夏琪琪, 梁媛媛, 朱晨, 等. 4 种动物源性成分荧光定量 PCR 方法的建立及其在牛肉制品掺假鉴定中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(13): 272−279. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060031
XIA Qiqi, LIANG Yuanyuan, ZHU Chen, et al. Establishment and Application of Multiplex Real-time PCR Method for Rapid Detecting Four Animal-derived Ingredients in Beef Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(13): 272−279. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060031

· 分析检测 ·

4 种动物源性成分荧光定量 PCR 方法的建立及其在牛肉制品掺假鉴定中的应用

夏琪琪[1,2], 梁媛媛[1,2], 朱　晨[1,2], 郑方媛[1,2], 孙丽萍[1,2], 唐　畅[1,2], 刘鹏鹏[1,2,*]
（1.浙江方圆检测集团股份有限公司, 浙江杭州 310018;
2.浙江省市场监管生物安全重点实验室, 浙江杭州 310018）

摘　要: 目的：针对目前市场上牛肉中使用鸡、鸭和猪肉掺假行为，本研究建立一种能够同时、快速鉴别牛肉制品中牛、鸡、鸭和猪 4 种动物源性成分的荧光定量 PCR 方法。方法：以细胞色素 b（*Cytb*）基因为靶基因，设计并筛选牛、鸡、鸭、猪四组特异性引物及 TaqMan 探针，构建单一反应体系；通过灵敏度、特异性、线性与检出限实验对方法进行系统验证。结果：该方法仅对牛、鸡、鸭和猪有特异性扩增，与其他动物的核酸无交叉反应；同时检测 4 种动物源性 DNA 的灵敏度为 10^{-4} ng/μL，检出限低至 0.01%（质量比）；对 100 份市售牛肉制品的分析显示，有 24 份样品掺假，且主要掺入成分为鸭肉和猪肉，实验结果与标准方法一致。结论：该方法具有快速、高效、成本低和高通量的特点，显著提升了肉类掺假检测能力，为食品安全监管和消费者权益保护提供了强有力的技术支持。

关键词: 荧光定量 PCR, 牛肉制品, 动物源性成分, 肉类掺假
中图分类号: TS251.5+2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)13−0272−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060031　　本文网刊:

Establishment and Application of Multiplex Real-time PCR Method for Rapid Detecting Four Animal-derived Ingredients in Beef Products

XIA Qiqi[1,2], LIANG Yuanyuan[1,2], ZHU Chen[1,2], ZHENG Fangyuan[1,2], SUN Liping[1,2], TANG Chang[1,2], LIU Pengpeng[1,2,*]
（1.Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China;
2.Key Laboratory of Biosafety Detection for Zhejiang Market Regulation, Hangzhou 310018, China）

Abstract: Objective: To establish a multiplex real-time PCR assay capable of simultaneously and rapidly identifying bovine, chicken, duck and porcine components in beef products and thus to counteract economically motivated adulteration with cheaper meats. Methods: Species-specific primers and TaqMan probes targeting the mitochondrial cytochrome b (*Cytb*) gene were designed and screened for cattle, chicken, duck and pig. A single-tube reaction system was constructed and systematically validated for sensitivity, specificity, linearity and adulteration simulation. Results: The assay exclusively amplified DNA from cattle, chicken, duck and pig, with no cross-reactivity against 6 non-target species. The method simultaneously detected four animal-derived DNA with 10^{-4} ng/μL sensitivity and a 0.01% (w/w) detection limit. Screening of 100 retail beef samples revealed 24 adulterated products, predominantly containing duck meat and/or pork. All results were fully concordant with those obtained by the national standard method. Conclusion: The developed multiplex real-time PCR protocol is rapid, cost-effective and high-throughput, significantly enhancing the capability to detect meat adulteration and providing robust technical support for food-safety regulation and consumer protection.

收稿日期: 2025−06−05
基金项目: 浙江省市场监管生物安全重点实验室（2023BS002）。
作者简介: 夏琪琪（1992−）, 女, 本科, 工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: 380729309@qq.com。
*** 通信作者:** 刘鹏鹏（1985−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: liupeng_0204@163.com。

Key words: fluorogenic quantitative PCR; beef products; animal-derived ingredients; meat adulteration

牛肉作为全球消费量最大的肉类食品之一，其市场需求持续增长的同时也逐渐凸显掺假问题[1−2]。部分不法商家为降低成本、牟取更高利润，常使用其他低价肉类（如鸡肉、鸭肉、猪肉）与牛肉混合或完全替代牛肉[3]。这类掺假肉类经过加工后，在感官特性上与真牛肉相似，消费者难以通过常规手段辨别[4]。牛肉掺假问题手段呈现复杂化、多样化、隐蔽化的趋势，不仅损害消费者权益，扰乱市场秩序，还可能引发宗教争议[1,5]。《解读 2023 年度食品安全与健康十大热点》指出食品掺假宛如不断膨胀的“毒瘤”，是食品安全的“隐形杀手[6]。如何有效鉴别肉类的真实成分，保障消费者权益，已成为亟待解决的食品安全问题。

食品真实性鉴定技术的研究和应用近年来取得了显著进展，如光谱分析、免疫学检测（如 ELISA）、生物质谱技术和荧光定量 PCR 方法等[7−9]。李斌等[5] 研究的高光谱反射和透射融合技术虽能达到 95% 以上的识别准确率，但检出限较高且易受添加剂干扰。高通量测序技术可实现同时检测多种未知物种，检测灵敏度达 1%，但为减缓 DNA 降解，对环境控制的要求较高，同时存在不可避免的定量偏差[10]。ELISA 法检测目标蛋白，简便快速，但受限于蛋白质变性，故不适用于熟肉制品[11−12]。电子舌检测方法利用主成分分析技术，可同时识别三种肉类，但无法分析成分复杂的加工肉制品[13]。近红外光谱技术（NIR）通过有机物形成的光谱来识别掺假元素，可无损检测，但需要单独建立数据库[14−15]。相较而言，实时荧光定量 PCR 技术凭借其快速、灵敏、特异性强等优势，已成为肉制品掺假检测领域极具实用性和推广价值的重要技术手段[16−18]。例如王磊[19] 通过荧光定量 PCR 方法检测肉制品中的鸭源成分，而杜丽丽[20] 则通过三重 PCR 方法检测肉制品中羊、猪、鸭肉三种成分。然而，传统的 PCR 技术局限于单一反应体系仅能检测单一靶基因，且当面对复杂样品时需进行多次独立检测以逐一排查可疑成分，不仅显著增加了时间成本和试剂消耗，还容易发生漏检或误检[21]。

为此，本研究基于荧光定量 PCR 技术，根据牛、鸭、鸡和猪 4 种动物源性成分的特异性引物及扩增片段大小，通过优化反应体系和扩增条件，建立了一种快速高通量精准对 4 种不同动物源性成分的检测方法。通过构建这一检测方法，本研究旨在提高牛肉制品中牛、鸭、鸡和猪源性成分检测效率，为食品安全市场监管提供有效的技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

肉制品　通过随机抽样方式，从超市、农贸市场、网络平台等不同销售渠道采购酱卤牛肉、牛肉干、冷冻牛肉串等牛肉制品，确保样品的代表性和多样性，所有样品在 48 h 内冷链运送至实验室；血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒　天根生化科技（北京）有限公司；游离 DNA 提取试剂盒（磁珠法）　广州华峰生物科技有限公司；荧光定量 PCR 引物及探针合成　生工生物工程（上海）有限公司；Pro Taq HS 预混型探针法 qPCR 试剂　湖南艾科瑞生物工程有限公司。

ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪　美国应用生物系统公司；Nano-300 超微量分光光度计　杭州奥盛仪器有限公司；Beckman Microfuge 16 台式微量离心机　美国贝克曼库尔特有限公司；D1200 板式加热器　美国 Labnet 公司；Vortex-genie2 漩涡式振荡器　Scientific Industries。

1.2　实验方法

1.2.1　样品 DNA 提取　使用无菌水漂洗去除样品表面杂物，采用无菌剪刀多点取样后用无菌均质器均质。分别采用离心柱法、磁珠法、NaOH 裂解液法对均质后的样品（每份约 200 mg）进行 DNA 提取，每种方法设置 3 次平行实验。离心柱法的提取参考血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书[22]。磁珠法的提取参考磁珠法提取 DNA 试剂盒说明书。NaOH 裂解液法为均质样品与 NaOH 裂解液按体积比为 1∶10 混匀（NaOH 裂解液为 0.5 mol/L NaOH 与 10 mol/L Na_2EDTA 以体积比为 1∶1 配制）后涡旋 5 s，室温放置 1 min，取上清即为 DNA 溶液。

1.2.2　引物探针设计与合成　根据 Genebank 数据库，分别获取牛 *Cytb* 基因（NC_006853.1）、鸭 *Cytb* 基因（EU585609.1）、鸡 *Cytb* 基因（OK206569.1）、猪 *Cytb* 基因（AY830188.1）序列及各物种 18S rRNA 序列，通过比对筛选出物种相关的保守序列，使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物及探针（表 1），本研究所用引物及探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3　检测方法建立　样品检测体系：2×Pro Taq HS qPCR 反应预混液 12.5 μL，牛、鸭、鸡、猪的正向引物（10 μmol/L）和反向引物（10 μmol/L）各 1.0 μL，牛、鸭、鸡、猪的荧光探针（10 μmol/L）各 1.0 μL，样品 DNA 溶液 0.5 μL，无核酸酶水补足至 25 μL；18S rRNA 内参 PCR 体系：2×Pro Taq HS qPCR 反应预混液 12.5 μL，内参基因的正向引物（10 μmol/L）、反向引物（10 μmol/L）和内参荧光探针（10 μmol/L）各 1.0 μL，样品 DNA 溶液 0.5 μL，无核酸酶水补足至 25 μL；反应条件：95 ℃ 预变性 10 s，95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火及延伸 30 s，共进行 40 个循环，每个循环结束收集荧光信号。用含目标源性成分的样品作为阳性对照；以不含目标源性成分的样品作为阴性对照；以无菌水作为空白对照。阳性信号：荧光通道有荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct 值≤

表 1 引物及探针序列

Table 1 Primers and TaqMan probes

名称		序列(5'—3')	TM (℃)	GC(%)	扩增片段长度(bp)
牛	F	CCTTCTCTATCCTAATTCTTGC	54.8	41	168
	R	CGATGGTGATATATGGGTG	51.6	47	
	P	CY5-AATCCCCCTACTACACACCTCC-BHQ2	62.9	55	
鸭	F	CGGATCTCTGCTCGCCATC	60.1	63	101
	R	CTACTGAGGAGAAAGCAAGGGA	60.8	50	
	P	FAM-CCTACTGGCTATGCACTACACCGCA-BHQ1	65.8	56	
鸡	F	GTATTACTATCATCCACCTCAC	54.1	41	137
	R	GAGTATGAGAGTTAAGCCCAGA	57.8	45	
	P	VIC-CATCTCATCCGACTCTGACAAAATTCC-BHQ1	62.3	44	
猪	F	CAGAATGATATTTCTTATTCGCC	54.0	35	116
	R	GTGTAGTATGGGCATTAAAATTAG	53.5	33	
	P	ROX-TGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCC-BHQ1	63.2	52	
内参	F	GTAGTGACGAAAAATAACAATAC	52.5	30	92
	R	CCTCCAATGGATCCTCG	55.1	59	
	P	CY5-AGGCCCTGTAATTGGAATGAGTCC-BHQ2	63.5	50	

注: F, 5' 端引物; R, 3' 端引物; P, 探针。

35.0; 阴性信号: 荧光通道无荧光信号检出, 或有荧光信号但无典型扩增曲线, Ct 值>35。

1.2.4 特异性实验 利用 1.2.3 建立的检测方法对 4 种目标源性样品(牛、鸭、鸡、猪)和 6 种非目标源性样品(鹅、山羊、绵羊、野鼠、裸盖鱼、驴)的 DNA 进行检测, DNA 模板浓度 10~100 ng/μL, 验证本方法的特异性。

1.2.5 灵敏度及重复性实验 对所提取的牛、鸭、鸡、猪 4 种 DNA 溶液进行 10 倍梯度稀释, 使浓度梯度为 10^{1}、10^{0}、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} ng/μL。以稀释后的 DNA 为模板进行多重荧光定量 PCR 扩增, 重复 3 次, 以 DNA 浓度对数值为横坐标, Ct 值为纵坐标建立标准曲线。

1.2.6 检出限实验 参照范维等[23] 的方法进行不同比例模拟样品的制备。将预先混匀的 9 g 猪肉糜与 1 g 牛肉糜间歇性混匀 10 min, 得到含 10% 牛肉的猪肉样本(A1); 将预先混匀的 9 g 猪肉糜与 1 g A1 样品间歇性混匀 10 min, 得到含 1% 牛肉的猪肉样本(A2); 将预先混匀的 9 g 猪肉糜与 1 g A2 样品间歇性混匀 10 min, 得到含 0.1% 牛肉的猪肉样本(A3); 将预先混匀的 9 g 猪肉糜与 1 g A3 样品间歇性混匀 10 min, 得到含 0.01% 牛肉的猪肉样本(A4); 以同样方法依次制备其他源性混合样本。

分别取含 1%、0.1%、0.01% 牛肉的猪肉样本、含 1%、0.1%、0.01% 牛肉的鸭肉样本、含 1%、0.1%、0.01% 牛肉的鸡肉样本; 含 1%、0.1%、0.01% 鸭肉的牛肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 鸭肉的鸡肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 鸭肉的猪肉样本; 含 1%、0.1%、0.01% 鸡肉的牛肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 鸡肉的鸭肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 鸡肉的猪肉样本; 含 1%、0.1%、0.01% 猪肉的牛肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 猪肉的鸭肉样本, 含 1%、0.1%、0.01% 猪肉的鸡肉样本, 用离心柱法提取样品的 DNA, 进行动物源性成分检测, 验证本方法的检出限。

1.2.7 实际样品的检测 将从不同渠道购买的 100 份牛肉制品进行编号。用离心柱法提取牛肉制品样本的 DNA, 分别采用建立的多重荧光定量 PCR 方法和 GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性成分检测方法实时荧光 PCR 法》[24] 对样品进行检测, 对比两种方法的检测结果。

1.3 数据处理

本研究 DNA 扩增曲线均由实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司, ABI7300)产生; 结果中标准曲线和柱状图均由 Excel 绘制和统计。

2 结果与分析

2.1 牛肉制品 DNA 提取的方法比较

为了探索牛肉制品 DNA 提取最合适的方法, 本研究提取 6 份不同牛肉制品的 DNA, 以比对提取效果。如表 2 所示, 离心柱法提取的 DNA 浓度和纯度均较高(A_{260}/A_{280} 在 1.8 左右); 磁珠法提取的 DNA 浓度和纯度适中; 而 NaOH 裂解法提取的 DNA 浓度偏低且显示 DNA 有少许降解(A_{260}/A_{280} 大于 2)。综合考虑, 离心柱法是最适合用于牛肉制品 DNA 提取的方法。

2.2 引物探针可行性验证及检测方法建立

本研究使用牛、鸭、鸡、猪的阳性样本提取的 DNA 为模板(DNA 模板浓度 10~100 ng/μL), 通过荧光定量 PCR 体系对 *Cytb* 基因及内参基因(18S rRNA)进行扩增。结果如图 1 所示, 所有样品的内参基因引物及 *Cytb* 基因特异性引物均呈现典型的 S 型扩增曲线, 且 Ct 值均小于 35, 表明本研究所设计的引物和探针可以对牛、鸭、鸡、猪目标源性成分进行检测。

2.3 特异性实验

为了验证本研究采用的引物及探针是否受其他动物源性成分影响, 本研究采用 1.2.3 建立的检测方法对牛、鸭、鸡、猪、鹅、山羊、绵羊、野鼠、裸盖鱼和驴的 DNA 模板进行检测(DNA 模板浓度

表 2　采用 3 种提取方法提取的牛肉制品 DNA 浓度及纯度

Table 2　Concentration and purity of beef products DNA extracted by 3 kinds of methods

方法	样品	浓度(ng/μL)	A_{260}/A_{280}
磁珠法	样品1	70.04±1.85	1.80±0.03
	样品2	26.31±1.01	1.62±0.04
	样品3	46.34±0.93	1.60±0.03
	样品4	78.65±1.84	1.76±0.03
	样品5	54.72±1.71	1.74±0.04
	样品6	22.04±0.87	1.65±0.05
离心柱法	样品1	443.86±10.69	1.81±0.02
	样品2	308.80±7.07	1.79±0.02
	样品3	107.07±2.95	1.78±0.02
	样品4	195.55±3.91	1.78±0.01
	样品5	380.37±8.74	1.77±0.02
	样品6	210.79±3.93	1.80±0.01
NaOH裂解法	样品1	18.62±0.73	2.07±0.04
	样品2	11.64±0.82	2.06±0.04
	样品3	14.68±0.73	2.03±0.03
	样品4	12.49±0.44	2.04±0.03
	样品5	11.94±0.58	2.16±0.05
	样品6	15.29±0.81	2.12±0.03

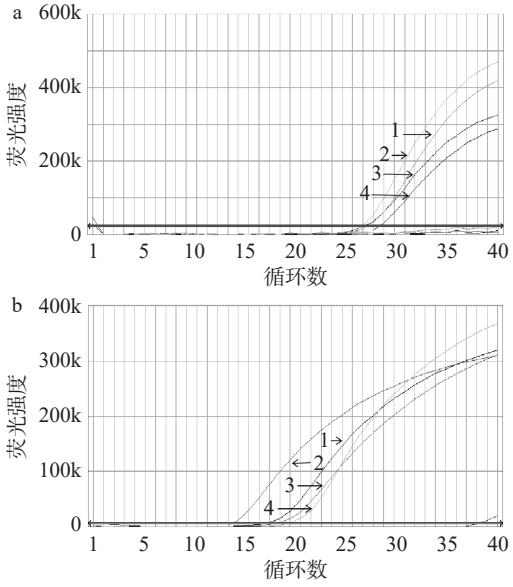


图 1　引物探针可行性

Fig.1　Feasibility of primers and probes

注：a.18S 内参基因引物探针可行性效果图，1：鸭源性 DNA 扩增曲线，2：牛源性 DNA 扩增曲线，3：鸡源性 DNA 扩增曲线，4：猪源性 DNA 扩增曲线；b.4 种目标源性引物探针可行性效果图，1：鸭源性 DNA 扩增曲线，2：牛源性 DNA 扩增曲线，3：鸡源性 DNA 扩增曲线，4：猪源性 DNA 扩增曲线。

10~100 ng/μL）。结果如图 2 所示，所有样本的 18S rRNA 内参信号均呈现阳性结果（图 2a），表明检测方法可行性较好。牛、鸭、鸡和猪的 DNA 均呈现阳性结果（Ct 值≤35 且扩增曲线呈 S 型），而鹅、山羊、绵羊、野鼠、裸盖鱼和驴的 DNA 均呈现阴性结果（图 2b）。上述结果表明本体系内未发生交叉反应，具有较高的特异性。

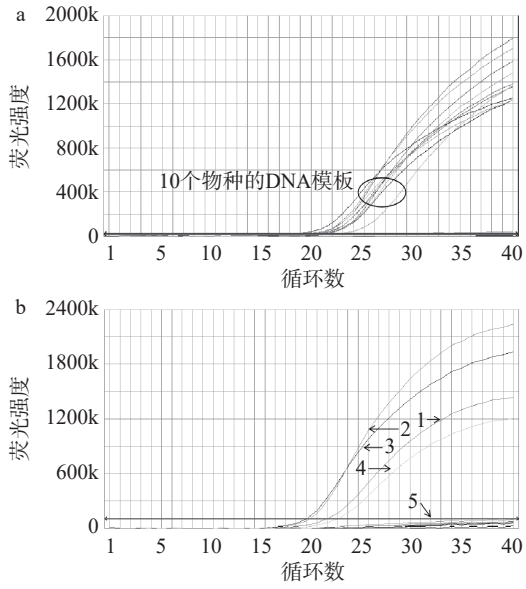


图 2　实验体系特异性

Fig.2　Specificity of detection system

注：a.10 个动物源性样品内参基因扩增曲线；b.目标源性样品扩增曲线，1：鸭；2.牛；3.鸡；4.猪；5.非目标源性（鹅、山羊、绵羊、野鼠、裸盖鱼和驴）。

2.4　灵敏度及重复性实验

为了验证本研究对牛、鸡、鸭和猪的 DNA 检测灵敏度，使用 1.2.5 所述实验方法进行实验。结果如图 3 所示，4 种动物源性 DNA 模板在 1×10^{1}~1×10^{-4} ng/μL 范围内均具有典型的 S 型扩增曲线，表明该检测体系在此区间具有良好的扩增效率。标准曲线结果显示（图 4a~d），鸭源性标准曲线（$y=-2.5914x+25.07$，$R^2=0.9912$）、鸡源性标准曲线（$y=-2.9486x+20.517$，$R^2=0.9911$）、猪源性标准曲线（$y=-3.3629x+21.809$，$R^2=0.9979$）、牛源性标准曲线（$y=-3.2717x+21.224$，$R^2=0.9905$）均表现出良好的线性关系。综上所述，本体系对 4 种目标源性（牛、鸡、鸭、猪）的 DNA 检测灵敏度达到 10^{-4} ng/μL。结果还表明当模板 DNA 质量浓度低于该阈值时，虽然可观察到扩增信号，但线性关系丧失且重复性显著降低。

2.5　检出限实验

提取不同质量分数样本的 DNA，通过多重荧光定量 PCR 检测不同质量分数（1%、0.1%、0.01%）的混合肉样，在 CY5 通道（牛）、FAM 通道（鸭）、HEX 通道（鸡）和 ROX 通道（猪）通道中分别验证交叉混合样品的识别能力，结果如图 5 显示，当目标源性成分掺入比例为 0.01% 时，各通道均能检测到特异性荧光信号且 Ct 值≤35.0，表明该方法的最低检出限可达 0.01% 质量分数。

2.6　牛肉制品掺假鉴定的应用

本研究通过对比建立的多重荧光定量 PCR 方法与 GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》对 100 份市售牛肉制品的检测，结果如表 3 所示，两种方法的检测结果具有高度一致性。100 份牛肉制品中有 76 份样品检测结果与

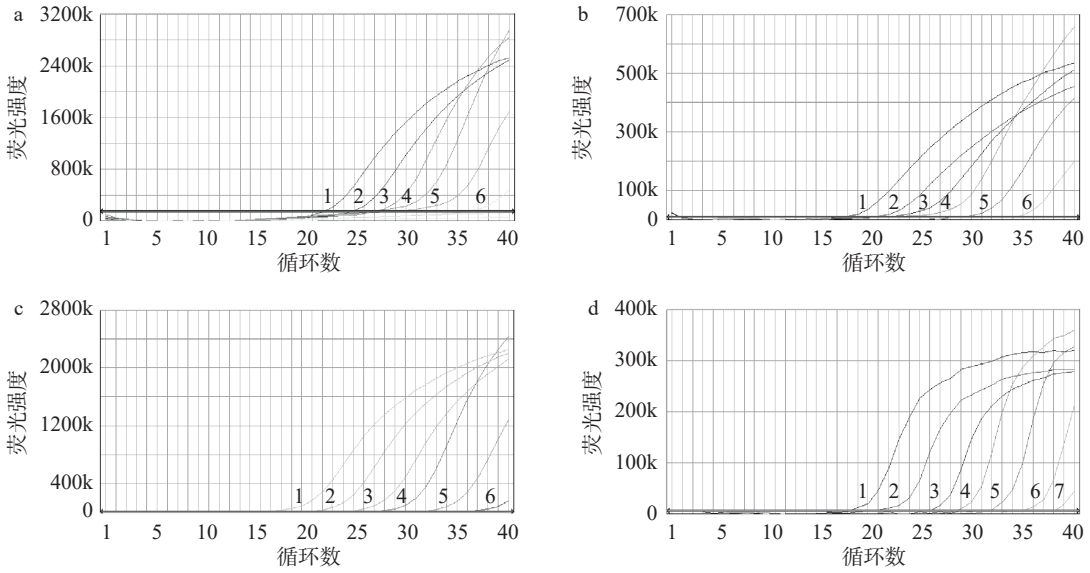


图 3　4 种目标源性扩增曲线

Fig.3　Amplification curves of four target components

注: a.鸭源性扩增曲线, 1~6: DNA 浓度为 1×10^{1}~1×10^{-4} ng/μL; b.鸡源性扩增曲线, 1~6: DNA 浓度为 1×10^{1}~1×10^{-4} ng/μL; c.猪源性扩增曲线, 1~6: DNA 浓度为 1×10^{1}~1×10^{-4} ng/μL; d.牛源性扩增曲线, 1~7: DNA 浓度为 1×10^{1}~1×10^{-5} ng/μL。

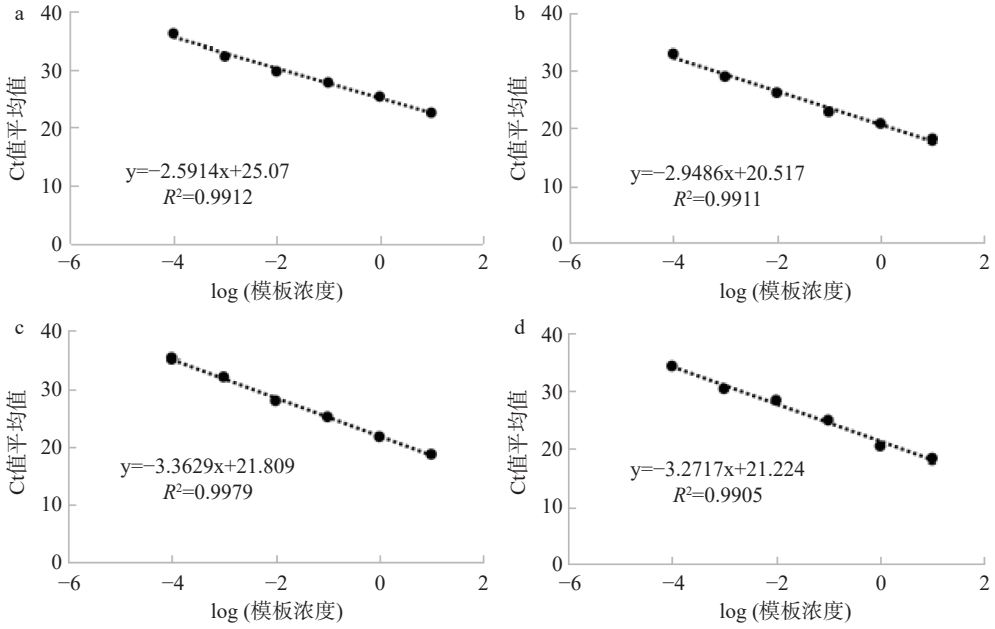
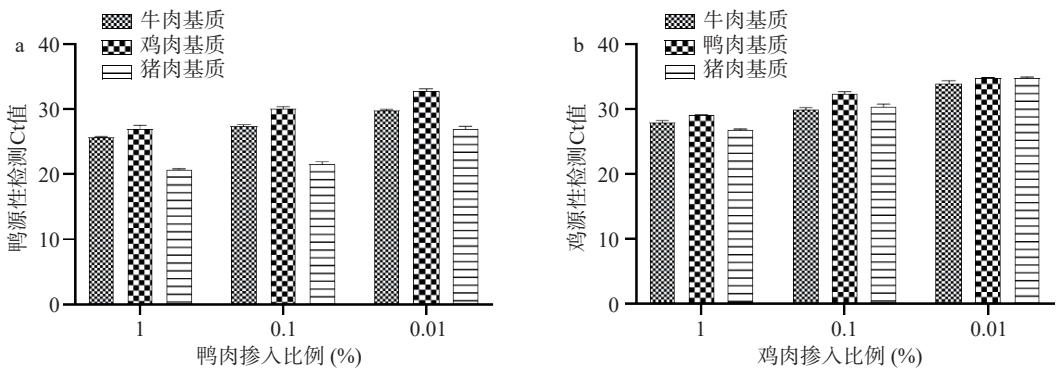


图 4　4 种源性成分定量分析曲线

Fig.4　Quantitative analysis curves of four source components

注: a.鸭源性标准曲线; b.鸡源性标准曲线; c.猪源性标准曲线; d.牛源性标准曲线。



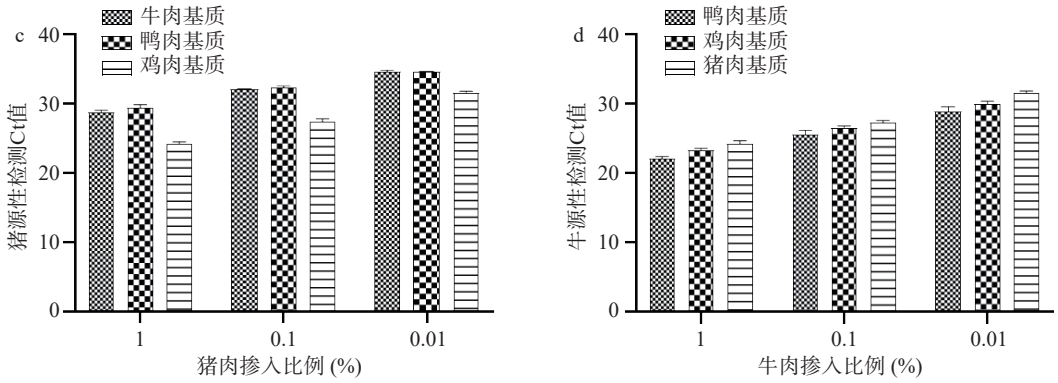


图 5　不同掺入比例的样品检测结果

Fig.5　Results of samples with different blending ratios

注：a.鸭源性检测；b.鸡源性检测；c.猪源性检测；d.牛源性检测。

表 3　实际牛肉制品源性成分检测掺假情况

Table 3　Detection of adulteration in actual beef product source components

本实验建立的多重荧光定量PCR方法检测结果（Ct值）								标准方法结果判定
编号	样品名称	牛	鸭	鸡	猪	内参	结果判定	
1	牛肉串	–	17.27±0.90	–	–	18.15±0.07	检出鸭	检出鸭
2	牛肉小串	–	–	17.77±0.27	–	21.56±0.13	检出鸡	检出鸡
3	牛肉小串	–	–	19.09±0.04	–	22.19±0.11	检出鸡	检出鸡
4	烧烤食材牛肉串	–	19.25±0.23	33.52±0.25	–	22.26±0.10	检出鸭、鸡	检出鸭、鸡
5	牛肉小串	–	17.64±0.23	32.02±0.10	–	18.34±0.01	检出鸭、鸡	检出鸭、鸡
6	牛肉串	–	–	–	18.04±0.62	18.07±0.04	检出猪	检出猪
7	烧烤牛肉串	–	–	–	17.68±0.19	18.04±0.03	检出猪	检出猪
8	小肥牛风味肉串	–	15.69±0.13	–	–	23.17±0.35	检出鸭	检出鸭
9	手工牛肉串	29.46±0.58	–	–	16.92±0.64	18.47±0.01	检出牛、猪	检出牛、猪
10	卤牛肉	17.65±0.53	15.68±0.48	–	–	22.50±0.01	检出牛、鸭	检出牛、鸭
11	红柳牛肉串	30.86±0.11	20.49±0.45	–	17.32±0.15	22.95±0.22	检出牛、鸭、猪	检出牛、鸭、猪
12	轻享薄切牛肉干	15.57±0.05	–	–	33.56±0.19	22.57±0.25	检出牛、猪	检出牛、猪
13	卤五香牛腱子	29.16±0.16	–	–	15.05±0.21	23.01±0.29	检出牛、猪	检出牛、猪
14	卤牛肉	15.65±0.15	–	–	27.57±0.50	23.31±0.01	检出牛、猪	检出牛、猪
15	酱牛肉	15.10±0.09	–	34.19±0.48	26.48±0.45	23.27±0.23	检出牛、鸡、猪	检出牛、鸡、猪
16	酱牛肉	14.95±0.01	–	–	29.49±0.13	23.62±0.45	检出牛、猪	检出牛、猪
17	鲜嫩真牛肉串	15.35±0.11	–	26.35±0.33	–	23.06±0.19	检出牛、鸡	检出牛、鸡
18	生牛肉串（自制）	15.67±0.08	–	29.03±0.19	–	23.32±0.02	检出牛、鸡	检出牛、鸡
19	牛肉串	17.21±0.08	31.87±0.74	–	17.89±0.13	18.13±0.09	检出牛、鸭、猪	检出牛、鸭、猪
20	麦臻选牛肉串	16.65±0.30	–	32.29±0.01	–	21.62±0.17	检出牛、鸡	检出牛、鸡
21	黑椒味牛排肉串	16.46±0.58	33.17±0.20	–	–	19.06±0.13	检出牛、鸭	检出牛、鸭
22	手柄牛肋条串	15.68±0.52	26.37±0.08	–	–	18.59±0.33	检出牛、鸭	检出牛、鸭
23	牛肉串	16.70±0.23	28.56±0.62	–	–	23.34±0.66	检出牛、鸭	检出牛、鸭
24	牛肉串	15.58±0.50	34.06±1.24	–	–	23.80±0.35	检出牛、鸭	检出牛、鸭

注：“–”表示未检出Ct值。

其商品标签中描述一致（未列出）、8 份样品未检出牛源性成分、16 份样本检出鸡或鸭或猪源性成分。在 8 份未检出牛源性成分的牛肉制品中，有 2 份只检出鸭源性成分，有 2 份只检出鸡源性成分，有 2 份只检出猪源性成分，有 2 份同时检出鸭源性成分和鸡源性成分。在余下 16 份问题样本中有 5 份检出鸭源性成分、5 份检出猪源性成分、3 份检出鸡源性成分、2 份检出鸭源性成分和猪源性成分、1 份检出鸡源性成分和猪源性成分。综上所述，采用本研究建立的方法与标准方法的检测结果基本保持一致，可见本实验构建的检测方法结果较为可靠，可用于牛肉制品掺杂掺假情况的检测。

3　讨论与结论

近年来为防止不法商家对肉制品的掺假行为，针对肉制品中动物种类的检测方法取得了显著进展，如光谱分析、免疫学检测（如 ELISA）、生物质谱技术和荧光定量 PCR 方法等。由于荧光定量 PCR 技术具有便捷快速、操作简单、检测费用低和仪器设备要求低等特点，其在动物源性鉴定方面得到了广泛的应用。目前有较多报道均利用多重 PCR 或荧光定

量 PCR 方式对肉制品动物源性检测[4,23−27]。

本研究在前人的基础上建立了一种基于荧光定量 PCR 技术的动物源性成分检测方法，对市面上用鸡肉、鸭肉和猪肉替代牛肉的牛肉制品进行鉴别检测。本研究通过优化特异性引物探针组合，实现了在同一反应体系中高效同步检测牛、鸭、鸡和猪 4 个物种，从而大大提高了检测的效率。本研究使用牛、鸭、鸡和猪 *Cytb* 基因作为目的基因，该基因位于线粒体基因组，其含量在单个细胞中可高达 10^3~10^4 拷贝数，远远高于细胞核单拷贝的基因，因此本研究建立的检测方法可以用于高度加工或热处理之后的牛肉制品[28−30]。本研究还通过比较目前常用的三种 DNA 提取方式，结果显示血液/细胞/组织基因组 DNA 提取方法在牛肉制品的 DNA 提取中最好，其提取的 DNA 含量和纯度都符合实验需求。此外，本研究通过对梯度稀释的 DNA 模板检测，证明了本研究建立的检测方法可以有效识别到 10^{-4} ng/μL 的目标 DNA。本实验通过模拟掺假实验，结果表明本研究建立的方法检出限可达 0.01%(w/w)。本研究还通过和 GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性成分检测方法实时荧光 PCR 法》对市面上购买的 100 份样品进行检测比较，结果表明本方法和标准方法得出的结论一致。

综上所述，本研究成功构建了一种基于多重荧光定量 PCR 技术的动物源性成分快速检测方法，该方法通过优化特异性引物与探针组合，可在同一反应体系中高效、特异性地检测牛、鸭、鸡、猪四种物种成分，灵敏度高(检出限达 0.01% 质量分数，DNA 检测下限为 10^{-4} ng/μL)，能够有效识别低比例掺杂情况，可满足对市售常见牛肉制品掺杂掺假的风险评估需求。本研究显著降低了时间、人力与物料成本，适用于大批量样品的筛查，且在实际应用中与标准方法 GB/T 38164-2019 结果一致，展现出良好的可靠性与适用性。该技术的推广有望提升肉类制品的风险识别效率与精准度，为市场监管和风险防控提供高效、可靠的技术支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] IQBAL Z, AFSETH N K, POSTELMANS A, et al. Detection and quantification of pork adulteration in beef meatballs with Raman spectroscopy and near infrared spectroscopy[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2025, 337: 126069.

[2] XU H L, MA X Y, YE Z H, 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.

[3] 刘蔼滢, 林琳, 廖晓珊, 等. 2021-2023 年广东省市售预制菜食品质量安全现状分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 302−309. [LIU A Y, LIN L, LIAO X S, et al. Analysis on the quality and safety status of prepared dishes in Guangdong Province from 2021 to 2023[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 302−309.]

[4] 陈冉越, 周庆, 王昱, 等. 6 种肉类成分多重 PCR 鉴别方法的建立及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6661−6666. [CHEN R Y, ZHOU Q, WANG Y, et al. Establishment and application of multiple PCR identification method for 6 kinds of meat ingredients[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(19): 6661−6666.]

[5] 李斌, 卢英俊, 刘燕德, 等. 基于高光谱反射和透射融合技术的牛肉糜掺假检测[J]. 农业工程学报, 2024, 40(16): 251−260. [LI B, LU Y J, LIU Y D, et al. Detection of adulteration of minced beef based on hyperspectral reflectance and transmission fusion technique[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2024, 40(16): 251−260.]

[6] 孙永立. 解读 2023 年食品安全与健康十大热点[J]. 中国食品工业, 2024(1): 9−11. [SUN Y L. Interpretation of the top ten hot topics in food safety and health in 2023[J]. China Food Industry, 2024(1): 9−11.]

[7] AHAMED Z, SAIFULLAH M, SHELLIE R A, et al. Volatilomics in meat research: Species authentication, quality assessment & adulteration detection[J]. Food Res Int, 2025, 214: 116690.

[8] 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 Sci Nutr, 2025, 13(7): e70590.

[9] SU G, YU C, LIANG S, et al. Multi-omics in food safety and authenticity in terms of food components[J]. Food Chemistry, 2024, 437(Pt 2): 137943.

[10] 甘永琦, 卢曼曼, 赖青鸟, 等. 高通量测序技术在肉类掺假检测中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 411−426. [GAN Y Q, LU M M, LAI Q N, et al. Application and progress in high-throughput sequencing technology for meat adulteration detection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 411−426.]

[11] 刘敏, 李升升, 张艳, 等. 牛肉掺假鉴别技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 477−489. [LIU M, LI S S, ZHANG Y, et al. Research progress of beef adulteration identification technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 477−489.]

[12] LI Y C, LIU S Y, MENG F B, et al. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2020, 19(4): 2256−2296.

[13] KAROUI R, DEBAERDEMAEKER J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products[J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 621−640.

[14] 路宇轩, 翟睿, 吴帆, 等. 肉类掺假检测方法及研究进展[J]. 计量学报, 2023, 44(6): 1000−1008. [LU Y X, ZHAI R, WU F, et al. Research progress on detection technology of meat adulteration[J]. Acta Metrologica Sinica, 2023, 44(6): 1000−1008.]

[15] TUO L, FENG L, LUO A X, 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.

[16] TAN L L, AHMEDS 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.

[17] del RIO-LAVÍN A, JIMéNEZ E PARDO M A. SYBR-green real-time PCR asay with melting curve analysis for the rapid identi-

fication of *Mytilus* species in food samples[J]. Food Control, 2021, 130: 108257.
[18] ZHAO J, YANG W, CAI H L, et al. Current progress and future trends of genomics-based techniques for food adulteration identification[J]. Foods, 2025, 14(7): 1116.
[19] 王磊. 肉及肉制品中鸭源成分荧光定量 PCR 检测方法的建立[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2019. [WANG L. Establishment of fluorescent quantitative PCR detection method for duck-derived components in meat and meat products[D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2019.]
[20] 杜丽丽. 羊肉产品中肉种来源的 PCR 检测方法研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018. [DU L L. Study on PCR detection of meat origin in mutton products[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2018.]
[21] LI T T, JALBANI Y M, ZHANG G L, et al. Detection of goat meat adulteration by real-time PCR based on a reference primer[J]. Food Chem, 2019, 277: 554−557.
[22] ZHAO Z J, WANG Y X, KANG Y T, et al. A retrospective study of the detection of sepsis pathogens comparing blood culture and culture-independent digital PCR[J]. Heliyon, 2024, 10(6): e27523.
[23] 范维, 高晓月, 李贺楠, 等. 4 种动物源性成分多重 real-time PCR 检测方法的建立及其在驴肉制品检测中的应用[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 317−323. [FAN W, GAO X Y, LI H N, et al. Establishment and application of multiplex real-time PCR method for rapid detection of four animal-derived components in donkey meat products[J]. Food Science, 2023, 44(8): 317−323.]
[24] 国家标准化管理委员会. GB/T 38164-2019 常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019. [National Standardization Administration. GB/T 38164-2019 Identification of animal ingredient from common livestock and poultry-Real-time PCR[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.]
[25] 赫晓宇. 多重 PCR 技术在食品中 4 种肉类成分快速鉴别中的应用[J]. 中医临床研究, 2016, 8(25): 119−120. [HE X Y. Application of multiplex PCR technology in rapidly identifying 4 kinds of meat[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2016, 8(25): 119−120.]
[26] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873−1880. [HE W L, ZHANG C, YANG J, et al. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products[J]. Frontiers of Chinese Agricultural Sciences, 2012, 45(9): 1873−1880.]
[27] 付理文, 张宇, 依含, 等. Taqman 多重实时荧光 PCR 同步定量检测 6 种动物源性成分方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(9): 48−59. [FU L W, ZHANG Y, YI H, et al. Establishment and application of multiplex fluorescent real-time PCR for detecting six kinds of animal derived materials[J]. China Biotechnology, 2017, 37(9): 48−59.]
[28] KUMAR D, SINGH S P, KARABASANAVAR N S, et al. Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial *cytb* gene[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore-, 2012, 51(11): 3458−34633.
[29] RAHMAN M M, ALI M E, HAMID S B, et al. Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation[J]. Meat Sci, 2014, 97(4): 404−409.
[30] CHEN Y, WANG Y L, XIAO M Y, et al. Polymerase chain reaction with lateral flow sensor assay for the identification of horse meat in raw and processed meat products[J]. Food Chem, 2021, 345: 128840.