

# 羊肉掺假鉴别快速荧光定量 PCR 芯片制备及应用研究

李婷婷, 张桂兰, 王之莹, 陈爱亮\*

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081

**摘要:** 为了建立一种基于芯片的快速鉴别羊肉掺假成分的方法, 将不同动物源性成分的引物及反应所需试剂预先冻干固定到空白芯片反应池内, 以制备羊肉掺假鉴别快速荧光定量 PCR 芯片。同时, 通过模拟掺假样品(在羊肉中掺入猪肉、鸡肉、鸭肉、鼠肉成分)检测实验, 对所得芯片的性能进行了评价。从与 ABI7500 荧光定量 PCR 结果对比可知, 基于芯片的快速荧光定量 PCR 检测方法可以准确检测 5 种动物源性成分, 具有较高的准确性及可用性, 且其 PCR 扩增时间较短, 操作简单, 满足了羊肉掺假快速鉴别的要求。该芯片的研制及快速检测方法的建立将有效的简化羊肉制品掺假检测的步骤、缩短检测时间, 且成本较低, 仪器便于携带, 使现场检测成为可能。研究结果为我国肉类食品安全监管提供了有力保障。

**关键词:** 肉制品; 掺假; 鉴别; 荧光定量 PCR; 芯片

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0075

## Chip Preparation and Application Research with Real-time PCR for Rapid Identification of Mutton Adulteration

LI Tingting, ZHANG Guilan, WANG Zhiying, CHEN Ailiang\*

*Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*

**Abstract:** In order to establish a rapid chip-based method to identify adulterated mutton, the primers for different animal-sourced components and the reagents required for amplification were freeze-dried and immobilized on blank chip reaction cells beforehand, which could be used in fluorescent quantitative PCR for rapid detection of mutton adulteration. And the performance of prepared chip was evaluated by detection test for simulated adulterated samples, which were made by adding pork, chicken, duck and rat meat into mutton. Compared with ABI7500 fluorescent qPCR, the detection method using rapid chip-based fluorescent qPCR could accurately detect five animal-sourced components, and it had high accuracy and availability. In addition, the time required for PCR amplification of this method was shorter, and it could be easily performed, meeting the requirement for quick detection of mutton adulteration. The preparation of the chip and the establishment of the rapid detection method would effectively simplify the detection process of mutton adulteration and shorten the detection time. Additionally, this method cost lower, and the instruments were easy to carry, which made field testing possible. The research result could provide a strong guarantee for meat safety supervision in China.

**Key words:** meat product; adulteration; identification; fluorogenic quantitative PCR (real-time PCR); chip

随着社会经济水平的提高,我国居民饮食结构发生了重大的变化,火锅、羊肉串等备受喜爱。然而,目前羊肉制品掺假现象愈发严重<sup>[1,2]</sup>,常见的掺假肉类主要包括猪肉、鸡肉、鸭肉等,有的甚至还会掺入鼠肉<sup>[3,4]</sup>。这种欺诈行为严重损害了

消费者权益,同时对社会发展带来了消极影响。

目前,研究人员已经开发出多种肉品掺假检测技术<sup>[5]</sup>,主要包括以蛋白质为基础的酶联免疫吸附<sup>[6,7]</sup>、色谱质谱技术<sup>[8~11]</sup>,以代谢物为基础的红外光谱技术<sup>[12]</sup>和以核酸为基础的 PCR 检测技

收稿日期:2018-06-13; 接受日期:2018-08-24

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFF0211302)资助。

作者简介:李婷婷,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail:810831158@qq.com。\* 通信作者:陈爱亮,研究员,博士,研究方向为食品质量安全。E-mail:aaliang.chen@gmail.com

术<sup>[13~17]</sup>等。其中,应用最多的为基于荧光定量 PCR 的检测技术,但是现有技术所需时间较长,无法满足现场快速鉴别的要求。同时,以羊肉串掺假为例,其掺假的肉类品种可能有猪肉、鸡肉、鸭肉、甚至老鼠肉等,如果逐个对可能的掺假物种进行 PCR 检测,则存在操作繁琐、分析时间长等问题。

近年来,芯片式快速荧光定量 PCR 技术的发展为羊肉掺假鉴别等核酸检测提供了一种快速、多重的荧光定量 PCR 检测方法,其是一种将芯片技术与荧光定量 PCR 技术相结合的高新生物技术<sup>[18~20]</sup>。传统的微芯片技术是运用微电机系统(micro-electro-mechanical system, MEMS)技术,通过制作微管道等空间结构及微加热等控制结构,实现芯片上的快速 PCR 扩增<sup>[21]</sup>,而本研究通过将引物、反应所需试剂预先冻干固定到芯片上,只需将模板滴加至微孔内即可进行扩增,同时利用微芯片实时荧光定量 PCR 仪实现通过荧光信号检测 PCR 产物。该技术也可应用于农业(植物病原菌检测、转基因鉴别)、畜牧(牛类病害鉴别、鱼类和家禽病原菌检测)、食品安全(病原菌鉴别、微生物腐败鉴别)、生命科学和医疗(人类疾病鉴别、人类基因检测)等领域。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羊肉、猪肉、鸭肉、鸡肉均购自北京市农贸市场,鼠肉由中国农业科学院饲料研究所提供。

二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、海藻糖等均购自北京雁栖湾生物技术有限公司。

1.2 实验仪器

7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); AriaDNA-10 便携式微芯片实时荧光定量 PCR 仪(LUMEX 分析仪器公司); NanoDrop 2000c 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司); 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); 5424 离心机(德国 Eppendorf 公司); MS 3 涡旋仪(德国 IKA 公司); KAPA SYBR® FAST Universal Kits(北京百诺威生物科技有限公司); TIANamp Genomic DNA Kit(北京天根生化科技有限公司)。

1.3 样品制备

用电子天平称取羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉、鼠肉各 20 mg,用于提取引物特异性实验所用模板。再按照不同重量百分比(表 1)分别称取不同肌肉组织进行混合,作为模拟掺假样品(每份样品为 20 mg),总掺假比例为 0~80%。

表 1 研究用模拟掺假样品  
Table 1 Simulated samples used in this study.

编号	各种肉品掺入比例(%)					总掺假比例(%)
	羊	猪	鸡	鸭	鼠	
1	100	-	-	-	-	0
2	50	50	-	-	-	50
3	33.3	33.3	33.3	-	-	67
4	25	25	25	25	-	75
5	20	20	20	20	20	80

注:“-”表示该样品不含此成分。

1.4 DNA 的提取及检测

按照 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书提取制备好的样品的基因组 DNA。采用超微量分光光度计对提取的 DNA 进行浓度及纯度检测。其浓度为 10~20 ng/μL,且纯度较高( $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~1.9,  $A_{260}/A_{230} > 2.0$ ),因此可用于后续 PCR 扩增。

1.5 引物特异性实验

研究所用引物均由北京生工生物技术有限公司合成,具体序列见表 2。为了确定引物特异性,在 ABI7500 仪器上分别用羊源、猪源、鸡源、鸭源与鼠源成分的特异性引物对 5 种肉的基因组 DNA 进行扩增。反应体系(20 μL): 2×PCR Mix 10 μL, 10 mol/L 正、反向引物各 0.4 μL,模板 2 μL,剩余用无菌去离子水补齐;反应程序:95℃ 5 min; 95℃ 3 s, 60℃ 32 s, 共 40 个循环; 72℃ 2 min。添加熔解曲线。通过扩增  $C_t$  值(每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数)来判断引物的特异性,  $C_t < 35$  为有效扩增,  $C_t \geq 35$  为无效扩增。

1.6 芯片式 PCR

1.6.1 芯片的制备 本研究的空芯片微阵列设计为 5×6 阵列,每个位点包含冻干固定的一对引物(表 3)及反应所需试剂。反应体系(20 μL):

表 2 本研究所用引物  
Table 2 Primers used in this study.

靶标	引物名称	引物序列(5'→3')	种属	参考文献
细胞色素 b	F1	5'-ACACAATTCTACCACAACCC-3'	羊源基因	[22]
	R1	5'-AAACAATGAGGGTAACGAGGG-3'		
细胞色素 b	F2	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGAAA-3'	猪源基因	[23]
	R2	5'-GCCCCTCAGATGATATTGTCTCTCA-3'		
NADH 脱氢酶	F3	5'-TTATTCTRTGCTCYGGCCT-3'	鸡源基因	[24]
	R3	5'-CGTAYGATTGGGAGRATGGCTG-3'		
16S rRNA	F4	5'-TTGTTTGTGATTAGGTGGGTG-3'	鸭源基因	[25]
	R4	5'-CGACCAAATTTATAACGTG-3'		
细胞色素 b	F5	5'-GACCAATGATATGAAAAACCATCGTTGT-3'	鼠源基因	[26]
	R5	5'-GGAATAATAGTAATATAAATACACCTAGGAGGTC-3'		

表 3 芯片中引物的位置(5×6)  
Table 3 The positions of primers in the chip (5×6).

第 1 列	第 2 列	第 3 列	第 4 列	第 5 列	第 6 列
羊源性引物	羊源性引物	羊源性引物	羊源性引物	羊源性引物	羊源性引物
猪源性引物	猪源性引物	猪源性引物	猪源性引物	猪源性引物	猪源性引物
鸡源性引物	鸡源性引物	鸡源性引物	鸡源性引物	鸡源性引物	鸡源性引物
鸭源性引物	鸭源性引物	鸭源性引物	鸭源性引物	鸭源性引物	鸭源性引物
鼠源性引物	鼠源性引物	鼠源性引物	鼠源性引物	鼠源性引物	鼠源性引物

2×PCR Mix 10 μL, 10 mol/L 正、反向引物各 0.4 μL, 剩余体积用无菌去离子水补齐, 同时将 5 μL 0.5 g/mL DMSO、1.65~1.95 mg 保护剂 BSA、0.6~1.2 mg 赋型剂海藻糖与 20 μL 反应体系进行混合。随后取 2 μL 混合溶液滴加到芯片上, 采用冻干机进行冻干(−40℃, 冷冻 2 h), 置于 4℃ 备用。

**1.6.2 芯片式 PCR 反应** 将 2 μL 模拟掺假样品 1、2、3、4、5 的基因组 DNA 分别滴加到芯片的第 1、2、3、4、5 列的反应池内, 第 6 列为阴性对照, 即不含任何模板。然后用 640 μL 矿物油将液体覆盖, 以免高温蒸发, 此方法无需繁琐的配制体系与操作步骤, 简单快速。反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 3 s, 60℃ 32 s, 共 40 个循环; 72℃ 2 min。添加熔解曲线。

**1.7 ABI7500 荧光定量 PCR**

在 ABI7500 仪器上分别用羊源、猪源、鸭源、鸡源与鼠源性成分的特异性引物对 5 种模拟掺假样品的基因组 DNA 进行扩增, 反应体系(20

μL): 2×PCR Mix 10 μL, 10 mol/L 正、反向引物各 0.4 μL, 模板 2 μL, 剩余体积用水补齐即可。反应程序与芯片式 PCR 相同。

**2 结果与分析**

**2.1 引物特异性实验**

引物的特异性是动物源性成分核酸检测技术的关键, 本研究利用筛选出的羊源、猪源、鸭源、鸡源与鼠源性成分的特异性引物对 5 种肉的基因组 DNA 进行扩增, 结果如图 1 所示。

以羊源性引物为例(图 1A), 用羊源性引物进行扩增时, 除了羊源 DNA 出现扩增且所对应的熔解曲线均为单峰外, 其他物种模板均无扩增且熔解曲线为平滑的一条直线, 说明羊源性引物的特异性较好。猪源、鸡源、鸭源与鼠源性引物与羊的结果一致, 表明 5 对引物特异性好, 可用于后续实验。

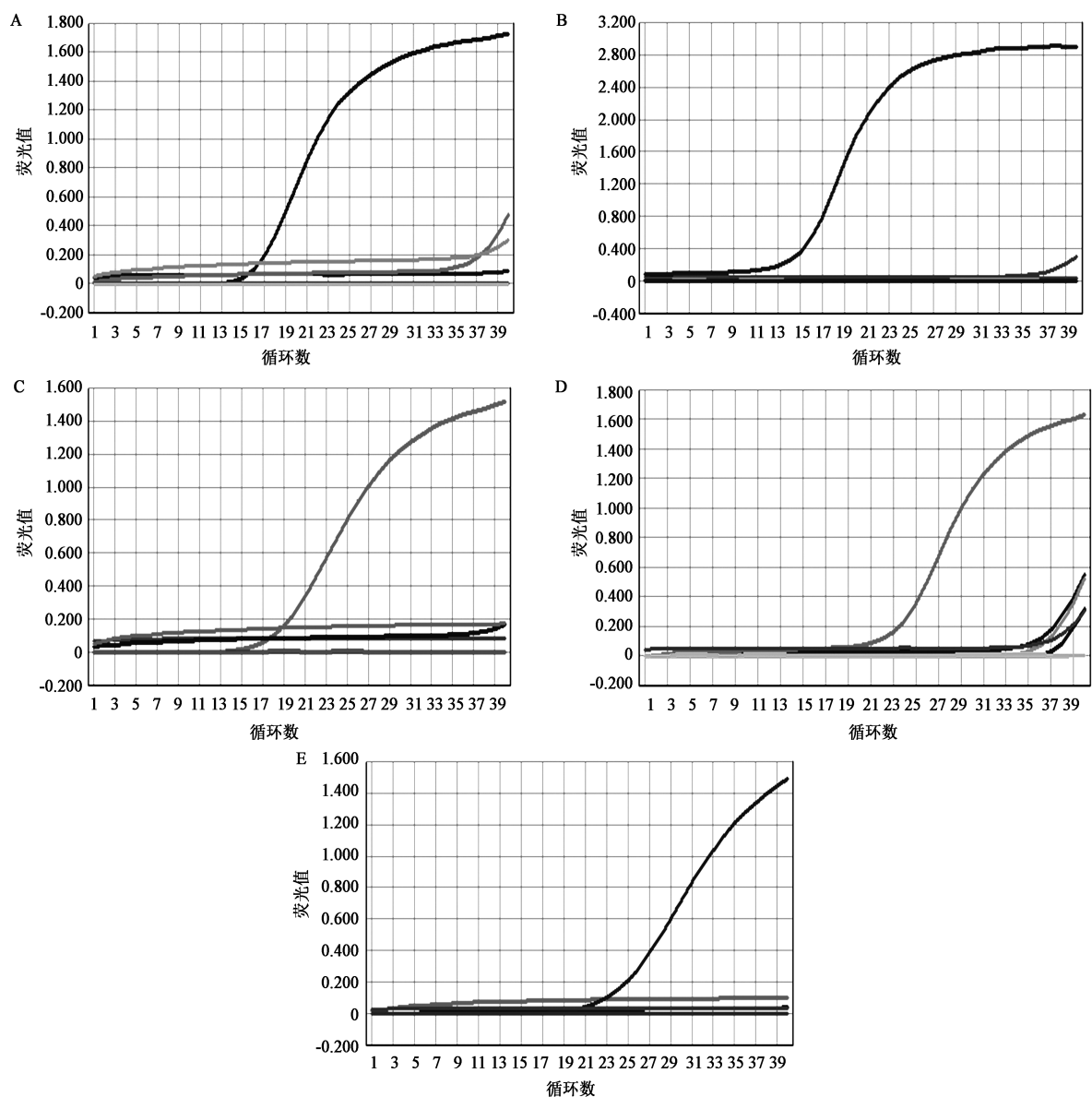


图 1 引物特异性实验

Fig.1 The specificity of primers.

A~E 依次为羊源、猪源、鸡源、鸭源、鼠源性成分的特异性引物分别对 5 种肉的基因组 DNA 扩增后的结果。

2.2 自制多重 PCR 芯片检测模拟羊肉掺假样品结果

本研究利用自制的羊肉掺假鉴别多重 PCR 芯片以及 AriaDNA-10 便携式微芯片实时荧光定量 PCR 仪对 5 种模拟掺假样品进行检测,各靶标的扩增 C<sub>t</sub> 值见表 4,扩增曲线见图 2。

根据 5 种模拟掺假样品的成分配比可知,每个样品中均含有羊源性成分,因此,采用羊源性引物对 5 种模拟掺假样品进行扩增时,共 5 条扩增曲线(图 2A)。同理,猪源、鸡源、鸭源与鼠源性

引物的位置分别出现 4 条、3 条、2 条与 1 条扩增曲线,结果与已知样品中所含成分保持一致。由于在实际应用中若掺假比例太低,则获利微薄,因此,本研究将最低掺假比例设为 20%,未对含量更低的样品进行检测。从图 2 可以看出,利用自制的 PCR 芯片对 5 种模拟掺假样品进行检测,均可检测到相应的动物源性成分,定性检测准确率为 100%,同时,扩增曲线表明自制的 PCR 芯片具有较好的扩增效率,而且随着动物源性成分含量的降低,相应的 C<sub>t</sub> 值逐渐增大。

表 4 模拟羊肉掺假样品的扩增  $C_t$  值 (Lumex)  
Table 4 The  $C_t$  values of simulated adulterated mutton samples (Lumex).

样品 编号	羊	猪	鸡	鸭	鼠
1	25.940	-	-	-	-
2	26.360	22.390	-	-	-
3	28.520	22.820	19.960	-	-
4	29.240	23.050	20.170	27.010	-
5	29.960	24.070	20.450	28.470	21.250

2.3 ABI7500 荧光定量 PCR 验证及结果比对

采用 ABI7500 仪器对 5 种模拟掺假样品进行检测,从而验证 AriaDNA-10 便携式微芯片实时荧光定量 PCR 仪的性能。各靶标的扩增  $C_t$  值见表 5,扩增曲线见图 3。

结合芯片式 PCR 和 ABI7500 荧光定量 PCR 的结果可知,本研究所建立的扩增体系中,在 AriaDNA-10 仪器上用芯片进行扩增时,其扩增曲线不如 ABI7500 仪器显示的曲线平滑,同时,从  $C_t$

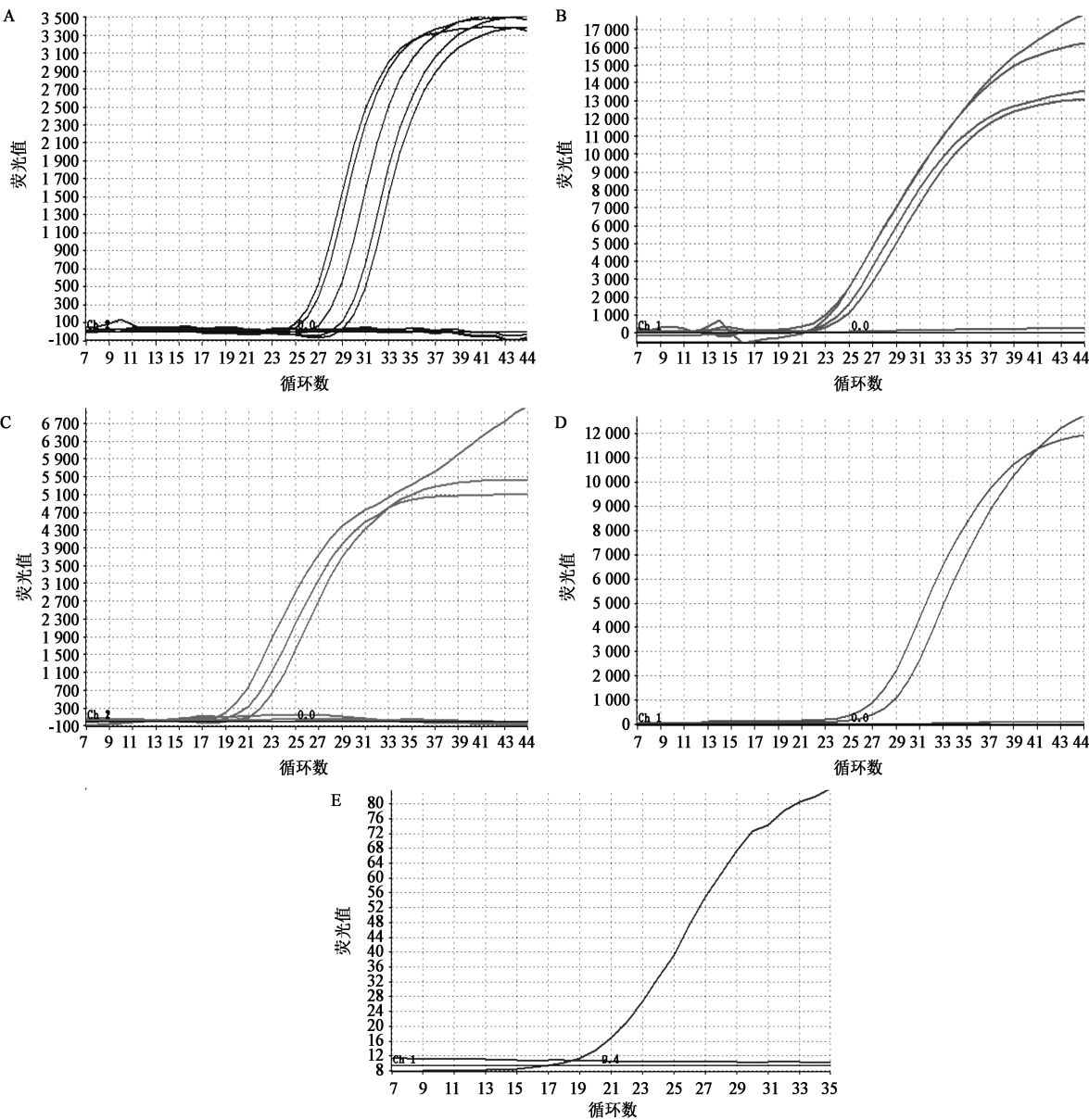


图 2 Lumex 仪器对不同样品进行扩增的曲线图

Fig.2 The fluorescent amplification curves of the different samples by Lumex.

A~E 依次为羊源、猪源、鸡源、鸭源和鼠源性成分的特异性引物对 5 种模拟掺假样品扩增后的结果。



值可以看出,采用 ABI7500 仪器进行扩增的  $C_t$  值均小于采用芯片进行扩增的  $C_t$  值,可能原因是芯片上的扩增体系相对较少,导致达到阈值的时间偏后,因此,采用芯片进行扩增时效率偏低。但是总体来说,2 种 PCR 检测方法的结果一致,2 种方法均能准确的检测出 5 种成分,且随着动物源性成分含量的减少,相应的  $C_t$  值会逐渐增加。需要注意的是,本研究无法通过  $C_t$  值进行定量检测,只能进行定性检测,即确定含有哪种成分的掺假。

表 5 模拟羊肉掺假样品扩增  $C_t$  值 (ABI7500)  
Table 5 The  $C_t$  values of simulated adulterated mutton samples (ABI7500).

样品 编号	羊	猪	鸡	鸭	鼠
1	22.214	—	—	—	—
2	22.567	22.624	—	—	—
3	22.431	23.054	15.472	—	—
4	22.841	23.145	15.820	24.497	—
5	23.542	23.586	15.129	25.196	17.370

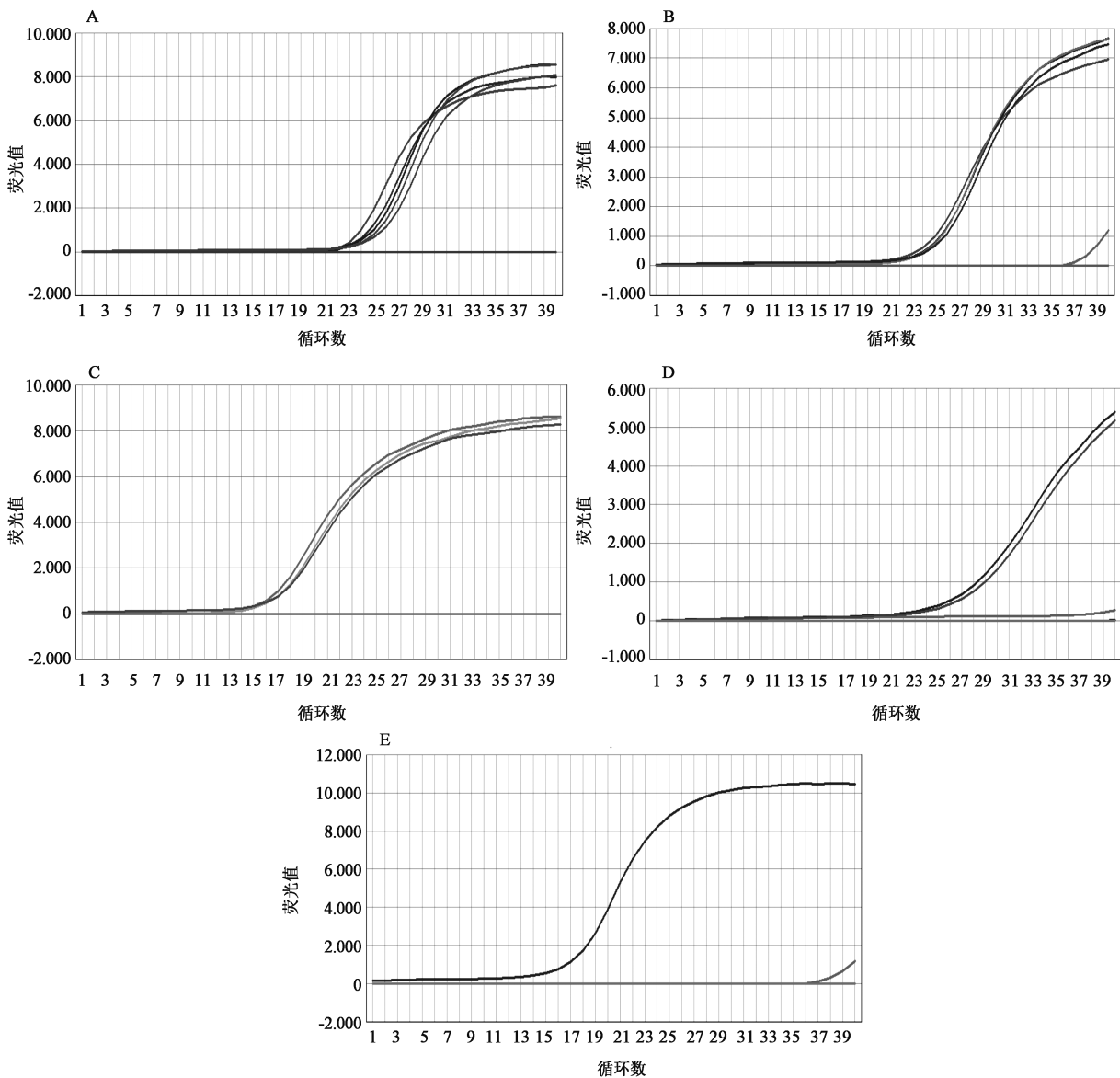


图 3 ABI7500 对不同样品进行扩增的曲线图

Fig.3 The fluorescent amplification curves of the different samples by ABI7500.

A~E 依次为羊源、猪源、鸡源、鸭源和鼠源性成分的特异性引物对 5 种模拟掺假样品扩增后的结果。

### 3 讨论

本研究建立了基于芯片的快速荧光定量 PCR 检测方法,与传统的荧光定量 PCR 相比,PCR 芯片一般由 5×4 或更多的反应池组成,可实现样品多指标的检测;由于芯片式 PCR 预先将反应所需试剂和引物冻干保存,只需将提取的 DNA 模板滴加到芯片上即可进行扩增,简化了检测步骤、缩短了检测时间。通过与 ABI7500 荧光定量 PCR 结果进行对比,发现两者的结果具有一致性,均可准确的检测出 5 种成分,且  $C_t$  值均随着动物源性成分比例的减少而升高。

目前,已有很多关于利用 PCR 技术检测肉制品中掺假成分的报道<sup>[27-29]</sup>。Prusakova 等<sup>[30]</sup>采用多重 PCR 扩增法,可同时鉴别肉类产品中 5 种常见的掺假肉类,每种肉类的检测灵敏度可达 30 pg。Dalsecco 等<sup>[31]</sup>采用荧光定量 PCR 的方法,可以检测 10 种不同的动物源性成分;利用该方法对 46 种实验肉品混合物进行了评价,结果显示所有品种均鉴定正确,检测灵敏度为 1%;同时对 14 种商业的肉类产品进行分析,结果表明 14 个样品中有 6 个含有鸡肉原料,由此可知,该方法对肉类产品的分析是有效和可靠的。普通 PCR 虽然操作简单、成本较低,但是对产物进行电泳检测所需时间较长,而传统的荧光定量 PCR 一般需要 2 h 才能完成,不适用于现场检测。本研究所建立的芯片式荧光定量 PCR 扩增法,由于所需样本体积小(只需 2  $\mu$ L),PCR 升降温反应速度快,可缩短至 30 min 完成扩增及数据收集,操作简单,实验周期短。该芯片的研制及快速检测方法的建立将有效的简化羊肉制品掺假检测的步骤、缩短检测时间,同时所用芯片检测仪器 Lumex 体积较小,携带方便,为现场检测提供了技术支撑。

本研究虽然可以在 30 min 内完成扩增及数据收集,但是要建立一种快速检测体系,DNA 提取也需快速进行,目前虽然已经有相关的快速提取 DNA 试剂盒,但大多数为磁珠法,需要进行细胞裂解、去除蛋白质等步骤,操作繁琐,而 PCR 技术是一项非常灵敏的分子检测技术,扩增效率高,只需痕量 DNA 即可检测。因此,本课题组开发了一种粗提 DNA 技术<sup>[32]</sup>,在 5 min 内即可提取 DNA 进行扩增,进一步缩短了检测时间,为羊肉制品安

全监测、掺假监管提供了理想的技术手段及方法。未来,如何将 DNA 提取、特异片段扩增和数据收集整合为一体化的检测方法仍需进一步探索。

### 参 考 文 献

- [1] Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, *et al.*. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay[J]. *Meat Sci.*, 2009, 82(4): 444-449.
- [2] 高丹丹, 曹郁生, 王迎华. PCR 技术在食品动物源性检测中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(1): 141-144.
- [3] 逯文娟. 从羊肉造假看食品安全监管[J]. *食品安全导刊*, 2013(5): 13.
- [4] 李楠, 王佳慧, 沈青, 等. 北京地区牛、羊肉片中鸭、鸡、猪源性成分调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(3): 227-232.
- [5] 李婷婷, 张桂兰, 赵杰, 等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018(2): 409-415.
- [6] 任秀, 骆海朋, 崔生辉. 酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(1): 93-97.
- [7] Kreuz G, Zagon J, Broll H, *et al.*. Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: A novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration[J]. *Food Addit. Contam. A*, 2012, 29(5): 716-726.
- [8] Montowska M, Fornal E. Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products[J]. *Food Chem.*, 2017, 237: 1092-1100.
- [9] Naveena B M, Jagadeesh D S, Babu A J, *et al.*. OFFGEL electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cooked ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat[J]. *Food Chem.*, 2017, 233: 311-320.
- [10] Prandi B, Lambertini F, Faccini A, *et al.*. Mass spectrometry quantification of beef and pork meat in highly processed food: Application on bolognese sauce[J]. *Food Control*, 2017, 74: 61-69.
- [11] Zhou W, Xia L, Huang C, *et al.*. Rapid analysis and identification of meat species by laser-ablation electrospray mass spectrometry (LAESI-MS)[J]. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2016, 30(S1): 116-121.
- [12] Gao F, Zhou S, Han L, *et al.*. A novel FT-IR spectroscopic method based on lipid characteristics for qualitative and quantitative analysis of animal-derived feedstuff adulterated with ruminant ingredients[J]. *Food Chem.*, 2017, 237: 342-349.
- [13] Hwang I K, Lee H Y, Kim M H, *et al.*. Development of real-time PCR assay for genetic identification of the mottled skate, *Beringraja pulchra*[J]. *Forensic Sci. Int.*, 2015, 255: 80-84.
- [14] Soares S, Amaral J S, Oliveira M B P P, *et al.*. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products[J]. *Meat Sci.*, 2013, 94(1): 115-120.
- [15] Sharma H, Mendiratta S K, Agrawal R K, *et al.*. Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the

- quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions[J]. LWT-Food Sci. Technol., 2017, 81:118-127.
- [16] Ran G, Ren L, Han X, *et al.*. Development of a rapid method for the visible detection of pork DNA in halal products by loop-mediated isothermal amplification[J]. Food Anal. Method., 2016, 9(3): 565-570.
- [17] Xiang W, Shang Y, Wang Q, *et al.*. Identification of a chicken (*Gallus gallus*) endogenous reference gene (*Actb*) and its application in meat adulteration[J]. Food Chem., 2017, 234: 472-478.
- [18] 陈建伟, 邵宁, 张雨晨, 等. 一种载样简单的多重可视化 PCR 微芯片[J]. 遗传, 2017, 39(6): 525-534.
- [19] 王可可, 杨柯, 赵俊, 等. 基于微流控芯片的荧光定量 PCR 法快速检测乙肝病毒核酸[J]. 分析测试学报, 2018, 34(4): 450-453.
- [20] 何启迪, 黄丹萍, 黄冠, 等. 微流控 PCR 芯片的研究进展[J]. 分析化学, 2016, 44(4): 542-550.
- [21] 章春笋, 徐进良. 连续流动式 PCR 芯片相关技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 114-118.
- [22] 顾文佳, 徐琼, 张奕南, 等. 应用荧光聚合酶链式反应检测冷冻羊肉卷中羊肉的含量[J]. 肉类研究, 2016, 30(7): 26-29.
- [23] Colombo F, Cardia A, Renon P, *et al.*. A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing[J]. Meat Sci., 2004, 66(3): 753-755.
- [24] Unajak S, Meesawat P, Anyamaneeratch K, *et al.*. Full length research paper identification of species (meat and blood samples) using nested-PCR analysis of mitochondrial DNA[J]. Afr. J. Biotechnol., 2011, 10(29): 5670-5676.
- [25] 张晶鑫, 高玉时, 樊艳凤, 等. 利用 PCR 技术鉴别畜禽肉中鸭源性成分研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(34): 202-203, 322.
- [26] 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.
- [27] Di Pinto A, Bottaro M, Bonerba E, *et al.*. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay[J]. J. Food Sci. Tech. Mys., 2015, 52(4): 2479-2484.
- [28] Kim M, Yoo I, Lee S Y, *et al.*. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region[J]. Food Chem., 2016, 210: 102-106.
- [29] Hou B, Meng X, Zhang L, *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 Sci., 2015, 101: 90-94.
- [30] Prusakova O V, Glukhova X A, Afanas'eva G V, *et al.*. A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species[J]. Meat Sci., 2018, 137: 34-40.
- [31] Dalsecco L S, Palhares R M, Oliveira P C, *et al.*. A fast and reliable real-time PCR method for detection of ten animal species in meat products[J]. J. Food Sci., 2018, 83(2): 258-265.
- [32] 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, 17(9): 4755-4758.