

4种鳕鱼多重PCR检测方法建立

孙晓飞¹, 万超¹, 宋大贺², 贾贇¹

(1. 大连海关技术中心, 辽宁大连 116001) (2. 大连海关综合技术服务中心, 辽宁大连 116001)

摘要: 为了建立可对鳕鱼DNA进行特异性检测的PCR方法, 从GenBank数据库下载太平洋鳕、大西洋鳕、狭鳕、绿青鳕4种鳕鱼的突触素样蛋白(pantophysin Pan I)基因序列, 并用Bioedit 7.0软件对上述不同鳕鱼的该基因碱基序列进行比较。根据引物设计的基本原则, 选择了鳕鱼与其他鱼类碱基序列上差异位点较多片段, 设计出太平洋鳕、大西洋鳕、狭鳕、绿青鳕PCR特异性引物。用该引物分别对从7种鳕鱼和14种非鳕鱼鱼类的肌肉、脏器组织中提取的DNA进行PCR扩增。实验将所设计的引物通过两种引物组合、三种引物组合以及四种引物组合, 进行多重PCR试验, 结果表明, 大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕四种鳕鱼分别出现597、392、266、527 bp大小的清晰条带, 4种引物之间相互不干扰, 具有显著特异性。该方法具有较高灵敏度, 低至4 ng/μL混合样品仍可检出。

关键词: 鳕鱼; 多重PCR; 突触素样蛋白

文章编号: 1673-9078(2021)08-302-307

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1114

Establishment of Multiplex PCR Detection Methods for Four Cod Species

SUN Xiao-fei¹, WAN Chao¹, SONG Da-he², JIA Yun¹

(1. Dalian Customs Technology Centre, Dalian 116001, China)

(2. Dalian Customs Comprehensive Technical Service Center, Dalian 116001, China)

Abstract: To establish a PCR method for specific cod DNA detection, DNA sequences of pantophysin (Pan I) of four cod species, including those of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), Atlantic pollock (*Pollachius pollachius*), and Saithe (*Pollachius virens*), were obtained first from GenBank. The base sequence of the DNA of these four cod species was compared using Bioedit 7.0. According to the basic principles of primer design, cod fragments showing more significant base sequence differences from those of other fish species were selected for specific PCR primer design for the above-mentioned four cod species. These primers were used in the PCR amplification of DNA extracted from muscles and organ tissues of seven cod and fourteen other fish species. Combinations of two, three, and four primers were adopted for multiplex PCR experiments. The results showed clear 597, 392, 266, and 527 bp bands for Pacific cod, Atlantic cod, Atlantic pollock, and Saithe, respectively. In addition, no interference between the four primers was noticed, they are thus highly specific. The described method is highly sensitive and provides accurate results even for mixed samples with a concentration as low as 4 ng/μL.

Key words: cod; multiple PCR; pantophysin Pan I

引文格式:

孙晓飞, 万超, 宋大贺, 等. 4种鳕鱼多重PCR检测方法建立[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 302-307, +349

SUN Xiao-fei, WAN Chao, SONG Da-he, et al. Establishment of multiplex PCR detection methods for four cod species [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 302-307, +349

鳕鱼属脊椎动物门(Vertebrata)、脊椎动物亚门(Vertebrata)、真骨鱼纲(Teleostei)、鳕形目(Gadiformes)。鳕鱼多是生活在海洋底层和深海中下层的冷水性鱼类, 广泛分布于世界的各大洋, 是价值极高的世界级重要经济鱼类, 其肉质鲜美, 营养丰富;

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2019-ZD-0872; 2019-ZD-0870)

作者简介: 孙晓飞(1983-), 女, 高级兽医师, 研究方向: 动物源性成分鉴定

通讯作者: 万超(1980-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 物种鉴定

胰腺含有大量的胰岛素, 可以从1 kg 胰腺中提取12000 IU 胰岛素; 鳕鱼的肝脏可用于提取鱼肝油(含油量20%~40%)^[1,2]。因鳕鱼具有极高的经济价值, 国内外市场不断出现以假乱真、以次充好事件, 原质检总局曾通报不法企业以鳕鱼内脏冒充鳕鱼内脏出口。针对这类掺假造假的判断, 传统的形态特征鉴别方法已经不能满足, 必须基于更精准的物种鉴定技术^[3,4]。由此可见, 为了更加有效地确保出口鳕鱼产品质量, 防止欺诈, 建立一种可以对鳕鱼DNA进行特异性检测的准确性高、实用性强的方法, 从分子水平上

对鳕鱼样品进行特异性检测鉴定, 都是十分亟需和必要的。目前的鳕鱼 PCR 检测文章是针对鳕属与其他鱼类目、属的区别, 并未区分鳕形目内不同属、科的鱼类, 在鳕科中不同的鳕鱼也存在着差异。本文中太平洋鳕鱼以及大西洋鳕鱼无论从经济价值还是营养价值都要高于黑线鳕鱼和蓝鳕鱼, 按照常规鳕鱼的检测方法是无法进行区分的, 为了避免了一些不法分子混淆概念, 用价格低廉的鳕鱼替代价格昂贵的真鳕, 特选取 4 种经济鳕鱼, 太平洋鳕、大西洋鳕、狭鳕、绿青鳕进行检测, 为保障食品安全提供技术保障。

多重 PCR 技术是在常规 PCR 基础上改进并发展起来的一种新型 PCR 扩增技术, 是在同一反应体系中加入多对引物同时扩增多条目的 DNA 片段的方法, 采用这一技术可同时检测多个物种^[5-8]。突触素样蛋白 pantophysin (Pan I) 是公认相对保守的 DNA 序列, 动物分类学和生态学中得到了广泛应用^[9-12]。由于多重 PCR 同时扩增多个目的基因, 具有节省时间、降低成本、提高效率的优点, 特别是节省珍贵的实验样品, 所以一经提出, 即得到众多研究者的青睐, 并且发展迅速, 在生命科学的各个领域得以应用。本文选取 4 种经济鳕鱼, 太平洋鳕、大西洋鳕、狭鳕、绿青鳕, 通过设计的特异性引物, 可对鳕鱼种内、种间进行分析, 为鳕鱼的物种鉴定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 试剂及耗材

海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP324): 天根生物公司; Premix Ex Taq: TaKaRa 公司; 琼脂糖: 北京沃比森科技有限公司; 引物: 上海生工生物公司; 广泛收集鱼类样品: 太平洋鳕鱼、大西洋鳕鱼、狭鳕鱼、绿青鳕鱼、黑线鳕鱼、南蓝鳕鱼、蓝鳕鱼、红鱼、六线鱼、黄花鱼、鲈鱼、蓝鳍红娘鱼、大西洋蓝金枪、牙鲆、多宝鱼、龙利鱼、大马哈鱼、大西洋鲑鱼、太平洋鲱鱼、小体鲟鱼以及欧鳊等来自大连各水产市场及中国水产研究院。

1.1.2 仪器设备

荧光定量 PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad 公司, 超微量分光光度计: Nano Drop 2000; 梯度 PCR 仪: 德国 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取

采用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明书提取 100 mg 肉中的总 DNA, 保存于 -20 °C 冰箱备用。并测定 OD₂₆₀ nm 值, 计算 DNA 质量浓度。

1.2.2 实时荧光 PCR 引物设计

通过大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕比对分析, 在序列的差异处设计特异性引物, 序列见表 1。将设计好的引物在 NCBI 进行序列分析, 利用 primer blast 程序选择 nr 数据库, 进行特异性分析: 结果表明, 只有大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕的物种能和所设计的引物完全互补结合, 没有检测到完全匹配的其它物种, 证明引物的特异性较好。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequence

鳕鱼	引物名称	序列
绿青鳕 <i>Pollachius virens</i>	GmF	TTGTAACACACCCAGATCGGCA
	GmR	CAACCAACCAGCCAGGACTTT
大西洋鳕鱼 <i>Gadus morhua</i>	PvF	GTGACTTGTAACACACCCAGTTCA
	PvR	AGAAAGCGTCAGCAGGAAAA
狭鳕 <i>Theragra chalcogramma</i>	TcF	GCAGCATTCTTACACAGTCCCTAC
	TcR	GTCACAGCACAGATTAAGCAA
太平洋鳕鱼 <i>Gadus macrocephalus</i>	GmaF	CTGTAGTGGTATGTGCCAATTCTCT
	GmaR	TTCAACGTGGGTTCAGCTG

1.2.3 引物的特异性

为检测大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕 PCR 法的单项引物的特异性, 利用上述引物对四种鳕鱼及其他鱼类样品 DNA 分别进行实时 PCR 扩增。荧光 PCR 反应体系为 50 μL, 反应体系见表 2。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火延伸

30 s, 40 个循环。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶 110 V 电泳, 通过凝胶成像系统进行分析。

1.2.4 多重 PCR 方法

1.2.4.1 二重 PCR

将不同鳕鱼模板两两混合 (太平洋鳕+绿青鳕; 太平洋鳕+大西洋鳕; 太平洋鳕+狭鳕; 绿青鳕+大西

洋鳕；绿青鳕+狭鳕；狭鳕+大西洋鳕），PCR 产物为两种鳕鱼 Pan I 基因片段的特异性引物，进行 PCR 反应。反应体系及条件见 3.2.2。

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system	
试剂名称	加入量
DNA 模板	1 μL (约为 100 ng)
正向引物(10 mmol/μL)	1 μL
反向引物(10 mmol/μL)	1 μL
Premix buffer (Sybr Green)	25 μL
灭菌蒸馏水	Up to 50 μL

注：反映体系中个试剂的用量根据反应体系的总体积进行适当调整。每个反应体系设置两个平行管，PCR 反应液应在冰中配置。

1.2.4.2 三重 PCR

将不同鳕鱼模板三种混合（大西洋鳕+绿青鳕+太平洋鳕、大西洋鳕+太平洋鳕+狭鳕、太平洋鳕+狭鳕+绿青鳕），PCR 产物为三种鳕鱼 Pan I 基因片段的特异性引物，进行 PCR 反应。反应体系及条件见 3.2.2。

1.2.4.3 四重 PCR

将四种鳕鱼模版进行混合，PCR 产物为四种鳕鱼 Pan I 基因片段的特异性引物，进行 PCR 反应。反应体系及条件见 3.2.2。

1.2.5 灵敏度的检测

为检测鳕鱼多重 PCR 法的灵敏度，将四种鳕鱼 DNA 梯度稀释，进行 DNA 浓度灵敏度实验，制备成 100 ng/μL、20 ng/μL、4 ng/μL、0.8 ng/μL 4 个浓度梯度的混合样品（起始浓度 100 ng/μL 含每种鳕鱼样品 25 ng/μL），进行灵敏度实验。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果见图 1~4。

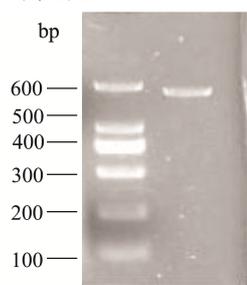


图 1 大西洋鳕单对引物 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR amplification results of a single pair of primers for Atlantic cod

注：1: Marker; 2: 大西洋鳕 PCR 扩增结果。

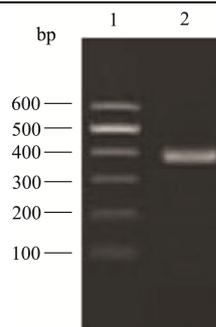


图 2 绿青鳕单对引物 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification results of a single pair of primers for Alaska pollock

注：1: Marker; 2: 绿青鳕 PCR 扩增结果。

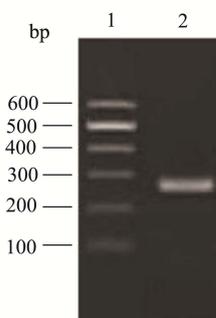


图 3 太平洋鳕单对引物 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification results of a single pair of primers for Pacific hake

注：1: Marker; 2: 太平洋鳕 PCR 扩增结果。

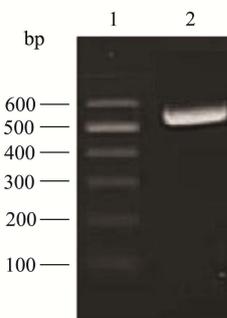


图 4 狭鳕单对引物 PCR 扩增结果

Fig.4 Alaska pollack single-pair primer PCR amplification results

注：1: Marker; 2: 狭鳕 PCR 扩增结果

结果显示，四种不同鳕鱼 PCR 均扩增出相应特异性条带。即对应的大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕四种鳕鱼分别出现 597、392、266、527 bp 大小的清晰条带。说明 4 对引物设计满足检测需求。一般认为，在一定范围内，引物序列越长，PCR 反应的特异性越高、灵敏度越低。因此，在方法设计中，选择合适长度的多重 PCR 引物序列，从而获得最优化的检测灵敏度、特异性及各目标片段扩增均一性将尤为关键。对此，本研究基于相同的特异性位点设计了长度不同

的两套引物, 试验结果显示, 当把引物片段长度降低到 18~24 bp 时, 在优化的反应条件下, 对绿青鳕 DNA 及其两两混合物的检测表现出良好的特异性与灵敏度。使用长度为 28 bp 的引物, 对目标绿青鳕的检测表现出扩增效率的差异, 绿青鳕成分难以被检出。

2.2 特异性检测结果

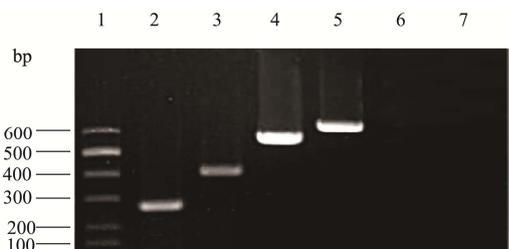


图5 大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕引物的特异性

Fig.5 The specificity of primers for Atlantic cod, Alaska Pollock, Pacific Hake and Alaska pollack

注: 1: Marker; 2: 太平洋鳕 PCR 扩增结果; 3: 绿青鳕 PCR 扩增结果; 4: 狭鳕 PCR 扩增结果; 5: 大西洋鳕 PCR 扩增结果; 6: 蓝鳕鱼; 7: 六线鱼。

以四对引物混合为 PCR 引物, 四种不同鳕鱼 PCR 均扩增出相应特异性条带, 并且只有该物种对应的一条条带。即对应的大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕四种鳕鱼分别出现 597、392、266、527 bp 大小的清晰条带, 以其他鱼类为模板作为阴性对照无条带, 见图 5。

影响多重 PCR 反应效果的因素很多, 其中引物设计直接影响 PCR 扩增的特异性与灵敏度; 另外, PCR 体系的优化可以使多重 PCR 得到最佳效果。通过检测结果可以看出说明 4 种引物之间相互不干扰, 具有显著特异性。

2.3 PCR 检测结果

2.3.1 双重 PCR 检测结果

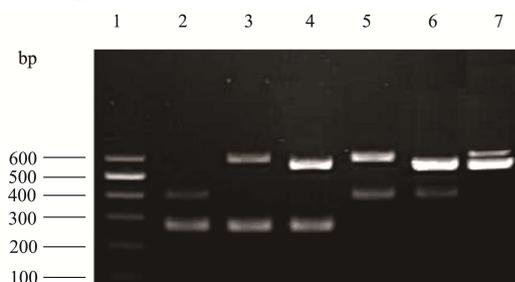


图6 两重 PCR 结果

Fig.6 Results of double PCR

注: 1: Marker; 2: 太平洋鳕+绿青鳕 PCR 扩增结果; 3: 太平洋鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果; 4: 太平洋鳕+狭鳕 PCR 扩增结果; 5: 绿青鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果; 6: 绿青鳕+狭

鳕 PCR 扩增结果; 7: 狭鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果。

经多次调整反应条件, 优化反应体系, 以 2 对引物混合为 PCR 引物, 对应的 2 种不同鳕鱼 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。均扩增出相应特异性条带, 阴性无条带。见图 6。

2.3.2 三重 PCR 结果

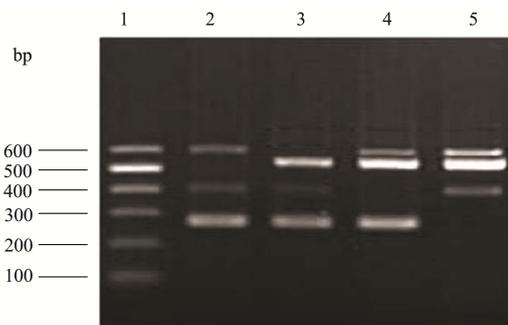


图7 三重 PCR 结果

Fig.7 Triple PCR results

注: 1: Marker; 2: 太平洋鳕+绿青鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果; 3: 太平洋鳕+绿青鳕+狭鳕 PCR 扩增结果; 4: 太平洋鳕+狭鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果; 5: 狭鳕+绿青鳕+大西洋鳕 PCR 扩增结果。

经多次调整反应条件, 优化反应体系, 以 3 对引物混合为 PCR 引物, 对应的 3 种不同鳕鱼 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。均扩增出相应特异性条带, 阴性无条带。见图 7。

2.3.3 四重 PCR 结果

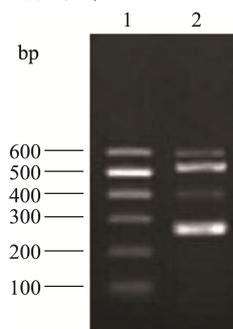


图8 四重 PCR 结果

Fig.8 Quadruple PCR results

注: 1: Marker; 2: 太平洋鳕+绿青鳕+大西洋鳕+狭鳕 PCR 扩增结果。

经多次调整反应条件, 优化反应体系, 以四对引物混合为 PCR 引物, 对应的 4 种不同鳕鱼 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。均扩增出相应特异性条带, 阴性无条带。见图 8。

多重 PCR 的原理是在同一 PCR 反应体系里加上两对以上引物, 同时扩增出 2 个以上核酸片段的 PCR 反应。以多重 PCR 为基础的成分鉴别技术具有仪器设备简单、检测通量高、操作方便且检测费用低的优点,

但由于需要在同一 PCR 体系里加入多对特异性物,复杂的 PCR 体系易造成引物之间相互干扰、灵敏度降低以及对序列扩增效率差异,从而使得相关方法的使用和标准化受到极大限制。有研究报道,多重 PCR 多采用了正向引物通用、反向引物特异的 UP-M-PCR 设计策略,即应用包含 1 条上游或下游引物通用引物,其他 3~4 条差异引物的原则,最大限度地避免引物数量过多造成的交叉干扰^[13-15]。目前,通用引物多重 PCR 方法对食品中大肠杆菌、单增李斯特菌、耶尔森氏菌、沙门氏菌及水中脊髓灰质炎病毒、柯萨奇 B 组病毒和埃可病毒等肠道病毒的检测已有报道^[16-20]。但由于鳕鱼种属之间基因序列差异较小,差异位点挑选困难,梯度差异合适的序列更少,以通用引物法很难找到合适的多重引物,因此本文设计多条配对引物法进行多重 PCR 检测。结果发现,引物之间干扰较小,基本不影响 PCR 扩增效率。

2.3.4 四重 PCR 灵敏度结果

四种鳕鱼 DNA 梯度稀释,以 100 ng/μL、20 ng/μL、4 ng/μL、0.8 ng/μL,4 个浓度梯度的混合样品 DNA 进行 PCR 扩增,100 ng/μL、20 ng/μL 浓度有明显特异性条带出现,4 ng/μL 浓度出现条带丢失现象,0.8 ng/μL 无明显条带出现,见图 9。

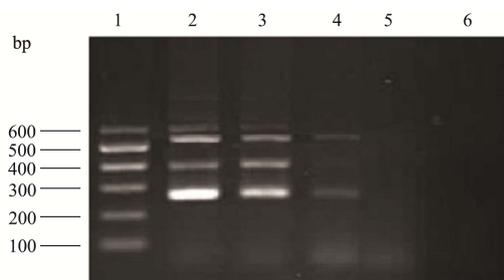


图 9 四重 PCR 灵敏度结果

Fig.9 Four-fold PCR sensitivity results

注: 1: Marker; 2: 100 ng/μL 混合样品 PCR 扩增结果; 3: 20 ng/μL 混合样品 PCR 扩增结果; 4: 4 ng/μL 混合样品 PCR 扩增结果; 5: 0.8 ng/μL 混合样品 PCR 扩增结果; 6: 阴性对照。

多重 PCR 检测结果表明,大西洋鳕、绿青鳕、太平洋鳕和狭鳕四种鳕鱼分别出现 597、392、266、527 bp 大小的清晰条带。该方法具有较高灵敏度,低至 4 ng/μL 混合样品仍可检出。

本研究主要针对鳕鱼市场以次充好现状进行试验设计,具有较显著的现实意义和应用价值;万超建立的 TaqMan 荧光 PCR 方法可以快速检测太平洋鳕鱼源性成分,但该方法仅是针对一种鳕鱼的鉴定^[21];林霖等研究设计了可用于细鳞壮鳕 DNA 成分检测的实时荧光 PCR 法^[22];李富威等建立了鳕鱼成分的实时荧光

PCR 检测方法,该方法可作为鳕鱼成分鉴定的检测方法,但不能具体分析鳕鱼的种^[23]。本研究中可针对四种鳕鱼进行成分鉴定,相比于中国出入境检验检疫标准《SN/T 3589.7-2013》并不能对不同鳕鱼成分进行鉴别^[24],本研究具有多重成分检测、检测成本节省、检测通量较高等优点,更适用于对进出口鳕鱼中以次充好、低价鳕鱼冒充高价鳕鱼销售的鉴别筛选。

3 结论

考虑到鳕鱼以次充好销售,往往是以价格较为低廉的蓝鳕、青鳕冒充价格相对较高的真鳕,大西洋鳕和太平洋鳕出售,因此在同一多重 PCR 反应体系中针对多种鳕鱼同时鉴定方面,本研究重点考察了目标鳕鱼两两混合时的检测特异性。进一步的试验表明,本文建立的多重 PCR 技术对于同时鉴定目标鳕鱼中的 3 或 4 种也具备良好的效果,且具有显著特异性及较高灵敏度,低至 4 ng/μL 混合样品仍可检出。

参考文献

- [1] 郭淼,索一平,毕思丹,等. DNA 检测技术在鳕鱼及其制品鉴定中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(21): 7700-7707
- [2] GUO Miao, SUO Yi-ping, BI Si-dan, et al. Application of DNA-based methods for the identification of cod fish and its products [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(21): 7700-7707
- [3] Charlie Ess. Pacific cod [J]. National Fisherman, 2020, 101(1): 15
- [4] 许随根,李家鹏,李金春,等. 多重实时荧光 PCR 熔解曲线法同步鉴别蓝鳍金枪鱼、裸盖鱼、异鳞蛇鲭[J]. 食品科学, 2020, 637(24): 268-275
- [5] XU Sui-gen, LI Jia-peng, LI Jin-chun, et al. A multiplex RT-PCR melting curve analysis method for simultaneous identification of bluefin tuna, sablefish and oilfish [J]. Food Science, 2020, 637(24): 268-275
- [6] Heng Feng, Xue Huang, Jiangjing Tai, et al. Lipids analysis and rapid identification of cod products [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2020, 122(8): 1900444
- [7] 钟泽澄,王进,张师音. 多重 PCR 技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(2): 171-179
- [8] ZHONG Ze-cheng, WANG Jin, ZHANG Shi-yin. Advances in multiple PCR technology studies [J]. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 171-179
- [9] 杨艳歌,李莉,王丹丹,等. 多重实时荧光 PCR 技术快速鉴别特种乳中的乳源动物成分[J/OL]. 食品科学, DOI:10.7506/

- spkx1002-6630-20200407-080
YANG Yan-ge, LI Li, WANG Dan-dan, et al. Identification of milk animal ingredients in the characteristic dairy based on multiple real-time PCR [J/OL]. Food Science, DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200407-080
- [7] 薛瑞林, 高强, 李守湖, 等. 湖羊乳房炎病原菌多重 PCR 检测方法的建立及其耐药性分析[J]. 中国草食动物科学, 2020, 4: 49-54
XUE Rui-lin, GAO Qiang, LI Shou-hu, et al. Establishment of multiplex PCR detection method and analysis of drug resistance in Hu sheep mastitis [J]. China Herbivore Science, 2020, 4: 49-54
- [8] Tingyao Zhu, Xiefei Zhou, Wei Zhang, et al. Multiplex and real-time PCR for qualitative and quantitative donkey meat adulteration [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 10: 1-8
- [9] G A Makeenko, A A Volkov, N S Mogue, et al. Genetic variation at the pantophysin (Pan I) locus in north-east Arctic cod *Gadus morhua* L. (Gadiformes: Gadidae) population in the Barents Sea and adjacent waters [J]. Russian Journal of Genetics, 2014, 50(12): 1271-1284
- [10] T H Skarstein, J I Westgaard, S E Fevolden. Comparing microsatellite variation in north-east Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to genetic structuring as revealed by the pantophysin (Pan I) locus [J]. Journal of Biology, 2007, 70: 271-290
- [11] Stenvik, Jørgen, Wesmajervi, et al. Genotyping of pantophysin I (Pan I) of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) by allele-specific PCR [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 272-275
- [12] Pogson G H. Nucleotide polymorphism and natural selection at the pantophysin (Pan I) locus in the Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.) [J]. Genetics, 2001, 157(1): 317-330
- [13] 何玮玲, 张弛, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880
HE Wei-ling, ZHANG Chi, YANG Jing, et al. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(9): 1873-1880
- [14] Ying Shang, Yuancong Xu, Kunlun Huang, et al. Multiplex pyrosequencing quantitative detection combined with universal primer-multiplex-PCR for genetically modified organisms [J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126634
- [15] 张楠驰, 苟小兰, 王利. 致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定及三重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 89-95
ZHANG Nan-chi, GOU Xiao-lan, WANG Li. Isolation and Identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and development of a triple PCR detection method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 89-95
- [16] 丁天翊, 潘阳阳, 何翊阔, 等. 快速检测奶牛乳房炎四种病原菌的多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2018, 1: 19-26
DING Tian-yi, PAN Yang-yang, HE Hong-hong, et al. Development and applications of a multiplex-PCR for quick detection of four pathogens resulting in bovine mastitis [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 1: 19-26
- [17] Zhenyan Cao, Yihua Yang, Yang Song, et al. Simultaneous detection of four pathogens in *Dendrobium officinale* by nested multiplex PCR assay [J]. Crop Protection, 2021, 140: 105445
- [18] 王瑶, 张焕容, 罗薇. 禽源沙门菌鉴定、分子分型及耐药性分析[J]. 动物医学进展, 2020, 11: 53-57
WANG Yao, ZHANG Huan-rong, LUO Wei. Identification, molecular typing and drug resistance analysis of avian *Salmonella* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 11: 53-57
- [19] Celik Elif, Otlu Salih. Isolation of *Arcobacter* spp. and identification of isolates by multiplex PCR from various domestic poultry and wild avian species [J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1)
- [20] Sun J, Shi Y, Du Y, et al. Rapid detection of *Diarrheagenic escherichia coli* by a new multiplex real-time quantitative PCR assay [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2020, 56(6): 748-757
- [21] 万超, 王雷, 王贵滨, 等. TaqMan 荧光 PCR 法快速检测太平洋鲑鱼源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 2012-2015
WAN Chao, WANG Lei, WANG Gui-bin, et al. Rapid identification of *Gadus macrocephalus* source components by TaqMan fluorescent PCR [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(7): 2012-2015
- [22] 林霖, 陈国培, 何永盛, 等. 鲑鱼产品属性鉴别及细鳞壮鲑检测方法建立[J]. 食品工业, 2017, 38(4): 208-212
LIN Lin, CHEN Guo-pe, HE Yong-sheng, et al. Cod fish product authentication and *Albatrossia pectoralis* detection method construction [J]. Food Industry, 2017, 38(4): 208-212