

实时荧光 PCR 法快速鉴别狐狸貉子肉源性成分研究

章晶晶¹, 杜利强², 李永艳¹, 李顺才², 齐艳玲², 李永波¹, 张岩¹, 周巍¹

(1. 河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 河北石家庄 050071)

(2. 河北科技师范学院生命科技学院, 河北昌黎 066604)

摘要: 根据狐狸线粒体基因组中的保守序列和貉子线粒体 D-loop 基因保守序列设计狐狸、貉子特异性引物和 TaqMan 探针, 建立一种基于实时荧光聚合酶链式反应的肉及肉制品狐狸、貉子源性成分测定方法, 通过特异性、灵敏性、线性检测对该方法体系进行检验和评价。本研究建立的狐狸、貉子源性成分实时荧光聚合酶链式测定方法体系具有良好的特异性及灵敏性, 最低可检测 0.5 pg/μL 纯狐狸 DNA 和 5 pg/μL 纯貉子 DNA。本研究建立的狐狸貉子源性成分荧光 PCR 检测方法, 可以用来检测实际样品中是否含有狐狸貉子源性。

关键词: 实时荧光聚合酶链式反应; 狐狸源性成分; 貉子源性成分; 肉类掺假

文章编号: 1673-9078(2017)8-269-275

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.039

Rapid Detection of *Alopex lagopus*- and *Nyctereutes procyonoides*-derived Constituents of Meat Products Using RT-PCR

ZHANG Jing-jing¹, DU Li-qiang², LI Yong-yan¹, LI Shun-cai², QI Yan-ling², LI Yong-bo¹, ZHANG Yan¹, ZHOU Wei¹

(1. Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China)

(2. Hebei Normal University of Science & Technology, College of life science and technology, Changli 066604, China)

Abstract: *Alopex lagopus*- and *Nyctereutes procyonoides*-specific primers and TaqMan probes were designed based on the conserved sequences in the mitochondrial genome of the *Alopex lagopus* and the displacement-loop (D-loop) region of *Nyctereutes procyonoides*. A real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)-based method for the determination of *Alopex lagopus*- and *Nyctereutes procyonoides*-derived constituents of commercial meat products was developed in this study. The established RT-PCR method was evaluated for specificity, sensitivity, and linearity; the method showed good specificity and sensitivity, and the limits of detection for *Alopex lagopus* DNA and *Nyctereutes procyonoides* DNA were 0.5 pg/μL and 5 pg/μL, respectively. In summary, this RT-PCR method can be used for the identification of *Alopex lagopus*- and *Nyctereutes procyonoides*-derived constituents in commercial samples.

Key words: real-time polymerase chain reaction; *Alopex lagopus*-derived constituents; *Nyctereutes procyonoides*-derived constituents; meat adulteration

狐狸貉子因其动物皮毛保暖性良好常被用作名贵衣料, 据农业部数据统计在我国北方河北山东等地, 年饲养量在 2000 万只。但这些动物的肉去向不明, 不禁令人怀疑在巨额利益驱使下, 不法商贩将狐狸貉子肉冒充驴肉狗肉进行销售^[1,2]。更有公安部公布的发生在 2013 年 5 月份的一起食品安全犯罪案件, 不法商家将未经检验的狐狸、貉子和老鼠等肉品掺杂到羊肉中,

收稿日期: 2016-12-29

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2015BAK36B03); 河北省科技厅重点研发计划项目 (16275502D); 河北省高等学校科学技术研究青年基金项目 (QN2014159)

作者简介: 章晶晶 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学
通讯作者: 张岩 (1979-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全

销往上海等多地的农贸市场^[3]。国内市场上肉类掺假行为严重扰乱了市场秩序, 就食品安全性和宗教信仰等方面要求^[4], 迫切的需要建立一种快速高效鉴定狐狸貉子肉类掺假的技术手段。

在狐狸貉子动物源性检测方面, 目前国内有张全芳^[3]和李通^[5]等人针对狐狸线粒体 16S rRNA 基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增、电泳、酶切^[6]检测流程实现对食品中狐狸源性成分进行检测; 以及孙敏^[7]等人利用线粒体 COI 基因序列采用实时荧光 PCR 技术快速检测狐源性成分。国际上仅有针对狐狸貉子遗传物质微卫星标记技术的初步研究^[8-12]以及使用原位 DNA 合成技术 (PRINS) 鉴别狐狸貉子的报道^[13], 然而使用简便、快速、特异性强、灵敏度高的实时荧光

PCR 技术检测狐狸貉子源性成分检测方面尚未见有报道。Real-Time PCR 是在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量,不需将 PCR 产物分离取出分析,所以 Real-Time PCR 相较普通 PCR 更安全高效,目前该技术已应用于多种畜禽肉源成分分析及鉴别^[14-18]。

本实验针对常见的狐狸品系和貉子品系,分别依据狐狸、貉子线粒体基因保守序列设计用于肉制品中狐狸、貉子源性成分鉴定的 TaqMan 实时荧光 PCR 引物和探针,拟建立狐狸、貉子源性成分的检测方法,为肉制品中狐狸、貉子源性成分的鉴别检测提供有效的工具,为相关执法部门提供可靠的技术手段和执法依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉和驴肉均购于石家庄市北国超市新店;狗肉、兔肉和鼠肉均由河北师范大学友情提供;狐狸貉子肉来自秦皇岛市昌黎狐狸貉子养殖基地。

荧光 PCR 试剂 SuperReal 荧光定量预混试剂(探针法)(天根 FP206); SYBR Premix Ex Taq(RR420)(TaKaRa); 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP 304-03); 引物及探针由上海生工生物工程公司合成。

1.2 仪器与设备

涡旋振荡器为 IKA 公司 MS3 基本型涡旋混匀仪,电子天平为梅特勒公司 ME002 型号分析天平,离心机为 Eppendorf 公司台式小型离心机,恒温金属浴为上海东升仪器有限公司生产的 6400 型恒温金属浴,核酸蛋白分析仪为 Thermo 公司生产的 nano drop lite 型号,罗氏 480 实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 样品预处理和 DNA 提取

为保证取样的均一性,使用灭菌手术剪在待检肉样的不同部位取样,置于灭菌研钵中剪碎,加入液氮研磨充分。称取 50 mg 研磨充分的肉末,使用天根基因组 DNA 提取试剂盒提取样本中的总 DNA。肉类样本经蛋白酶 K 充分消化后经离心柱纯化,提取的 DNA 溶解于 TE 缓冲液中并根据实验需要进行适度稀释,以 TE 缓冲液做空白对照在核酸蛋白分析仪 NanoDrop lite 上测定 DNA 的浓度和纯度。

1.4 Real-Time PCR 引物与探针设计

根据狐狸线粒体基因序列(GenBank 登陆号为 AF365968.1)设计并确定特异性引物和探针:狐狸-F、狐狸-R、狐狸-P;根据貉子线粒体 D-loop 基因序列(GenBank 登陆号为 AB292740.1)设计并确定特异性引物和探针:貉子-F、貉子-R 以及貉子-P。具体信息见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of the primers and probes

引物	引物及探针序列 5'→3'
狐狸-F	正: GGATCATACATGACTGCACG
狐狸-R	反: CCAGATGCCAGGTATAGTTC
狐狸-P	探针: FAM-AGGGATTATCACCATGCCTCG-TAMARA
貉子-F	正: CTACCTCCTGTGCCATGTCTG
貉子-R	反: CGGAGCGAGAAGAGGTACA
貉子-P	探针: FAM-CTTGCCCCATGCATATAAGCAGGTACA-TAMARA

1.5 PCR 反应体系及扩增条件

基于 TaqMan 实时荧光 PCR 反应体系(25 μL)为: 2×SuperReal Premix(Probe) 12.5 μL, primer-F (10 μmol/L) 0.75 μL, primer-R (10 μmol/L) 0.75 μL, probe (10 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。

基于 TaqMan 实时荧光 PCR 扩增条件为: 预变性 95 °C、15 min; 扩增 95 °C、15 s, 61 °C、30 s, 72 °C、

5 s, 45 个循环; 50 °C、30 s 冷却仪器。

基于 SYBR Green 实时 PCR 反应体系(20 μL)为: 2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL, primer-F (10 μmol/L) 0.4 μL, primer-R (10 μmol/L) 0.4 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。

基于 SYBR Green 实时 PCR 扩增条件为: 变性 95 °C、30 s; 扩增 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 °C、5 s, 60 °C、1 min, 0.11 °C/s 升温至 95 °C 连续收集信号; 50 °C、30 s 冷却仪器。

1.6 特异性试验

为验证引物与探针对于狐狸源性成分和貉子源性成分的特异性,将狐狸、貉子样本的总 DNA 作为阳性,同时选择常见的畜肉(牛、羊、猪、马、驴)以及常见禽肉(鸡、鸭)和其他动物(狗、兔、鼠)作为阴性对照,所有 DNA 模板均使用双蒸水稀释至 20 ng/μL,根据各反应体系的 Ct 值考察引物与探针对于不同 DNA 模板的特异性。

1.7 方法的线性关系和灵敏度检验

分别将 100 ng/μL 的纯狐狸 DNA 溶液、纯貉子 DNA 溶液,用灭菌双蒸水进行 5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 和 5×10^{-7} 倍比稀释,用狐狸特异性引物探针体系对梯度质量浓度的狐狸肉 DNA 标准样品进行 RT-PCR,同样方法用貉子特异性引物探针体系对梯度质量浓度的貉子肉 DNA 标准样品进行 RT-PCR,考察方法的线性关系和灵敏度。

以 Ct 值为 35 时的模板浓度作为方法的检测限,根据各梯度的扩增曲线及梯度质量浓度标准样品的 RT-PCR 结果,以 lg(纯 DNA 样品稀释度)为横坐标,以对应的 Ct 值为纵坐标做标准曲线。

2 结果与分析

2.1 引物特异性结果

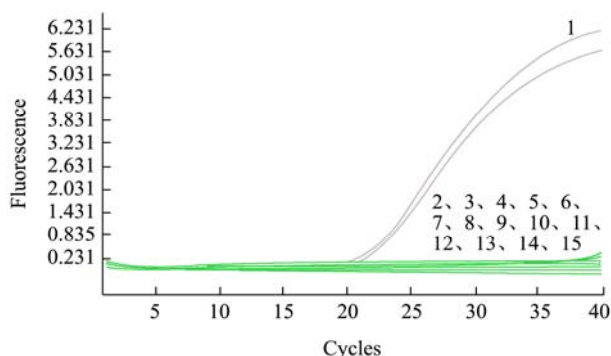


图1 狐狸引物的特异性结果

Fig.1 Specificity of *Alopex lagopus* primers

注: 1, 狐狸; 2, 貉子; 3, 马; 4, 驴; 5, 狗; 6, 兔; 7, 鼠; 8, 牛; 9, 羊; 10, 猪; 11, 鸡; 12, 鸭; 13, 大豆; 14, 玉米; 15, 大米。

利用狐狸引物,分别以狐狸、貉子、马、驴、狗、兔、鼠、牛、羊、猪、鸡、鸭、大豆、玉米和大米的 DNA 为模板进行 RT-PCR 扩增;使用貉子引物,分别以狐狸、貉子、马、驴、狗、兔、鼠、牛、羊、猪、鸡、鸭、大豆、玉米和大米的 DNA 为模板进行 RT-PCR

扩增,所有模板 DNA 浓度控制在 20 ng/μL,特异性结果见图 1~图 2。图 1 显示只有狐狸 DNA 模板能显著扩增且 Ct 值为 21.85,而其他阴性模板及空白对照反应 Ct 值均大于 35,说明狐狸引物的特异性强。图 2 显示只有貉子 DNA 模板能显著扩增且 Ct 值为 20.52,同时其他阴性模板及空白对照反应 Ct 值均大于 35,说明貉子引物的特异性强。

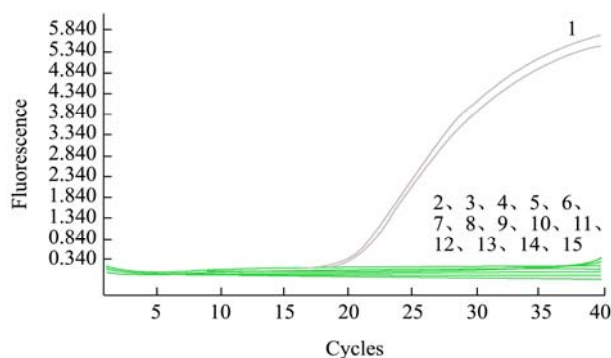


图2 貉子引物的特异性结果

Fig.2 Specificity of *Nyctereutes procyonoides* primers

注: 1, 貉子; 2, 狐狸; 3, 马; 4, 驴; 5, 狗; 6, 兔; 7, 鼠; 8, 牛; 9, 羊; 10, 猪; 11, 鸡; 12, 鸭; 13, 大豆; 14, 玉米; 15, 大米。

2.2 TaqMan™ 实时 PCR 对狐狸、貉子检测

灵敏度及线性关系

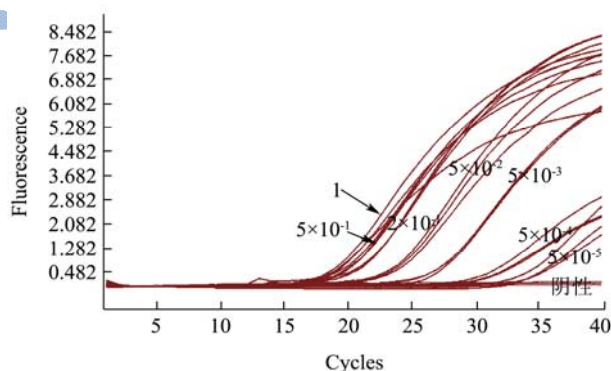


图3 梯度质量浓度狐狸样品 TaqMan RT-PCR 扩增曲线

Fig.3 TaqMan RT-PCR amplification curves of gradient concentration of *Alopex lagopus* DNA

注: 从左向右依次为 1、 5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 倍比稀释纯狐狸 DNA 扩增曲线。

分别使用 10 倍梯度稀释的狐狸肉 DNA、貉子肉 DNA 作为模板进行狐狸源性成分和貉子源性成分的荧光定量 PCR 检测,各梯度反应体系中模板量(m)分别为 100 ng、50 ng、20 ng、5 ng、500 pg、50 pg、5 pg、500 fg 和 50 fg,每个浓度梯度均设 3 个平行反应。反应的扩增曲线见图 3 和图 5,以 log(纯 DNA 样品稀释

度)为横坐标, 以对应的 Ct 值为纵坐标做标准曲线, 相应标准曲线见图 4 和图 6。狐狸引物探针的标准曲线方程为 $Ct = -3.596 \log m + 18.92$, $R^2 = 0.999$, 扩增效率为 1.897; 貉子引物探针的标准曲线方程为 $Ct = -3.842 \log m + 17.29$, $R^2 = 0.994$, 扩增效率为 1.821。

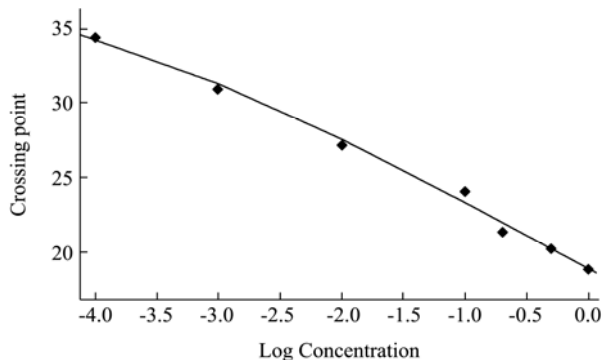


图 4 梯度质量浓度狐狸样品 TaqMan RT-PCR 扩增标准曲线

Fig.4 Standard curve of gradient concentration of *Alopex lagopus* DNA by TaqMan RT-PCR

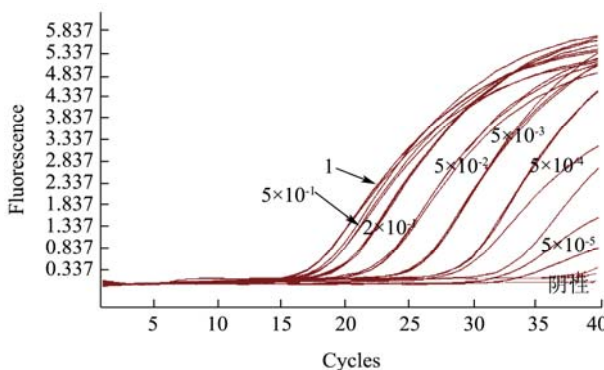


图 5 梯度质量浓度貉子样品 TaqMan RT-PCR 扩增曲线

Fig.5 TaqMan RT-PCR amplification curves of gradient concentration of *Nyctereutes procyonoides* DNA

注: 从左向右依次为 1、 5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 倍比稀释纯貉子 DNA 扩增曲线。

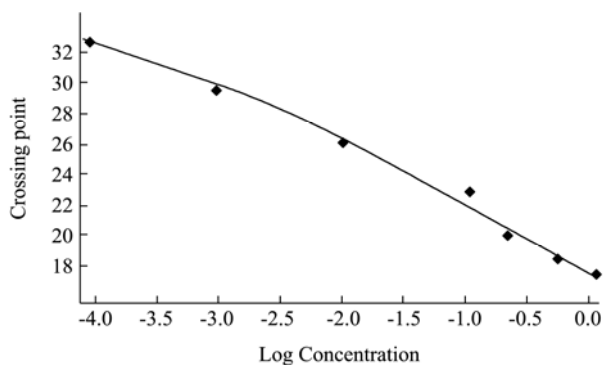


图 6 梯度质量浓度貉子样品 TaqMan RT-PCR 扩增标准曲线

Fig.6 Standard curve of gradient concentration of *Nyctereutes procyonoides* DNA by TaqMan RT-PCR

TaqMan 荧光定量 PCR 以 Ct 值为 35 时的模板浓度作为方法的检测限, 根据本研究的标准曲线, Ct 值

为 35 时狐狸模板量为 0.5 pg, 表明狐狸引物的定性检测灵敏度达到 0.5 pg。同样 Ct 值为 35 时貉子模板量为 5 pg, 表明貉子引物的定性检测灵敏度达到 5 pg。

2.3 TaqManTM 和 SYBR Green 实时 PCR 对

狐狸、貉子检测灵敏度的差异比较

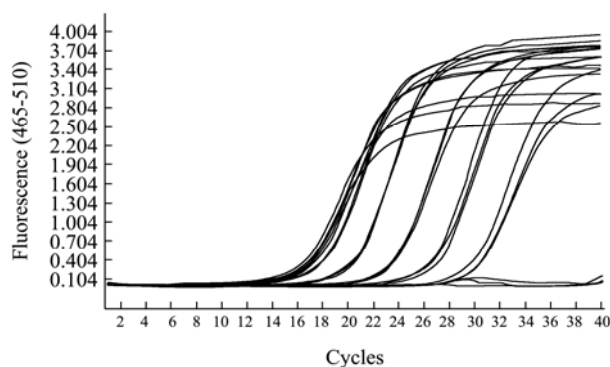


图 7 梯度质量浓度狐狸 DNA 样品 SYBR RT-PCR 扩增曲线

Fig.7 SYBR RT-PCR amplification curve of gradient concentration of *Alopex lagopus* DNA

注: 从左向右依次为 1、 5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 倍比稀释纯狐狸 DNA 扩增曲线。

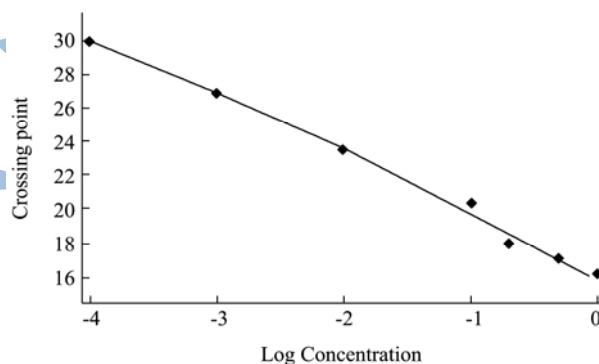


图 8 梯度质量浓度狐狸 DNA 样品 SYBR RT-PCR 扩增标准曲线

Fig.8 Standard curve of gradient concentration of *Alopex lagopus* DNA by SYBR RT-PCR

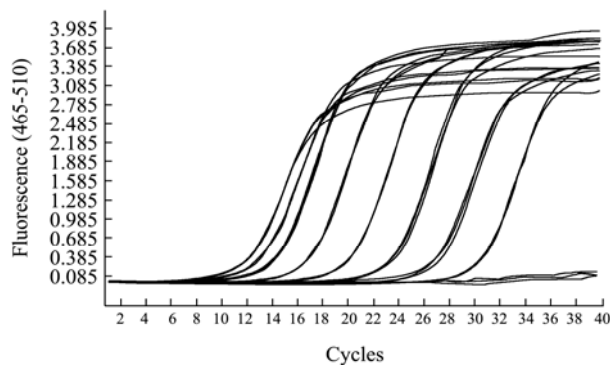


图 9 梯度质量浓度貉子 DNA 样品 SYBR RT-PCR 扩增曲线

Fig.9 SYBR RT-PCR amplification curves of gradient concentration of *Nyctereutes procyonoides* DNA

注: 从左向右依次为 1、 5×10^{-1} 、 2×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 倍比稀释纯狐狸 DNA 扩增曲线。

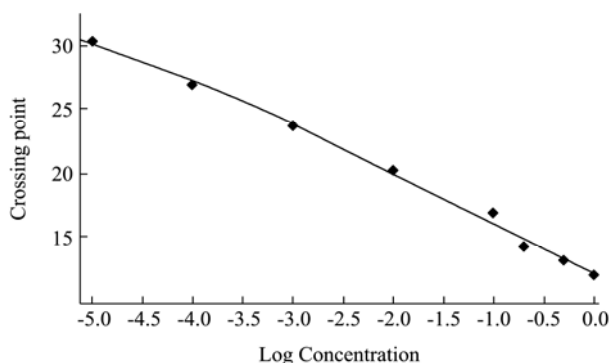


图 10 梯度质量浓度貉子 DNA 样品 SYBR RT-PCR 扩增标准曲线
Fig.10 Standard curve of gradient concentration of *Nyctereutes procyonoides* DNA by SYBR RT-PCR

对相同浓度的狐狸、貉子 DNA, 使用 SYBR Green 实时 PCR 法对其进行扩增, 构建标准曲线。PCR 引物都是针对狐狸、貉子线粒体基因保守序列设计的特异性引物。

分别使用 10 倍梯度稀释的狐狸肉 DNA、貉子肉 DNA 作为模板进行狐狸源性成分和貉子源性成分的荧光定量 PCR 检测, 各梯度反应体系中模板量(m)分别为 100 ng、50 ng、20 ng、5 ng、500 pg、50 pg、5 pg、500 fg 和 50 fg。反应的扩增曲线见图 7 和图 9, 以 log(纯 DNA 样品稀释度)为横坐标, 以对应的 Ct 值为纵坐标做标准曲线, 相应标准曲线见图 8 和图 10。狐狸引物 SYBR RT-PCR 的标准曲线方程为 $Ct = -3.255 \log m + 15.96$, $R^2 = 0.984$, 扩增效率为 2.047; 貉子引物 SYBR RT-PCR 的标准曲线方程为 $Ct = -3.569 \log m + 11.79$, $R^2 = 0.985$, 扩增效率为 1.906。

SYBR 荧光定量 PCR 以 Ct 值为 30 时的模板浓度作为方法的检测限, 根据本研究的标准曲线, Ct 值为 30 时狐狸模板量为 5 pg, 表明狐狸引物的定性检测灵敏度达到 5 pg。同样 Ct 值为 30 时貉子模板量为 0.5 pg, 表明貉子引物的定性检测灵敏度达到 0.5 pg。

对比两种方法的标准曲线发现, TaqMan™ 和 SYBR Green 实时 PCR 法对狐狸 DNA 和貉子 DNA ($5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 至 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 都有扩增, 且 Ct 值与 log(纯 DNA 样品稀释度)呈很好的线性关系, TaqMan™ 探针法线性相关系数 $R^2(\text{TaqMan}^{\text{TM}}) = 0.995$, SYBR Green 染料法相关系数 $R^2(\text{SYBR Green}) = 0.985$ 。两种方法都能检测出 $5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 的狐狸 DNA 和 $5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 貉子 DNA。

为确定 SYBR-PCR 体系狐狸和貉子引物扩增产物的特异性, 使用狐狸引物和貉子引物做 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测, 通过熔解曲线可以有效区分目的片段、非特异性扩增和引物二聚体并且分析熔解温

度可检验引物的特异性, 狐狸引物的熔解温度为 $83.86 \text{ }^\circ\text{C}$, 貉子引物的熔解温度为 $83.49 \text{ }^\circ\text{C}$, 见图 11 和图 12。

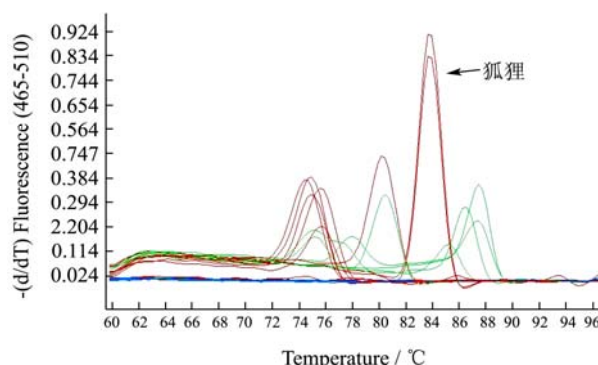


图 11 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 测定狐狸引物熔解曲线
Fig.11 Melting curves of SYBR Green I PCR to detect *Alopex lagopus* primers

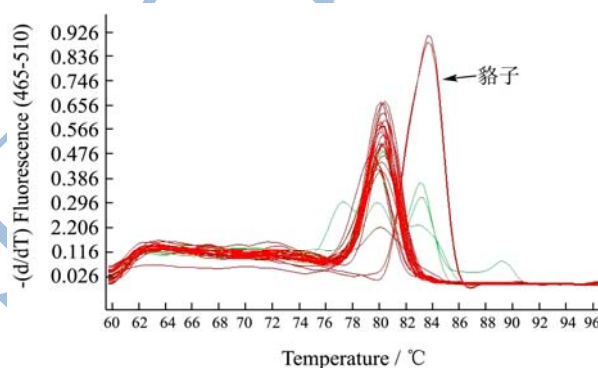


图 12 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 测定貉子引物熔解曲线
Fig.12 Melting curves of SYBR Green I PCR to detect *Nyctereutes procyonoides* primers

3 讨论

本实验建立了实时荧光定量 PCR 技术检验肉制品中狐狸肉、貉子肉源性成分的方法, 与普通 PCR 扩增、电泳检测的常规检测方法流程相比, 具备省时、快速、高效、灵敏及安全等方面的优势。

线粒体 DNA 种属特异性强且在同一个个体的不同组织其结构也没有组织特异性^[19]。同时线粒体基因在每个细胞中都存在高拷贝数, 从而避免和降低肉制品加工过程中高温蒸煮及添加调味料对肉类 DNA 破坏造成实验结果偏差的影响, 因此在肉类物种成分鉴别中线粒体基因常被用作靶基因^[20-23]。因此本研究建立的狐狸、貉子源性成分检验方法选择线粒体 DNA 的片段基因作为扩增靶序列, 但不同组织中存在线粒体和线粒体 DNA 数量的区别可能会导致定量结果偏差^[15]。同时, 本研究建立的方法只能对肉类是否掺有狐狸肉、貉子肉源性成分进行定性检测, 无法获得肉类质量的掺混比例及检测模板 DNA 中狐狸貉子源性成

分的大致含量,也无法判断肉制品中狐狸貉子成分是主成分还是来自于污染,这与肉类检测工作时实际需求仍存在有一定的差距,这也正是后续实验进行更深入研究而努力的方向。

4 结论

4.1 本研究针对常见的狐狸品系和貉子品系,选取狐狸线粒体基因组中的保守序列和貉子线粒体 D-loop 基因保守序列设计特异性引物和探针,建立了肉制品中狐狸貉子源性成分检测的 TaqMan 荧光定量 PCR 技术。经验证,本方法特异性良好,能较好的将狐狸肉、貉子肉区分于市场上常见畜肉类(牛、羊、猪、马和驴)和禽肉类(鸡和鸭)以及其他动物肉(狗、兔和鼠)。同时,本方法具较高的检测灵敏度,其中狐狸引物最低可检测到 0.5 pg/ μ L 的纯狐狸肉 DNA,貉子引物最低可检测到 5 pg/ μ L 的纯貉子肉 DNA。TaqManTM 和 SYBR Green 实时 PCR 法对狐狸 DNA 和貉子 DNA(5 pg/ μ L 至 100 ng/ μ L)都有扩增,并且在此浓度范围内 Ct 值与 log(纯 DNA 样品稀释度)呈很好的线性关系。

4.2 本文建立的肉制品中狐狸、貉子源性成分检验方法稳定性好、检出限低、准确性高,可以为相关执法部门进行监管执法提供可靠的技术支持和执法依据。

参考文献

- [1] 宁迪,杨羽念.狐狸肉冒充驴肉超市“道歉”难以平息事件[J]. 中国食品,2014,642(2):26-27
NING Di, YANG Yu-nian. Supermarket's apology can't calm things down for imitating donkey meat with fox meat [J]. China Food, 2014, 642(2): 26-27
- [2] 马慧敏.揭开狐狸肉的神秘面纱-访山东省梁山县狐狸养殖户马广玉[J]. 食品安全导刊,2014,2:38-39
MA Hui-min. Uncovering secrets of fox meat by interviewing with SHANDONG fox breeder MA Guangyu [J]. China Food Safety, 2014, 2: 38-39
- [3] 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,2014,12:4-6,10
ZHANG Quan-fan, MA De-yuan, LIU Yan-yan, et al. Study on method for identification of mutton mixed with fox meat by multiple PCR [J]. Shandong Agricultural Science, 2014, 12: 4-6, 10
- [4] Wang Q, Zhang X, Zhang H Y, et al. Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene [J]. Meat Science, 2010, 85(2): 265-269
- [5] 李通,尹艳,袁其朋,等.运用 PCR 方法鉴别四种犬科动物的研究[J]. 食品工业科技,2013,17:146-149
LI Tong, YIN Yan, YUAN Qi-peng, et al. Study on identification of four kinds of canidae by PCR assay [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 17: 146-149
- [6] Haider N, Nabulsi I, Al-Safadi B. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene [J]. Meat Science, 2012, 90(2): 490-493
- [7] 孙敏,高宏伟,龚方,等.利用线粒体 CO I 序列快速检测狐源性成分[J]. 畜牧与兽医,2013,45(7):57-60
SUN Min, GAO Hong-wei, GONG Fang, et al. Rapid identification of *Alopex lagopus* ingredients by PCR of the mitochondrial COI gene [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 45(7): 57-60
- [8] Yan S Q, Li Y M, Bai C Y, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) [J]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12(4): 6351-6355
- [9] Hong Y, Kim K S, Lee H, et al. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in south Korea using newly developed 12 microsatellite markers [J]. Genes Genetic Systems, 2013, 88(1): 69-76
- [10] Korablev N P, Korablev M P, Rozhnov V V, et al. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the population of raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834) introduced into the Upper Volga basin [J]. Genetika, 2011, 47(10): 1378-1385
- [11] Switonski M, Szczerbal I, Nowacka-Woszek J. Comparative genomics of 3 farm canids in relation to the dog [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2009, 126(1-2): 86-96
- [12] Szczerbal I, Rogalska-Niznik N, Schelling C, et al. Development of a cytogenetic map for the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*) genomes, using canine-derived microsatellite probes [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2003, 102(1-4): 267-271
- [13] Wnuk M, Oklejewicz B, Lewinska A, et al. PRINS detection of 18S rDNA in pig, red fox and Chinese raccoon dog, and centromere DNA in horse [J]. Hereditas, 2010, 147(6): 320-324
- [14] 薛晨玉,宋丽萍,路勇,等.实时定量 PCR 法对羊肉中鸡源性成分的量化检测[J]. 食品工业科技,2014,35(17):294-297
XUE Chen-yu, SONG Li-ping, LU Yong, et al. Real-time PCR method for quantitative detect chicken blending in sheep [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014,

- 35(17): 294-297
- [15] 周彤,李家鹏,田寒友,等.一种基于实时荧光聚合酶链式反应的肉及肉制品中猪源性成分含量测定[J].肉类研究,2013, 37(12):11-15
ZHOU Tong, LI Jia-peng, TIAN Han-you, et al. A RT-PCE Method for quantitative determination of pork-derived ingredients in meat and meat products [J]. Meat Research, 2013, 37(12): 11-15
- [16] 张驰,邱皓璞,张筠.荧光定量 PCR 检测肉制品中鸭源性成分[J].食品科学,2013,34(18):154-157
ZHANG Chi, QIU Hao-pu, ZHANG Yun. A quantitative fluorescent pcr method for detection of duck-derived ingredients in meat products [J]. Food Science, 2013, 34(18): 154-157
- [17] Santos C G, Melo V S, Amaral J S, et al. Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin [J]. Meat Science, 2012, 90(3): 836-841
- [18] Kesmen Z, Yetiman A E, Sahin 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): C167-173
- [19] Kim H R, Cho J Y, Park Y C. Intraspecific comparison of complete mitogenome sequences from two Asian raccoon dogs (Canidae: Nyctereutes procyonoides) [J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(6): 827-828
- [20] Imaizumi K, Akutsu T, Miyasaka S, et al. Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA [J]. International Journal of Legal Medicine, 2007, 121(3): 184-91
- [21] Girish P S, Anjaneyulu A S, Viswas K N, et al. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species [J]. Meat Science, 2004, 66(3): 551-6
- [22] 段庆梓,尚柯,张玉,等.多重 PCR 法用于鸡、鸭肉源性的鉴定[J].食品研究与开发,2014,5:90-93
DUAN Qing-zi, SHANG Ke, ZHANG Yu, et al. Multiplex PCR for identification of chicken and duck in meat [J]. Food Research and Development, 2014, 5: 90-93
- [23] 尚柯,段庆梓,张玉,等.多重 PCR 法用于畜肉源性鉴定的研究[J].食品工业科技,2013,34(8):83-5,96
SHANG Ke, DUAN Qing-zi, ZHANG Yu, et al. Multiplex PCR for identification of species origin of meat [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 83-5, 96