PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX, XX(XX): 1~11
www.pibb.ac.cn

基于多重PCR–毛细管电泳的常见物种鉴别体系的构建与验证*

郭润泽[1)] 胡 胜[2)] 陈利萍[3)] 张 颖[2)] 贺永锋[4)] 宋 振[4)] 杨瑞琴[1)**] 孙启凡[2)**]

([1)] 中国人民公安大学侦查学院，北京 100038；[2)] 公安部鉴定中心，北京 100038；
[3)] 陕西省血液中心，西安 710061；[4)] 陕西省公安厅，西安 710000）

摘要 目的 建立一种灵敏、高效的多重PCR-毛细管电泳检测体系，能够在单管反应中同时鉴别牛、小鼠、犬、大鼠、猪、中国仓鼠、猫、马、人、鸡、鸭、驴、羊等13个物种的DNA，并验证其在法医物证及食品安全领域的应用潜力。**方法** 针对上述物种线粒体DNA，筛选具有物种特异性的序列并设计引物，构建多重PCR体系，优化引物浓度、退火温度等反应条件，使用毛细管电泳检测平台对多重PCR扩增产物进行检验，根据特征性片段长度及荧光差异表征不同物种，建立多重PCR-毛细管电泳体系，并评估其特异性、灵敏度、模拟混合样本、市售肉类样本及真实案件样本检测能力。**结果** 所建立的多重PCR-毛细管电泳检测体系物种鉴别能力强，灵敏度在0.05 ng~0.001 ng之间，可检测掺假比例为0.1%~0.5%的模拟混合样本，成功鉴别真实案件检材并识别出标签信息不实的肉类及肉制品。**结论** 本研究所建立的多重PCR-毛细管电泳检测体系特异性强，灵敏度高，具有良好的物种鉴别能力，在法医物证分析、食品安全监测等司法问题中具有较好的应用价值。

关键词 多重PCR，毛细管电泳，种属鉴别，法医物证，食品安全
中图分类号 DF795.2，D919.2，TS201.6 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0299 **CSTR**：32369.14.pibb.20250299

未知生物样本的种属鉴别对法医物证分析来讲至关重要，其隐含的犯罪信息可能为刑事侦查提供重要线索[1]。此外，种属鉴别方法也能够对肉类及其加工制品的掺假、污染问题进行检测，是加强食品安全监管必不可少的技术手段[2-3]。因此，建立快速高效、灵敏可靠的种属鉴别方法一直是法医物证及食品安全领域的热点研究方向。目前种属鉴别的主要鉴定方法包括常规PCR、多重PCR[4]、实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）[5]、微滴式数字PCR（droplet digital PCR，ddPCR）[6]、酶联免疫吸附法[7]（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）、质谱法[8]（mass spectrum，MS）、电子鼻技术[9]（electronic nose，E-nose）、近红外光谱[10]（near-infrared spectroscopy，NIR）及表面增强拉曼光谱[11]（surface enhanced raman spectroscopy，SERS）等等。当前使用最为广泛的种属鉴别方法当属以DNA为检测对象的PCR及其衍生技术。其中，多重PCR技术仅靠物种特异性引物即可在单一反应体系中完成精准地鉴别多个物种，同时节省了时间与成本，被视为特异性鉴定不同物种的首选方法[12]。

核DNA与线粒体DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）都已被研究用于肉类种属鉴别，相较而言，mtDNA在每一个细胞中的拷贝数远大于核DNA，此外，线粒体膜的保护及mtDNA的环状结构使其拥有更强的抗降解能力[13]，更重要的是，mtDNA是通过母系遗传，重组率低，突变率高、进化速度更快造就了不同物种间差异大的特点[14]，这些特性使得mtDNA成为种属鉴别的理想靶标。

基于此，本研究通过对mtDNA的线粒体细胞

* 国家重点研发计划（2022YFC3341002）资助项目。
** 通讯联系人。
杨瑞琴 Tel：18611988837，E-mail：yangruiqin@ppsuc.edu.cn
孙启凡 Tel：15801616421，E-mail：sunqifan@cifs.gov.cn
收稿日期：2025-06-25，接受日期：2025-10-09

色素b（mitochondrial cytochrome b，*Cytb*）、细胞色素c氧化酶亚基1（cytochrome c oxidase subunit I，*CO I*）、16S核糖体RNA（16S ribosomal RNA，16S rRNA）及NADH脱氢酶亚基2（NADH dehydrogenase subunit 2，*ND2*）等基因的物种特异性序列设计特异性引物，构建牛（*Bos taurus*）、小鼠（*Mus musculus*）、犬（*Canis lupus familiaris*）、大鼠（*Rattus norvegicus*）、猪（*Sus scrofa*）、中国仓鼠（*Cricetulus griseus*）、猫（*Felis catus*）、马（*Equus caballus*）、人（*Homo sapiens*）、鸡（*Gallus gallus*）、鸭（*Anas platyrhynchos*）、驴（*Equus asinus*）、羊（*Ovis aries*）等13个物种多重PCR-毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）检测体系，验证了该体系的特异性与灵敏度，并以市售肉类样本、真实案件检材评估该体系的实际应用潜力。

1 材料与方法

1.1 样本采集

鸡、鸭、羊、猪、牛的肌肉组织样本购自北京市某屠宰场，经过形态学验证保证其真实性并使用。猫、犬肌肉组织样本获得自宠物医院，驴、马血液样本采集自育种场。小鼠、大鼠、鹅、兔、火鸡、鲤鱼的肌肉组织样本购自汇智和源生物技术公司（苏州），中国仓鼠DNA标准品购自北纳生物公司（北京）。人血样本采集方法为：通过肘静脉穿刺抽取，采集过程遵循相关流程和协议，采样前所有志愿者均签署知情同意书。上述每个物种采集3例样本。所有商品肉类及肉制品样本购自北京市当地市场，包括生驴肉、羊肉卷、牛肉干、火腿肠（标签成分分别为鸡肉；鸡肉、猪肉；鸡肉、猪肉、牛肉）、卤驴肉、烤牛肉、烤羊肉、炒牛肉、炒羊肉各3份。所有肉类及肉制品均在冰冷条件下（4℃）运输，依次用70%乙醇和双蒸水冲洗2~3次，收集到干净的密封袋中，－20℃下冻存直至用于提取DNA。以上样本采集工作已通过公安部鉴定中心科研伦理委员会审查（批件号：2023-002）。

1.2 DNA提取

使用PureLink™ Genomic DNA Mini Kit试剂盒（Thermo Fisher，美国）提取DNA，肉类样品剪取肉块（≤100 mg）进行提取，血液样本利用静脉血收集卡收集，剪取收集卡面积约0.75 cm^2的圆形部分进行提取，具体操作参照试剂盒说明书。使用Qubit™ dsDNA HS Assay试剂盒（Thermo Fisher，美国）和Qubit® 4.0荧光定量仪（Thermo Fisher，美国）对DNA进行定量，将DNA稀释至1 mg/L，冻存于－20℃冰箱备用。

1.3 引物设计

从GenBank数据库（www.ncbi.nlm.nih.gov）中下载牛（NC_006853.1）、小鼠（NC_005089.1）、犬（NC_002008.4）、大鼠（NC_001665.2）、猪（NC_000845.1）、中国仓鼠（NC_007936.1）、猫（NC_001700.1）、马（NC_091244.1）、人（NC_012920.1）、鸡（NC_053523.1）、鸭（NC_009684.1）、驴（NC_001788.1）、羊（NC_001941.1）的线粒体基因序列。鸡、鸭、猫、中国仓鼠、大鼠、小鼠、犬等7个物种使用参考文献[15-16]所给出的引物。猪、人、牛、羊、马、驴等6个物种使用Oligo7软件筛选具有物种特异性的序列，将筛选出的核苷酸序列提交至Primer3Plus（https：//www.primer3plus.com）进行引物设计，使用基本局部比对搜索工具（basic local alignment search tool，BLAST）（https：//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）检查了所有的引物种间特异性。反向引物的5'端使用荧光染料6-FAM或HEX进行标记，引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。经多次实验验证，最终经筛选使用的引物信息、扩增产物长度及其在检测体系中的浓度信息见表1。

1.4 单一PCR和多重PCR检测

使用所合成的引物针对每一个目标物种的mtDNA进行单一PCR扩增。PCR反应在10 μl总体积中进行，其中2×Multiplex PCR Buffer（湖州申科，中国）5 μl、引物2 μl，DNA模板0.1 ng，无核酸酶水补足至10 μl。扩增在96孔热循环仪（Bio-Rad，美国）中进行，扩增程序：95℃ 15 min；94℃ 30 s，58℃ 60 s，72℃ 60 s，30个循环；72℃ 10 min。扩增产物通过3500XL型毛细管电泳仪（Applied Biosystems，美国）进行分析。

针对多重PCR，将13对浓度为10 μmol/L的引物均匀混合，加入无核酸酶水稀释，得到浓度均为0.02 μmol/L的混合引物溶液，将13种浓度为5 mg/L的目标DNA混合，加无核酸酶水稀释，得到各DNA浓度均为0.1 mg/L的混合DNA溶液。在96孔热循环仪中进行多重PCR扩增。在单重PCR体系的基础上，对多重PCR检测体系的各引物浓度（0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 μmol/L）、退火温度（58、60、62、64、66℃）进行梯度优化，保证反

Table 1　Species−specific primer sequences and associated data of different species

Species	Sequence (5'→3')	Amplicon size/bp	Target genes	c/(μmol·L^{-1})	Reference
Cattle(*Bos taurus*)	TGCTTGGGCCGGTATAGTAGG 6-FAM-GTGTGCGGTTACAACTGCGT	115	*Cytb*	0.005	This study
Mice(*Mus musculus*)	ACAGCCGTACTGCTCCTATTATCACTAC 6-FAM-CCCAAAGAATCAGAACAGATGCTGGT	147	*CO* I	0.005	[15]
Dog(*Canis lupus familiaris*)	GAACTAGGTCAGCCCGGTACTTTACT 6-FAM-TTCGGGGGAATGCCATGTCC	172	*CO* I	0.005	[15]
Rat(*Rattus norvegicus*)	CTTCGGCCACCCAGAAGTGTAC 6-FAM-AGGCTCGGGTGTCTACATCTAGG	200	*CO* I	0.005	[15]
Pig(*Sus scrofa*)	TCCGTCGACAAAGCAACCCT 6-FAM-GGGTGGGGTGTTTAGTGGGT	294	*Cytb*	0.1	This study
Chinese hamster(*Cricetulus griseus*)	ACTAACCCGCTTCTTCGCATTC 6-FAM-GCGTAGGCGAACAGGAAGTATC	315	*Cytb*	0.02	[15]
Cat(*Felis catus*)	TATTGCCATTCCTACCGGGGTG 6-FAM-GTGCTGAGGGAAGAACGTTATATTGACTC	355	*CO I*	0.01	[15]
Horse(*Equus caballus*)	GGGGTGACCTCGGAGAACAA 6-FAM-CTGTTCTAGGGCGGTAGAAGTTA	414	16S rRNA	0.01	This study
Human(*Homo sapiens*)	GACGCCCTCGGCTTACTTCT HEX-TTCGGGCTTGATGTGGGGAG	132	*Cytb*	0.01	This study
Chicken(*Gallus gallus*)	ACAGCAGACACATCCCTAGC HEX-GTTTCCTTGTAGAGGTAGGAGCC	170	*Cytb*	0.01	[16]
Duck(*Anas platyrhynchos*)	TTCTTCATCTGCATCTACCTGCAC HEX-GGCTCATTCTACCAGGGTCTG	225	*Cytb*	0.005	[16]
Ass(*Equus asinus*)	AGCCCTCGCCATAAAACTTGGA HEX-TGGGTTGTACACTAAGATGGCTGC	295	*ND2*	0.005	This study
Sheep(*Ovis aries*)	CACGCAAACGGGGCATCAAT HEX-GGTGAACTATGGCGAGGGCT	343	*Cytb*	0.005	This study

应结果不出现非特异性扩增现象，确定不同靶标的最佳引物浓度及扩增程序。

1.5　物种特异性研究

使用优化好的多重PCR检测体系分别对所提取的牛、小鼠、犬、大鼠、猪、中国仓鼠、猫、马、人、鸡、鸭、驴、羊、鹅、兔、火鸡、鲤鱼等17个物种的DNA进行检测，同时设立以无核酸酶水为模板的阴性对照，评估方法的种属特异性。

1.6　灵敏度研究

将混合好的13种目标DNA按照模板量为0.1 ng、0.05 ng、0.01 ng、0.005 ng、0.001 ng加入相应反应中进行检测，以确定方法灵敏度。每个模板量平行检测3次。

1.7　模拟混合样本检测

为考察该体系的混合样本检测能力，制备羊肉与鸭肉、驴肉与马肉、牛肉与猪肉的混合样本，将鸭肉以10%、5%、1%、0.5%、0.1%的质量比掺杂到羊肉中，马肉、猪肉重复上述操作掺杂到驴肉、牛肉中，得到模拟混合样本，充分混匀后提取DNA，利用多重PCR检测体系进行扩增检测。

1.8　市售肉类样本与案件检测

为考察该体系对实际样本检测的适用性，本研究从当地市场购买了商品肉类及肉制品共27份，包括生驴肉、羊肉卷、牛肉干、火腿肠（标签成分分别为鸡肉；鸡肉、猪肉；鸡肉、猪肉、牛肉）、卤驴肉、烤牛肉、烤羊肉、炒牛肉、炒羊肉各3份。对收集的样本进行DNA提取并利用多重PCR检测体系进行扩增检测。参考相关国标及行标[17-20]中所给出的方法对本体系的检测结果进行验证，考察方法的检测结果是否准确。

为考察该体系在法医物证检验方面的适用性，本研究收集了一起实际案件的现场检材，对收集的

检材提取DNA并利用多重PCR检测体系进行扩增检测。

2　结 果

2.1　多重PCR−毛细管电泳检测体系的建立

首先，使用特定引物对13个目标样本DNA分别进行单一PCR扩增并优化反应体系，经检测，13种目标样本的扩增产物长度均与理论大小一致。在此基础上，将13对特异性引物混合进行多重PCR体系的优化，最终扩增体系包含5 μl 2× Multiplex PCR Buffer，2 μl正、反向引物混合物（各引物最佳浓度见表1），0.1 ng DNA模板，无核酸酶水补足至10 μl。优化退火温度以保证引物扩增效率且无引物非特异性结合，最终多重PCR扩增程序为：95℃ 15 min；94℃ 30 s，62℃ 60 s，72℃ 60 s，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13个物种。

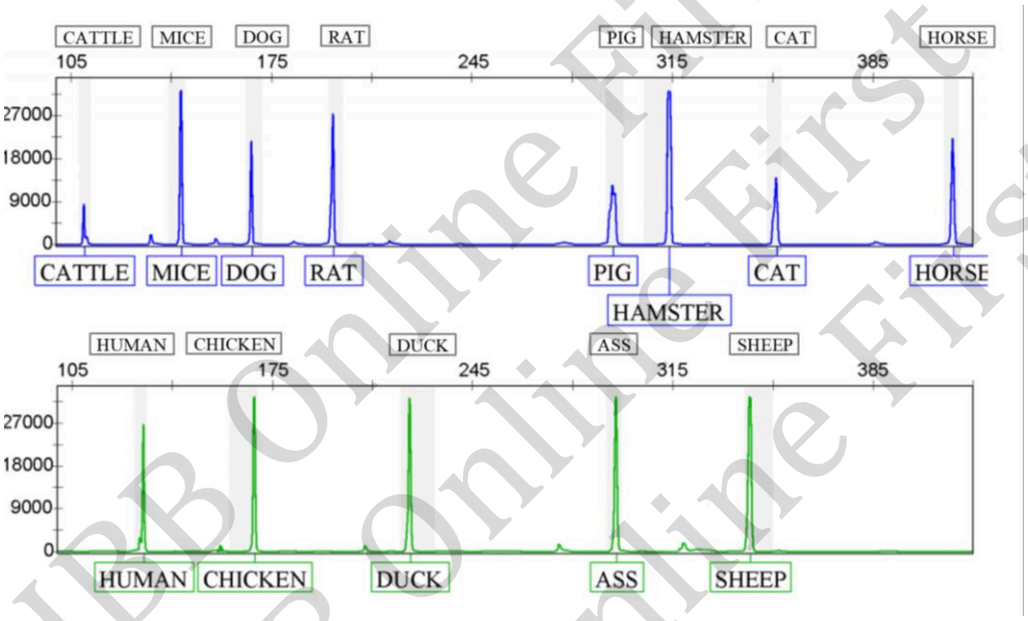


Fig.1　Multiplex PCR−CE electropherogram for 13−species identification

DNA template quantity is 0.1 ng per species.

2.2　种属特异性研究结果

使用优化好的多重PCR体系分别对13种目标DNA及4种非目标DNA进行单独扩增，方法特异性研究结果如表2所示。结果表明，优化后的多重PCR检测体系能够准确区分13个目标物种，各目标位点只有相应DNA模版有响应峰，所有DNA模版及阴性对照无非特异扩增现象，表明方法特异性良好。

Table 2　Detection results of different DNA templates at the target site

DNA template name	Target site												
	Cattle	Mice	Dog	Rat	Pig	Hamster	Cat	Horse	Human	Chicken	Duck	Ass	Sheep
Cattle	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mice	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dog	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rat	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pig	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamster	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cat	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

续表

DNA template name	Target site												
	Cattle	Mice	Dog	Rat	Pig	Hamster	Cat	Horse	Human	Chicken	Duck	Ass	Sheep
Horse	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Human	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Chicken	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Duck	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ass	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sheep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Goose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rabbit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

"+" indicates detected， and "-" indicates not detected.

2.3　灵敏度研究结果

灵敏度检测结果如表3所示，在DNA模板量为0.05 ng时，各物种均被检出，在DNA模板量为0.001 ng时，能够检出犬、大鼠、中国仓鼠、猫、马、人、鸡、鸭、驴、羊等10种DNA，小鼠DNA的检测限为0.05 ng，猪DNA的检测限为0.01 ng，牛DNA的检测限为0.005 ng。

Table 3　Sensitivity analysis results

DNA template quantity/ng	Species												
	Cattle	Mice	Dog	Rat	Pig	Hamster	Cat	Horse	Human	Chicken	Duck	Ass	Sheep
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.005	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

"+" indicates detected， and "-" indicates not detected.

2.4　模拟混合样本检测结果

模拟混合样本检测结果如表4所示，羊鸭混合样本在鸭肉含量为10%、5%、1%、0.5%时能检出鸭源性成分，牛猪混合样本在猪肉含量为10%、5%、1%、0.5%时能检出猪源性成分，驴马混合样本在马肉含量为10%、5%、1%、0.5%、0.1%时均能检出马源性成分。

Table 4　Detection results of simulated mixed samples

Sample name	Detection results					
	Sheep	Duck	Ass	Horse	Cattle	Pig
Sheep-duck mixed samples （10% duck）	+	+	-	-	-	-
Sheep-duck mixed samples （5% duck）	+	+	-	-	-	-
Sheep-duck mixed samples （1% duck）	+	+	-	-	-	-
Sheep-duck mixed samples （0.5% duck）	+	+	-	-	-	-
Sheep-duck mixed samples （0.1% duck）	+	-	-	-	-	-
Ass-horse mixed samples （10% ass meat）	-	-	+	+	-	-
Ass-horse mixed samples （5% ass meat）	-	-	+	+	-	-

续表

Sample name	Detection results					
	Sheep	Duck	Ass	Horse	Cattle	Pig
Ass-horse mixed samples （1% ass meat）	-	-	+	+	-	-
Ass-horse mixed samples （0.5% ass meat）	-	-	+	+	-	-
Ass-horse mixed samples （0.1% ass meat）	-	-	+	+	-	-
Cattle-pig mixed samples （10% pork）	-	-	-	-	+	+
Cattle-pig mixed samples （5% pork）	-	-	-	-	+	+
Cattle-pig mixed samples （1% pork）	-	-	-	-	+	+
Cattle-pig mixed samples （0.5% pork）	-	-	-	-	+	+
Cattle-pig mixed samples （0.1% pork）	-	-	-	-	+	-

"+" indicates detected， and "-" indicates not detected.

2.5　市售肉类样本与案件检测结果

使用多重PCR体系对收集的27份市售肉类样本进行扩增检测，市售样本检测结果如表5所示。经检验，样本1~7、10~18、21~25、27与标签中所声明的肉源性成分一致，然而，样本5检出驴与猪源性成分，推测商家在驴肉中掺入了猪肉；样本6仅检测到了马源性成分，推测该商品以马肉冒充驴肉；样本19检出驴与牛源性成分，推测商家在驴肉中掺入了牛肉；样本20仅检出牛源性成分，推测该商品以牛肉冒充驴肉；样本26检出牛与猪源性成分，推测商家在牛肉中掺入了猪肉。27份样本中共有5份样本检测出有掺假的可能性，总掺假检出率为18.52%。参考相关国标及行标方法进行验证，检测结果与上述检测结果一致，证明了该体系对市售样本检测的准确性。

Table 5　Detection results of commercially available meat samples

Meat/Product name	Sample ID	Processing method	Test results （positive/total）						Consistency with Label Claims
			Chicken	Pork	Mutton	Beef	Ass	Horse	
Mutton rolls	1 - 3	Raw	0/3	0/3	**3/3**	0/3	0/3	0/3	Yes
Raw ass meat	4 - 6	Raw	0/3	**1/3**	0/3	0/3	**2/3**	**1/3**	No （5， 6）
Sausage	7 - 9	Cooked	**3/3**	**2/3**	0/3	**1/3**	0/3	0/3	Yes
Beef jerky	10 - 12	Dried	0/3	0/3	0/3	**3/3**	0/3	0/3	Yes
Grilled mutton	13 - 15	Grilled	0/3	0/3	**3/3**	0/3	0/3	0/3	Yes
Grilled beef	16 - 18	Grilled	0/3	0/3	0/3	**3/3**	0/3	0/3	Yes
Braised ass meat	19 - 21	Braised	0/3	0/3	0/3	**2/3**	**2/3**	0/3	No （19， 20）
Stir-fried mutton	22 - 24	Stir-fried	0/3	0/3	**3/3**	0/3	0/3	0/3	Yes
Stir-fried beef	25 - 27	Stir-fried	0/3	**1/3**	0/3	**3/3**	0/3	0/3	No （26）

实际案件的案情介绍如下：2025年3月某日，陕西某地发生一起野狗袭击致人死亡案件，提取3处受害人疑似被咬伤部位的衣服碎片作为检材TF1、TF2、TF3。对所提取的检材TF1~3进行检测，检测结果如图2所示。经检验，3份检材均检测出人与狗的DNA，证明了在该起案件中野狗的确与受害人产生接触，此外，检材2还检出了少量猪的DNA，推测可能由于野狗在与受害人接触前，进食了猪肉及其相关肉制品，导致猪的DNA出现在疑似咬伤部位的衣服碎片处。

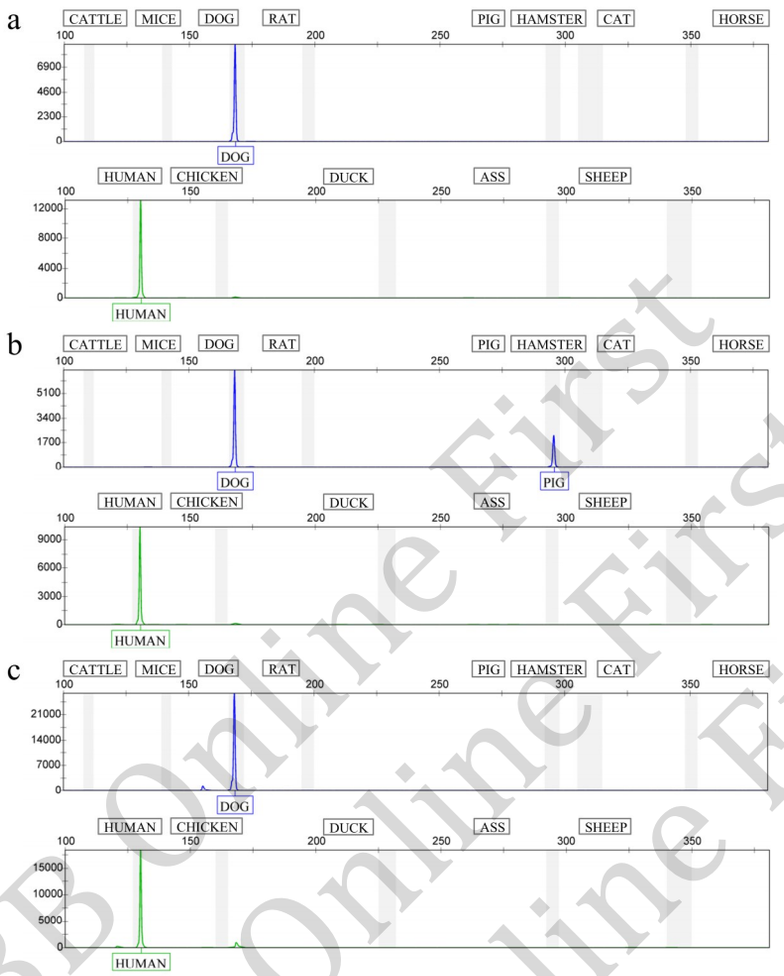


Fig. 2　Detection results of casework evidence

（a） TF1，（b） TF2，（c） TF3.

3　讨 论

随着人们生活水平的提高和食品供应链的不断变化，肉类掺假问题无疑将长期存在且不断变化。因此本研究贴合实际，在目标物种的筛选过程中，不仅选择了牛、猪、鸡、鸭、驴、羊等常见肉源性物种，以及人、犬、猫等常见法医鉴定物种，还根据热点安全案（事）件，如北京朝阳区驴肉火烧掺马肉案[21]、2023年“鼠头鸭脖”事件[22]，补充了马作为潜在掺假物种和小鼠、大鼠、中国仓鼠等可能出现的加工环境污染物种，以此来监测肉类掺假及生产加工环境的污染，加强食品生产线监管，拓宽应用场景。

琼脂糖凝胶电泳（agarose gel electrophoresis，AGE）是最常用的扩增产物检测方法，但其存在分辨率低、灵敏度不足等缺点[23]。毛细管电泳基于DNA片段在高压电场中的迁移速率的差异实现DNA片段的分离，再通过激光激发不同荧光标记的DNA产生响应信号，由检测器捕获信号并转化为按片段长度排序的电泳图谱，实现分析物的检测。相较于传统的琼脂糖凝胶电泳，毛细管电泳技术具有的高灵敏度、高通量、自动化程度高、节省分析时间的优势[24]，结合多荧光标记体系，能够显著提升多重PCR方法的灵敏度及检测物种数量。本研究可检测多达13种物种，对不同目标DNA的灵敏度范围为0.001~0.05 ng，与基于凝胶电泳的研究相比，本研究在灵敏度和物种覆盖范围上更具优势，如Iqbal等[12]所建立的6物种检测方法的灵敏度范围为0.03~0.05 ng、蒋志伟等[25]所建立的6物种检测方法的灵敏度为0.062 5 ng、Yang等[26]所

建立的8物种检测方法的灵敏度为0.01 ng。与同样基于毛细管电泳的研究相比，本研究可检测的物种数也具有明显优势，如陈维忠等[16]建立的多重PCR方法能够检测9种肉源种属。此外，与同为分子检测技术的qPCR、ddPCR相比，本方法在多靶标检测与检测成本上占有显著优势，相应的适用场景也存在不同，多重PCR-毛细管电泳适用于公安机关进行大规模筛查与常态化监管，成本低，分析快，qPCR、ddPCR适用于鉴定涉案检材并精准识别掺假比例。

多重PCR体系的成功与否，关键在于物种特异性引物与靶序列的高效结合能力以及多重引物存在时各引物的互不干扰性[27]。本研究针对目标物种设计多对引物，并利用BLAST程序对每对引物进行了严格评估，将其与非目标物种DNA序列进行比对，确保每对引物与非目标物种无显著错配，并通过大量实验验证以得到无引物二聚体和非特异性扩增的特异性引物，但同时由于多引物同时存在时导致的引物竞争效应，当多个目标DNA同时存在时，个别引物扩增效率较低，且导致了牛的扩增产物出现双峰现象，而仅检测1~3种物种时，并不会出现双峰，本研究据此认为该现象不影响体系对标靶的检测能力。另外，在低模板量的条件下，猪、小鼠、牛的特异性引物被抑制，未能检出目标DNA。这些现象意味着如果继续增加单一体系中的多重PCR体系的引物对，会对引物的特异性及扩增效率提出更高要求，使得研究更加复杂，并且存在降低检测灵敏度的可能。因此，后续研究应谨慎继续增加标靶数量或采用新的方法解决该问题，如采用双管法检测，将多对引物均匀分配至两个反应体系中。在下一步研究中，可以补充靶向真核生物的引物作为阳性控制，以验证PCR反应的有效性，确认样本不含目标物种DNA，增加该研究的科学性与严谨性。此外，还可以通过对更多非目标DNA进行扩增检验，以进一步验证该体系的物种特异性。

在实际应用方面，研究通过对羊鸭、驴马、牛猪三类混合肉类进行检测，证明了体系具备混合样本检测能力。研究还对27份市售肉类样本进行检测，发现5份样本存在标签信息不实问题，包括以马肉冒充驴肉、以牛肉冒充驴肉以及在驴肉中掺入猪肉或牛肉的情况，检出率达18.52%。上述结果均通过相关国标及行标方法进行了验证，二者检测结果一致。这可能指向了目前肉类市场仍存在以低价肉冒充高价肉及驴肉掺假现象严重的问题，需要加强监管，也验证了本检测体系在实际应用中的可靠性和必要性。此外，本研究能够成功鉴别出经过不同程度加工处理（包括卤制、烤制、烘干和炒制）的肉类制品中的掺假成分，这表明该方法对于加工食品同样具有良好的适用性。同时，研究还通过对真实案件检材的检测，进一步验证了该检测体系的多重检测能力，还揭示了更多动物行为特征，为案件重建提供了多维证据链，说明了其在法医物证学中的应用价值。除本研究所展现的场景之外，该体系的应用还可延伸至对生物制品污染的筛查，不明生物材料种属的识别，控制人畜共患病传播风险等生物安全领域。

4 结 论

本研究成功构建了一种能够在单管反应中同时鉴别牛、小鼠、犬、大鼠、猪、中国仓鼠、猫、马、人、鸡、鸭、驴、羊等13个物种的多重PCR-毛细管电泳检测体系。该体系灵敏度高、通用性强，凭借毛细管电泳检测平台的高通量特性，能够实现大规模筛查，而且在对模拟混合样本、市售肉类样品及实际案件检材的检测中显示出了其良好的实用性，为公安机关办理相关法医物证鉴定及食品安全案件提供了一种高效解决方案。

参 考 文 献

[1] Cui W, Jin X, Guo Y, *et al*. Development and validation of a novel five-dye short tandem repeat panel for forensic identification of 11 species. Front Genet, 2020, **11**: 1005

[2] Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J, *et al*. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. J Agric Food Chem, 2019, **67**(14): 3854-3864

[3] Li X, Zang M, Li D, *et al*. Meat food fraud risk in Chinese markets 2012-2021. NPJ Sci Food, 2023, **7**(1): 12

[4] Doroudian M, Soezi M, Rasouli M, *et al*. Identification of meat adulteration in minced meat samples labeled as beef and mutton in Tehran stores using duplex PCR. Food Sci Nutr, 2024, **12**(10): 7504-7511

[5] Chang L, Huang P, Liu J, *et al*. Real-time PCR method based on single-copy nuclear DNA sequences for the quantitative detection of pork adulteration in processed beef products. Food Control, 2024, **163**: 110518

[6] He Y, Yan W, Dong L, *et al*. An effective droplet digital PCR method for identifying and quantifying meat adulteration in raw and processed food of beef (*Bos Taurus*) and lamb (*Ovis Aries*). Front Sustain Food Syst, 2023, **7**: 1180301

[7] Zvereva E A, Hendrickson O D, Dzantiev B B, *et al*. Comparison

of competitive and sandwich immunochromatographic analysis in the authentication of chicken in meat products. Anal Biochem, 2024, **689**: 115484

[8] Zhang M, Li Y, Zhang Y, *et al*. Rapid LC-MS/MS method for the detection of seven animal species in meat products. Food Chem, 2022, **371**: 131075

[9] Malikhah M, Sarno R, Sabilla S. Ensemble learning for optimizing classification of pork adulteration in beef based on electronic nose dataset. Int J Intell Eng Syst, 2021, **14**(4): 44-55

[10] Masithoh R E, Pahlawan M F R, Kim J, *et al*. Shortwave infrared hyperspectral imaging for the determination of pork adulteration in minced beef and lamb. Food Control, 2024, **166**: 110736

[11] Liu H, Cao T, Wang J, *et al*. Accurate and simultaneous detection of pork and horse meat adulteration by double tailed recombinase polymerase amplification integrated with SERS based two-color lateral flow nucleic acid hybridization strip. J Food Compos Anal, 2024, **134**: 106562

[12] Iqbal M, Saleem M S, Imran M, *et al*. Single tube multiplex PCR assay for the identification of banned meat species. Food Addit Contam Part B Surveill, 2020, **13**(4): 284-291

[13] 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. Meat Sci, 2018, 137: 34-40

[14] Elyasigorji Z, Izadpanah M, Hadi F, *et al*. Mitochondrial genes as strong molecular markers for species identification. Nucleus, 2023, **66**(1): 81-93

[15] 纳涛, 袁宝珠 . 基于细胞色素 b 序列差异的细胞种属鉴别及种属间细胞交叉污染的快速检测方法 . 药物分析杂志, 2014, **34**(11): 2054-2059
Na T, Yuan B Z. Chin J Pharm Anal, 2014, **34**(11): 2054-2059

[16] 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 . 中国法医学杂志, 2020, **35**(2): 177-181
Chen W Z, Zhang J, Wang X, *et al*. Chin J Forensic Med, 2020, **35**(2): 177-181

[17] 国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会 . 动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR 方法: GB/T 21107—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-4
Standardization Administration of the People's Republic of China. Identification of horse and donkey derived materials in animal-originated feedstuffs—PCR method: GB/T 21107—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 1-4

[18] 国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会 . 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 方法: GB/T 21101—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-4
Standardization Administration of the People's Republic of China. Identification of porcine derived materials in animal-originated feedstuffs—PCR method: GB/T 21101—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 1-4

[19] 国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会 . 饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法: GB/T 20190—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1-6
Standardization Administration of the People's Republic of China. Detection of bovine, sheep and goat-derived material in feeds—Qualitative polymerase chain reaction(PCR)method: GB/T 20190—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006: 1-6

[20] 国家质量监督检验检疫总局 . 动物源性产品中鸡源性成分 PCR 检测方法: SN/T 2978—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-5
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. PCR method for the detection of chicken components in animal derived products: SN/T 2978—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012: 1-5

[21] 孙满桃 . 在驴肉火烧中掺杂马肉餐饮店店长被判刑[EB/OL]. 北京: 光明网 (2025-03-25) [2025-06-21]. https://legal.gmw.cn/2025-03/25/content_37926376.htm
Sun M T. Restaurant owner sentenced for adulterating donkey meat burgers with horse meat[EB/OL]. Beijing: Guangming Online (2025-03-25) [2025-06-21]. https://legal. gmw. cn/2025-03/25/content_37926376.htm

[22] 郑皓月 . 江西通报"鼠头鸭脖事件"调查处理结果!认定饭菜中异物是鼠头![EB/OL]. 北京: 央广网 (2023-06-17) [2025-06-21]. https://news.cnr.cn/dj/20230617/t20230617_526291923.shtml
Zheng H Y. Jiangxi announces investigation results of "rat-head-duck-neck incident": foreign object in food confirmed as rat head [EB/OL]. Beijing: China National Radio (2023-06-17) [2025-06-21]. https://news. cnr. cn/dj/20230617/t20230617_526291923.shtml

[23] 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. Food Chem, 2019, 295: 395-402

[24] Li Y, Miao S, Tan J, *et al*. Capillary electrophoresis: a three-year literature review. Anal Chem, 2024, **96**(20): 7799-7816

[25] 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 . 法医学杂志, 2024, **40**(3): 254-260
Jiang Z W, Xia R C, Tao R Y, *et al*. J Forensic Med, 2024, **40**(3): 254-260

[26] Yang C, Zhong G, Zhou S, *et al*. Detection and characterization of meat adulteration in various types of meat products by using a high-efficiency multiplex polymerase chain reaction technique. Front Nutr, 2022, **9**: 979977

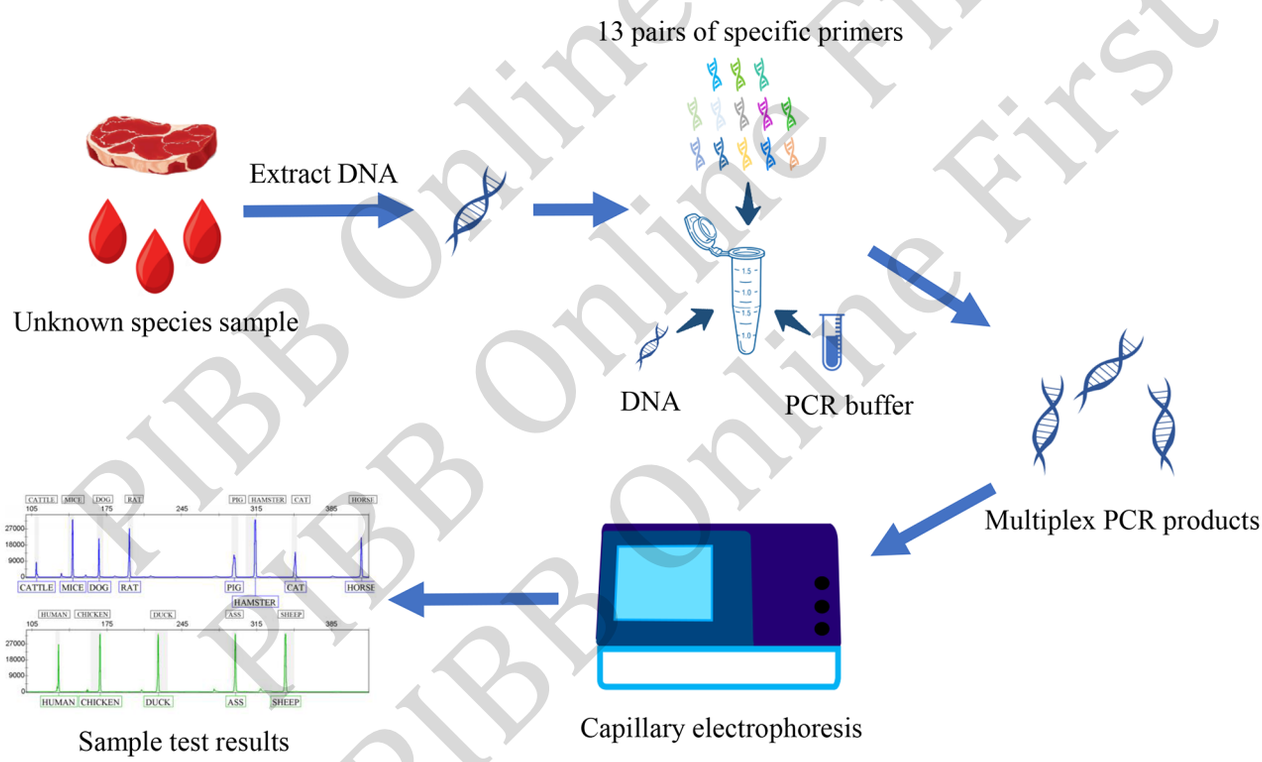
[27] Chaudhary P, Kumar Y. Recent advances in multiplex molecular techniques for meat species identification. J Food Compos Anal, 2022, **110**: 104581

Development and Validation of a Multiplex PCR−capillary Electrophoresis System for Identification of Frequently Encountered Species*

GUO Run-Ze[1)], HU Sheng[2)], CHEN Li-Ping[3)], ZHANG Ying[2)], HE Yong-Feng[4)], SONG Zhen[4)], YANG Rui-Qin[1)**], SUN Qi-Fan[2)**]

([1)]*School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing* 100038, China;
[2)]*Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing* 100038, China;
[3)]*Shaanxi Blood Center, Xi'an* 710061, China;
[4)]*Shaanxi Provincial Public Security Department, Xi'an* 710000, China)

Graphical abstract



Abstract　Objective　To address the challenge of identifying unknown animal-derived components in the fields of forensic evidence and food safety, this study developed and validated a sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction-capillary electrophoresis (PCR-CE) detection system capable of simultaneously identifying DNA from 13 species—cattle (*Bos taurus*), mouse (*Mus musculus*), dog (*Canis lupus familiaris*), rat (*Rattus norvegicus*), pig (*Sus scrofa*), Chinese hamster (*Cricetulus griseus*), cat (*Felis catus*), horse (*Equus caballus*), human (*Homo sapiens*), chicken (*Gallus gallus*), duck (*Anas platyrhynchos*), donkey (*Equus asinus*), and sheep (*Ovis aries*)—within a single-tube reaction. **Methods**　Species-specific primers were meticulously designed targeting hypervariable regions of the mitochondrial DNA (including *Cytb*, *COI*, *16S rRNA*, and *ND2* genes), with primer specificity rigorously verified in silico using BLAST analysis against non-target species. A multiplex PCR system was constructed, and critical reaction parameters, including primer concentrations and

annealing temperature, were systematically optimized through gradient experiments to ensure balanced amplification of all 13 targets without non-specific products or primer-dimer formation. Amplification products were subsequently separated and detected based on their characteristic fragment lengths and distinct fluorescent labels (6-FAM, HEX) using a capillary electrophoresis platform. The established multiplex PCR-CE system was comprehensively evaluated across several parameters: specificity was tested against 17 species (13 target species and 4 non-target species); sensitivity was determined using serial dilutions of mixed DNA templates; the ability to detect adulteration was assessed using simulated mixed meat samples with known adulteration percentages (10% to 0.1%); and practical applicability was investigated by analyzing 27 commercially available meat products and authentic casework samples from a fatal dog attack incident. **Results** The optimized multiplex PCR-CE system successfully demonstrated specific and simultaneous amplification for all 13 target species, with zero cross-reactivity observed with 4 non-target species. The system exhibited high sensitivity, with detection limits ranging from 0.05 ng to 0.001 ng of DNA template depending on the species; ten species were detectable at the 0.001 ng level. In simulated adulteration studies, the system reliably detected duck DNA in sheep meat at 0.5%, pork in beef at 0.5%, and horse meat in donkey meat at a remarkably low level of 0.1%. Analysis of commercial meat products revealed an 18.52% (5/27) mislabeling rate. These findings were consistent with validation tests using national and industry standard methods. Furthermore, the system effectively identified human and dog DNA from real forensic case evidence (clothing fragments from bite marks), and even detected trace pig DNA, suggesting the dog's prior pork consumption. **Conclusion** This study successfully established a highly specific, sensitive, and practical multiplex PCR-CE system for the simultaneous identification of 13 species. By combining the power of multiplex PCR with capillary electrophoresis, our approach delivers a significant advantage in terms of throughput, resolution, and automation over traditional gel-based methods. The system's proven effectiveness in detecting low-level adulteration in complex mixtures and processed food products, along with its successful application to genuine forensic specimens, underscores its substantial value and broad potential for routine use in forensic laboratories for evidence analysis and in regulatory settings for ensuring food authenticity and safety monitoring.

Key words multiplex PCR, capillary electrophoresis, species identification, forensic evidence,food safety
DOI：10.3724/j.pibb.2025.0299 **CSTR**：32369.14.pibb.20250299

* This work was supported by a grant from National Key R&D Programme (2022YFC3341002).
** Corresponding author.
YANG Rui-Qin. Tel：86-18611988837，E-mail：yangruiqin@ppsuc.edu.cn
SUN Qi-Fan. Tel：86-15801616421，E-mail：sunqifan@cifs.gov.cn
Received：June 25，2025 Accepted：October 9，2025