

· 论 著 ·

鉴别6种常见食用肉类的多重PCR检测体系的构建及验证

蒋志伟^{1,2}, 夏若成², 陶瑞旸², 李成涛^{1,2}

1. 温州医科大学基础医学院法医学系, 浙江 温州 325035; 2. 司法鉴定科学研究院 上海市法医学重点实验室 司法部司法鉴定重点实验室 上海市司法鉴定专业技术服务平台, 上海 200063

摘要: 目的 建立一种快速、准确、灵敏的多重PCR检测方法, 用于同时鉴别6种常见食用肉类(牛、羊、鸡、猪、鹅、鸭), 并评估其在肉类食品掺假鉴定中的应用价值。方法 基于GenBank数据库中6个物种的线粒体全基因组序列, 筛选具有种内保守性、种间特异性的DNA序列(牛 *16S rRNA*、羊 *COX-I*、鸡 *Cytb*、猪 *COX-I*、鹅 *NADH2*、鸭 *16S rRNA*), 并设计物种特异性引物, 以此构建一个可同时鉴别6种常见食用肉类的多重PCR检测体系。对该体系进行种属特异性、灵敏度和重复性研究, 并进行模拟混合样品检测。结果 成功构建了一个可同时鉴别6种常见食用肉类的多重PCR检测体系, 该体系在非目标物种的DNA中均未有效扩增; 在DNA模板量为0.062 5~2 ng/ μ L时, 6个物种的扩增产物均能检出。在鸭肉和牛肉混合比例低至0.5%时, 仍能检测到鸭肉成分。结论 本研究构建了一个特异性强、灵敏度高、重复性好的多重PCR检测体系, 可准确鉴别6种常见食用肉类食品中的动物源性成分, 为我国常见食用肉类及肉制品的掺假鉴定提供了一种简单、实用的检测技术。

关键词: 法医物证学; 线粒体DNA; 多重PCR; 种属鉴定; 食用肉类

文章编号: 1004-5619(2024)03-0254-07

中图分类号: R89; DF795.2; D919.2

doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2023.531002

文献标志码: A

**Establishment and Validation of a Multiplex PCR Detection System for the Identification of Six Common Edible Meat Components**JIANG Zhi-wei^{1,2}, XIA Ruo-cheng², TAO Rui-yang², LI Cheng-tao^{1,2}

1. Department of Forensic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Key Laboratory of Forensic Science, Ministry of Justice, Shanghai Forensic Service Platform, Academy of Forensic Science, Shanghai 200063, China

Abstract: Objective To establish a rapid, accurate, and sensitive multiplex PCR detection method for the simultaneous identification of the six common edible meats (beef, lamb, chicken, pork, goose, duck), and to evaluate its application value in meat adulteration identification. **Methods** Based on complete mitochondrial genomic sequences of six species in the GenBank database, DNA sequences (cattle: *16S rRNA*; sheep: *COX-I*; chickens: *Cytb*; pig: *COX-I*; goose: *NADH2*; duck: *16S rRNA*) with intra-species conservation and inter-species specificity were screened, and species-specific primers were designed to construct a multiplex PCR detection system that can simultaneously detect the meat of six common species. The species specificity, sensitivity and reproducibility of the system were studied, and the simulated mixture sample detection was performed. **Results** This study successfully constructed a multiplex PCR detection system that can detect the meats of six common species simultaneously. The system was not effective in DNA amplification of non-target species. When the DNA template sizes

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81930056); 上海市法医学重点实验室资助项目(21DZ2270800); 司法部司法鉴定重点实验室资助项目; 上海市司法鉴定专业技术服务平台资助项目

作者简介: 蒋志伟(1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: wujzw@163.com

通信作者: 李成涛, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事法医遗传学研究; E-mail: lichengtaohla@163.com

引用格式: 蒋志伟, 夏若成, 陶瑞旸, 等. 鉴别6种常见食用肉类的多重PCR检测体系的构建及验证[J]. 法医学杂志, 2024, 40(3): 254-260.

To cite: JIANG Z W, XIA R C, TAO R Y, et al. Establishment and validation of a multiplex PCR detection system for the identification of six common edible meat components[J]. *Fayixue Zazhi*, 2024, 40(3): 254-260.

were 0.062 5–2 ng/ μ L, the amplified products of all six species could be detected. The duck component was still detected when the mixing ratio of duck and beef was as low as 0.5%. **Conclusion** This study constructs and establishes a multiplex PCR detection system with strong specificity, high sensitivity, and good reproducibility. It can accurately identify the components of animal origin in common edible meats and provide a simple and practical method for identifying adulteration of common edible meats and meat products in China.

Keywords: forensic genetics; mitochondrial DNA; multiplex PCR; species identification; edible meat

肉类食品掺假已成为一个全球性问题,尽管各国食品安全部门对肉及肉制品生产者和经营者具有明确的法律法规约束^[1-2],但由于不同肉类价格差异带来的经济效益诱惑,不法分子仍会用猪肉、鸡肉、鸭肉等廉价肉类来替代牛肉、羊肉这些高价肉类进行贩卖和销售^[3-4],加之我国肉类交易市场分布零散、监管盲点较多,使得肉类掺假问题层出不穷。肉类掺假不仅破坏市场秩序,导致经济损失,还可能影响消费者的健康,甚至引发宗教冲突^[5]。同时我国是肉类生产和消费大国,肉类食品的真实性和可追溯性是最重要的社会问题之一,关乎经济、公共安全、宗教信仰、生态安全、食品安全等。因此,对肉及肉制品进行种属鉴定是法庭科学工作者的重要任务,也是法医物证领域亟待解决的难题之一。

在肉类掺假的检测和鉴定中,传统方法主要包括形态学检测法、组织学检测法、血清学检测法^[6]等。然而,上述方法对样本质量要求较高,需要样本、组织保存完整。此外,上述鉴定方法特异性不足,尤其是血清学检测法,因受蛋白质稳定性的制约,难以应用于被高温破坏和降解检材的鉴定,同时组织学和形态学检测方法还对检验人员的经验要求较高,鉴定意见的主观性强,故存在较大的局限性^[7]。因此,为了准确、高效地检测肉及肉制品的种属来源,保护消费者免受不法行为的侵害,亟须建立一种简单、快速、准确的肉类种属鉴定方法。

DNA作为生物体的主要遗传物质,具有较好的结构稳定性及遗传信息的物种特异性,是用于种属鉴定的理想生物大分子^[1]。其中,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)因其自身的独特优势,在物种鉴定中具有较为可观的研究前景。mtDNA是细胞中独立于细胞核DNA之外的遗传物质,通常以多拷贝形式存在,相较于细胞核DNA更易于从组织细胞中分离而获取,可以满足法医微量检材的检测需求,在无法检测细胞核DNA的陈旧、降解、腐败甚至是烹煮过的检材中具有较大的应用潜力^[8-10]。更重要的是,mtDNA进化速率较快,约为细胞核DNA的5~10倍,既具有物种间的差异性,又具有物种内的遗传稳定性^[11],是进行种属鉴定、研究近缘种属关系及进化的

良好分子标记。

近年来,随着分子生物学技术的快速发展,基于PCR的DNA检测技术被广泛应用于肉及肉制品的种属鉴定,并被证明是一种潜在、高效和灵敏的检测技术^[12]。目前,应用于肉及肉制品种属鉴定的PCR技术主要包括常规PCR、实时荧光定量PCR^[13-14]、多重PCR^[15]、数字PCR^[16]、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[17-18]等。与传统的肉类掺假鉴定技术相比,这些基于PCR的DNA检测技术由于准确性高、灵敏度高、特异性强、可追溯性强等优势,已成为肉类掺假鉴定的主要技术手段^[19-24]。其中,多重PCR是一种简单、高效、低成本的技术,通过使用多对特异性引物同时扩增目标DNA序列,可以在同一反应体系中鉴别多个物种,采用简单的琼脂糖凝胶电泳即可进行分析,既节省时间及成本,又可提供更准确的鉴定意见。

因此,本研究以各物种线粒体全基因组序列为参考,筛选出6种常见食用肉类(牛、羊、鸡、猪、鹅、鸭)具有种内保守性和种间特异性的物种特异性DNA序列,并设计特异性引物,以此构建一个可用于同时鉴别6种常见食用肉类的多重PCR检测体系,并研究该检测体系的种属特异性、灵敏度和重复性。同时进行模拟混合样品的检测,验证该体系在肉及肉制品鉴定中的实际效能和应用价值,为我国常见肉及肉制品的掺假鉴定提供一种简单、实用的检测方法。

1 材料与方法

1.1 样本采集和DNA提取

牛、羊、鸡、猪、鹅、鸭、兔和驴的肌肉组织来自上海市农贸市场,马、狗、猫、鼠和人的DNA为实验室现存样本。每个物种采集6例样本。使用DNeasy® Blood & Tissue试剂盒(德国Qiagen公司)提取DNA,具体操作参照试剂盒说明书。使用Qubit™ dsDNA HS Assay试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)和Qubit® 2.0荧光定量仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)对DNA进行定量,将DNA稀释至1 ng/ μ L,冻存于-20℃冰箱备用。本研究已获得司法鉴定科学研究院伦理委员会审批。

1.2 DNA 扩增和测序

使用 *12S rRNA* 基因的通用引物^[25],对采集的样本 DNA 进行扩增并对扩增产物进行双向 Sanger 测序,将测序序列校对、拼接后于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)基于局部比对算法的搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)进行比对,以验证所采集样本的准确性。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 物种特异性 DNA 序列的筛选和特异性引物的设计

从 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中下载常见食用肉类物种牛(NC_006853.1)、羊(NC_001941.1、NC_005044.2)、鸡(NC_053523.1)、猪(NC_000845.1)、鹅(NC_011196.1)、鸭(NC_009684.1)的线

粒体全基因组序列。使用 MEGA 11 软件^[26]筛选具有种内保守性、种间特异性的 DNA 序列作为物种特异性 DNA 序列。物种特异性 DNA 序列纳入标准:(1)该序列在不同物种之间具有足够的碱基差异,特别是近缘物种之间;(2)该序列在分布于不同地理区域的同一物种内没有碱基长度差异;(3)数据库中关于该序列的资料全面,能够查找到该序列不同物种的信息;(4)该序列长度大于 200 bp,便于引物的设计。基于物理参数(如解链温度、二级结构、引物错配性等),采用 Primer Premier 5.0 软件(加拿大 Premier 公司)设计 6 对物种特异性引物,并使用 NCBI 的 BLAST 评估所设计引物的特异性。利用 AutoDimer 1.0 软件^[27]模拟多重 PCR 反应,以确保在多重 PCR 体系中不会发生引物间交叉反应。引物序列及扩增产物长度见表 1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 6 种常见食用肉类物种的特异性引物信息
Tab. 1 Information on specific primers for six common edible meat species

物种	目标基因	引物序列(5'→3')	扩增长度/bp	引物浓度/(μmol·L ⁻¹)
牛	<i>16S rRNA</i>	正向:ACACAGGAGTGCATCTAAGG 反向:AATACTGGGAATGCTGGAGG	104	0.40
羊	<i>COX-Ⅰ</i> ^[28]	正向:CACGACGATACTCTGATTAC 反向:GTGGTTAGGTCTACAGTTAG	157	0.40
鸡	<i>Cytb</i>	正向:ACACTTGCCGGAACGTACAA 反向:CCCCATGGGAGAACATAGCC	205	0.16
猪	<i>COX-Ⅰ</i> ^[28]	正向:CGGGTACACACTCAACCAAG 反向:TGTGCTTGTCAGTTCTACTGC	268	0.16
鹅	<i>NADH2</i>	正向:TGCTACTCTCGACCCTCAT 反向:GTTGTGATCATGGATAGGTTAAGG	313	0.32
鸭	<i>16S rRNA</i>	正向:CTAGCTCAGCCGCTTAAACA 反向:TCCACTAGTCGAGGTTGTGT	495	0.56

1.4 单一和多重 PCR 检测

基于新设计的物种特异性引物对每个目标物种的样本 DNA 进行单一 PCR 扩增。PCR 体系总体积为 20 μL,10 μL 2×PCR 预混液,8 μL 无核酶水,1 μL 正、反向引物混合物,1 μL DNA(1 ng/μL)。初始扩增条件:94 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 100 bp DNA Ladder(苏州近岸蛋白公司)为分子量标准,使用 E-Gel™ Power Snap 核酸电泳系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)分析扩增产物。

对于多重 PCR 扩增,将目标物种的 6 对引物(牛、羊、猪、鸡、鹅和鸭)混合在一起。样本 DNA 为 1.1 节中 6 种肉类 DNA 1:1:1:1:1:1 的混合物。在 GeneAmp® PCR 9700 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)中进行与单一 PCR 相同反应体系和扩增条件

的多重 PCR 扩增。为构建一个同时扩增 6 种肉类的多重 PCR 检测体系,需要根据琼脂糖凝胶电泳结果对引物浓度、退火温度、循环数等 PCR 反应条件进行优化,以达到扩增平衡,并且不出现非特异性扩增条带,最终确定最佳引物浓度及反应条件。空白对照以去离子水代替 DNA 进行 PCR 扩增。

1.5 PCR 产物测序

基于新设计的物种特异性引物扩增目标物种 mtDNA,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,选取在预期位置上出现的单一、清晰、明亮、无拖尾的条带,纯化回收后进行双向 Sanger 测序,并于 NCBI 中进行 BLAST 比对分析扩增片段是否为所设计物种特异性引物的目标扩增子。

1.6 种属特异性研究

种属鉴定中,对于构建体系的特异性评估尤为重要。本研究将牛、羊、猪、鸡、鹅、鸭、马、狗、猫、兔、鼠、

驴和人13种常见物种的DNA样本稀释至5 ng/ μ L,然后利用所构建的多重PCR检测体系进行检测,同时设立以去离子水为模板的空白对照,以评估体系的种属特异性,每个物种检测6例样本。

1.7 灵敏度研究

将6个目标物种的DNA模板按照2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 ng/ μ L的梯度连续稀释。进行多重PCR扩增,以获得所构建多重PCR检测体系的最低检测限,每个质量浓度平行检测3次。

1.8 重复性研究

将6个目标物种的DNA样本(每个物种6例)分别进行多重PCR扩增,产物采用2%琼脂糖凝胶电泳检测,以验证体系的可重复性。

1.9 模拟混合样本研究

由于肉类食品掺假案中多数为将廉价鸭肉掺入价格相对较高的牛肉,因此,本研究制备鸭肉和牛肉的混合物以模拟实际案件。将鸭肉和牛肉切薄片放入75℃的烘箱中,去除水分后研磨成粉末。按照0.5%、1%、5%、10%的质量比将研磨后的鸭肉掺入牛肉中。每种模拟混合样本的总质量为100 mg,充分混匀后提

取DNA,利用多重PCR检测体系进行扩增检测。

2 结果

2.1 物种特异性多重PCR检测体系的构建

基于新设计的物种特异性引物对1.1节提取的6个目标物种样本DNA分别进行单一PCR扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测,牛、羊、鸡、猪、鹅和鸭mtDNA扩增产物条带清晰、明亮、无拖尾,且扩增产物长度均在预期范围内。对扩增产物进行Sanger测序,所得序列经NCBI中BLAST比对分析,结果显示,牛、羊、鸡、猪、鹅和鸭扩增的目标序列与NCBI数据库中已知的目标物种序列相似性均为100%。

经一系列优化后,最终确定PCR反应最佳扩增体积为20 μ L,包含10 μ L 2 \times PCR预混液,4 μ L无核酶水,4 μ L正、反向引物混合物(各引物终浓度见表1),2 μ L模板DNA(1 ng/ μ L)。多重PCR扩增体系反应条件:94℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min。结果(图1)显示,优化后的多重PCR检测体系能够准确区分6种肉类,且扩增片段与目标物种预期的产物长度大小相对应。

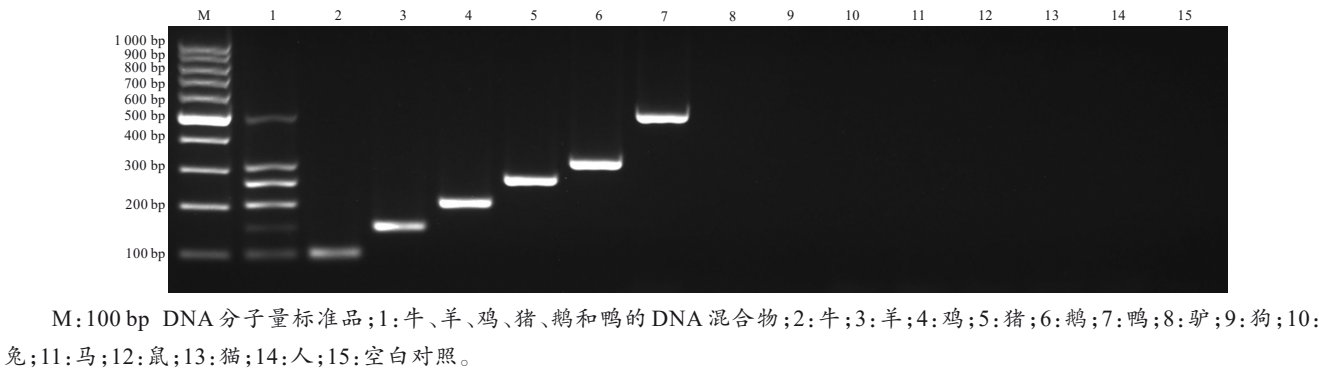


图1 多重PCR扩增和种属特异性检测结果
Fig. 1 Detection results of multiplex PCR amplification and species specificity

2.2 种属特异性研究结果

种属特异性研究结果(图1)显示,上述13个物种除6个目标物种扩增出预期产物条带外,其余7个非目标物种所对应的区带均未扩增出条带。

2.3 灵敏度研究结果

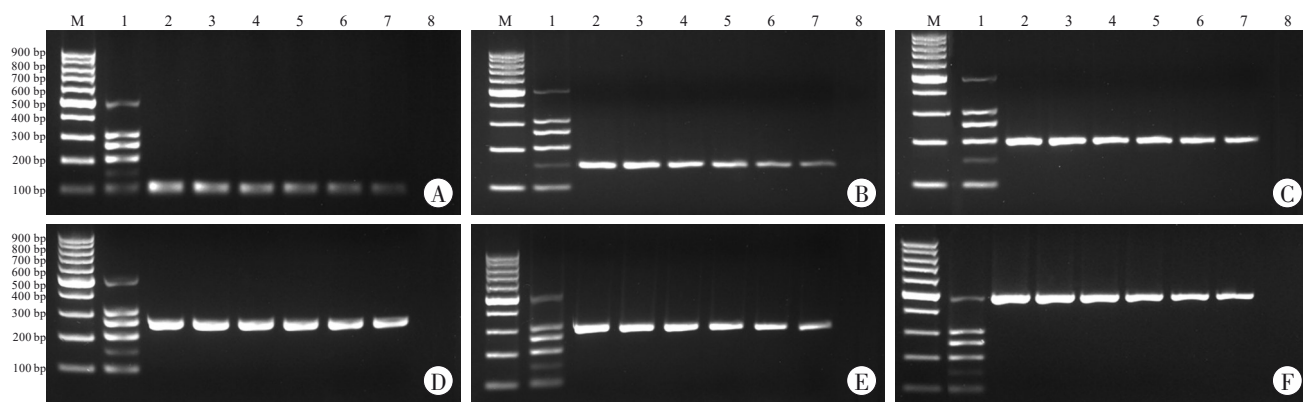
以梯度稀释的6个目标物种的混合DNA为模板,利用所构建的体系进行PCR扩增与电泳。结果如图2所示,随着DNA模板量的减少,扩增产物在琼脂糖凝胶中的亮度逐渐降低。在DNA模板量为0.062 5~2 ng/ μ L时,6个物种的扩增产物均能检见。

2.4 重复性研究结果

利用所构建的复合扩增体系对6个目标物种DNA样本(每个物种6例)进行多重PCR扩增,产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测,每个物种获得的条带结果均一致,扩增产物长度符合预期,能准确判别物种类型。

2.5 模拟混合样本研究结果

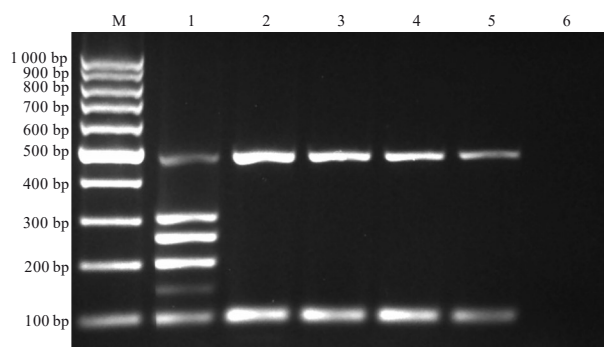
按照0.5%、1%、5%、10%的质量比将鸭肉掺入牛肉中,形成100 mg的模拟混合物,经琼脂糖凝胶电泳检测,混合样本比例低至0.5%时,即非牛肉成分的质量低至0.5 mg,混合物中仍能检测到鸭肉成分(图3)。



A:牛;B:羊;C:鸡;D:猪;E:鹅;F:鸭。M:100 bp DNA 分子量标准品;1:牛、羊、鸡、猪、鹅和鸭的 DNA 混合物;2:质量浓度为 2 ng/ μ L;3:质量浓度为 1 ng/ μ L;4:质量浓度为 0.5 ng/ μ L;5:质量浓度为 0.25 ng/ μ L;6:质量浓度为 0.125 ng/ μ L;7:质量浓度为 0.0625 ng/ μ L;8:空白对照。

图 2 多重 PCR 检测体系灵敏度检测结果

Fig. 2 Sensitivity detection results of multiplex PCR detection system



M:100 bp DNA 分子量标准品;1:牛、羊、鸡、猪、鹅和鸭的 DNA 混合物;2:添加鸭肉与牛肉的质量比为 10%;3:添加鸭肉与牛肉的质量比为 5%;4:添加鸭肉与牛肉的质量比为 1%;5:添加鸭肉与牛肉的质量比为 0.5%;6:空白对照。

图 3 模拟鸭肉掺假牛肉样本的检测结果

Fig. 3 Detection results of the simulated samples of duck mixed with beef

3 讨 论

肉类掺假一直以来都是食品安全领域备受关注的重要问题,掺杂其他肉类或添加非肉类成分不仅欺骗消费者,还严重影响人体健康^[20-21]。因此,准确鉴定肉类成分在食品安全领域具有重要意义。

基于 DNA 的多重 PCR 检测技术是一种快速、准确、特异、灵敏且易于操作的肉类掺假鉴定方法,该方法通过在同一体系中同时扩增多对物种特异性引物,从而达到快速鉴别肉类食品中不同物种成分的目的。然而,多重 PCR 体系中引物数量的增加会导致更多的交叉反应^[5,21],这些交叉反应是限制同一体系中可鉴定物种数量的主要原因。此外,多重 PCR 体系中,由于不同引物与模板 DNA 处于同一反应体系,导致引物与模板之间更容易发生非特异性扩增。因此,本研究基于线粒体全基因组序列严格按照特异性 DNA

序列筛选标准,选择具有种内保守性、种间特异性的物种特异性 DNA 序列用于引物设计,以提高多重 PCR 检测体系的特异性和可靠性。但需要注意的是,在某些加工肉制品中, DNA 可能会发生降解导致 PCR 扩增失败。研究^[15,29]表明,当肉加热到 100 $^{\circ}$ C 时 DNA 片段长度减少至 1 100 bp 左右,加热到 120 $^{\circ}$ C 时则减少至 600 bp 以下。因此,为提高 PCR 扩增成功率,本研究特异性引物所扩增的目标片段均在 500 bp 以下,并且成功扩增出 6 种目标肉类的特异性条带,在 1 000 bp 内未产生非特异性扩增片段。同时,将所构建的多重 PCR 检测体系对驴、狗、兔、马、鼠、猫、人 7 个常见物种的 DNA 样本进行扩增,结果未出现非特异性条带,表明该体系具有良好的种属特异性。在多重 PCR 反应体系中,多重 PCR 反应的灵敏度通常比单个 PCR 反应低 10~100 倍^[19],这种灵敏度的降低可能是由于多对引物之间的交叉反应和引物与模板 DNA 之间的非特异性结合所导致。尽管如此,本研究建立的多重 PCR 检测体系能够检测到的 DNA 量低至 0.062 5 ng,这一灵敏度水平足以用于实际案件。

为评估所构建多重 PCR 检测体系的实用性,本研究对该体系进行模拟混合样本测试。在模拟混合样本检测中,按照一定比例混合鸭肉和牛肉,并提取混合物的总 DNA,研究结果表明,即使在混合比例低至 0.5% 的混合物中仍能够检测出所掺假的低价肉类,在实际生产销售过程中,0.5% 的掺假肉类添加量几乎是无利可图的。因此,本研究建立的多重 PCR 检测体系能够满足实际情况下肉类掺假案件的检测。

本研究构建了一种用于同时鉴定牛、羊、鸡、猪、鹅和鸭 6 种常见食用肉类物种的多重 PCR 检测体系。通过对该体系进行一系列的验证,表明该检测体系具有较高的特异性、灵敏度和重复性,可准确鉴定市场

中这6种常见食用肉类食品中的动物源性成分。能够为法医学动物类食品鉴定提供一种可靠、便捷的检测手段,有助于食品监管机构及警方打击动物源性食品欺诈行为,为我国常见肉及肉制品的掺假鉴定提供一种简单、实用的检测方法。

参考文献:

- [1] 王柏辉,周晋尧,周霞,等. 肉及肉制品真实性鉴别技术的研究进展[J]. 食品工业,2022,43(9):239-243.
WANG B H, ZHOU J Y, ZHOU X, et al. Research progress of meat and meat products authenticity identification technology[J]. Shipin Gongye, 2022,43(9):239-243.
- [2] MANSOURI M, KHALILZADEH B, BARZE-GARI A, et al. Design a highly specific sequence for electrochemical evaluation of meat adulteration in cooked sausages[J]. Biosens Bioelectron, 2020, 150: 111916. doi:10.1016/j.bios.2019.111916.
- [3] LI X M, ZANG M W, LI D, et al. Meat food fraud risk in Chinese markets 2012-2021[J]. NPJ Sci Food, 2023, 7(1): 12. doi:10.1038/s41538-023-00189-z.
- [4] 田晨曦,周巍,王爽,等. 基于DNA条形码技术常见肉类掺假鉴别技术的研究[J]. 现代食品科技,2016,32(8): 295-301. doi:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.045.
TIAN C X, ZHOU W, WANG S, et al. Techniques for identifying common meat adulterations based on DNA barcoding[J]. Xiandai Shipin Keji, 2016,32(8):295-301.
- [5] LI J C, LI J P, XU S G, et al. A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes[J]. Food Chem, 2019, 295: 395-402. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.112.
- [6] 周斌,张林,吴梅筠,等. DNA分析与种属鉴定[J]. 法医学杂志,2003,19(4): 245-248,252. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2003.04.021.
ZHOU B, ZHANG L, WU M J, et al. DNA-based technique and species identification[J]. Fayixue Zazhi, 2003,19(4):245-248,252.
- [7] 王闯. DNA分析在法医学种属鉴定中的应用研究[D]. 成都:四川大学,2006.
WANG C. A study of DNA analysis in forensic species identification[D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.
- [8] BATAILLE M, CRAINIC K, LETERREUX M, et al. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation[J]. Forensic Sci Int, 1999, 99(3): 165-170. doi:10.1016/s0379-0738(98)00185-6.
- [9] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K, et al. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene to identify meat species[J]. J Appl Anim Res, 2013, 41(1): 77-81. doi: 10.1080/09712119.2012.738213.
- [10] NATONEK-WIŚNIEWSKA M, KRZYŚCIN P. Evaluation of the suitability of mitochondrial DNA for species identification of microtraces and forensic traces[J]. Acta Biochim Pol, 2017, 64(4): 705-708. doi:10.18388/abp.2017_2304.
- [11] MORITZ C. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics[J]. Annu Rev Ecol Syst, 1987, 18: 269-292. doi:10.1146/annurev.ecolsys.18.1.269.
- [12] CUI W, JIN X Y, GUO Y X, et al. Development and validation of a novel five-dye short tandem repeat panel for forensic identification of 11 species[J]. Front Genet, 2020, 11: 1005. doi: 10.3389/fgene.2020.01005.
- [13] WU Q Q, XIANG S N, WANG W J, et al. Species identification of fox-, mink-, dog-, and rabbit-derived ingredients by multiplex PCR and real-time PCR assay[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 185(1): 1-12. doi:10.1007/s12010-017-2621-2.
- [14] THANAKIATKRAI P, KITPIPIT T. Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting[J]. Food Chem, 2017, 233: 144-150. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.090.
- [15] 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. doi:10.1016/j.gene.2020.145062.
- [16] SHEHATA H R, LI J P, CHEN S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182872. doi:10.1371/journal.pone.0182872.
- [17] FAJARDO V, GONZÁLEZ I, LÓPEZ-CALLEJA I, et al. PCR-RFLP authentication of meats from red Deer (*Cervus elaphus*), fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*)[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(4): 1144-1150. doi: 10.1021/jf051766r.
- [18] SIVARAMAN B, JEYASEKARAN G, SHAKILA R J, et al. PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme[J]. Food Control, 2018, 90: 58-65. doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.028.
- [19] ISHIDA N, SAKURADA M, KUSUNOKI H, et al. Development of a simultaneous identification

- method for 13 animal species using two multiplex real-time PCR assays and melting curve analysis[J]. Leg Med, 2018, 30: 64-71. doi: 10.1016/j.legalmed.2017.11.007.
- [20] QIN P Z, QU W, XU J G, et al. A sensitive multiplex PCR protocol for simultaneous detection of chicken, duck, and pork in beef samples[J]. J Food Sci Technol, 2019, 56(3): 1266-1274. doi: 10.1007/s13197-019-03591-2.
- [21] LIU W 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]. Eur Food Res Technol, 2019, 245(11): 2385-2392. doi:10.1007/s00217-019-03350-9.
- [22] TOBE S S, LINACRE A M T. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. Electrophoresis, 2008, 29(2): 340-347. doi: 10.1002/elps.200700706.
- [23] 贾慧建,王天添,赵远,等.肉制品中狗、狐、貂源性成分DNA检测试剂盒的制备[J].肉类研究,2021,35(8):48-53. doi:10.7506/rlyj1001-8123-20210311-064.
JIA H J, WANG T T, ZHAO Y, et al. Development of DNA detection kit for dog, fox and mink-derived components in adulterated meat products[J]. Roulei Yanjiu, 2021, 35(8):48-53.
- [24] 夏若成,陶瑞阳,袁春艳,等.应用16S *rRNA* 基因测序鉴定肉类掺假1例[J].中国法医学杂志,2022,37(2): 135-136. doi:10.13618/j.issn.1001-5728.2022.02.005.
XIA R C, TAO R Y, YUAN C Y, et al. Identification of a case of meat adulteration by 16S *rRNA* gene sequencing[J]. Zhongguo Fayixue Zazhi, 2022, 37(2):135-136.
- [25] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Sequence analysis of mitochondrial 12S *rRNA* gene can identify meat species[J]. Meat Sci, 2004, 66(3): 551-556. doi: 10.1016/S0309-1740(03)00158-X.
- [26] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Mol Biol Evol, 2021, 38(7):3022-3027. doi:10.1093/molbev/msab120.
- [27] VALLONE P M, BUTLER J M. AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures[J]. Biotechniques, 2004, 37(2):226-231. doi:10.2144/04372ST03.
- [28] DAI Z Y, QIAO J, YANG S R, et al. Species authentication of common meat based on PCR analysis of the mitochondrial *COI* gene[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 176(6): 1770-1780. doi: 10.1007/s12010-015-1715-y.
- [29] 陈睿贇.一种利用线粒体DNA鉴别羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉的PCR检测方法[D].保定:河北农业大学, 2013:58-59.
CHEN R Z. A PCR-mtDNA approach for the identification of lamb, pork, chicken and duck[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2013:58-59.

(收稿日期:2023-10-10)

(本文编辑:刘希玲)