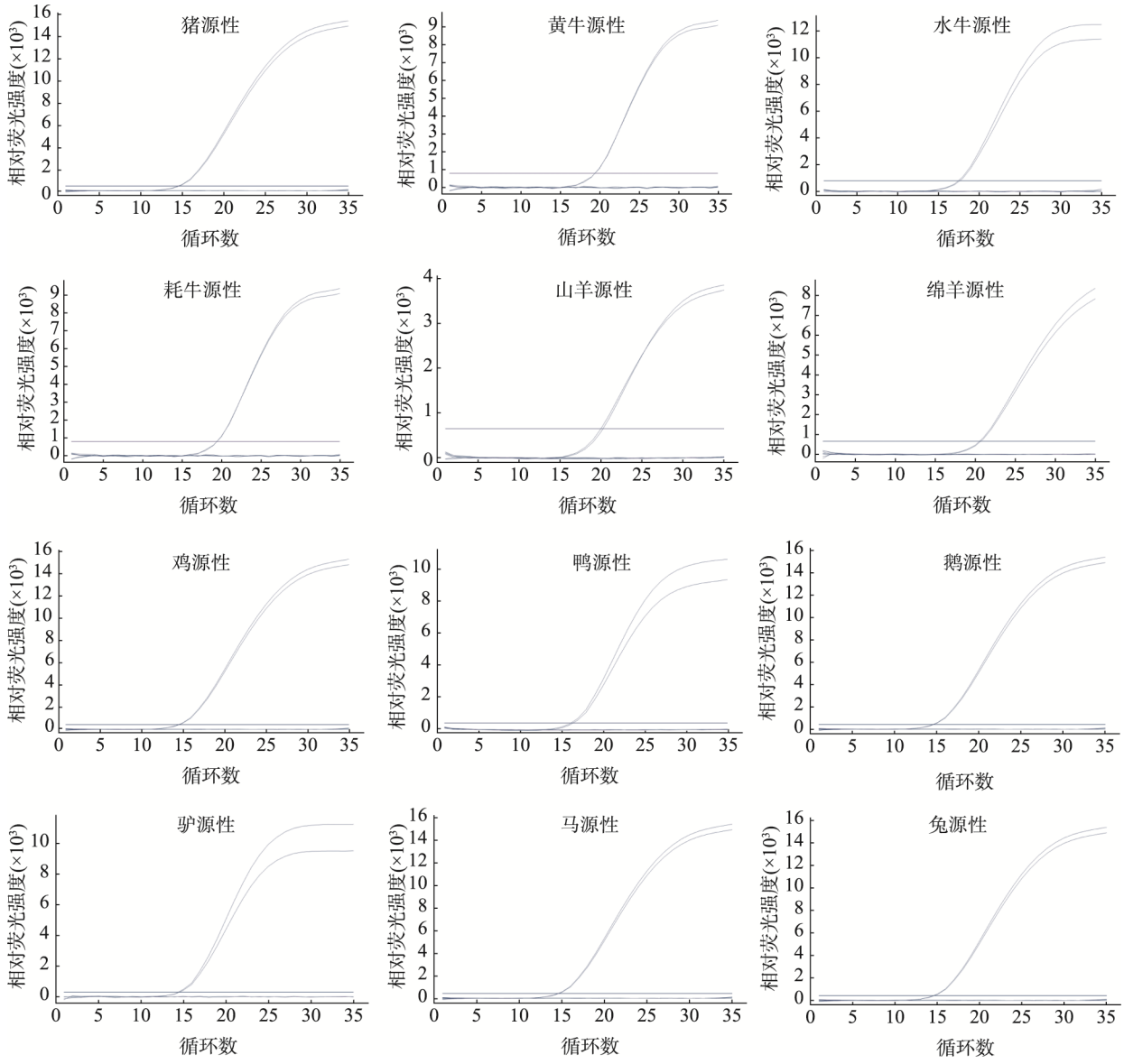


图 2 不同源性成分特异性扩增曲线

Fig.2 Specific amplification curves of different homologous components

2.3　检出限研究结果

各源性成分检出限研究结果见表 4。结果表明, 所有源性成分在 1.00%、0.10%含量时 Ct 值均在 23.47~29.09 之间, 均小于 30.0, 说明在该含量时能够对各目标源性成分进行准确检测。因此根据结果确定本方法对生鲜肉中不同源性成分的最低检出限为 0.1%。由上述实验结果可知, 本研究构建的 12 种动物源性成分的检测方法特异性强、灵敏度高, 可满足实际检测对准确性、稳定性及高效性的要求。

2.4　样品均匀性研究分析

样品经实时荧光 PCR 检测结果可知, 所有样品检测结果均检出相应源性成分; 检测结果 Ct 值方差分析结果见表 5。结果表明, 所有源性成分的 F 均小于 $F_{临界}$, 说明样品内和样品间的检测结果无显著性差异, 样品是均匀的。

表 4　不同源性成分生鲜肉混合肉样检出限

Table 4　Limits of detection of mixed fresh meat samples with different source components

目标源性	结果平均值(Ct 值)			目标源性	结果平均值(Ct 值)		
	1.00%	0.10%	0.01%		1.00%	0.10%	0.01%
猪	24.80	28.04	31.15	兔	25.24	28.26	31.80
黄牛	25.22	28.57	31.79	鸭	23.47	26.63	30.00
水牛	25.47	28.60	32.15	鹅	23.74	26.80	30.44
牦牛	25.38	28.51	31.30	鸡	25.33	28.45	31.54
山羊	24.70	27.76	31.12	马	24.39	27.53	31.07
绵羊	26.05	29.09	32.64	驴	23.55	27.41	31.07

表 5　标准样品均匀性研究分析结果

Table 5　Analysis results of the homogeneity study of standard samples

目标源性	变差源	平方和	均方	F	目标源性	变差源	平方和	均方	F
牦牛	组间	2.87582	0.31954	1.10	鸡	组间	5.67071	0.63008	1.51
	组内	2.90760	0.29076			组内	4.18355	0.41836	
黄牛	组间	3.30349	0.36705	1.19	鸭	组间	6.51638	0.72404	1.42
	组内	3.08285	0.30829			组内	5.11560	0.51156	
水牛	组间	3.63520	0.40391	1.11	鹅	组间	6.86156	0.76240	1.44
	组内	3.62630	0.36263			组内	5.28850	0.52885	
山羊	组间	5.52648	0.61405	1.28	兔	组间	6.08656	0.67628	1.38
	组内	4.80610	0.48061			组内	4.89590	0.48959	
绵羊	组间	6.75592	0.75066	1.16	马	组间	11.94754	1.32750	1.53
	组内	6.46430	0.64643			组内	8.67600	0.86760	
猪	组间	4.33043	0.48116	1.10	驴	组间	5.97297	0.66366	1.91
	组内	4.36135	0.43614			组内	3.47165	0.34717	

注: 组间自由度 9, 组内自由度为 10; $F_{临界}$为 3.02; 置信概率为 95%。

2.5　样品稳定性研究结果分析

2.5.1　长期稳定性研究结果

所有样品的检测结果 Ct 值均在 24.00~26.00 之间, 均小于 30, 即检测结果均为检出相应源性成分。检测结果 Ct 值采用直线经验模型进行统计分析, 分析结果见表 6。结果表明, 样品储存 36 个月的检测结果的斜率$|b_1|$均小于 $t_{(0.05,n-2)}\times s(b_1)$, 说明未见明显变化趋势, 未观测到不稳定性, 即在 36 个月时间内样品稳定性良好。

2.5.2　短期稳定性研究结果

所有样品检测结果 Ct 值在 24.00~26.00 之间, 均小于

表 6　标准样品长期稳定性检验方差分析结果

Table 6　Analysis of variance results for long-term stability test of reference material

参数	分析结果		
	猪	牛	羊
斜率 b_1	0.0051	–0.0016	0.0012
截距 b_0	24.4538	24.5896	24.5467
标准偏差 s	0.134	0.150	0.091
与斜率相关的不确定度 $s(b_1)$	0.0043	0.0048	0.0029
$t_{(0.05,n-2)}$	2.571	2.571	2.571

30, 即检测结果均为检出相应源性成分。检测结果 Ct 值采用直线经验模型进行统计分析, 分析结果见表 7。结果表明, 在 25 ℃条件下 30 d、50 ℃条件下 15 d 的模拟运输条件下检测结果的斜率$|b_1|$均小于 $t_{(0.05,n-2)}\times s(b_1)$, 说明未见明显变化趋势, 未观测到不稳定性, 样品可在上述条件下运输。

表 7 标准样品短期稳定性检验方差分析结果

Table 7 Analysis of variance results for short-term stability test of reference material

参数	25 ℃分析结果			50 ℃分析结果		
	猪	牛	羊	猪	牛	羊
斜率 b_1	–0.0040	0.0007	0.0012	0.0081	0.0169	0.0177
截距 b_0	25.1004	24.9165	25.1210	24.9164	24.7674	24.7492
标准偏差 s	0.103	0.192	0.164	0.153	0.274	0.288
与斜率相关的不确定度 $s(b_1)$	0.0047	0.0088	0.0075	0.0095	0.0170	0.0178
$t_{(0.05,\,n-2)}$	4.303	4.303	4.303	4.303	4.303	4.303

2.6 定值结果分析

经 8 家定值实验室检测, 样品检测结果的 Ct 值平均值及判定结果见表 8。结果表明, 所有源性成分的检测结果 Ct 值均在 24~26 之间, 均检出对应源性成分, 即各源性成分阳性。

表 8 参加定值实验室及结果汇总

Table 8 Participating value-assignment laboratories and summary of results

检测项目	Ct 值平均值	检测结果	检测项目	Ct 值平均值	检测结果
牦牛	24.47	检出	鸡	25.05	检出
黄牛	24.65	检出	鸭	25.15	检出
水牛	24.80	检出	鹅	25.23	检出
山羊	25.05	检出	兔	24.90	检出
绵羊	24.83	检出	马	25.49	检出
猪	24.96	检出	驴	25.00	检出

3 结 论

本研究成功构建并验证了猪、黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、鸡、鸭、鹅、驴、马、兔等 12 种主要经济性动物的高特异性基因扩增检测方法, 在引物设计方面, 选取各物种的 *cytb* 基因作为靶标, 且经实验验证, 12 个目标物种间均未出现交叉扩增, 与非目标物种(如鱼、鹿、骆驼)亦无交叉反应, 显示出良好的物种特异性; 与部分现行的标准方法相比, 本方法的检出限可达 0.1%; 检测时间缩短至 2 h 内, 且无需电泳步骤, 降低了交叉污染风险, 可满足实际检测对准确性、稳定性及高效性的要求。同时配套研制了相应的标准样品, 均匀性和稳定性均良好, 可适用于方法验证、检测全过程质量控制以及试剂验收与人员考核等。

尽管如此, 本研究仍存在若干局限性, 需要在后续研究中加以关注和解决。首先, 物种覆盖范围仍存在拓展空间。本研究聚焦于猪、牛、羊、鸡等当前全球贸易与消费中占据主导地位的经济动物, 未纳入鹿、骆驼及某些特定鱼类等具有区域消费特色或宗教文化敏感性的物种; 其次, 尽管本方法在灵敏度和特异性等方面表现出了良好的检测性能, 但在应对极端加工工艺与复杂食品基质(例如高温、高压等极端加工工艺及高脂肪、高蛋白等复杂食品)的检测效能方面, 仍需进一步评估, 对检测的灵敏度仍需更多的数据支撑。最后, 方法的稳健性与可推广性有待进一步验证。本研究目前在同一实验室环境下完成, 尚需开展实验室间协同试验, 以系统考察其在不同环境、不同人员和不同设备等条件下运行的影响。

综上所述, 本研究建立的方法与标准样品为肉及肉制品的真实性鉴别提供了可靠的技术支撑。为保障结果准确可靠, 服务于监管, 维护市场秩序和保障消费者合法权益具有积极且重要的意义。未来研究将致力于扩展其适用范围和场景等方面, 提供一套更为稳定、可靠且易于操作的实用工具。

参考文献

[1] 鞠闻. 严打肉类食品兽药残留超标、掺杂掺假等违法行为: 2023 民生领域“铁拳”行动典型案例(第六批)公布[N]. 中国消费者报, 2023-09-06 (2).
Ju Wen. Eradicate illegal activities such as excessive veterinary drug residues in meat products and adulteration: typical cases from the 2023 “iron fist” campaign in people’s livelihood areas (sixth batch) announced [N]. China Consumer Journal, 2023-09-06 (2).

[2] 刘硕. 烧烤店羊肉串掺假、房企违法收集人脸信息……检察技术如何助力揭开真相? [EB/OL]. (2025-10-14) [2026-07-08]. https://www.news.cn/politics/20251014/86a05980870f4d729f123614ad00a81f/c.html.
Liu Shuo. How procuratorial technology helps uncover the truth: lamb skewer adulteration in BBQ restaurants and illegal facial information collection by real estate companies [EB/OL]. (2025-10-14) [2026-07-08]. https://www.news.cn/politics/20251014/86a05980870f4d729f123614ad00a81f/c.html.

[3] EU Agri-Food Fraud Network. January 2025 report on EU agri-food fraud suspicions [R/OL]. European Commission, 2025: p.4. [2026-07-08]. https://food.ec.europa.eu/food-safety/acn/ffn-monthly_en.

[4] EU Agri-Food Fraud Network. November 2025 report on EU agri-food fraud suspicions [R/OL]. European Commission, 2025: p.4. [2026-07-08]. https://food.ec.europa.eu/food-safety/acn/ffn-monthly_en.

[5] Everstine K D, Chin H B, Lopes F A, et al. Database of food fraud records: summary of data from 1980 to 2022 [J]. Journal of Food Protection, 2024, 87(3): 100227.

[6] Tibola C S, Da Silva S A, Dossa A A, et al. Economically motivated food fraud and adulteration in brazil: incidents and alternatives to minimize occurrence [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(8): 2028–2038.

[7] 刘瑞, 白李薇薇. 肉制品中动物源性成分鉴别研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(19): 102–110.
Liu Rui, Bai Liweiwei. Research progress on identification of animal-derived components in meat products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(19): 102–110.

[8] Usman I, San A, Afzaal M, et al. Advances and challenges in conventional and modern techniques for halal food authentication: a review [J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(3): 1430–1443.

[9] Daher Z, Mohamadin M, Rama A, et al. Meat adulteration in the MENA and GCC regions: a scoping review of risks, detection technologies, and regulatory challenges [J]. Foods, 2025, 14(21): 3743.

[10] Zia Q, Alawami M, Mokhtar N F K, et al. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products [J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126664.

[11] 陈梦琪, 彭淼曦, 刘婧文, 等. 靶向蛋白质组学技术在食品安全检测的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 23297–23310.
Chen Mengqi, Peng Miaoxi, Liu Jingwen, et al. Application of targeted proteomics technology in food safety detection [J]. Food Science, 2024, 45(23): 23297–23310.

[12] 陈燕雨. 高光谱成像技术在食品掺假检测中的应用研究综述[J]. 食品安全导刊, 2025(3): 144–147.
Chen Yanyu. Review on the application of hyperspectral imaging technology in food adulteration detection [J]. Journal of Food Safety Guide, 2025(3): 144–147.

[13] 林墉, 林晓冰. 近红外光谱技术在食品掺假检测中的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2024(28): 141–143, 148.
Lin Yong, Lin Xiaobing. Application of near-infrared spectroscopy in food adulteration detection [J]. Journal of Food Safety Guide, 2024(28): 141–143, 148.

[14] 程月红, 师景双, 高喜凤, 等. 肉制品源性成分检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 157–165.
Cheng Yuehong, Shi Jingshuang, Gao Xifeng, et al. Research progress on detection technology of meat product-derived components [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 157–165.

[15] 毛书灿, 郝梦, 汪兰, 等. NMR 在肉制品品质检测中的应用进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 354–366.
Mao Shucan, Hao Meng, Wang Lan, et al. Application progress of NMR in quality detection of meat products [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 354–366.

[16] Shi Shijie, Zhang Kaidi, Tian Nina, et al. Spectroscopic techniques combined with chemometrics for rapid detection of food adulteration: applications, perspectives, and challenges [J]. Food Research International, 2025, 211: 116459.

[17] Nehal N, Choudhary B, Nagpure A, et al. DNA barcoding: a modern age tool for detection of adulteration in food [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(5): 767–791.

[18] Li Jiapeng, Wei Yixuan, Li Jinchun, et al. A novel duplex SYBR Green real-time PCR with melting curve analysis method for beef adulteration detection [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127932.

[19] Tan L L, Ahmed S A, Ng S K, et al. Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green real-time PCR assay [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125654.

[20] 孙雪, 李晓萌, 张雅薇, 等. 肉制品中多源性成分精准检测技术类型及应用研究[J]. 食品安全导刊, 2025, 19(25): 190–192.
Sun Xue, Li Xiaomeng, Zhang Yawei, et al. Types and application research of precision detection technologies for multi-source components in meat products [J]. Journal of Food Safety Guide, 2025, 19(25): 190–192.

[21] Adenuga B M, Biltes R, Villa C, et al. A novel normalized quantitative real-time PCR approach for ensuring roe deer (*Capreolus capreolus*) meat authenticity in game meat foods [J]. Foods, 2024, 13(23): 3728.

[22] Yang Yiyuan, Wang Jingnan, Sun Yajuan, et al. Simple and rapid identification of beef within 30 min using a new food nucleic acid release agent combined with direct-fast qPCR [J]. Food Chemistry, 2024, 460(Part 1): 140473.

[23] Yadav S S, Tariqr R, Padhy P K, et al. A multiplex DNA probe-based method for simultaneous identification of adulteration in meat samples [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2024, 8: 100200.

[24] 苏妙贞, 杨丹婷, 丁清龙, 等. 食品中牛、羊、猪、马源性成分检测能力验证结果与分析[J]. 现代食品, 2023, 29(5): 136–139.
Su Miaozhen, Yang Danting, Ding Qinglong, et al. Results and analysis of proficiency testing for the detection of bovine, ovine, porcine, and equine derived components in food [J]. Modern Food, 2023, 29(5): 136–139.

[25] Maphaisa T C, Akinmoladun O F, Adelusi O A, et al. Advances in mycotoxin detection techniques and the crucial role of reference material in ensuring food safety. A review [J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2025, 200: 115387.

[26] 闵洁. 浅谈标准物质的基本用途及广泛应用[J]. 计量与测试技术, 2019, 46(5): 73–75.
Min Jie. Discussion on the basic uses and wide applications of reference materials [J]. Metrology & Measurement Technique, 2019, 46(5): 73–75.

[27] Wang Xia, Bae Y K, Hong S R, et al. Development and interlaboratory validation of a linearized plasmid DNA certified reference material by single molecule direct counting and digital PCR [J]. Talanta, 2026, 297(Pt B): 128762.

[28] 汪星宇, 邢圆莹, 徐香富, 等. 骆驼源性标准物质研制工艺优化及性能评价[J]. 科技资讯, 2023, 21(12): 17–23.
Wang Xingyu, Xing Yuanying, Xu Xiangfu, et al. Optimization of preparation process and performance evaluation of camel-derived reference material [J]. Science & Technology Information, 2023, 21(12): 17–23.

[29] 纪艺, 王凯莉, 余卉茹, 等. 羊源性基因组 DNA 标准物质研制[J]. 生物技术进展, 2024, 14(1): 125–132.
Ji Yi, Wang Kaili, Yu Huiru, et al. Development of sheep-derived genomic DNA reference material [J]. Current Biotechnology, 2024, 14(1): 125–132.

[30] Griffiths K R, McLaughlin J L H, Hall F, et al. Development of seven new dPCR animal species assays and a reference material to support quantitative ratio measurements of food and feed products [J]. Foods, 2023, 12(20): 3839.

(责任编辑: 韩晓红　蔡世佳)