

基于同源加尾系统的双重实时 PCR 方法鉴定混合肉样中猪成分比例

邵建宏, 廖秀云, 罗宝正, 赵福振, 沙才华, 陈轩, 薄清如

(中华人民共和国拱北海关, 广东珠海 519001)

摘要: 为了对掺入猪肉成分的比例进行鉴定, 本研究拟建立基于同源加尾系统 (Homo-tag Assisted Non-dimer system, HANDS) 的双重实时 PCR 检测方法, 借助简易数学模型将实时 PCR 的 Ct 值 (循环阈值) 换算成猪肉成分的百分比。根据常见家畜、家禽染色体中的管家基因 *Myostatin* 序列设计家禽家畜通用引物和探针序列, 针对猪染色体 *beta actin* 基因设计猪源性成分特异型引物和探针序列, 并在所有引物 5' 端加上同源引物。通过评估以上两套引物和探针的通用性, 特异性, 优化引物和探针浓度、退火温度, 构建同源加尾双重实时 PCR 检测方法对不同猪源性成分比例的肉样进行检测并换算 Ct 值得出混合肉样中猪源性成分的比例。所构建的同源加尾双重实时 PCR 方法两重之间扩增效率相近, 通用性引物、探针可以扩增所有家畜家禽成分, 特异性引物探针只扩增猪源性成分。通过检测制备的混合肉样显示, 该方法换算结果与肉样实际比例接近。

关键词: 混合肉样; 猪肉; 比例; 同源加尾系统; 双重实时 PCR

文章编号: 1673-9078(2019)02-264-269

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.037

Study on the Identification of Pork Fraction Proportion in Mixed Meats with Dual Real-time PCR Based on Homo-tag Assisted Non-dimer System

SHAO Jian-hong, LIAO Xiu-yun, LUO Bao-zheng, ZHAO Fu-zhen, SHA Cai-hua, CHEN Xuan, BO Qing-ru

(Gongbei Customs District P. R. China, Zhuhai 519001, China)

Abstract: The beef & mutton and their products in the market always mixed with pork, which is relatively cheaper. In order to identify the proportion of pork, a dual real-time PCR assay was established on the basis of Homo-tag Assisted Non-dimer system (HANDS). The assay applied a simple mathematical model to calculate the percentage of pork fraction according to the Ct (cycle thresholds) values shown on the real-time PCR assay. Universal primers and probe sequences were designed according to the House-keeping gene that consist in all livestock-poultry chromosome named *Myostatin*, while specific primers and probe sequences were designed according to the *beta actin* gene sequences in swine chromosome. The homologous tag primer sequences were added to the 5'-end of all primer sequences. To establish the real-time PCR assay, the universality and specificity of the primers & probes were assessed, and the concentration of primers & probe and annealing temperature of reaction were optimized. After testing of 5 mixed meats which were prepared in advance, the calculation of pork proportion was based on the Ct values which were obtained from the assay. Comparing the proportion differences between the calculation and actual preparation, the feasibility of identification pork proportion in mixed meats was evaluated. The efficiency of amplification of two reactions in dual Real-Time PCR detection is approximate. The calculation results are in agreement with the actual proportion according to the detection results of the mixed meats which have been prepared in advance. The newly established assay is stable, sensitive and accurate, so it is suitable for the supervision of food in market.

Key words: mixed meats; pork; proportion; homo-tag assisted non-dimer system; dual real-time PCR

民以食为天, 在中华传统文化中, “食”有着举

收稿日期: 2018-09-18

基金项目: 原国家质量监督检验检疫总局科技项目 (2016IK299)

作者简介: 邵建宏 (1983-), 男, 兽医师, 学士, 研究方向: 动物疫病及动物源性成分检测

通讯作者: 罗宝正 (1975-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 动物疫病及动物源性成分检测

足轻重的地位, 然而近 20 年来, 中国内地的苏丹红鸭蛋、三聚氰胺奶粉地沟油、瘦肉精等有毒有害食品层出不穷^[1], 严重危及国民健康, 受到全球的广泛关注; 使用相似性状原料进行掺假的肉制品也屡见不鲜^[2], 该类制品短期风险小但潜在风险高, 相对于有毒有害食品更容易被忽视。

由于猪肉与牛羊肉性状相近、售价低廉, 常成为

掺假原料的首选^[3]。肉制品虚标牛羊肉成分比例或加工过程使用含有猪源性成分的调料、添加剂等情况十分常见,为区分具体情况,在执法时需要使用科学的方法进行评估和分析,以获得客观、准确的鉴定结果。

目前,国内外鉴定动物源性成分主要包括显微镜法、近红外反射光谱学、免疫学方法、色谱分析法、ELISA法、分子生物学法等^[4]。其中,PCR法的凝胶电泳条带亮度分析是一种传统意义上的半定量分析,操作繁琐、易造成气溶胶污染^[5];数字PCR法是近年来兴起的绝对定量检测方法,但样品通量很低,技术成本很高,难以充分推广应用^[6];荧光PCR法与数字PCR法原理相同,特异性、灵敏度和稳定性相当,但检测成本低。

现有研究对猪源性成分的分子生物学检测多以线粒体DNA为目标^[7,8],但不同动物的相同组织和相同动物的不同组织中线粒体数量差异较大,用作定量检测可能影响结果的准确性,相比之下,动物细胞核基因组中的管家基因拷贝数稳定、变异少,不易发生核外重组,不易受异源基因的影响。为此,本研究拟以管家基因为目标,建立一种使用双重荧光PCR法鉴定混合肉样中猪源性成分所占比例的方法,弥补目前国内外相关研究的空缺。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 畜禽样品

市场采购的鲜肉样品2份(分别为猪肉和牛肉),使用标准方法(ZH2006-1, CNAS认可标准)扩增并测序,确其来源分别是家猪(*Sus scrofa domestica*)和牛(*Bos taurus*);本实验室留存的家畜、家禽鲜肉样品13份,使用上述标准方法扩增并测序,确认为鸡(*Pullus*)、鹌鹑(*Coturnix coturnix*)、鸭(*Anatinae*)、鹅(*Anser cygnoides orientalis*)、牛(*Bubalus bubalus*)、羊(*Capra aegagrus hircus*)、马(*Equus caballus*)、驴(*Equus asinus*)、狗(*Canis lupus familiaris Linnaeus*)、兔(*Leporidae*)、狐狸(*Otocyon megalotis*)、鸽(*Columba*)、猫(*Catus*)。

1.1.2 非畜禽样品

本实验室留存的非家畜、家禽的鲜肉样品11份,使用上述1.1的标准方法扩增并测序,确认为非洲鲫鱼(*Oreochromis mossambicus*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)、龙头鱼(*Harpodon nehereus*)、鲢鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、带鱼(*Trichiurus*)、鲈鱼(*lepturus*)、鲟鱼(*Lateolabrax japonicus*)、秋刀鱼(*Cololabis saira Brevoort*)、沙丁鱼(*Sardina melamosticta*)、白鲟鱼(*Colossoma barchipomum*)。

1.1.3 主要试剂

DNA提取试剂盒E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit,美国OMEGA公司产品;荧光PCR反应试剂盒Premix Ex TaqTM(Probe qPCR),日本TaKaRa公司产品。

1.1.4 主要仪器设备

XS105DU电子天平,瑞士Mettler Toledo公司;FD115-230V烘箱,德国Binder公司;Tube Mill Control研磨机,德国IKA公司;NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer紫外分光光度计,美国NanoDrop Technologies公司;Sigma 3-18 K高速冷冻台式离心机,德国Sartorius公司;7500 Fast Real Time PCR System,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 单一样品的制备

取上述1.1.1和1.1.2的鲜肉样品,分别使用研磨机进行搅拌,拌匀后取1000 mg置于1.5 mL离心管,于-20℃保存备用。

1.2.2 混合样品的制备

将上述1.1.1的鲜猪肉和鲜牛肉去脂肪后切片,于烘箱60℃放置72 h,分别研磨成猪肉粉、牛肉粉,按重量分别将牛肉粉和猪肉粉以1:999、1:99、1:9、1:1的比例混匀,分别制成总重量1000 mg的混合样品,置于1.5 mL离心管,于-20℃保存备用。

1.2.3 样品DNA的提取

取单一样品或混合样品50 mg置于1.5 mL离心管,使用上述1.1.3的DNA提取试剂盒提取样品的DNA,并确保所提取的DNA模板260/280比值介于1.8至2.0,于-80℃保存备用。

1.2.4 引物和探针的设计

为确保引物、探针的通用性和特异性,选取家畜、家禽基因组中普遍存在的管家基因(House-keeping gene) *Myostatin Precursor* MSTN mRNA基因序列和家猪(*Sus scrofa*)基因组 *Sus scrofa beta actin* (ACTB)基因序列,使用序列比对软件DNAMAN 8.0筛选出适合扩增的区域;使用分子生物学软件Oligo 7.0分别设计用于检测家畜、家禽源性成分的引物探针组合My75F、My75R、My75P和猪源性成分的引物探针组合Sus91F、Sus91R、Sus91P;为保证两套引物探针的扩增效率尽量统一,使用一条同源加尾(Homo-Tag Assisted Non-Dimer, HAND)引物TagP20加在每一条引物的5'端。

表1 双重实时 PCR 引物、探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes of dual real-time PCR

No.	Primer/Probe	Sequences(5'-3')
1	My75TF	ggggtcccaaaagggtcagtACAAGGTATACTGGAATCCGATCT
2	My75TR	ggggtcccaaaagggtcagtCACATCAATGCTCTGCCAAA
3	My75P	Cy5-TGAAACTTGACATGAACCCAGGCACT-BHQ3
4	Sus91TF	ggggtcccaaaagggtcagtACCTACTGTGCACCTACGGGATA
5	Sus91TR	ggggtcccaaaagggtcagtTATAGGTACTAACACTGGCTCGTGTGA
6	Sus91P	FAM-ACACTCCGAGGCCCTTTACGGC-BHQ1
7	TagP20	ggggtcccaaaagggtcagt

1.2.5 双重实时 PCR 检测方法的建立

引物、探针浓度和退火温度是双重实时 PCR 反应的重要因素, 本研究对引物、探针的最佳浓度进行优化, 将所设计的家畜家禽通用引物探针、猪特异性引物探针和同源引物分别设置多种浓度模型进行组合试验, 并在试验中及时进行调整。确定引物探针浓度之后, 对退火温度进行梯度优化, 确定最佳反应温度。

根据优化和调整的结果, 获得双重荧光 PCR 最佳反应参数为:

反应体系: 2×Taq PCR Master mix 12.5 μL, 浓度为 2、2、10 μmol/L 的通用引物和探针 My75TF、My75TR、My75P 各 1 μL, 浓度为 2、2、6 μmol/L 的特异性引物和探针 Sus91TF、Sus91TR、Sus91P 各 1 μL, 浓度为 20 μmol/L 的同源引物 TagP20 1 μL, DNA 模版 3 μL, DEPC 水 2.5 μL。

反应参数: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 45 s (该阶段收集荧光信号), 40 个循环。

1.2.6 My75 引物、探针通用性试验

分别以上述 1.2.3 提取的畜禽样品和非畜禽样品 DNA 为模板, 按下述反应体系和上述 1.2.5 的反应参数进行荧光 PCR 扩增, 验证 My75 引物、探针对畜禽样品和非畜禽样品的扩增情况。

反应体系: 2×Taq PCR Master mix 12.5 μL, 浓度分别为 2、2、10 μmol/L 的通用型引物和探针 My75TF、My75TR、My75P 各 1 μL, 浓度为 20 μmol/L 的同源引物 TagP20 1 μL, DNA 模版 3 μL, DEPC 水 5.5 μL。

1.2.7 Sus91 引物、探针特异性试验

分别以上述 1.2.3 提取的畜禽样品和非畜禽样品 DNA 为模板, 按下述反应体系和上述 1.2.5 的反应参数进行荧光 PCR 扩增, 验证 Sus91 引物、探针对猪肉样品和非猪肉样品的扩增情况。

反应体系: 2×Taq PCR Master mix 12.5 μL, 浓度分别为 2、2、6 μmol/L 的特异性引物和探针 Sus91TF、Sus91TR、Sus91P 各 1 μL, 浓度为 20 μmol/L 的同源引物 TagP20 1 μL, DNA 模版 3 μL, DEPC 水 5.5 μL。

1.2.8 双重实时 PCR 的扩增效率验证

以 1.2.3 提取的猪 DNA 为模板, 按 1.2.5 的反应体系和参数进行双重荧光 PCR 扩增, 验证双重实时 PCR 对同一样品畜禽源性、猪源性成分的扩增效率。

1.2.9 混合肉样中猪源性成分检测比例验证

以上述 1.2.3 提取的混合样品 DNA 为模板, 按上述 1.2.5 的反应体系和反应参数进行双重实时 PCR 扩增, 验证该方法对不同比例混合肉样中猪源性成分和畜禽源性成分的扩增情况。

1.2.10 双重实时 PCR 检测结果与猪源性成分所占比例的换算

$$M = 2^{Ct(a) - Ct(b)} \times 100\%$$

其中: M 为猪源性成分比例, Ct(a)、Ct(b) 分别为双重荧光 PCR 中检测家畜家禽源性成分和猪源性成分的 Ct 值。

2 结果与讨论

2.1 My75 引物、探针的通用性

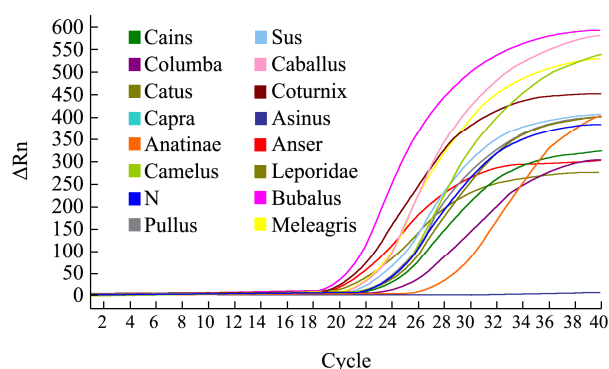


图1 My75 引物、探针对畜禽样品的检测结果

Fig.1 Detection results of My75 primers and probes on samples of livestock and poultry

注: 扩增曲线: 15 份畜禽样品; 未扩增曲线: 阴性对照。

根据所建立的双重实时 PCR 检测方法, 使用 My75 引物、探针和 TagP20 引物, 在浓度、循环参数不变的情况下, 分别对畜禽样品和非畜禽样品进行扩增, 结果畜禽样品均出现扩增曲线, 非畜禽样品均未

出现扩增曲线, 与预期一致 (图 1 和图 2)。

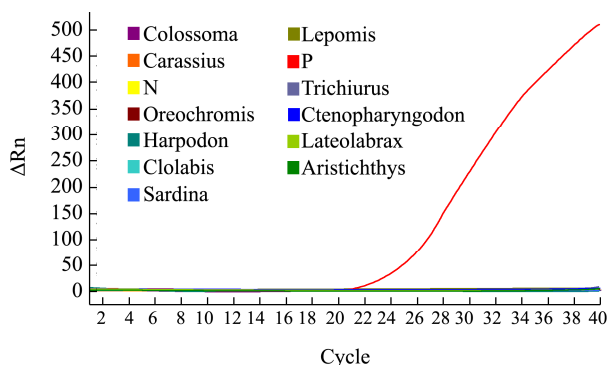


图 2 My75 引物、探针对非畜禽样品的检测结果

Fig.2 Detection results of My75 primers and probes on samples of other animals which not belong to livestock and poultry

注: 扩增曲线: 阳性对照 (猪); 未扩增曲线: 非畜禽样品, 阴性对照。

2.2 Sus91 引物、探针的特异性

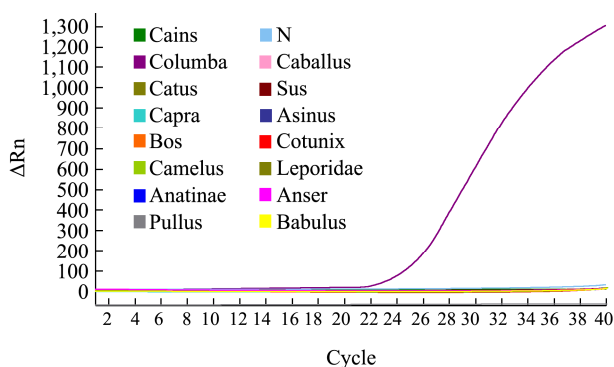


图 3 Sus91 引物、探针对畜禽样品的检测结果

Fig.3 Detection results of Sus91 primers and probes on samples of livestock and poultry

注: 扩增曲线: 猪; 未扩增曲线: 14 份其他畜禽样品, 阴性对照。

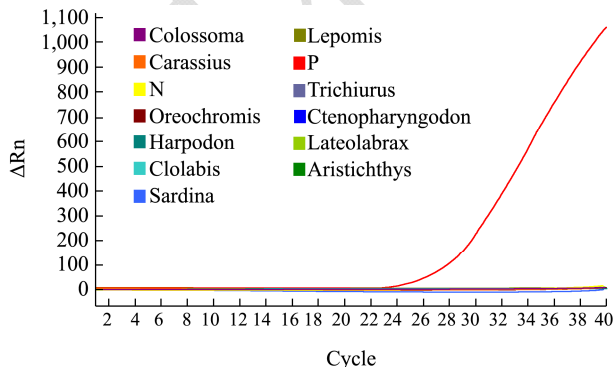


图 4 Sus91 引物、探针对非畜禽样品的检测结果

Fig.4 Detection results of Sus91 primers and probes on samples of other animals which not belong to livestock and poultry

注: 扩增曲线: 阳性对照 (猪); 未扩增曲线: 11 份非畜禽样品, 阴性对照。

根据所建立的双重荧光 PCR 检测方法, 使用 Sus91 引物、探针和 TagP20 引物, 在浓度和循环参数不变的情况下, 对猪肉样品和非猪肉样品进行扩增, 猪肉样品出现扩增曲线, 其它所有样品均未出现扩增曲线, 结果与预期一致 (图 3 和图 4)。

2.3 双重实时 PCR 的扩增效率

以上述 1.2.3 提取的猪 DNA 为模板, 按上述 1.2.5 的反应体系和循环参数进行双重荧光 PCR 扩增, 验证双重荧光 PCR 对同一样品中畜禽源性成分和猪源性成分的扩增效率, 两份猪肉样品的家禽家畜源性成分扩增曲线和猪源性成分扩增曲线基本重叠, 结果与预期一致 (图 5)。

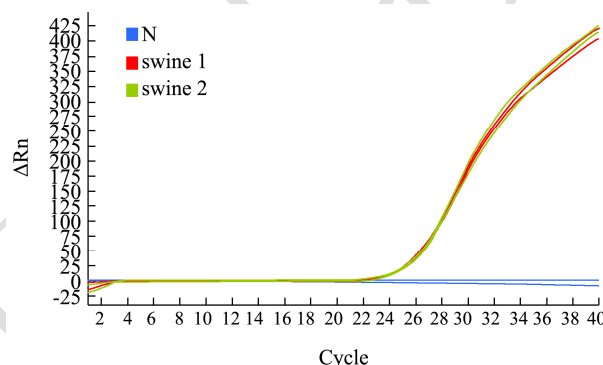


图 5 双重实时 PCR 扩增效率验证

Fig.5 Verification of the efficiency of amplification of the dual real-time PCR

注: 扩增曲线: 猪; 未扩增曲线: 阴性对照。

2.4 不同混合比例肉样的双重荧光 PCR 扩增

结果

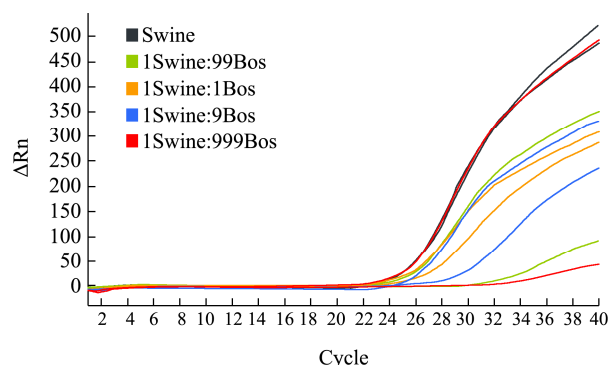


图 6 不同混合比例肉样的双重荧光 PCR 扩增结果

Fig.6 Results of the amplification of the double-multiplex real-time PCR of different mix proportion of meat samples

注: 黑线: 100%猪肉; 绿线: 1%猪肉 & 99%牛肉; 黄线: 50%猪肉 & 50%牛肉; 蓝线: 10%猪肉 & 90%牛肉; 红线: 0.1%猪肉 & 99.9%牛肉。

以上述 1.2.3 提取的混合样品 DNA 为模板,按上述 1.2.5 的反应体系和循环参数进行双重荧光 PCR 扩增,可见不同比例混合肉样的畜禽源性成分和猪源性成分的扩增曲线具有显著差异(图 6)。

表 2 扩增曲线与所占比例的换算结果

Table 2 Results of the conversion of the proportion according to the amplification curves

混合肉样成分比例 (猪肉:牛肉)	猪源性成分循环阈 值 Cb	家禽家畜源性成分 循环阈值 Ca	猪源性成分占比 $M=2^{Ct(a)-Ct(b)} \times 100\%$	相对误差
1:999	33.6047	23.7598	0.11%	8.75%
1:99	31.3987	24.7680	1.01%	0.92%
1:9	27.3687	24.1132	10.47%	4.71%
1:1	24.9507	24.0183	52.40%	4.80%
1:0	22.9164	22.9707	103.84%	3.84%

3 结论

3.1 本研究旨在鉴定猪肉成分在混合肉样中所占的比例,查阅同类研究资料得知,赵冉^[9]、曾少灵等^[10]均开展过使用双重或多重荧光 PCR 检测家畜、家禽源性成分的研究,但只停留在定性检测的层面,未能定量,缺乏明确的指导意义;姜洁等^[11]、宋丽萍等^[12]也开展过使用荧光 PCR 技术定量检测肉样中猪源性成分和鸡源性成分的研究,但所研究的均为已知肉样,如“羊肉中的猪肉含量”,适用面窄,且无法通过一次反应得出结果、需要绘制标准曲线,试验操作复杂;徐琼等^[13]通过荧光 PCR 法定量检测生肉中的猪源性成分,选取肌蛋白基因为猪特异性基因、线粒体 12SrRNA 为内参基因,使用 ΔCt 法进行相对定量,该方法针对性强,理论上能够检测出所有真核生物源性成分中混有猪源性成分的比例,但由于两组引物未处于同一反应体系中,难以对扩增效率进行优化,也影响最低检出限值(报告所述有效检出值为 1%~100%)。Iwobi 等^[14]建立的三重荧光 PCR 检测牛、羊肉成分的方法中,针对哺乳动物和家猪成分比例准确性较为理想,但研究报告也显示该方法无法检出较极端的混比情况(如牛肉:猪肉=995:5),推测其原因其三重 PCR 反应体系过于复杂,易受非特异性结合等其他因素的影响。另外,更为重要的是对于浓度差异超过 100 倍的两个样品在一个反应体系中检测,由于高浓度样品提前消耗了大部分的酶和 dNTP,所以低浓度样品信号微弱甚至检测不到。

3.2 本研究采用同源加尾系统建立的双重荧光 PCR 定量鉴定畜禽混合肉样中猪成分的方法具有快速、稳定、特异、灵敏和低成本的特点。由于我们引进了同源加尾系统,保证了两种浓度差异很大的样品仍然能够真实反应其浓度的真实差异,当模拟混合样品中猪

2.5 扩增结果与所占比例的换算

按上述 1.2.10 建立的数学模型对上述 2.4 的扩增结果进行量化计算,结果如下(表 2)。

源性成分仅占 1%时,鉴定结果的相对误差仍能控制在 10%以内,其精确度足以作为食品流通领域的监管和企业的品控检测提供技术参考。同时,由于客观条件的制约,本研究中家禽家畜样品的种类仍较为欠缺,对除牛肉外的其他肉类混合猪肉或更为复杂的多物种混合猪肉的鉴定情况也未作分析,上述问题均有待后续的进一步收集和研究。

参考文献

- [1] 金羽.中国食品安全问题分析[J].中国-东盟博览,2013,8:2
JIN Yu. Analysis of food safety situation in China [J]. China-asean Panorama, 2013
- [2] 张小莉,魏玲,李宝明,等.肉制品掺假鉴别技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014(10):3190-3196
ZHANG Xiao-li, WEI Ling, LI Bao-ming, et al. Research progress of identification techniques for meat products adulteration [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 10: 3190-3196
- [3] 唐穗平,张燕,黄景辉.广东省牛羊肉及其制品中掺杂掺假情况的调查分析[J].食品安全质量检测学报,2016,7(5): 1882-1886
TANG Sui-ping, ZHANG Yan, HUANG Jing-hui. Analysis of beef and lamp products adulteration in Guangdong Province [J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2016, 7(5): 1882-1886
- [4] 范冰冰.肉制品中动物源性成分检测方法研究进展[J].新疆畜牧业,2018,3:10-12
FAN Bing-jie, Research progress on detection methods of animal derived components in meat products [J]. Xinjiang Animal Husbandry, 2018, 3: 10-12
- [5] 李宗梦,赵良娟,赵宏,等.肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J].食品研究与开发,2014,18:122-127

- LI Zong-meng, ZHAO Liang-juan, ZHAO Hong, et al. Research progress in identification techniques of animal ingredient in meat and meat products [J]. Food Research and Development, 2014, 18: 122-127
- [6] 林彩琴,姚波.数字 PCR 技术进展[J].化学进展,2012,24(12): 2415-2423
- LIN Cai-qin, YAO Bo. Recent advance in digital PCR [J]. Progress in Chemistry, 2012, 24(12): 2415-2423
- [7] 陈正芳,曾萍,杨具田,等.动物源性食品中猪源性成分检测 [J].中国农学通报,2015,31(36):259-264
- CHEN Zheng-fang, ZENG Ping, YANG Ju-tian, et al. Detection of swine derived ingredients in animal derived foods [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(36): 259-264
- [8] 徐琼,张奕南,顾文佳,等. TaqMan 实时荧光 PCR 法定量检测生肉中猪源性成分的建立[J].食品科技,2016,2:309-313
- XU Qiong, ZHANG Yi-nan, GU Wen-jia, et al. Establishment of quantitative TaqMan real-time PCR targeting the swine-derived in raw meat [J]. Food Science and Technology, 2016, 2: 309-313
- [9] 赵冉.动物产品中猪源性和牛源性成分双重荧光 PCR 检测方法建立[J].畜牧与饲料科学,2012,33(10):1-4
- ZHAO Ran. Identification of swine-derived and bovine-derived materials in animal products by multiplex fluorescent PCR assay [J]. Animal Husbandry & Feed Science, 2012, 33(10): 1-4
- [10] 曾少灵,秦智锋,阮周曦,等.多重实时荧光 PCR 检测牛,山羊和绵羊源性成分[J].生物工程学报,2009,25(1):139-146
- ZENG Shao-ling, QIN Zhi-feng, RUAN Zhou-xi, et al. Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(1): 139-146
- [11] 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, 2015,9:3701-3707
- JIANG Jie, SONG Li-ping, GUO Miao, et al. Detection and quantification of pork and chicken in sheep products using real-time PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 9: 3701-3707
- [12] 宋丽萍,薛晨玉,路勇,等.应用实时荧光 PCR 技术定量检测羊肉中的猪肉成分[J].食品科技,2014,10:319-322
- SONG Li-ping, XUE Chen-yu, LU Yong, et al. Detection and quantification pork in sheep products using real-time PCR [J]. Food Science & Technology, 2014, 10: 319-322
- [13] 徐琼,张奕南,顾文佳,等.TaqMan 实时荧光 PCR 法定量检测生肉中猪源性成分的建立[J].食品科技,2016,2:309-313
- XU Qiong, ZHANG Yi-nan, GU Wen-jia, et al. Establishment of quantitative TaqMan real-time PCR targeting the swine-derived in raw meat [J]. Food Science & Technology, 2016, 2: 309-313
- [14] Iwobi A, Sebah D, Kraemer I, et al. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat [J]. Food Chemistry, 2015, 169: 305-313