

食品和饲料中鹅源性成分微滴式数字 PCR 检测与定量分析

王强¹, 蔡一村¹, 张扬², 潘良文¹

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

(2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 本研究利用微滴式数字 PCR (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 技术对食品和饲料中鹅源性成分进行检测与精确定量。选取鹅的单拷贝核基因作为靶基因, 建立了鹅源性成分靶基因拷贝数与样品质量之间的线性关系; 选取 21 种常见动物物种及鹅的 9 个品系对所设计的引物及探针的种间特异性和种内保守性进行了验证, 并对该方法的检测下限 (limit of detection, LOD) 和定量检测下限 (limit of quantification, LOQ) 进行了验证, 利用已知鹅源性成分含量的样品和市售商品对该方法的准确性和适用性分别进行了验证。结果表明, 所设计的引物及探针具有良好的种间特异性和种内保守性, 该定量检测方法的检测下限和定量检测下限分别为 1 copy/ μL 和 5 copies/ μL , 且该方法具有良好的准确性和适用性, 可用于对食品和饲料中鹅源性成分进行检测和精确定量。

关键词: 肉类产品; 定量检测; 数字 PCR; 物种鉴定; 鹅肉

文章编号: 1673-9078(2018)10-258-263

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.035

Detection and Quantification of Goose-derived Materials in Food and Feedstuffs by Droplet Digital PCR

WANG Qiang¹, CAI Yi-cun¹, ZHANG Yang², PAN Liang-wen¹

(1. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Shanghai 200135, China)

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

Abstract: In this study, a highly precise, quantitative method based on the droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) technique was developed to identify and quantify the goose content in food and feedstuffs. The single-copy *Anser cygnoides* domesticus genomic scaffold gene was selected as the target gene, a formula for calculating raw meat weight based on target DNA copy number was established. Exclusive specificity was verified using samples from 21 different animal species, and inclusive specificity of goose was tested using nine different breeds. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the method were 1 and 5 copies/ μL , respectively. The accuracy and applicability of the method were verified using mixed powder samples with known proportions and commercial products. The results confirmed that the developed ddPCR method is highly precise for identifying and quantifying the goose content in food and feedstuffs, indicating the potential applicability in future routine analyses.

Key words: meat products; quantification; ddPCR; species identification; goose

肉类产品的种类鉴定和定量在食品安全监测当中具有重要作用, 在一些欧洲国家, 所有肉类产品均

收稿日期: 2018-07-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601700); 上海市科学技术委员会标准项目 (16DZ0501501); 上海市技术服务平台项目 (17DZ2293700); 上海检验检疫局科技计划项目 (HK008-2017)

作者简介: 王强 (1987-), 男, 博士后, 研究方向: 昆虫分类及动物源性成分检测

通讯作者: 潘良文 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量安全控制

需要明确标注动物源性成分和所占比例^[1], 即便如此, 肉类掺假事件仍然时有发生^[2-5], 极大的增加了消费者的不信任感, 损害消费者利益, 对食品安全带来挑战^[6-8]。不同的定性或相对定量检测技术尤其是实时荧光 PCR (real-time PCR) 检测技术已经广泛的应用于食品和饲料的动物源性成分检测中^[9-15]。与实时荧光 PCR 技术相比, 数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是近几年兴起的依据 DNA 拷贝数直接对成分进行精确定量的检测技术^[16-20], 可以不需要对照标准样本的标准曲线来实现精确定量分析^[21,22]。因此, 数字 PCR 相较

于实时荧光 PCR 具有更准确、更灵敏、抗干扰等多种优势^[23-26]。

由于现实生活中肉类产品的定义相对广泛,其组成成分也相对复杂,如皮肤、肌肉组织、脂肪和内脏等均可用作食品和饲料的原料,且在同一物种中不同的成分所包含的 DNA 含量也不尽相同^[7],给定量检测带来较大困难。相较于其他形式的肉类成分,肌肉组织更常用作食品及饲料的原材料,用于直接烹饪和加工^[27]。另外,线粒体基因作为靶基因在物种的定性检测中得到了广泛的应用,但由于线粒体基因在同一物种的不同组织中的含量差异巨大,不利于定量检测,而单拷贝核基因相较于线粒体基因具有拷贝数少且数量相对恒定等特点,具有准确且稳定的定量检测优势^[24,28,29],有利于对肉类产品的定量检测。因此本项目利用微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 技术对食品和饲料中鹅源性成分的精确定量方法进行研究,通过建立单拷贝核基因的拷贝数与样品质量之间的线性关系对鹅源性成分进行精确定量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验使用的中国家鹅 (*Anser cygnoides domesticus*) 和欧洲家鹅 (*Anser anser domesticus*) 均取自扬州大学动物科学与技术学院,牛、绵羊、山羊、猪、鸡、鸭、兔子、鸽子、鲑鱼、鹅肉丸、烧鹅、酱鸭、五香鸭脖、鸭血、鸡肉香肠、鸡肉狗粮和鸡肉罐头为市售商业化肉类产品;水牛、马、驴、鹿、骆驼、猫、狗、狐狸、火鸡、野鸡、鹌鹑和小鼠样品均为本

表1 引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequences

引物及探针名称	引物及探针序列 (5'-3')	碱基对大小/bp
Goose-121bp-F	ACGAGGATAGGTTGTGACAGC	
Goose-121bp-R	GAATCTCTGTGTCGTCTTCTCTATATG	121
Goose-121bp-P	FAM-ACTCTGTTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGC-TAMRA	

1.1.2 样品 DNA 提取

使用苯酚/氯仿抽提法^[31]对 10 份质量分别为 10~100 mg 的鹅肉粉,每份样品 3 次重复,以及其他肉粉样品(各 100 mg)进行 DNA 提取:加 800 μ L 裂解液和 10 μ L 蛋白酶 K,65 $^{\circ}$ C 恒温震荡孵育 60 min 加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇混匀后 12000 r/min 离心 10 min,取上清液再进行一次酚/氯仿纯化后加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) 混匀,置于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min 后,12000 r/min 离心 30 min,使用 75% 乙醇漂洗两次并置于室温干燥后加 100

实验室留存的样品。选取动物肌肉组织切碎,利用烤箱 80 $^{\circ}$ C 干燥 72 h,使用液氮粉碎仪粉碎成超细粉末。

苯酚/氯仿/异戊醇、引物和探针,上海 Sangon Biotech 公司;DNA 提取裂解液、蛋白酶 K 溶液,北京 Tiangen 公司;醋酸钠上海 Beyotime 公司;超纯水美国 Invitrogen 公司;无水乙醇上海国药集团化学试剂有限公司;扩增预混液 (ddPCRTM Supermix for Probes)、微滴生成专用油美国 Bio-Rad 公司。

1.2 仪器与设备

UFE500AO 烘箱,德国 Memeert 公司;BSA224s 电子天平,北京 Sartorius 公司;SPEX 6870 液氮研磨仪,美国 SamplePrep 公司;Vortex Genius 3 震荡仪,德国 IKA 公司;Thermomixer comfort 恒温震荡孵育器、4515 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;NanoVue 分光光度计,英国 Biochrom 公司;QX100 数字 PCR 微滴生成仪、T100 PCR 仪、QX200 数字 PCR 微滴分析仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物与探针设计

选取中国家鹅单拷贝核基因序列 (GenBank 序列号: NW_013185870.1)^[30] 在 NCBI 中进行同源性比对,使用 Primer Express[®] Software version 3.0 设计引物和探针,引物及探针序列见表 1。再通过提取中国家鹅和欧洲家鹅共 9 个品系及其他 21 种动物物种的基因组 DNA (表 2),利用实时荧光 PCR 检测技术对所设计的引物和探针的种间特异性和种内保守性进行验证。

μ L 超纯水复溶备用。

1.3.3 数字 PCR 检测

ddPCR 反应体系为:上、下游引物各 1.8 μ L (900 nmol/L),探针 0.5 μ L (250 nmol/L),ddPCRTM Supermix for Probes 10 μ L, DNA 模板 4 μ L,加水至 20 μ L。利用 Bio-Rad QX100 数字 PCR 微滴生成仪将 20 μ L 体系混合物生成微滴,再利用 Bio-Rad T100 PCR 仪进行扩增。ddPCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,40 个循环,98 $^{\circ}$ C 微滴固化 10 min 后,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应结束后

利用 Bio-Rad QX200 微滴分析仪读取 DNA 拷贝数。

1.3.4 样品 DNA 含量与靶基因拷贝数关系

将提取的鹅基因组 DNA 系列稀释至 50、40、30、20、10、5、1 ng/μL 共计 7 个浓度，并对上述 7 个浓度样品进行 ddPCR 检测，每个浓度 3 个重复。3 次平行实验后，以平均值建立样品核酸含量与靶基因拷贝数之间的关系式。

1.3.5 LOD 和 LOQ

将 ddPCR 定量后的 DNA 稀释至 100、50、10、5、1、0.1、0.01 copies/μL 共计 7 个浓度，并对上述 7 个浓度样品进行 ddPCR 检测，每个浓度 8 个重复。通过 3 次平行实验，明确该方法的 LOD 和 LOQ。

1.3.6 准确性与适用性

提取 10 份质量分数分别为 10%~100% 的鹅肉粉混合样本和鹅肉丸、烧鹅、酱鸭、五香鸭脖、鸭血、鸡肉香肠、鸡肉狗粮、鸡肉罐头共 8 种市售商品（各 100 mg）的基因组 DNA，稀释后进行 ddPCR 检测，利用建立的定量检测方程，对鹅源性成分含量进行检测，通过 3 次平行实验，验证该方法的准确性和适用性。

2 结果与讨论

2.1 特异性

所选取的目标基因片段在 NCBI 中进行同源性比对，没有发现与其它物种存在任何交叉情况出现。利用实时荧光 PCR 检测技术对所设计的引物和探针的特异性进行验证，结果显示只有中国家鹅和欧洲家鹅有特异性扩增，其他物种均无特异性扩增（表 2），表明所设计的引物和探针在理论和实践中均具有良好的种间特异性和种内保守性。

2.2 样品质量与 DNA 含量关系

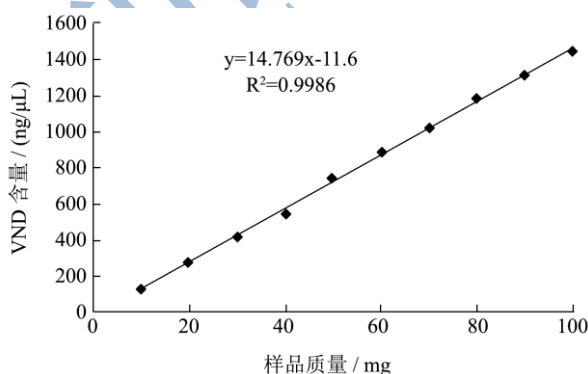


图1 鹅肉粉质量 (mg) 和核酸含量 (ng/μL) 间的线性关系

Fig.1 Linear relationship between goose quantity (mg) and nucleic acid content (ng/μL)

使用 NanoVue 分光光度计将 3 次提取的各 10 份不同质量的鹅肉粉样品的基因组 DNA 进行浓度测定，每个样品检测 3 次。

结果表明鹅肉粉质量 (mg) 和相应的核酸含量 (ng/μL) 间存在线性关系，相关系数 (R^2) 为 0.998 (图 1)。

表 2 引物及探针种间特异性检测结果

Table 2 Exclusive specificity test results of the primer and probe

序号	物种	结果
1	浙东白鹅	+
2	四川白鹅	+
3	皖西白鹅	+
4	马岗鹅	+
5	豁眼鹅	+
6	狮头鹅	+
7	卡洛斯鹅	+
8	罗曼鹅	+
9	霍尔多巴吉鹅	+
10	牛	-
11	水牛	-
12	绵羊	-
13	山羊	-
14	猪	-
15	马	-
16	驴	-
17	鹿	-
18	骆驼	-
19	兔子	-
20	猫	-
21	狗	-
22	狐狸	-
23	火鸡	-
24	鸡	-
25	野鸡	-
26	鸭	-
27	鹌鹑	-
28	鸽子	-
29	小鼠	-
30	鲑鱼	-

注：+，检测到特异性扩增；-，未检测到特异性扩增。

2.3 样品 DNA 含量与靶基因拷贝数关系

三次平行检测实验的统计结果显示，在浓度梯度范围内，鹅的核酸含量与靶基因拷贝数间存在线性关系，相关系数 (R^2) 为 0.998 (图 2)。

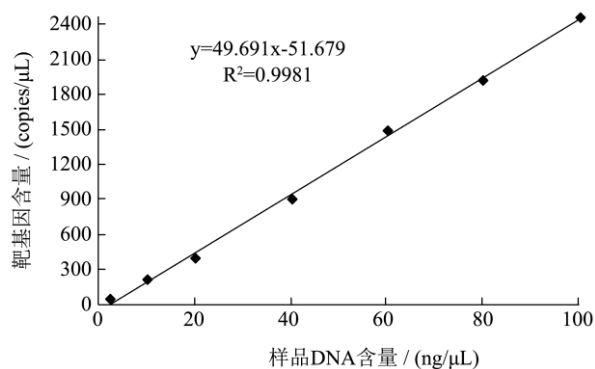


图2 DNA 含量 (ng/μL) 与靶基因拷贝数 (copies/μL) 间的线性关系

Fig.2 Linear relationship between target DNA content (ng/μL) and target DNA copy number (copies/μL)

2.4 建立定量检测方程

根据样品质量与 DNA 含量之间的线性关系以及

DNA 含量与靶基因拷贝数之间的线性关系两个关系式, 建立样品质量与靶基因拷贝数之间的关系式如下: $M_{goose}=0.00136 \times C+0.856$, 其中 C 代表靶基因拷贝数 (copies/μL), M 代表样品的质量 (mg)。在实际的检测过程中, 由于数字 PCR 的检测范围有限, 需要对所提取的样品基因组 DNA 进行稀释至图 2 所示的范围内, N 代表稀释倍数, 则样品质量与靶基因拷贝数之间的关系式转化为: $M_{goose}=N \times 0.00136 \times C+0.856$ 。

2.5 LOD 和 LOQ

标准规定, 当检出率 $\geq 95\%$ 时为最低检测下限, 当相对标准偏差 $RSD \leq 25\%$ 时为定量检测下限^[32]。三次平行检测实验的统计结果显示, 靶基因拷贝数在 1 copy/μL 时的检出率 $\geq 95\%$, 在 5 copy/μL 时的 $RSD \leq 25\%$, 因此, 该检测方法的 $LOD_{95\%}$ 和 LOQ 分别为 1 copy/μL 和 5 copies/μL (表 3)。

表 3 LOD 和 LOQ 检测结果

Table 3 Results of the LOD and LOQ tests

靶基因拷贝数/(copies/μL)	每次实验均值/(copies/μL)	三次实验均值/(copies/μL)	RSD/%	检出/总数	检出率/%
100	98.44	98.83	0.50	24/24	100
	99.38				
	98.67				
50	46.68	47.55	2.01	24/24	100
	48.57				
	47.39				
10	8.26	8.54	2.93	24/24	100
	8.74				
	8.62				
5	4.51	4.82	6.33	24/24	100
	4.83				
	5.12				
1	0.64	0.94	37.36	24/24	100
	0.86				
	1.33				
0.1	0.04	0.04	41.66	9/24	37.5
	0.02				
	0.05				
0.01	0.002	0.005	57.28	2/24	8.3
	0.008				
	0.006				

2.6 准确性和适用性

表4 鹅肉粉已知含量检测结果

Table 4 Quantification of samples with known concentrations

of goose material				
实际质量 分数/%	测定质量 分数/%	三次实验 均值/%	相对误 差/%	RSD/%
10	9.44	9.61	-3.90	1.72
	9.62			
	9.77			
20	21.31	20.42	2.10	4.14
	20.32			
	19.63			
30	28.68	28.61	-4.63	2.30
	27.92			
	29.23			
40	42.54	40.89	2.23	3.53
	39.89			
	40.23			
50	48.67	48.93	-2.14	0.74
	49.34			
	48.77			
60	62.12	60.17	0.28	2.92
	59.67			
	58.72			
70	69.95	69.24	-1.09	1.00
	68.57			
	69.21			
80	78.77	78.79	-1.51	0.56
	79.24			
	78.36			
90	88.33	88.72	-1.42	0.65
	89.38			
	88.45			
100	98.36	98.67	-1.33	0.33
	98.63			
	99.01			

对 10 份已知质量分数的鹅肉粉混合样品检测结果显示, 鹅肉粉混合样品定量检测结果与肉粉实际质量相对标准偏差均小于 5%, 相对误差均低于 ±5% (表 4), 符合定量检测要求, 表明该 ddPCR 检测方法具有较高准确性。另外, 对鹅肉丸、烧鹅、酱鸭、五香鸭脖、鸭血、鸡肉香肠、鸡肉狗粮和鸡肉罐头共 8 种市售商品的检测结果显示, 鹅肉丸和烧鹅中鹅源性成分含量分别为 43.44% 和 56.27%, 其余 6 种商品未检出鹅源性成分 (表 5), 即未发现鹅肉掺假其他肉类产品, 表明该方法具有良好的适用性。

表5 市售商品定量检测结果

Table 5 Quantification results of the commercial products

市售产品	鹅源性成分含量均值/%
鹅肉丸	43.44
烧鹅	56.27
酱鸭	0
五香鸭脖	0
鸭血	0
鸡肉香肠	0
鸡肉狗粮	0
鸡肉罐头	0

3 结论

本研究选择单拷贝核基因作为靶基因利用微滴式数字 PCR 技术对食品和饲料中鹅源性成分进行检测与精确定量, 通过构建鹅源性成分靶基因拷贝数与样品质量之间的线性关系对鹅源性成分进行精确定量检测, 实现了从靶基因拷贝数到样品实际质量间的一步转化, 无需利用相对质量分数来定义检测下线和定量检测下限, 简化了定量过程。并对该方法的特异性、检测下限 (LOD) 和定量检测下限 (LOQ) 分别进行了验证, 结果表明该方法具有良好的种间特异性和灵敏度, 检测下限和定量检测下限分别为 1 copy/μL 和 5 copies/μL; 利用已知成分含量样品和市售商品对该方法的准确性和适用性进行了验证, 结果显示鹅肉粉混合样品定量检测结果与肉粉实际质量相对标准偏差小于 5%, 相对误差低于 ±5%, 且实验中的市售商品除明确已知的鹅源性商品外其余商品未发现鹅肉掺假其他肉类产品, 说明该方法具有良好的准确性和适用性, 可用于对食品和饲料中鹅源性成分进行检测和精确定量。该定量检测方法的建立, 也可以应用于其他肉类食品和饲料的定量检测, 为我国食品和饲料安全的市场监管和相关执法提供技术保障。另外, 该方法还存在一定的不足之处, 本研究以动物的肌肉组织为取样材料, 未能对其他动物组织如皮肤、脂肪及内脏等进行全面的适用性验证, 今后也将对上述问题进行进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] EC152-2009, Europe: In official journal of the European communities. Method of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed [S].
- [2] O' MAHONY P J. Finding horse meat in beef products-a global problem [J]. QJM: An International Journal of

- Medicine, 2013, 106(6): 595-597
- [3] NAU J Y. Horse meat: first lessons of a scandal [J]. *Revue Medicale Suisse*, 2013, 9(376): 532-533
- [4] BOEHLER P. Poisoning may point to rat meat in Beijing lamb skewers [J] URL <<http://www.scmp.com/news/china/article/1288963/poisoning-points-rat-meat-beijing-lamb-skewers>> Accessed 06.15.14, 2013
- [5] 金萍,丁洪流,李培,等.2013年苏州地区肉及其制品掺假情况调查[J].*中国食品卫生杂志*,2014,26(2):168-172
JIN Ping, DING Hong-liu, LI Pei, et al. Analysis of meat products adulterated in Suzhou area in 2013 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(2): 168-172
- [6] CAI Y C, LI X, LV R, et al. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. *Bio Med Research International*, 2014, 2014(2014): 1-6
- [7] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173(173): 1054-1058
- [8] 苗丽,张秀平,陈静,等.微滴数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J].*食品科学*,2016,37(8):187-191
MIAO Li, ZHANG Xiu-ping, CHEN Jing, et al. Quantitative analysis of bovine and porcine ingredients in meat products by droplet digital PCR [J]. *Food Science*, 2016, 37(8): 187-191
- [9] laube i, zagon j, broll h. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR [J]. *Food Science and Technology*, 2007, 42(3): 336-341
- [10] Druml B, Mayer W, Cichna-Markl M, et al. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus*) in food to detect food adulteration [J]. *Food Chemistry*, 2015, 178(178): 319-326
- [11] Ballin N Z, Vogensen F K, Karlsson A H. Species determination-Can we detect and quantify meat adulteration [J]. *Meat Science*, 2009, 83(2): 165-74
- [12] Kumar A, Kumar R R, Sharma B D, et al. Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(10): 1340-1351
- [13] FANG X, ZHANG C. Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan(c) real-time PCR [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192(192): 485-490
- [14] 王玮,吕青骏,朱卢玺,等.食品中马源性成分的实时荧光 PCR 检测[J].*食品与生物技术学报*,2015,34(9):961-964
WANG Wei, LV Qing-qin, ZHU Lu-xi, et al. Detection for horse-derived components in foods by real-time polymerase chain reaction [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34(9): 961-964
- [15] 齐春萌,杨昕霆,薛晨玉,等.实时荧光 PCR 法检测食品中梅花鹿成分[J].*食品与生物技术学报*,2016,35(10):1088-1092
QI Chun-meng, YANG Xin-ting, XUE Chen-yu, et al. Detection for sika deer-origin ingredients in foods by fluorescent real-time PCR method [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(10): 1088-1092
- [16] Sanders R, Huggett J F, Bushell C A, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(17): 6474-6484
- [17] Hindson C M, Chevillet J R, Briggs H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005
- [18] 詹成,王群.数字 PCR 技术的发展和应[J].*复旦学报(医学版)*,2015,42(6):786-789
ZHAN Cheng, WANG Qun. The development and application of digital PCR [J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2015, 42(6): 786-789
- [19] Taylor S C, Carbonneau J, Shelton D N, et al. Optimization of droplet digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of oseltamivir-resistant subpopulations [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 224(224): 58-66
- [20] 刘津,刘二龙,谢力,等.数字聚合酶链式反应技术在食品安全检测领域的研究应用进展[J].*食品科学*,2016,37(17):275-280
LIU Jin, LIU Er-long, XIE Li, et al. Progress in research and application of digital polymerase chain reaction (dPCR) in food safety detection [J]. *Food Science*, 2016, 37(17): 275-280
- [21] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(22): 8604-8610
- [22] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindsonetal C M. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 1003-1011
- [23] Whale A S, Cowen S, Foy C A, et al. Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): 1-10
- [24] Morisset D, Štebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis

- of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): 1-9
- [25] Cai Y C, He Y P, Lv R, et al. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR [J]. PLoS ONE, 2017, 12(8): 1-12
- [26] Dingle T C, Sedlak R H, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR versus real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. Clinical Chemistry, 2013, 59(11): 1670-1672
- [27] WANG Q, CAI Y C, HE Y P, et al. Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products [J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(4): 767-774
- [28] Rodriguez M A, Garcia T, Gonzalez I, et al. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foiegras by species-specific polymerase chain reaction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(6): 1524-1529
- [29] 任君安,邓婷婷,黄文胜,等.微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J].食品科学, 2017,38(2):311-316
- REN Jun-an, DENG Ting-ting, HUANG Wen-sheng, et al. A precise quantitative assay for measuring pork incorporated into mutton products by droplet digital PCR [J]. Food Science, 2017, 38(2): 311-316
- [30] LU L, CHEN Y, WANG Z, et al. The goose genome sequence leads to insights into the evolution of waterfowl and susceptibility to fatty liver [J]. Genome Biology, 2015, 16(89): 1-11
- [31] ISO 21571, Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-nucleic acid extraction.A.1: Preparation of PCR-quality DNA using phenol/chloroform-based DNA extraction methods [S]
- [32] CAC/GL740-2010, Codex committee on methods of analysis and sampling. guidelines on performance criteria and validation of methods for detection identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods [S]