

王琰琳, 鲍志远, 韩小曼, 等. 基于 mtDNA ATP8 和 ND1 基因鉴别 8 种肉源种属的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 1-5.

WANG Y L, BAO Z Y, HAN X M, et al. Identification of 8 meat species based on mtDNA ATP8 and ND1 genes [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 1-5.

## 基于 mtDNA ATP8 和 ND1 基因鉴别 8 种肉源种属的研究

王琰琳, 鲍志远, 韩小曼, 薛瑜, 李嘉诚, 赵博昊, 吴信生, 陈阳\*

(扬州大学动物与科学技术学院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 目前食品安全问题越来越受到重视, 市面上常见的肉源检测方法存在自身的局限性, 本研究探索基于线粒体基因 ATP 酶 8 亚基 (ATP8) 和 NADH 脱氢酶亚基 1 (ND1) 基因检测不同肉源种属, 旨在为肉类掺假鉴别新技术的开发提供技术支撑。以猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、大鼠和小鼠共 8 种肉源的 DNA 作为检测靶标, 根据 ATP8 和 ND1 基因中种间特异性强的序列来设计引物, 采用 PCR 技术对目标 DNA 片段进行扩增, 利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测。结果: 成功构建了引物组合分别为小鼠+鸡+羊, 猪+牛+兔, 鸭+大鼠的复合检测体系, 能准确鉴别以上 8 种肉源种属; 随机在市场采集里脊肉、开花肠、飘香牛肉、肉肠和肥牛卷共 5 种样本进行测试, 其中里脊肉、开花肠、肉肠与配料表成分一致, 飘香牛肉、肥牛卷与配料表成分不一致, 证实该方法可应用于市场肉制品检测; 该方法有效识别浓度达 1 ng/ $\mu$ L。综上, 本研究建立了 8 种肉源的低成本、高效的复合 PCR 检测体系, 可以为食品安全中的肉类掺假鉴别提供帮助。

**关键词:** PCR; 肉类物种; 鉴别; ATP8; ND1

中图分类号: TS251.7

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)07-0001-05

## Identification of 8 meat species based on mtDNA ATP8 and ND1 genes

WANG Yanlin, BAO Zhiyuan, HAN Xiaoman, XUE Yu, LI Jiacheng,

ZHAO Bohao, WU Xinsheng, CHEN Yang\*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** At present, food safety issues are becoming more and more important, and the common meat source detection methods in the market have their own limitations. Therefore, the mitochondrial gene ATPase subunit 8 (ATP8) and NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) were used here to explore the authenticity of meat products, which provided technical support for the development of new technologies for meat adulteration identification. DNA from eight meat sources, including pig, cow, sheep, chicken, duck, rabbit, rat and mouse, was used as detection targets. Primers were designed according to the sequences with strong interspecific specificity in the ATP8 and ND1 genes. PCR was employed to amplify the target DNA fragments using the designed primers, and PCR amplification products were detected by agarose gel electrophoresis. The results showed that a composite detection system was formed, and different primer combinations were used to identify meat-derived species according to the difference in the length of the amplified fragments. Five kinds of actual samples were randomly collected for testing, which confirmed that the present method could be applied to the detection of meat products in the market. This low-cost and efficient composite PCR detection system for eight meat sources established in this study would help to provide food safety for meat adulteration.

**Keywords:** PCR; meat species; identification; ATP8; ND1

肉类富含多种营养素, 是人类饮食的重要组成部分<sup>[1-2]</sup>。然而, 一些不法商贩为牟利, 常掺假高价肉, 严重侵害消费者权益, 扰乱市场秩序。作为肉类

产销大国, 肉类质量检测对保障食品安全至关重要<sup>[3]</sup>。目前, 针对食品掺假的多种检测方法已被报道, 包括形态学、分子生物学及代谢组学技术, 各具特色但亦存在局限<sup>[4]</sup>。种属特异性 PCR 技术凭借其核酸序列的物种特异性, 在生鲜及加工肉制品掺假鉴别中得到了广泛应用<sup>[5]</sup>。Ali 等<sup>[6]</sup>设计了 5 对针对线粒体 NADH 脱氢酶亚基 (ND) 5、ATP 酶 6 亚基 (ATP6) 和细胞色素 b 基因 (Cytb) 的物种特异性引物, 扩增来自猫、犬、猪、猴和大鼠的 DNA 片段, 有效鉴别伊斯兰食品中禁用的 5 种肉类。

收稿日期: 2024-08-14; 修回日期: 2025-04-16

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20231332); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-43-A-1); 扬州大学青蓝工程项目

第一作者: 王琰琳, 女, 硕士研究生

\*通信作者: 陈阳, 博士, 教授, 研究方向为动物遗传育种与繁殖, E-mail: yangc@yzu.edu.cn。

线粒体 DNA (mtDNA) 是真核生物核外遗传物质, 结构简单, 发生变异的概率相对稳定, 可用于研究物种鉴别<sup>[7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup> 针对驴肉制品掺假问题, 开发了基于线粒体 ATP 酶 8 亚基 (ATP8)、ATP6 及 ND2 片段的双链 PCR 法, 该法高效特异, 适用于生肉及热加工肉制品中马、驴、骡肉的鉴别。Cho 等<sup>[9]</sup> 研究发现, ATP8 可作为靶标测定肉制品中的牛、羊、猪、鸡的 DNA。Colgan 等<sup>[10]</sup> 设计了针对牛、绵羊、猪和家禽物种 DNA 中线粒体 ATP6、ATP8 的 PCR 扩增检测方法。冉光耀<sup>[11]</sup> 建立了一个环介导等温扩增反应体系, 针对猪 ND1 基因、狐狸 Cytb 基因、大鼠和鸡的 D-loop 区等特定序列进行特异性识别, 从而准确检测各种肉源性成分。因此, 本试验根据市场上常见的肉品来源, 基于 ATP8 和 ND1 基因设计相关引物进行肉类物种的鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 肉类样本来源

猪、牛、羊、鸡、鸭、兔肉类样本购自市场, 大鼠、小鼠肉类样本来源于扬州大学比较医学中心。里脊肉、开花肠、飘香牛肉、肉肠和肥牛卷样品购自市场。

### 1.2 主要试剂和仪器

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根公司); 琼脂糖 (北京 BioFroxx 公司); DL500 DNA Marker (北京宝日医生物技术有限公司); PCR 仪 (南京润亚生物科技发展有限公司); 电泳仪 (美

国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 提取 DNA 及定量分析

根据 DNA 提取试剂盒说明书提取样品 DNA, 具体操作如下: 小心剪取约 0.1 g 肉类样品, 打碎处理为细胞悬液, 离心后加入 GA 缓冲液。利用 Proteinase K 溶液在 56 °C 进行组织溶解。依次加入 GB 缓冲液、无水乙醇, 瞬时离心后, 用吸附柱进行回收。加入 GD 缓冲液, 再次用吸附柱回收。加入 600 μL PW 漂洗液, 用吸附柱收集于管中, 重复 2 次。将吸附柱放回收集管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 倒掉废液, 于室温放置数分钟, 彻底晾干。悬空滴加 50~200 μL 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2~5 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中, 即获得对应样品 DNA。对提取得到的 DNA, 使用 Nanodrop 紫外可见光分光光度计测量其浓度与纯度, 并将其稀释至 100 ng/μL。

### 1.4 引物设计

根据不同种属的线粒体序列, 设计大鼠 (*Rattus norvegicus*)、兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、羊 (*Ovis aries*)、鸡 (*Gallus gallus*)、鸭 (*Anas platyrhynchos*)、牛 (*Bos taurus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和猪 (*Sus scrofa*) 种属特异性引物, 其中, 鸭选用了 ND1 基因, 其他 7 个种属引物均是根据 ATP8 基因设计, 如表 1 所示。所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表 1 肉源种属复合检测体系引物信息

种属	基因	登录号	引物序列 (5'→3')	预期产物大小/bp
猪	ATP8	FJ237003	F: GCCACAAC TAGATACATCCACATGATTCATTAC R: TTGTTGGATCGAGATTGTGCGGTT	300
小鼠	ATP8	NC005089	F: ACTAAAAGTCTCATCACAACATTCCCCTG R: GTGCTCAGTTTCGTCCTTTTGGTGT	295
牛	ATP8	EU177862	F: AACATGACTGACAATGATCTTATCAATATTCTTGA R: ATAGTAGGCTTGGAATAGTACGATAAGGGTT	232
鸭	ND1	NC009684	F: CTGAACCTCGGGGTCTCTT R: GTGCGATGGCAAAAAGTGCTG	214
鸡	ATP8	NC007236	F: CAATTAAACCCAAACCCATGATTCTCCA R: GATTCTAGTAGGCAGGGGCTTGAGAAT	200
羊	ATP8	EF490456	F: CTCAAAACACAACCTTCTACCACAACCCAG R: AACAAATGAGGGTAACGAGGGGAGAG	150
兔	ATP8	NC001913	F: CCACAACCTTGACACATCCACA R: GCAAGGGAATGAAGTAGACTCAAG	144
大鼠	ATP8	NC001665	F: AACCTTTCCTGCACCTCCCT R: GTGGGGTAATGAAAGAGGCA	107

根据预期产物大小,设置3组引物组合,即小鼠+鸡+羊,猪+牛+兔以及鸭+大鼠,构建不同种属肉类复合检测体系。

### 1.5 PCR 扩增

PCR反应采用25  $\mu\text{L}$ 体系:2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各1.0  $\mu\text{L}$ ,DNA 1  $\mu\text{L}$ ,双蒸水补足。扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  10 min;94  $^{\circ}\text{C}$  20 s,61  $^{\circ}\text{C}$  20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,30个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR扩增完成后,采用3%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 琼脂糖凝胶电泳

50 $\times$  Tris 乙酸盐-EDTA 缓冲液(TAE)配制:取Tris 242 g,乙二胺四乙酸(EDTA) 18.61 g,冰醋酸57.1 mL,加去离子双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)补足至1 L,搅拌直至全部溶解。1 $\times$  TAE 配制:取50 $\times$  TAE 20 mL加入容器中,加ddH<sub>2</sub>O定容至1 L,充分混匀即可。

3%琼脂糖凝胶制作:称量4.5 g琼脂糖加于锥形瓶中,加入1 $\times$  TAE 150 mL,微波炉中高火加热约4 min,直至完全溶解,稍微冷却后加入15  $\mu\text{L}$ 绿色核酸染料试剂(10 000 $\times$ ),缓慢摇晃混匀后倒入胶槽中,静置待其凝固。

凝胶电泳:所有PCR产物取20  $\mu\text{L}$ ,用3%琼脂糖凝胶,在120 V、400 mA条件下凝胶电泳40 min。然后用凝胶成像仪拍照,并分析图片。

### 1.7 市场样品检测

将市场购买的里脊肉、开花肠、飘香牛肉、肉肠、肥牛卷用超纯水浸泡冲洗,减少其他因素对试验结果的影响。小心剪取肉样中间部位( $\leq 100$  mg)于1.5 mL离心管中,进行DNA提取、PCR扩增、琼脂糖凝胶电泳。

### 1.8 灵敏度检测

对目标物种的预混合DNA模板(浓度为100 ng/ $\mu\text{L}$ )进行10、100、1 000、10 000倍的连续稀释,以确定可检测的最小浓度。

## 2 结果

### 2.1 引物特异性验证

利用大鼠、兔、羊、鸡、鸭、牛、小鼠和猪DNA,验证了各种属引物的特异性,发现均可获得单一目的条带,其中,大鼠、兔、羊、鸡、鸭、牛、小鼠、猪的扩增产物大小分别为107、144、150、200、214、232、295、300 bp。进一步将各种属DNA等体积混匀,用DNA混样进行电泳,均为单一条带,证明引物特异性良好(图1)。

### 2.2 复合检测体系

根据产物大小设置不同的引物组合,得到如下复合检测体系:小鼠、鸡和羊;猪、牛和兔;鸭和大鼠

共3个引物组合。在每个引物组合的PCR反应中加入1  $\mu\text{L}$  DNA混样,以及种属上下游引物各1  $\mu\text{L}$ 。由图2可见,电泳条带清晰单一,可明显区分种属。

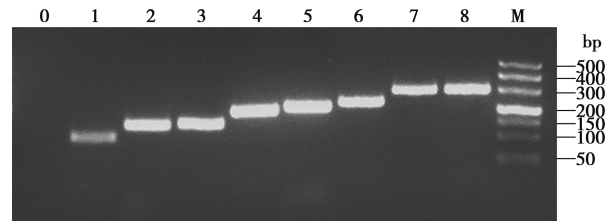


图1 引物特异性验证  
M. DL500 DNA Marker; 0. 空白对照; 1~8. 分别为大鼠、兔、羊、鸡、鸭、牛、小鼠、猪的引物。

图1 引物特异性验证

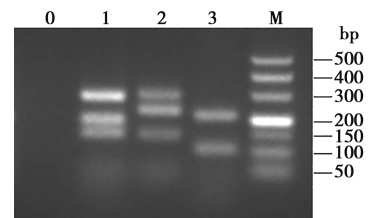


图2 复合检测体系验证  
M. DL500 DNA Marker; 0. 阴性对照; 1. 小鼠、鸡和羊引物组合; 2. 猪、牛和兔引物组合; 3. 鸭和大鼠引物组合。

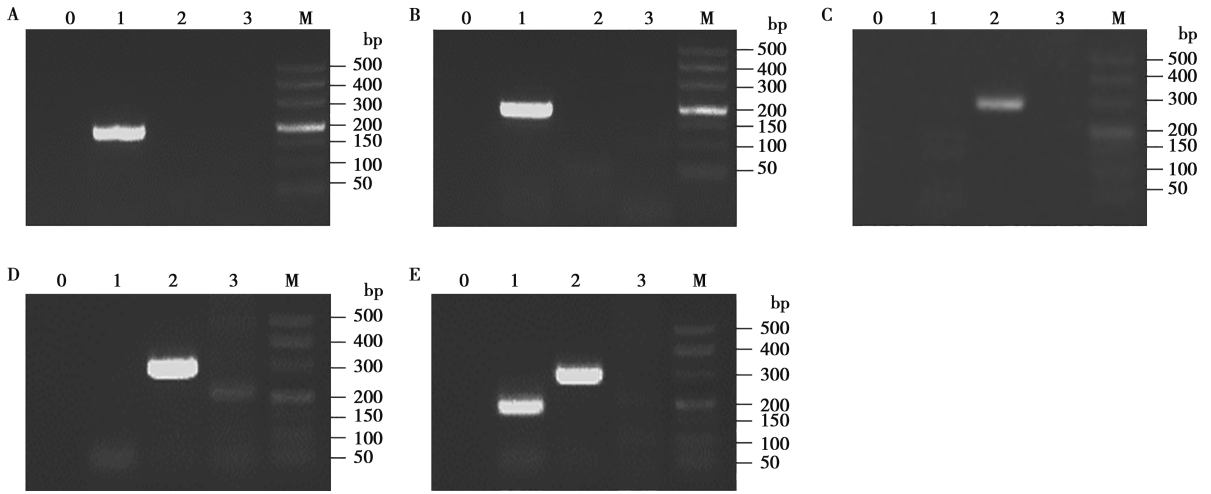
图2 复合检测体系验证

### 2.3 市场样品检测

提取市场中里脊肉、开花肠、飘香牛肉、肉肠、肥牛卷等检测样品的DNA进行检测,结果如表2和图3所示。里脊肉和开花肠检测时,第1泳道均可见明显200 bp条带,说明均为鸡肉制品;飘香牛肉检测时,泳道2出现明显300 bp条带,说明肉制品中含有猪肉,而泳道1没有条带,说明不含牛肉,因此此份飘香牛肉为猪肉制品;肉肠检测时,泳道2出现明显300 bp条带,泳道3出现明显214 bp条带,说明此份肉肠含猪肉和鸭肉;肥牛卷检测时,泳道1、泳道2出现明显200 bp和300 bp条带,而泳道3没有条带,说明肥牛卷由猪肉和鸡肉制成,不含牛肉。检测的5份市场肉制品结果表明,其中3份与配料表成分一致,2份不一致。

表2 市场样品肉源成分检测

市场样品	主要成分	检测结果
里脊肉	鸡肉	鸡肉
开花肠	鸡肉、鸡皮	鸡肉
飘香牛肉	牛肉	猪肉
肉肠	猪肉、鸭肉	猪肉、鸭肉
肥牛卷	牛肉、猪肉	猪肉、鸡肉



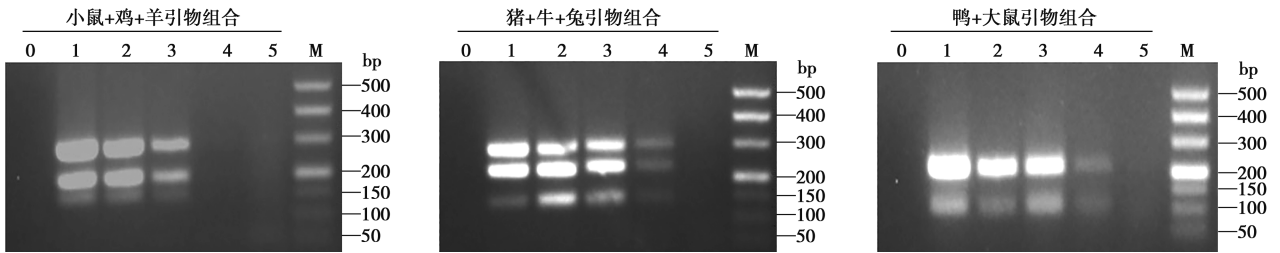
M. DL500 DNA Marker; 0. 阴性对照; 1. 引物组合为小鼠+鸡+羊; 2. 引物组合为猪+牛+兔; 3. 引物组合为鸭+大鼠。

图3 里脊肉 (A)、开花肠 (B)、飘香牛肉 (C)、肉肠 (D) 和肥牛卷 (E) 检测结果

### 2.4 灵敏度检测

从图4中可以发现, 3组引物组合均具备检测出

至少100倍稀释样本DNA的能力, 表明其有效识别浓度达1 ng/ $\mu$ L。



M. DL500 DNA Marker; 0. 阴性对照; 1~5. 样品DNA稀释倍数分别为0、10、100、1 000、10 000。

图4 复合检测体系灵敏度结果

## 3 讨论

近些年, 肉类掺假检测技术发展迅速, 如核酸检测技术、生物传感器技术、光谱学分析检测技术、免疫学检测技术和质谱技术等<sup>[13-14]</sup>。目前, 核酸检测技术主要是PCR及其衍生技术, 其高效、灵敏的优点使其成为肉类掺假鉴别的主要技术。陈勇勇<sup>[15]</sup>通过对比分析11种动物靶基因序列, 设计特异性引物, 通过PCR技术, 建立了具有高灵敏、准确、重复性好、成本低、适用范围广等动物源性肉制品检测技术。刘婉婉<sup>[16]</sup>利用“公共引物”构建了可检测11种肉源的多重PCR体系。Prusakova等<sup>[12]</sup>开发的多重PCR检测可有效地鉴定5种常见的肉类(牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和火鸡肉)和5种常见的禁用物种(猫、犬、小鼠、大鼠和人)肉类。Li等<sup>[17]</sup>开发了一种可同时检测14种物种的多重PCR检测方法。范

维等<sup>[18]</sup>基于ND5、ATP6、ATP8、Cytb基因, 研发出一种四重实时聚合酶链式反应(real-time PCR)方法, 同时检测驴、马、猪及鸭的源性成分。盛中伟等<sup>[19]</sup>建立了畜禽肉中鹅源性成分PCR和qPCR的鉴别方法。本研究则利用核酸检测技术来进行肉类的掺假检测技术的研发。

线粒体DNA被广泛应用于物种种源鉴定中<sup>[7]</sup>。以Cytb为靶基因, 陈维忠等<sup>[20]</sup>成功建立了一种特异性强、灵敏度高的复合检测体系, 该体系可用于法医学和食品安全等领域; Ana等<sup>[21]</sup>基于Cytb, 开发了一种可以准确检测新西兰最常见的19种陆生哺乳动物的多重PCR鉴定方法, 用于野生动物管理和保护、害虫入侵检测、法医和工业目的。Kesmen等<sup>[22]</sup>分别针对驴、猪和马的线粒体ND2、ND5和ATP6、ATP8基因设计了特异性引物和TaqMan探针, 用于生熟肉制品的物种鉴定和定量分析。以线粒体DNA 16S

rRNA 为靶基因, 唐修君等<sup>[23]</sup> 检测出畜禽肉中羊肉、牛肉、猪肉、兔肉和鸡肉成分。张媛媛等<sup>[5]</sup> 依据不同物种线粒体 DNA 的差异性, 成功开发了一项种属特异性 PCR 鉴别技术, 该技术能够有效区分肉类罐头中的猪、牛、羊、鸡、鸭等肉类成分。本研究基于以线粒体基因 ATP8 和 ND1 进行肉制品真伪鉴定的尝试性探索, 鉴定了猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、大鼠和小鼠等 8 种肉源的 DNA, 建立了 8 种肉源的低成本、高效的复合 PCR 检测体系。本试验中由于样品的加工类型不同, 0.1 g 肉样可提取的 DNA 浓度为 100~1 000 ng/ $\mu$ L (50  $\mu$ L), 经灵敏度检测分析, 检测浓度低至 1 ng/ $\mu$ L, 对应检测肉样质量为  $2 \times 10^{-6}$  ~  $2 \times 10^{-5}$  g。

本研究中, 对随机采集的 5 种市场肉制品测试结果发现, 其中 3 份与标签中声明的肉源性成分一致, 2 份不一致。将低价格肉类做成高价格肉类售卖, 从外观、口感难以辨别, 市场样品检测结果说明了肉类掺假鉴定的重要性, 也证明了本研究建立的复合检测体系的可行性。

## 4 结论

本试验建立了一种适用猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、大鼠和小鼠 8 种肉源种属鉴定的复合检测体系, 可以有效、准确、廉价和快速地检测出肉制品中所含肉源种属。

## 参考文献:

- [1] PEREIRA P M, VICENTE A F. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet [J]. *Meat Sci*, 2013, 93 (3): 586-592.
- [2] 李诗义, 诸晓旭, 陈从贵, 等. 肉和肉制品的营养价值及致癌风险研究进展 [J]. *肉类研究*, 2015, 29 (12): 41-47.
- [3] 路宇轩, 翟睿, 吴帆, 等. 肉类掺假检测方法及其研究进展 [J]. *计量学报*, 2023, 44 (6): 1000-1008.
- [4] 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.
- [5] 张媛媛, 孟镇, 仇凯, 等. 种属特异性 PCR 法鉴别罐头食品中猪、牛、羊、鸡、鸭源性成分 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47 (3): 164-169.
- [6] ALIM E, RAZZAK M A, HAMID S B, et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [J]. *Food Chemistry*, 2015, 177: 214-224.
- [7] 张娟, 郭亮, 顾亚玲, 等. 固原鸡线粒体基因组 ATPase 8 基因的克隆及序列分析 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (2): 1024-1025.
- [8] CHEN A, WEI C, CHEN G, et al. Duplex PCR approach for the detection and quantification of donkey, horse and mule in raw and heat-processed meat products [J]. *International Journal of Food Science Technology*, 2015, 50 (3): 834-839.
- [9] CHO A R, DONG H J, CHO S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA [J]. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 2014, 34 (6): 799-807.
- [10] COLGAN S, O'BRIEN L, MAHER M, et al. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal [J]. *Food Research International*, 2001, 34 (5): 409-414.
- [11] 冉光耀. 鉴定动物源性成分的可视化环介导等温扩增技术的建立及应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [12] 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.
- [13] 石盼盼, 李旭, 吴昊, 等. 肉及肉制品中动物源性成分核酸检测方法研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2016, 37 (10): 211-214.
- [14] 李松播. PCR 技术及质谱法在生化药品动物源性成分鉴定中的应用 [D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2020.
- [15] 陈勇勇. 畜禽肉类食品动物源性分子识别技术及应用 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [16] 刘婉婉. 一种用于肉源鉴定的多重 PCR 技术研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [17] LI J, LI J, XU S, et al. A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 395-402.
- [18] 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.
- [19] 盛中伟, 樊艳凤, 贾晓旭, 等. 基于线粒体 16S rRNA 基因的鹅肉源性成分鉴别方法研究 [J]. *中国家禽*, 2024, 46 (5): 108-112.
- [20] 陈维忠, 张健, 王鑫, 等. 同时鉴定 9 种肉源种属的复合检测体系的建立及其应用 [J]. *中国法医学杂志*, 2020, 35 (2): 177-181.
- [21] ANA R, LINACRE A M, GLEESON M D G, et al. Identification multiplex assay of 19 terrestrial mammal species present in New Zealand [J]. *Electrophoresis*, 2013, 34 (24): 3370-3376.
- [22] 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.
- [23] 唐修君, 樊艳凤, 贾晓旭, 等. 基于线粒体 16S rRNA 基因鉴别畜禽肉中 5 种动物源性成分 [J]. *食品科技*, 2015, 40 (12): 86-89.