

实验技术与方法

肉制品中毛皮动物源性成分掺假检测阳性质粒分子的构建与评价

翟清燕^{1,2}, 霍胜楠^{1,2}, 姚现琦³, 郑世超^{1,2}, 王骏^{1,2}, 任易婕^{1,2}, 孙潇慧^{1,2}, 杜东旭³

(1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250000; 2. 国家市场监管重点实验室肉及肉制品监管技术, 山东 济南 250000; 3. 临沂金锣文瑞食品有限公司, 山东 临沂 276000)

摘要:目的 建立一种肉制品中毛皮动物源性成分掺假快速检测技术。方法 构建狐狸、貉、水貂三种检测用阳性质粒分子, 利用实时荧光定量PCR方法对其特异性、灵敏度和方法适用性等关键指标进行分析。结果 构建好的狐狸、貉、水貂阳性质粒分子特异性强、灵敏度高, 检验灵敏度均可达到 10^{-4} ng/ μ L, 标准曲线扩增效率分别为94.451%、117.461%、114.709%, 且相关系数(R^2)均在0.995以上。在混合肉样品和市售肉制品中均可检测, 三种成分的检测限均低至1%, 具有较好的可行性及适用性。结论 本方法构建的三种阳性质粒分子可以满足实际工作中肉类掺假检测的需求。

关键词: 毛皮动物; 阳性质粒分子; 特异性; 灵敏度

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2023)03-0360-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.03.007

Construction and evaluation of positive plasmid molecules for adulteration detection of fur animal-derived components in meat productsZHAI Qingyan^{1,2}, HUO Shengnan^{1,2}, YAO Xianqi³, ZHENG Shichao^{1,2}, WANG Jun^{1,2}, REN Yijie^{1,2}, SUN Xiaohui^{1,2}, DU Dongxu³

(1. Institute for Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250000, China; 2. Key Laboratory of Supervising Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Shandong Ji'nan 250000, China; 3. Linyi Jinluo Win Ray Food Co., Ltd., Shandong Linyi 276000, China)

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for adulteration of fur animal-derived components in meat products. **Methods** Three positive plasmids (fox, raccoon dog and mink) for detection were constructed, and their specificity, sensitivity and applicability were analyzed by real-time quantitative PCR. **Results** The constructed positive plasmid molecules of fox, raccoon dog and mink had high specificity and sensitivity, and the sensitivity could reach 10^{-4} ng/ μ L. The amplification efficiency of standard curves were 94.451%, 117.461% and 114.709%, respectively. And the correlation coefficient R^2 was over 0.995. Three components could be detected in mixed meat samples as well as common meat products, the limits of detection were less than 1%, which had good feasibility and applicability. **Conclusion** The three positive plasmids constructed by this method could meet the needs of meat adulteration detection in practical work.

Key words: Fur animal; positive plasmid; specificity; sensitivity

中国是全球最大的毛皮动物(狐狸、水貂、貉)养殖国家。近年来,毛皮动物养殖已成为畜牧业养殖的重要组成部分,并形成了一定的区域特色,主要分布在河北、山东、吉林、黑龙江和内蒙古等地^[1]。目前国内的毛皮动物养殖方式主要以农户家庭养

殖为主,缺乏统一规范的流通监督管理,在疫病防控方面依然存在许多问题。毛皮动物的皮毛价格昂贵,在毛皮动物养殖不断繁荣的同时,由此附带的动物尸体的流向却很少获得关注,这其中蕴含着巨大的风险^[2]。针对这一现象,2017年山东出台了《关于加强病死畜禽和毛皮动物胴体无害化处理严厉打击相关违法犯罪行为的公告》(鲁牧动卫发[2017]16号),规定毛皮动物胴体必须依法进行无害化处理。但在调研中发现仍有一些不法商贩为了牟利低价收购这些屠宰后的胴体冒充或掺入优质高价肉(牛、羊、狗等)进行出售,这种行为不仅侵

收稿日期: 2021-12-29

基金项目: 山东省食品药品检验研究院自拟课题(SDIFDC-KY-2021019)

第一作者: 翟清燕 女 工程师 研究方向为食品生物安全检测技术研究 E-mail: 383230329@qq.com

通信作者: 霍胜楠 女 研究员 研究方向为食品生物安全质量管理与检测技术开发 E-mail: huosn@163.com

害了消费者的经济利益,还打击了养殖业的健康发展。因此,对于这些未经检验检疫的动物尸体作为副产物再利用的行为,需要食品安全监管部门重点关注,建立相应的检测方法,才能构建更加健康的食品安全环境^[3]。

目前在毛皮动物检测方面,分子生物学方法是较为重要的手段,其中包括聚合酶链式反应和荧光 PCR 技术、酶联免疫技术等。张全芳等^[4]针对狐狸线粒体 16S rRNA 基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增、电泳、酶切检测流程实现对食品中狐狸源性成分进行检测。钱云开等^[5]根据貉线粒体 *Cytb* 基因序列设计引物和探针,通过优化扩增反应体系进行实时荧光 PCR 扩增,针对上述基因序列设计了多组引物探针,结果却不甚满意,验证试验发现与同属犬科的某种或某几种犬有交叉反应。涉及毛皮动物源性成分的鉴定研究报道较少,缺少简便、快速、特异性强、灵敏度高的高通量实时荧光 PCR 筛选技术手段。

实时荧光 PCR 检测是指向反应体系中加入荧光基团,在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号的强弱变化,实时监测特异性产物的量,最后通过目的基因的标准曲线进行定量分析的过程^[6]。与常规 PCR 相比,自动化程度更高、特异性更强、灵敏度更高,已广泛运用到多种畜禽肉掺假检测方面的研究及应用当中。对于狐狸、水貂、貉源性成分检测,目前国内主要采用 GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》^[7]。在应用荧光 PCR 方法进行检测时,需要用含目标成分的样品作为阳性对照,然而典型的阳性材料很难获取,且有证标准物质价格昂贵。与传统的基体标准物质相比,阳性质粒分子通过微生物进行存储和大量培养,不依赖原材料,具有易构建、繁殖快、纯度高、成本低等优点,可有效解决阳性标准品匮乏和制备困难的问题,给检测工作带来便利^[8]。本研究试图建立一种毛皮动物掺假快速检

测技术,通过构建狐狸、水貂、貉三种动物源性成分检测用阳性质粒分子,对其特异性、灵敏度和方法适用性等关键指标进行验证,研究出一种高效、准确、灵敏的实时荧光 PCR 检测方法,为肉制品中毛皮动物源性成分的准确检测和安全监管提供可靠的技术支持^[9]。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

7500 FAST 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司), NanoDrop 2000c 生物紫外可见分光光度计(美国 ThermoFisher 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),生物安全柜(美国 Nuair 公司)。

DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN 公司); TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems 公司); DL 500 DNA Marker、Agarose Gel DNA Purification Kit、*E. coli* DH5 α Competent Cells、RNase-free Water (TaKaRa 公司);引物和探针由上海博尚生物技术有限公司(Biosune)合成。

狐狸、水貂、貉均通过山东威海某养殖基地获得,其他实验用物种和肉制品样品从超市、农贸市场、网络等不同渠道获取。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取

多点采取肌肉组织,选取适量具有代表性的样品进行研磨,加入液氮研磨至粉末状^[10],按照 DNeasy Blood&Tissue Kit 说明书对样品 DNA 进行提取。使用 NanoDrop 2000c 测定 DNA 的浓度和质量 A_{260}/A_{280} ,将 DNA 浓度稀释到 10~100 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物、探针序列的确认

通过 Genbank 基因序列比对分析,选取狐狸线粒体色素氧化酶 I 亚基基因(*COI*)、水貂线粒体细胞色素 b 基因(*cytb*)、貉线粒体色素氧化酶 I 亚基基因(*COI*),设计特异性引物和探针,详见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 检测引物、探针

Table 1 Specific primers and probes sequences in real time PCR

名称	引物序列(5'-3')	探针序列
狐狸	F-TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATTT R-GCGGGGAGGTTTTATATTGATAATAG	FAM-CCCTGCACCTGGCCGAGTC-TAMRA
水貂	F-GCTTCAATCCTCTATTTTCATAA R-GCTTCTTCTTGAGTCTTA	FAM-CCTCCTAGTCTTCATGCCAATCGT-Eclipse
貉	F:AATCTTGCCTGGGTTTGAA R:CAGTAAATATGTGGTGGCTCACA	FAM-CATACTACTCCGGGAAAA-MGBNFG

1.2.3 阳性质粒分子的构建

根据设计的 PCR 引物,选择狐狸线粒体 *COI* 基因、水貂线粒体 *cytb* 基因、貉线粒体 *COI* 基因引物

分别对狐狸、水貂、貉基因组 DNA 进行扩增。反应条件为 94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 次循环。将得到 PCR 产物

通过琼脂糖凝胶电泳进行分离,得到的目的基因再用胶回收试剂盒进行纯化。将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上,然后将连接产物加入大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞中进行转化,构建相应阳性质粒分子^[11]。

1.2.4 实时荧光 PCR 检测

实时荧光 PCR 反应体系: TaqMan™ Universal Master Mix II with UNG 酶 12.5 μL, 上、下游引物(终浓度为 10 μmol/L)各 1 μL, 探针(5 μmol/L)1 μL, 样品 DNA(10~100 μg/mL)2.0 μL, 加蒸馏水补足至 25 μL。

实时荧光 PCR 反应参数为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环, 仪器设置荧光自动收集。

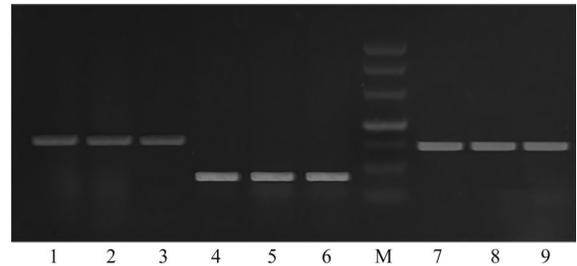
2 结果

2.1 阳性质粒分子的构建与鉴定

利用引物分别对狐狸线粒体 *COI* 基因、水貂线粒体 *cytb* 基因、貉线粒体 *COI* 基因进行 PCR 扩增, 再通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 每个样品设置 3 个平行。由图 1 可知, 狐狸线粒体 *COI* 基因大小为 161 bp, 水貂线粒体 *cytb* 基因大小为 109 bp, 貉线粒体 *COI* 基因大小为 146 bp, 将得到的扩增片段克隆到 pMD19-T 载体上, 从而得到 3 个标准质粒分子。

为了验证质粒分子插入序列的准确性, 将获得的载体质粒进行测序验证, 发现扩增序列与预期大

小的片段一致, 表明构建的狐狸、水貂、貉阳性质粒分子插入片段与预期一致, 质粒分子已按照预期构建成功^[12]。



注: 1、2、3: 狐狸线粒体 *COI* 基因 PCR 扩增产物(161 bp); 4、5、6: 水貂线粒体 *cytb* 基因 PCR 扩增产物(91 bp); 7、8、9: 貉线粒体 *COI* 基因 PCR 扩增产物(146 bp); M: marker, DL500

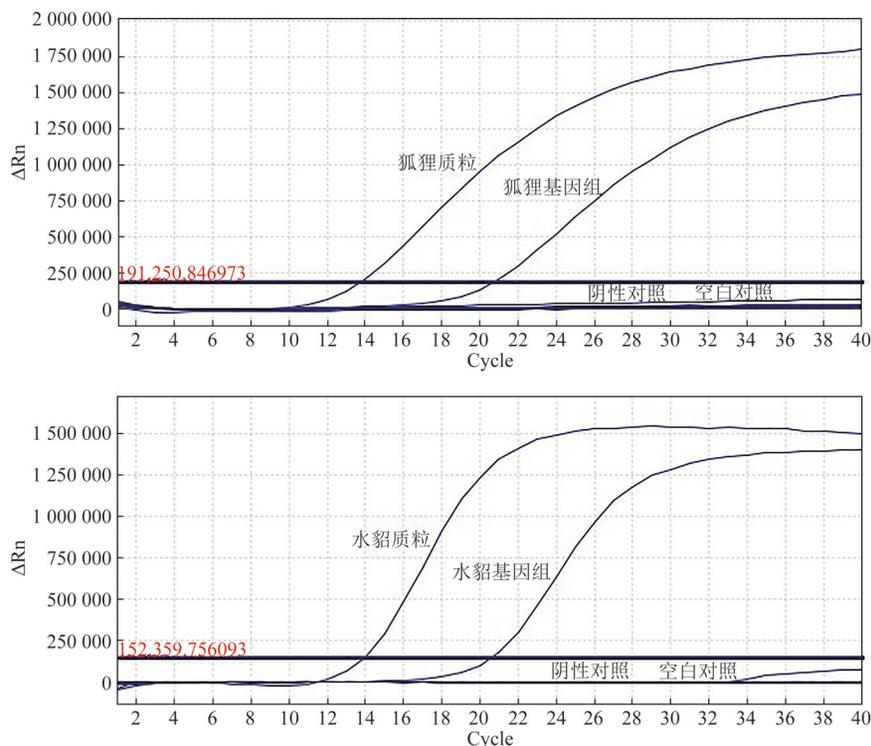
图 1 狐狸、水貂、貉 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳结果图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis graphs of fox, raccoon dog and mink

2.2 阳性质粒分子的特异性检测

利用狐狸、水貂、貉引物探针分别以相应阳性质粒分子、相应动物源性成分样品的 DNA(阳性对照)、不含相应动物源性成分样品的 DNA(猫、狗、猪、牛、羊、马、驴、鼠、鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、大豆、花生、核桃、芝麻、腰果、水稻、玉米等 20 种, 阴性对照)、无菌双蒸水(空白对照)为模板进行荧光 PCR 扩增, 对构建的阳性质粒分子的片段特异性进行检测。

如图 2 所示, 无论是狐狸、水貂、貉基因组还是构建的相应阳性标准质粒均能检出阳性信号。狐狸线粒体 *COI* 基因检出的 Ct 值为 21 个循环, 阳性



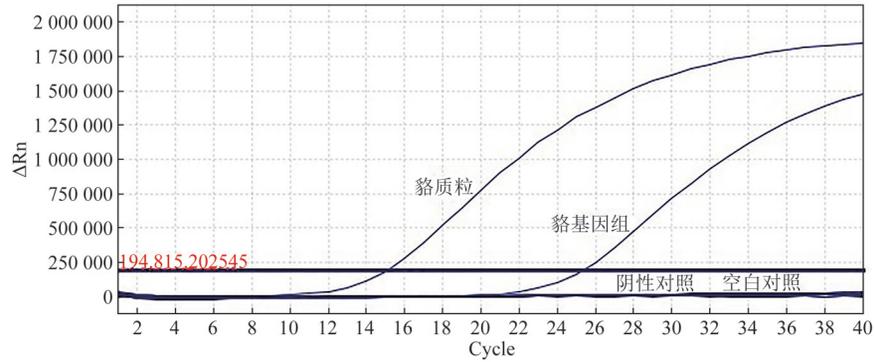


图2 狐狸、水貂、貉阳性质粒分子特异性检测

Figure 2 Specificity of positive plasmids of fox, raccoon dog and mink

质粒分子为 14 个循环,水貂线粒体 *cytb* 基因检出的 Ct 值为 20 个循环,阳性质粒分子为 14 个循环,貉线粒体 *COI* 基因检出的 Ct 值为 25 个循环,阳性质粒分子为 15 个循环,阴性对照和空白对照均无扩增。说明本发明制备的阳性标准分子能被特异性的引物和探针检测到,均具有良好的特异性,可

以作为特异性检测的阳性对照品来使用。

2.3 阳性质粒分子的灵敏度检测

为了检测狐狸、水貂、貉阳性质粒分子的灵敏度,将质粒分别稀释成 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ng/ μ L 作为 DNA 模板进行荧光 PCR 扩增,每个稀释度设置 3 个平行,结果见图 3。

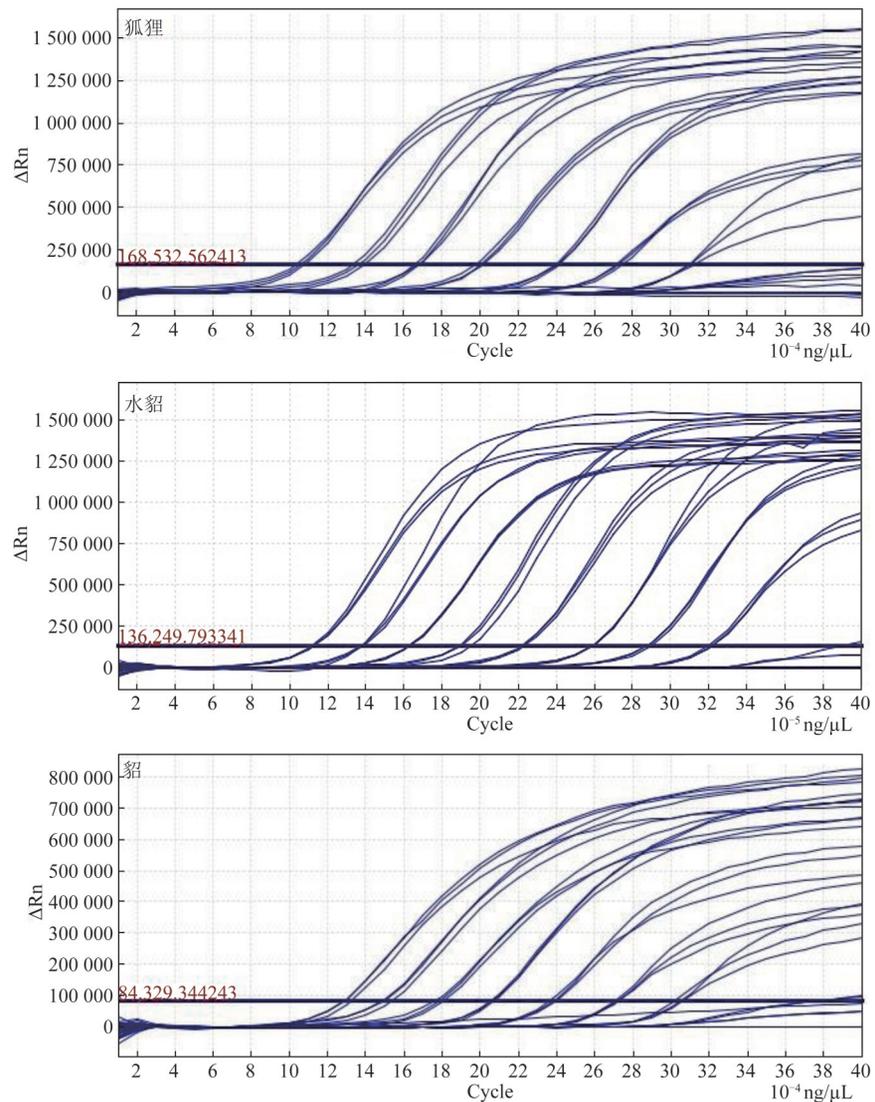


图3 狐狸、水貂、貉阳性质粒分子灵敏度检测

Figure 3 Sensitivity of positive plasmids of fox, raccoon dog and mink

通常认为,Ct值<35时判定检测结果为阳性,以此作为样品的最低检出限。由图3可知,当3种质粒浓度在 $10^0\sim 10^{-6}$ ng/ μ L范围内,狐狸和貉阳性质粒分子的检出限可达到 10^{-4} ng/ μ L,水貂阳性质粒分子的检出限可达到 10^{-5} ng/ μ L,均具有较高的检测灵敏度。三种阳性质粒的扩增曲线拐点清楚,指数增长期明显,扩增曲线的重复性均很理想。另外还可发现,随着稀释倍数的增高,平台期变低,可能是由于质粒浓度的降低导致反应体系中形成大量引物二聚体,使引物很快被消耗掉^[13]。

2.4 质粒标准曲线的可靠性分析

将质粒DNA标准物质从10 ng/ μ L稀释至 10^{-3} ng/ μ L,使用稀释后的狐狸、水貂、貉阳性质粒标准分子10倍梯度稀释产物作为模板进行荧光PCR扩增,每个稀释度设置3个平行。根据获得的Ct值和稀释倍数分别绘制标准曲线,以浓度为横轴,Ct值为纵轴,标准曲线见图4,相关系数和PCR反应效率见表2^[14]。

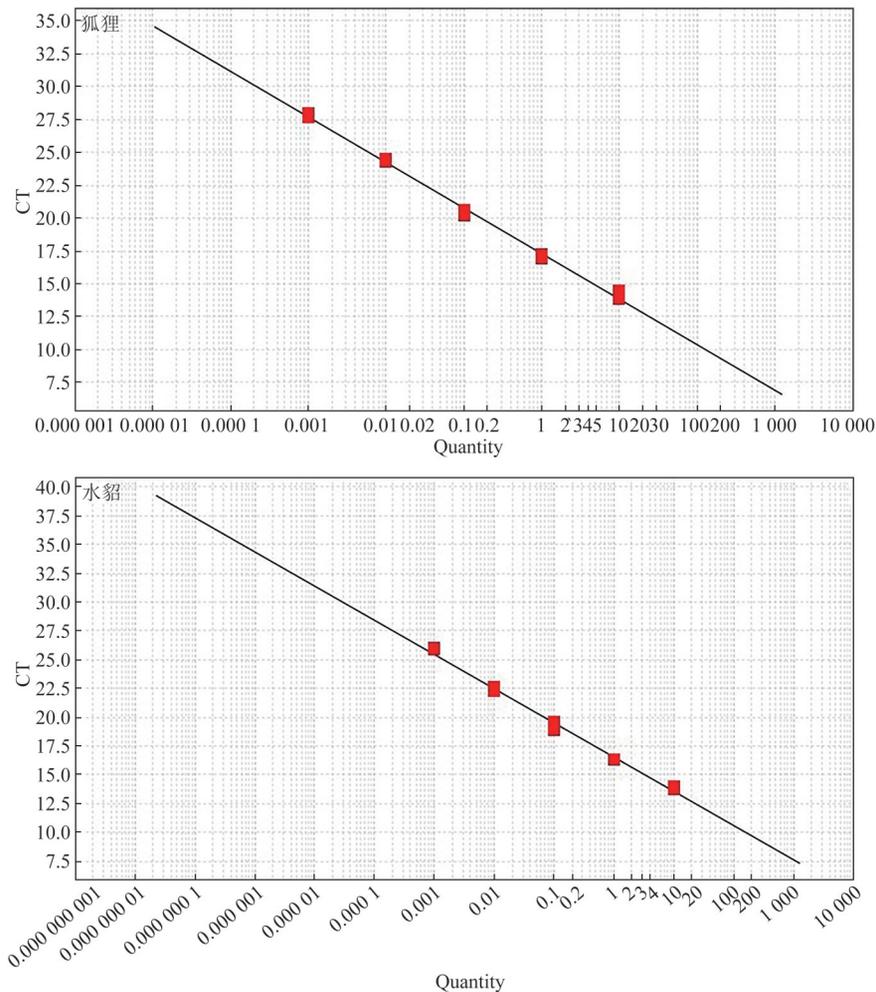
由表2可知,以狐狸、水貂、貉阳性质粒分子建立的标准曲线的扩增效率分别为94.451%、117.461%、114.709%,且相关系数(R^2)均在0.995

以上,由此可见标准曲线的试验数据与拟合函数之间的拟合度高,在模板浓度范围内均具有良好的线性关系和较高的反应效率,表明本方法可用于样品的定量检测。

2.5 模拟肉制品的检测

采用制作肉丸人工模拟肉制品试验^[15],样品肉经烘干研磨成粉,按照表3中将狐狸肉、水貂肉、貉肉分别按1%、10%、30%、50%与相应比例羊肉和其他成分(包括木薯淀粉、食用盐、大蒜组合成分)混合制作肉丸。肉丸分别经过烘箱200℃热处理30 min^[16];高压灭菌锅121℃处理30 min^[17]后,进行DNA提取和实时荧光PCR检测。

为了检测真实肉制品中复杂成分和工艺对检测结果的影响,按照肉制品的主要加工工艺和主要成分,将狐狸肉、水貂肉、貉肉制作肉丸人工模拟肉制品,经过粉碎、高温烘烤、蒸煮等处理后,试验结果见表4。三种成分检测限均低至1%,掺入1%时Ct值均<35,说明本试验设计的体系具有较好的抗干扰能力及较高的灵敏性,而且肉制品的加工处理工艺不影响本方法的检测。



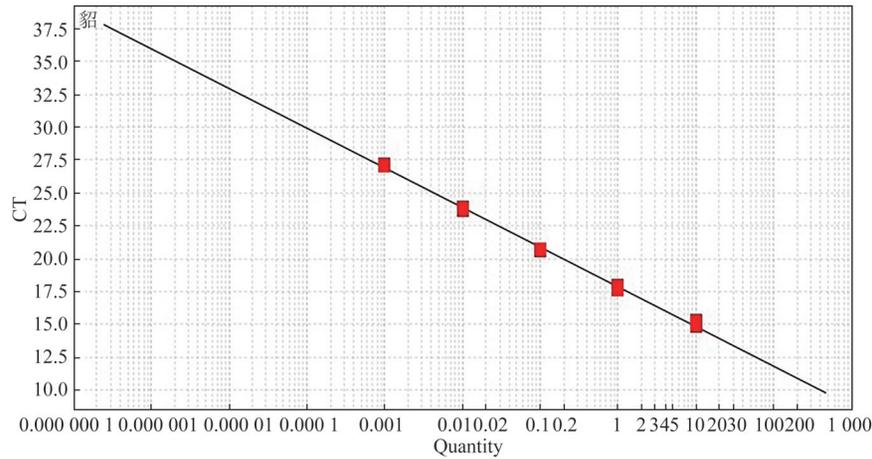


图4 狐狸、水貂、貉阳性质粒分子标准曲线

Figure 4 Standard curves of positive plasmid of fox, raccon dog and mink

表2 标准曲线的相关系数和扩增效率

Table 2 The correlation coefficient and amplification efficiency of standard curve

质粒名称	斜率	相关系数(R ²)	扩增效率/%
狐狸	-3.462	0.997	94.451
水貂	-2.964	0.995	117.461
貉	-3.013	0.997	114.709

表3 模拟混合样品成分

Table 3 Samples of meat mixture

编号	狐狸肉 占比/%	水貂肉 占比/%	貉肉 占比/%	羊肉 占比/%	其他成分 占比/%
1	1	0	0	89	10
2	10	0	0	80	10
3	30	0	0	60	10
4	50	0	0	40	10
5	0	1	0	89	10
6	0	10	0	80	10
7	0	30	0	60	10
8	0	50	0	40	10
9	0	0	1	89	10
10	0	0	10	80	10
11	0	0	30	60	10
12	0	0	50	40	10

表4 模拟混合肉样中目的源性成分的检测

Table 4 Detections of objective content in meat mixtures

编号	狐狸肉含量 (Ct值)	编号	水貂肉含量 (Ct值)	编号	貉肉含量 (Ct值)
1	33.28	5	31.07	9	32.33
2	30.32	6	27.32	10	29.17
3	28.83	7	25.53	11	27.92
4	28.51	8	24.82	12	27.33

2.6 市售肉制品的检测

为了对构建的质粒分子的适用性进行验证,实验室采集 20 份样本(超市、农贸市场、网络),样本类型包括原料肉和成品肉,以构建的质粒分子为阳性对照,分别对狐狸、水貂、貉源性成分进行荧光 PCR 扩增,结果见表 5。在所有的原料肉中,均能扩增出预期的目标成分,其他成品肉均未检出狐狸、

表5 市售肉制品目的源性成分检测

Table 5 Detection of objective content in meat products

编号	样品名称	狐狸成分	水貂成分	貉成分
1	狐狸肉(威海)	+	-	-
2	水貂肉(威海)	-	+	-
3	貉肉(威海)	-	-	+
4	貉肉(临沂)	-	-	+
5	貉肉(潍坊)	-	-	+
6	瀛州伊德牛肉片	-	-	-
7	草原牧轩草原羔羊肉	-	-	-
8	亓鲁鞑地羔羊肉片	-	-	-
9	乐帮羊肉片	-	-	-
10	瀛州伊德羊肉片	-	-	-
11	恒阳羔羊肉卷	-	-	-
12	逸品肥牛	-	-	-
13	宵肴派麻辣牛肉	-	-	-
14	诚誉源精品羔羊肉卷	-	-	-
15	至尊羔羊肉	-	-	-
16	尚品羔羊肉卷	-	-	-
17	牛肉松	-	-	-
18	撒尿牛丸	-	-	-
19	金锣火腿肠	-	-	-
20	双汇火腿肠	-	-	-

注:+:表示检出该成分;-:表示未检出该成分

水貂、貉成分,说明购买的成品肉均未掺入这三种成分。说明常见的肉制品中加入的各种成分和调料以及不同处理工艺造成的复杂成分均不影响本方法的检测,进一步说明构建的阳性质粒分子适合作为肉源性成分特异性检测的阳性对照。

3 结论

目前,检测动物原料及其产品的阳性物质主要来源于其本身,毛皮动物原料肉通常很难获取,制备标准物质的过程又非常复杂,需要精度很高的设备,而且生产成本很高,保存环境要求高^[18]。针对这一现象,本研究着力构建狐狸、水貂、貉三种阳性质粒分子以代替基体标准物质,经验证发现这三种质粒分子均具有灵敏度高、特异性强等特点,适用于毛皮动物掺假快速检测,使其阳性物质不再依赖

于原材料的供应,为肉制品中毛皮动物源性成分的准确检测和安全监管提供可靠的技术支持。

参考文献

- [1] 刘华阳,李俊玲,李会荣,等.全国貂、狐、貉养殖现状及建议[J].特种经济动植物,2020,23(10):10-12.
LIU H Y, LI J L, LI H R, et al. Current situation and suggestion of mink, fox and raccoon dog breeding in China[J]. Special Economic Animals and Plants, 2020, 23(10): 10-12.
- [2] 雒霞.2014中国貂、狐、貉取皮数量权威发布[J].西部皮革,2015,37(16):4.
LUO X. Published by the Authority of Chinese mink, fox and raccoon dog skin quantity in 2014[J]. West Leather, 2015, 37(16): 4.
- [3] 刘洪明,张祯涛,张宗东,等.山东省病死畜禽无害化处理体系现状及问题[J].中国动物检疫,2019,36(10):43-45.
LIU H M, ZHANG Z T, ZHANG Z D, et al. Discussion on current status and problems of bio-safety disposal system for dead livestock and poultry in Shandong Province [J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(10): 43-45.
- [4] 张全芳,马德源,刘艳艳,等.利用多重PCR技术检测羊肉中掺杂狐狸肉的方法研究[J].山东农业科学,2014,46(12):4-6,10.
ZHANG Q F, MA D Y, LIU Y Y, et al. Study on method for identification of mutton mixed with fox meat by multiple PCR [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2014, 46(12): 4-6, 10.
- [5] 钱云开,王海洋,崔宗岩,等.实时荧光PCR法快速检测肉类中貉源性成分[J].中国食品卫生杂志,2016,28(5):602-605.
QIAN Y K, WANG H Y, CUI Z Y, et al. Development of a real-time PCR method for the raccoon dog meat[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(5): 602-605.
- [6] 曲勤凤.重要食品掺假检测技术研究鱼糜制品中主料含量的测定(荧光PCR法)[D].上海:复旦大学,2011.
QU Q F. Study on the Detection Technology of Important Food Adulteration Determination of Main Ingredients in Surimi Products (Real-time PCR) [D]. Shanghai: Fudan University, 2011.
- [7] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光PCR法:GB/T 38164-2019 [S].北京:中国标准出版社,2019.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Identification of animal ingredient from common livestock and poultry—Real-time PCR: GB/T 38164-2019 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.
- [8] KURIBARA H, SHINDO Y, MATSUOKA T, et al. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean [J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2019, 85(5): 1077-1089.
- [9] 覃芳芳,刘春生,王德莲,等.貂毛皮的PCR检测鉴别方法探索[J].皮革科学与工程,2014,24(6):68-72.
QIN F F, LIU C S, WANG D L, et al. Exploration of identification of mink fur by PCR [J]. Leather Science and Engineering, 2014, 24(6): 68-72.
- [10] 章晶晶,杜利强,李永艳,等.实时荧光PCR法快速鉴别狐狸貉子肉源性成分研究[J].现代食品科技,2017,33(8):269-275.
ZHANG J J, DU L Q, LI Y Y, et al. Rapid detection of *Alopex lagopus*-and *Nyctereutes procyonoides*-derived constituents of meat products using RT-PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 269-275.
- [11] 郑世超,郭颖慧,董海龙,等.3种动物源性成分阳性标准分子的构建与应用[J].食品研究与开发,2018,39(3):168-174.
ZHENG S C, GUO Y H, DONG H L, et al. Construction and application of the positive standard molecules for three animal derived components [J]. Food Research and Development, 2018, 39(3): 168-174.
- [12] 梁文,许丽,李兰英,等.转基因大豆质粒DNA标准物质的研制[J].实验室研究与探索,2016,35(5):18-21,45.
LIANG W, XU L, LI L Y, et al. Development of a plasmid DNA reference material for PCR analysis of genetically modified roundup ready soybean [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2016, 35(5): 18-21, 45.
- [13] 周彤,李家鹏,李金春,等.一种基于多重实时荧光聚合酶链式反应熔解曲线分析的肉及肉制品掺假鉴别方法[J].食品科学,2017,38(12):217-222.
ZHOU T, LI J P, LI J C, et al. A multiplex RT-PCR melting curve analysis method for adulteration identification in meat and meat products [J]. Food Science, 2017, 38(12): 217-222.
- [14] 刘欣.转基因大豆MON₈₉₇₈₈实时荧光PCR检测体系的建立[D].南京:南京农业大学,2014.
LIU X. Establishment of event-specific real-time PCR detection system for genetically modified soybean MON₈₉₇₈₈ [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [15] 范丽丽.实时荧光PCR检测食品肉类种源方法研究[D].苏州:苏州大学,2013.
FAN L L. Detection for meat species in food using real-time PCR assays [D]. Suzhou: Soochow University, 2013.
- [16] KESMEN Z, YETIMAN A E, ŞAHİN F, et al. Detection of chicken and Turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(2): C167-C173.
- [17] KARABASANA VAR N S, SINGH S P, KUMAR D, et al. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 530-534.
- [18] 刘晋,邓汉超,王学林,等.转基因水稻标准质粒分子的构建与分析[J].中国种业,2016(12):52-55.
LIU J, DENG H C, WANG X L, et al. Construction and analysis of Standard plasmid molecules in transgenic rice [J]. China Seed Industry, 2016(12): 52-55.