

## 羊肉中貉源成分 Real-time PCR 检测方法的建立

张谊<sup>1</sup>, 汤思凝<sup>1</sup>, 梅汝蕃<sup>2</sup>, 郝立武<sup>1</sup>, 张书宏<sup>1</sup>, 王秋悦<sup>2</sup>, 郑百芹<sup>1\*</sup>

(1. 唐山市食品药品综合检验检测中心, 河北唐山 063000; 2. 河北科技师范学院动物科技学院, 河北秦皇岛 066000)

**摘要** [目的]检测羊肉中是否含有貉肉成分。[方法]通过实时荧光定量PCR方法,以cytB为靶基因设计特异性检测引物,选取8个不同物种的肌肉组织样本为研究对象,根据其 $\Delta Ct$ 值函数关系进行线性拟合建立标准曲线。[结果]该检测方法所用引物能将貉与其他物种区分,特异性较强,且最低检测限可达到3.2 pg/ $\mu$ L,回收率在97.71%~104.36%,组内变异系数 $\leq$ 0.28%,组间变异系数 $\leq$ 1.08%。[结论]该研究建立的羊肉中貉肉源成分实时荧光定量检测方法具有良好的特异性和敏感性,可用该方法检测实际羊肉样品中是否有貉肉源成分,为羊肉制品掺假的检测提供简单快捷准确的技术手段和执法依据。

**关键词** 羊肉;貉肉;Real-time PCR;掺假肉

中图分类号 TS251.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)01-0179-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2023.01.040



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Establishment of a Real-Time PCR Method for Detecting Raccoon Dog in Mutton**ZHANG Yi<sup>1</sup>, TANG Si-ning<sup>1</sup>, MEI Ru-fan<sup>2</sup> et al (1. Tangshan Food and Drug Comprehensive Inspection and Testing Center, Tangshan, Hebei 063000; 2. College of Animal Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066000)

**Abstract** [Objective] To detect whether raccoon dog meat components are contained in mutton. [Method] We designed specific detection primers using cytB as a target gene by real-time PCR, selected muscle tissue samples from eight different species as study subjects, and established a standard curve by linear fitting according to their  $\Delta Ct$  value function relationship. [Result] The primers used in this detection method could distinguish raccoon from other species, with specificity, the lowest detection limit could reach 3.2 pg/ $\mu$ L, the recovery rate was 97.71%~104.36%, the intraclass coefficient of variation was  $\leq$  0.28%, and the coefficient of variation was  $\leq$  1.08%. [Conclusion] The real-time fluorescence quantitative detection method system for raccoon dog meat components in mutton established in this study has good specificity and sensitivity, and this method can be used to detect whether there are raccoon dog meat components in actual mutton samples, providing a simple, rapid and accurate technical means and law enforcement basis for the detection of adulteration of mutton products.

**Key words** Mutton; Raccoon dog meat; Real-time PCR; Adulterated meat

我国是羊肉产量大国,羊肉消费呈逐年增长的趋势,但掺假问题一直是影响羊肉消费的关键问题,尤其是动物源性食品掺假是最常见也是最难鉴别的严重问题<sup>[1-2]</sup>。我国毛皮经济动物貉子养殖量大,每年会产出大量的貉子废弃肉,貉子胴体有可能成为羊肉掺假中一类。截至目前,已经开发了许多肉类掺假检测的检测技术,包括 Real-time PCR (qPCR) 检测技术、近红外特征光谱技术、高光谱法、分光光度法和酶联免疫分析法等<sup>[3-12]</sup>。这些检测方法中,Real-time PCR 特异性更强、灵敏度更高、成本更低,该方法在肉类掺假方面的应用已日趋成熟<sup>[13-18]</sup>。该研究利用 Real-time PCR,建立一种对貉肉源成分的快速检测方法,以期对羊肉及其肉制品中貉肉源的掺假进行定性及定量的检测,为量化羊肉成分研究提供参考。

**1 材料与与方法**

**1.1 试验材料** 猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉购自秦皇岛某大型超市;羊肉、貉肉、狐狸肉、貂肉由河北省预防兽医重点实验室提供;吸附柱法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、磁珠法动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根科技有限公司;琼脂糖、DL2000 DNA Marker、2 $\times$ ES Taq MasterMix (Dye)

均购自北京索莱宝科技有限公司。

**1.2 仪器与设备** NanoDrop 2000 核酸蛋白定量仪(美国 Thermo Scientific 公司);DYY-6D 型电泳仪(北京市六一仪器厂);高速离心机 FC5515R(上海京工实业有限公司);台式高速离心机 TGL-16G(上海安亭科学仪器厂);Mx3000P Agilent(美国安捷伦 Stratagene 公司)。

**1.3 试验方法**

**1.3.1 样品的制备。**分别取猪、牛、羊、鸡、鸭、狐狸、貉、貂 8 种动物的鲜肉组织样本各 1 g,放在高压灭菌处理过的研钵中进行液氮研磨,研成肉末后转移至冻存管中,于-80 °C 保存备用。

**1.3.2 基因组 DNA 的提取。**分别称取 100 mg 8 种动物组织肉末,按组织基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取 DNA, -20 °C 保存备用。

**1.3.3 DNA 浓度纯度检测。**用 NanoDrop 2000 核酸蛋白定量仪测定核酸浓度与纯度,记录  $A_{260}/A_{280}$  及  $A_{260}/A_{230}$  值;并将 DNA 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,以检测其完整性。

**1.3.4 PCR 引物设计。**参考相关文献<sup>[19-23]</sup>,根据貉子线粒体 cytB 基因序列,并使用 NCBI Blast、MEGA 7 等软件将貉源 cytB 基因与猪、牛、羊、鸡、鸭、狐狸、貂物种序列进行比对,筛选不同物种间差异序列,设计特异性引物。选择较为保守的基因 16S rDNA 为内参基因,设计通用引物。引物序列如表 1 所示。

**1.3.5 实时荧光 PCR 反应条件的建立与优化。**实时荧光**基金项目** 河北省高端人才项目;唐山市科技创新领军人才项目 (21130243A)。**作者简介** 张谊(1981—),男,河北唐山人,畜牧师,从事畜产品质量安全研究。\*通信作者,教授,硕士生导师,从事农产品质量安全检验研究。**收稿日期** 2022-02-25

PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )0.4  $\mu\text{L}$ ,下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )0.4  $\mu\text{L}$ ,2 $\times$ Perfect Start<sup>TM</sup> Green qPCR SuperMix 10.0  $\mu\text{L}$ , Nuclease-free Water 8.2  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ 。预试验中在 46~54  $^{\circ}\text{C}$  设置了梯度 PCR,最后确定了 50  $^{\circ}\text{C}$  为退火温度,其扩增效果最佳。PCR 反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,50  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s,共 40 个循环。

表 1 特异性引物和通用引物序列

Table 1 Specific primer and universal primer

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequence                                    | 引物大小<br>Primer size//bp |
|---------------------|--|-------------------------|
| cytB                | F:5'-TCTGTTCTCCACGAAACCG-3'<br>R:5'-GAGGTGTAGTTGCTGGGTC-3' | 126                     |
| 16S                 | F:ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCA<br>R:GCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT     | 82                      |

**1.3.6 特异性引物和通用性引物检测。**将提取 8 个物种基因组 DNA 进行稀释,浓度均为 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,分别使用特异性引物 cytB 及通用引物 16S rDNA 进行 qPCR 扩增,ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。根据所得曲线图及 Ct 值分析 cytB 引物的特异性和 16S 引物通用性。

**1.3.7 引物灵敏度检测。**将初始浓度为 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  的猪 DNA 样本进行 5 倍梯度稀释,使其终浓度分别为 50.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、10.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、2.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、400.0  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、80.0  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、16.0  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、3.2  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ,分别以其为模板进行 qPCR 扩增,ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。根据曲线图及 Ct 值分析特异性 cytB 引物所能扩增的最低检测浓度。

**1.3.8 定量标准曲线建立。**按照总质量为 100 mg,猪肉含量分别为 0%、10%、30%、50%、70%、90%和 100%的比例与羊肉混合,混合肉样提取 DNA 后,统一稀释初始浓度为 50.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,进行 qPCR 扩增。每个样品做 3 个重复,结果以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用相对定量法建立标准曲线。

**1.3.9 标准曲线准确性验证。**以总质量为 100 mg,猪肉含量分别为 5%、15%、45%、65%和 95%的猪羊混合肉进行 DNA 提取后,统一稀释为 50.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,进行 qPCR 扩增。将  $\Delta\text{Ct}$  值带入已建立的定量标准曲线,计算羊肉质量百分比及其回收率,16S rDNA 作为内参,每个样品做 3 个重复,检验标准曲线的准确性。

**1.3.10 检测方法的稳定性评估。**取终浓度分别为 400.0、80.0、3.2  $\text{pg}/\mu\text{L}$  的猪 DNA 样本,以其为模板进行 qPCR 扩增,分别进行组内及组间重复性试验。每个浓度重复检测 3 次,记录各浓度在检测体系的 Ct 值,并计算其变异系数,以评估检测方法的稳定性和重复性。

## 2 结果与分析

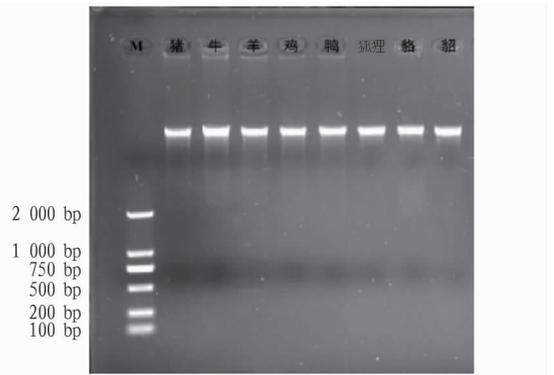
**2.1 DNA 浓度和纯度测定** 不同肉类 DNA 浓度和纯度测定结果见表 2。按核酸提取要求,无蛋白质污染的核酸溶液  $A_{260}/A_{280}>1.8$ ,无碳水化合物污染的核酸溶液  $A_{260}/A_{230}>2.0$ 。测定结果(表 2)显示,提取的各类肉 DNA 纯度和浓度均达到要求,模板 DNA 质量较好,无蛋白及杂质污染,可用于后续 qPCR 检测。

表 2 DNA 浓度和纯度测定结果

Table 2 Determination results of DNA concentration and purity

| 肉类<br>Meat type | 浓度 Concentration// $\text{ng}/\mu\text{L}$ | $A_{260}/A_{280}$ | $A_{260}/A_{230}$ |
|-----------------|--|-------------------|-------------------|
| 猪 Pig           | 680.8                                      | 1.85              | 2.36              |
| 牛 Cattle        | 566.4                                      | 1.92              | 2.05              |
| 貉 Raccoon dog   | 697.1                                      | 1.97              | 2.02              |
| 羊 Sheep         | 587.5                                      | 1.98              | 2.31              |
| 鸡 Chicken       | 660.0                                      | 1.83              | 2.31              |
| 鸭 Duck          | 488.4                                      | 1.93              | 2.16              |
| 貂 Mink          | 537.0                                      | 1.89              | 2.13              |
| 狐狸 Fox          | 533.4                                      | 1.84              | 2.36              |

不同肉类基因组 DNA 电泳检测结果如图 1 所示。电泳条带清晰、完整,说明提取的基因组 DNA 可用于后续 qPCR 检测。



注:M 为 mark。

图 1 各种肉类基因组 DNA 提取结果电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of genomic DNA extraction results of various meats

**2.2 引物 cytB 特异性及 16S 通用性检测结果** 以 cytB 作为特异性引物,分别以猪、牛、羊、鸡、鸭、貉、狐狸和貂基因组 DNA 为模板进行 qPCR 扩增。如图 2 所示,8 种畜禽肉中,只有猪肉 DNA 在第 17 个循环处开始进入指数扩增期,而其余 6 种在第 27 个循环处才开始进入指数扩增期,可以很好地与其他几个常见物种区分,表明 cytB 引物特异性较强,符合试验要求。

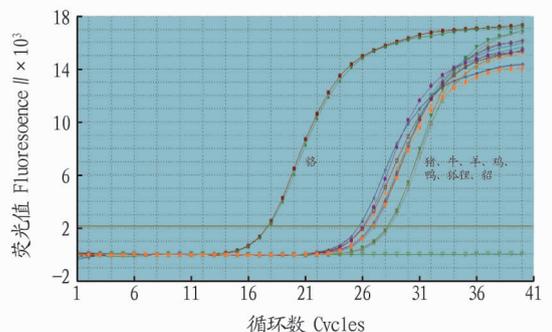


图 2 特异引物 cytB 对不同肉类 DNA 的扩增曲线

Fig. 2 Amplification curves of specific primer cytB on different meat DNA

内参引物 16S 对 8 种畜禽肉均有较好的扩增效率,且内

参基因 16S rDNA 检测的  $C_t$  值均集中在狭窄范围内,较为稳定(图 3),表明其具有通用性。

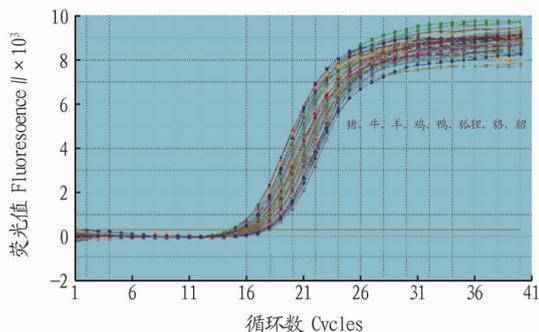


图 3 内参引物 16S 对不同物种肉 DNA 的扩增曲线

Fig. 3 Amplification curve of meat DNA of different species by internal reference primer 16S

图 4 分别为特异性引物和通用引物的扩增熔解曲线,特异性引物扩增熔解曲线峰值温度为 85.65℃,通用引物峰值

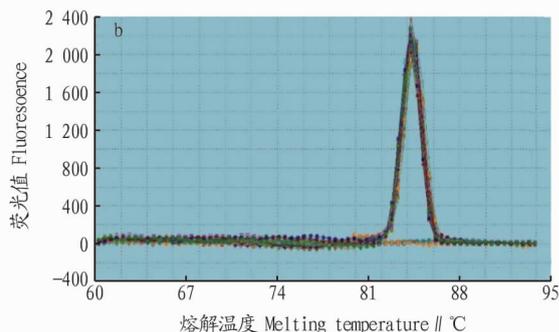
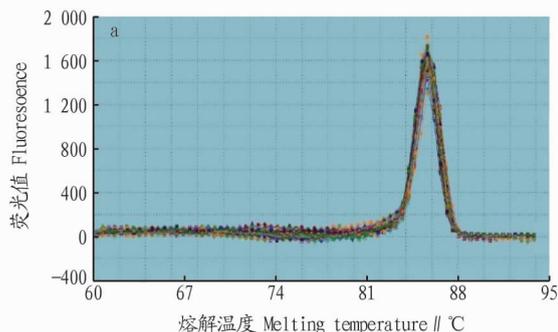


图 4 特异性引物 (a) 和通用引物 (b) 扩增熔解曲线

Fig. 4 Melting curve of amplification with specific primers (a) and universal primers (b)

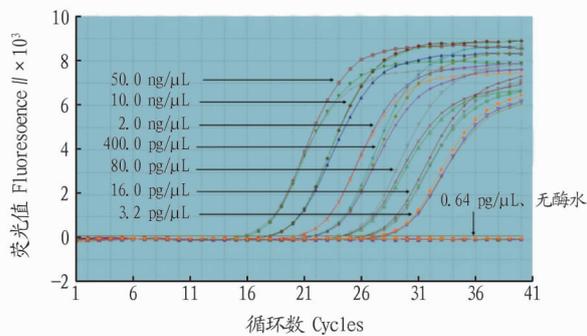


图 5 引物 cytB 对不同浓度 DNA 的扩增曲线

Fig. 5 Amplification curves of primer cytB on DNA gradients of different concentrations

**2.5 标准曲线准确性验证** 分别以质量比为 5%、15%、45%、65%、95% 的貉羊混合肉样为模板,进行 qPCR 检测, $C_t$  值结果如表 4 所示。将  $\Delta C_t$  值代入标准曲线  $Y = -4.212X - 0.6364$ ,计算出貉肉的含量及其回收率,由表 4 可知其回收率为 97.71%~104.36%。试验结果符合要求,具有实践意义。

**2.6 检测方法的稳定性评估** 为了检测该方法稳定性,该研究分别做了组内及组间重复各 3 组,每组 3 个重复。重复性检测结果见表 5,组内变异系数为 0.13%~0.59%,组间变异系数为 0.04%~1.08%,表明检测方法具有较好的稳定性。

温度为 84.25℃,2 个熔解曲线均为规则特异性单峰,无杂峰,说明试验所用 2 个引物均无二聚体产生且特异性较强,符合检测要求。

**2.3 引物灵敏度检测** 以不同浓度貉基因组 DNA 为模板进行 qPCR 检测判断其最低检测限,结果如图 5 所示。当模板浓度为 0.64 pg/μL 时,cytB 引物扩增曲线与阴性对照无酶水扩增曲线不能明确区分;而当模板浓度为 3.2 pg/μL 时,特异引物指数扩增曲线可与其他浓度曲线准确明显区分,因此该引物的最低检测限为 3.2 pg/μL。

**2.4 标准曲线建立** 不同比例貉羊混合肉样实时荧光定量结果如表 3 所示。每个样品做 3 个重复。以貉子肉质量百分比的  $\log_{10}$  值为横坐标, $\Delta C_t$  为纵坐标绘制标准曲线(图 6),得出回归方程为  $Y = -4.212X - 0.6364$  ( $R^2 = 0.9889$ ),且扩增效率 ( $E$ ) 为 97.86%,符合《实时荧光定量国际化标准-MIQE 指南》中  $E < 105\%$  的标准,表明建立的标准曲线具有良好的线性关系,满足实时荧光定量国际化标准的要求。

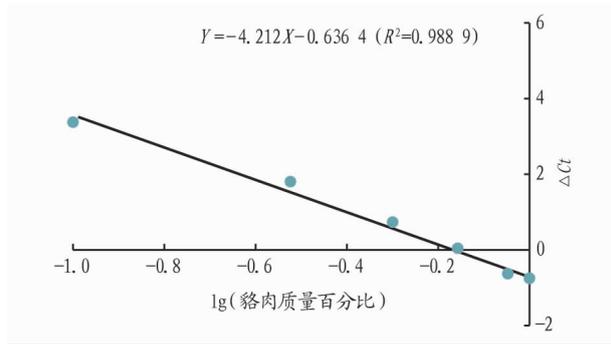
表 3 不同质量百分比貉肉  $C_t$  以及  $\Delta C_t$  检测结果

Table 3 Test results of raccoon dog meat mass percentage  $C_t$  and  $\Delta C_t$  values

| 貉肉质量百分比<br>Raccoon dog<br>meat mass<br>percentage//% | $C_t$ 值 $C_t$ value |            | $\Delta C_t$ |
|--|---------------------|------------|--------------|
|  | 16S rDNA            | Cytb       |              |
| 0  | 17.17±0.09          | 27.66±0.31 | 10.49±0.22   |
| 10   | 16.74±0.15          | 20.15±0.12 | 3.41±0.03    |
| 30   | 16.74±0.15          | 18.13±0.03 | 1.82±0.10    |
| 50   | 16.31±0.07          | 16.67±0.11 | 0.74±0.30    |
| 70   | 15.77±0.04          | 15.84±0.14 | 0.07±0.18    |
| 90   | 16.68±0.21          | 15.07±0.07 | -0.61±0.13   |
| 100  | 15.42±0.08          | 14.70±0.04 | -0.72±0.04   |

### 3 讨论与结论

肉类掺假中最常见的手段是使用废弃肉或低品质的肉类替代高品质昂贵的肉类,我国貉养殖量巨大,每年都会产生大量的貉废弃肉,这些肉往往容易被掺入到价格更高的羊肉中去,因此对羊肉中掺入貉源成分的检测方法的开发尤为重要。该试验为检测羊肉中貉源成分的含量,建立 Real-time PCR 的方法,以 cytB 基因为特异性检测引物,构建了标准定量曲线,检测结果表明在模拟掺假肉中样品回收率为

图6 混合貉肉含量  $\Delta C_t$  标准曲线Fig. 6 Mixed raccoon dog meat content  $\Delta C_t$  standard curve表4 模拟混合肉样  $C_t$  值检测结果Table 4  $C_t$  value of simulated mixed meat sample

| 貉羊混合肉含量<br>Content of mixed<br>meat of raccoon<br>dog and sheep//% | $C_t$ 值 $C_t$ value |            | $\Delta C_t$ | 貉肉质量含量<br>Quality content<br>of raccoon<br>dog meat//% | 回收率<br>Recovery<br>rate//% |
|--|---------------------|------------|--------------|--|----------------------------|
|  | 16S rDNA            | Cytb       |              |  |                            |
| 5  | 17.00±0.03          | 21.81±0.04 | 4.81±0.01    | 5.09±0.03  | 101.80                     |
| 15   | 16.86±0.11          | 19.71±0.05 | 2.85±0.16    | 14.87±0.96   | 99.12                      |
| 45   | 16.03±0.04          | 16.90±0.04 | 0.87±0.08    | 43.97±1.42   | 97.71                      |
| 65   | 15.63±0.06          | 15.74±0.01 | 0.11±0.05    | 66.85±1.37   | 102.85                     |
| 95   | 15.51±0.09          | 14.89±0.07 | -0.62±0.02   | 99.14±0.87   | 104.36                     |

表5 组内和组间重复性试验结果

Table 5 Repetitive experimental results within and between groups

| 项目<br>Item                       | DNA 浓度<br>DNA concentr-<br>ation//pg/ $\mu$ L | $\Delta C_t$ 平均值<br>$\Delta C_t$ mean | 变异系<br>数 CV//% |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|----------------|
| 组内重复 Within<br>group repetition  | 400.0   | 11.89±0.02                            | 0.13           |
|                                  | 50.0  | 16.83±0.10                            | 0.59           |
|                                  | 10.0  | 20.84±0.06                            | 0.28           |
| 组间重复 Between<br>group repetition | 400.0   | 11.87±0.05                            | 0.04           |
|                                  | 50.0  | 16.86±0.18                            | 1.08           |
|                                  | 10.0  | 20.89±0.14                            | 0.68           |

括试剂盒吸附柱法、试剂盒磁珠法、SDS法、氯仿-醋酸钠法、苯酚-氯仿抽提法。通过对提取DNA的完整性、浓度、纯度、试验耗时、耗材等方面比较得出,试剂盒法更适合用于常见动物源性肌肉DNA的提取。相比较试剂盒吸附柱法和试剂盒磁珠法,前者提取的核酸浓度高,糖类杂质少,DNA提取率更高。

该研究拓展了羊肉中动物源性成分检测的应用,实现了在基因水平对猪肉成分的量化判定,为羊肉掺假工作的检验奠定了基础。今后将进一步研究羊肉掺假中多种肉源成分鉴定的方法,为羊肉制品掺假的检测提供更为简单、快捷、准确的技术手段和执法依据,以满足市场需求。

#### 参考文献

- [1] 范梦晨,韩爱云. 肉类掺假检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(1): 236-241.
- [2] 陈晓宇,陆利霞,熊雄,等. 实时荧光PCR技术鉴别流通环节的掺假牛肉及其制品[J]. 生物加工过程, 2021, 19(2): 214-226.
- [3] 唐廷延. 羊肉中鸡源性成分实时荧光定量PCR量化检测技术研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2018.
- [4] 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

97.71%~104.36%,最低检测限达3.2 pg/ $\mu$ L. 董洋洋<sup>[24]</sup>通过实时荧光PCR法对牛肉中的鸭肉和猪肉成分进行了鉴定,其检测限分别达0.20和0.02 ng. 姜洁等<sup>[25]</sup>对羊肉中猪源成分和鸡源成分进行定量检测,结果显示其质量检测百分比的绝对误差可以控制在7%以内. 薛晨玉等<sup>[26]</sup>对羊肉中鸡源成分的量化检测发现,检测百分比与理论百分比间的绝对误差在5%以内. 该研究所建立的方法抗干扰能力较强,可有效地检测出羊肉中的猪源成分,量化研究结果准确。

由于羊肉制品在加工过程中其DNA质量会受到不同程度的损耗,因此选择一种高质量的核酸DNA提取方法至关重要. 在试验过程中分别采用常见组织DNA提取方法,包

品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 409-415.

- [5] 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.
- [6] 史莹莹,康雨薇,邵俊峰,等. 实时荧光定量PCR鉴定肉制品中牛源性成分及其含量[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(6): 158-163.
- [7] 张宗国,陈东杰,孟一,等. 基于顶空气相色谱-离子迁移谱与电子鼻技术快速检测宁夏滩羊肉中掺假鸭肉[J]. 肉类研究, 2020, 34(12): 43-48.
- [8] MAGIATI M, MYRIDAKI V M, CHRISTOPOULOS T K, et al. Lateral flow test for meat authentication with visual detection[J]. Food Chem, 2019, 274: 803-807.
- [9] AHAMAD M N U, ALI M E, HOSSAIN M A M, et al. Multiplex PCR assay discriminates rabbit, rat and squirrel meat t in food chain[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2017, 34: 2043-2057.
- [10] 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.
- [11] 卞如如,范阳阳,刘艳艳,等. 一种驴和马及狐狸源性成分快速检测方法的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(1): 100-104.
- [12] 骆训国,栗绍文,周蕾蕾,等. 夹心ELISA方法检测生肉混合物中的猪肉成分的研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(S1): 20-22.
- [13] 史莹莹,邵俊峰,郭娟,等. 基于荧光定量PCR鉴定生鲜肉制品中羊源性成分及其含量[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 146-150.
- [14] 许文娟,赵晗,孔彩霞,等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类工业, 2021(7): 44-49.
- [15] FENGOU L C, TSAKANIKAS P, NYCHAS G J E. Rapid detection of minced pork and chicken adulteration in fresh, stored and cooked ground meat[J]. Food Control, 2021, 125: 1-7.
- [16] 纪艺,陈笑芸,丁霖,等. 肉类及肉制品中动物源性成分鉴别方法研究进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 711-716.
- [17] 胡馨予,黄朱梁,汤海凤,等. 基于PCR技术的肉类成分溯源鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3385-3390.
- [18] 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.

(下转第187页)

选剔除不合理数据进一步分析验证。

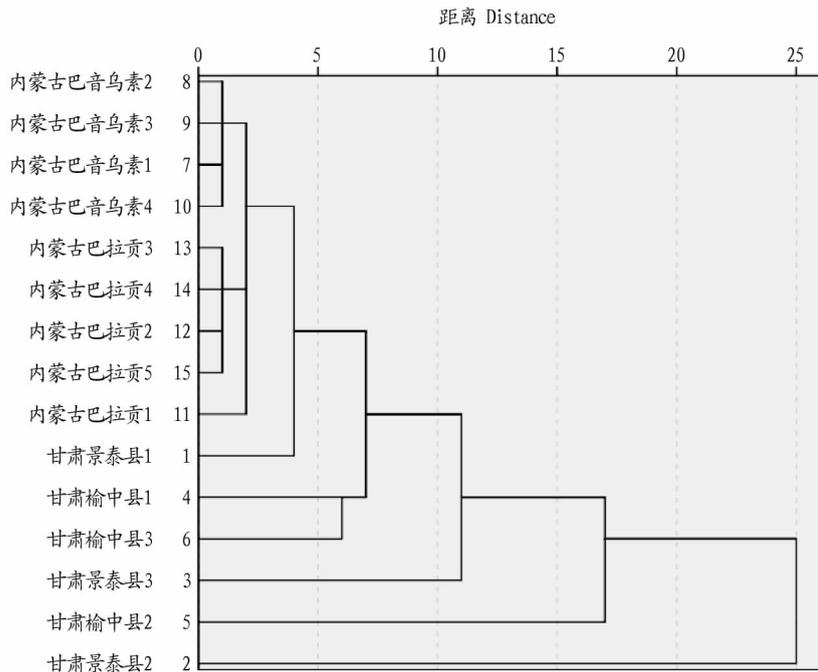


图 2 4 个产区甘草药材的 R 型聚类分析

Fig. 2 R-type cluster analysis of *Glycyrrhiza uralensis* in 4 production areas

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 86.
- [2] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 48.
- [3] 陶弘景撰, 尚志钧辑校. 名医别录(辑校本)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 28.
- [4] 李时珍. 本草纲目(校本点)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 691-694.
- [5] 辛红, 徐巍. 甘草查尔酮 A 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导肾癌细胞自噬的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3545-3552.
- [6] 王元花, 阎芳, 金永生. 甘草有效成分的提取及协同氟康唑抗真菌活性研究[J]. 药学服务与研究, 2017, 17(3): 218-222.
- [7] 孙舒玉, 何小鹏, 柴旺, 等. 甘草多糖对外周血  $\gamma$ 8T 细胞的免疫调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 242-245.
- [8] 徐海星, 胡伟. 甘草浸膏对小鼠免疫功能的影响研究[J]. 中国药业, 2018, 27(4): 3-5.
- [9] 刘新民, 黄晶, 刘晓刚, 等. 甘草对大鼠肺纤维化 PDGF 和 TNF- $\alpha$  影响的研究[J]. 光明中医, 2020, 35(16): 2467-2469.
- [10] 朱世超, 郑学敏, 张玥, 等. 甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3554-3559.
- [11] 程瑞凤, 景晶, 华冰, 等. 甘草总黄酮提取部位抗小鼠抑郁活性可能与其增强中枢 5-羟色胺能神经功能有关[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(4): 484-490.
- [12] 赵小梅, 官嫚, 董捷鸣, 等. 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 119-124.
- [13] 沈淑娇, 张志荣, 张林林, 等. 甘草水煎液对  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯诱导的肝内胆汁淤积性损伤的防治及其机理研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(12): 1321-1327.
- [14] 程丽娜, 曹世杰, 曲明, 等. 甘草主要成分改善 L6 大鼠成肌细胞胰岛素抵抗的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 88-94.
- [15] 邓桃妹, 彭灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [16] 冯靖, 张应蓉, 靳凤云, 等. 四逆散传统汤剂复方颗粒剂配方颗粒剂中甘草苷甘草酸的含量比较[J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(1): 35-37.
- [17] 刘海, 田兴云, 高树财, 等. 甘草绿色生产病虫害防治管理及操作规程[J]. 农业科技与信息, 2020(22): 35-36.
- [18] zen-thawed minced beef [J]. Meat Sci, 2013, 93(2): 292-302.
- [19] 纪艺, 徐晓丽, 姜媛媛, 等. 基于数字 PCR 的不同品种鸭组织中线粒体与核 DNA 拷贝数差异研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 86-91.
- [20] 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.
- [21] 杜利强, 章晶晶, 张涛, 等. 狐狸和貉子动物源性成分双重 PCR 鉴别[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 303-307.
- [22] MORSY N, SUN D W. Robust linear and non-linear models of NIR spectroscopy for detection and quantification of adulterants in fresh and fro-
- [23] 王建昌, 王金凤, 陈瑞春, 等. 鸭肉冒充牛肉的分子生物学检测[J]. 肉类研究, 2012, 26(6): 20-23.
- [24] 董洋洋. 实时荧光 PCR 对牛肉中掺入鸭肉和猪肉的定量检测研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [25] 姜洁, 宋丽萍, 郭淼, 等. 应用实时荧光 PCR 技术量化检测羊肉中猪源性和鸡源性成份[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3701-3707.
- [26] 薛晨玉, 宋丽萍, 路勇, 等. 实时定量 PCR 法对羊肉中鸡源性成分的量化检测[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 294-297.

(上接第 182 页)