

基于实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 的肉制品中牛源性成分检测

刘艳^{1,2}, 王鸣秋^{1,2}, 李诗瑶^{1,2}, 朱必婷^{1,2}, 杨硕^{1,2}, 马弋^{1,2}, 张莉^{1,2}

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 湖北武汉 430073)

(2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

摘要: 为了能够快速有效的检测出肉制品中牛源性成分, 采用实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 检测方法, 检测肉制品中牛源成分。先依据牛肉单复制基因组特异区域, 通过多序列比对设计特异性引物与探针, 再利用苯酚-氯仿法提取标准品基因组 DNA, 确立实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 两种方法的反应条件, 测定 DNA 模板纯度及浓度可得实验提取的 DNA 溶液不含杂质, 在此基础上构建牛源性成分荧光定量 PCR 标准曲线, 检测两种方法的特异性、抗干扰性与肉制品中牛源性成分。分析实验结果可知, 引物与探针在两种方法中均对牛肉有荧光信号显示, 两种方法具有牛源性特异性, 检测数值与实际样品数值基本一致, 且两种方法抗干扰性较好, 当存在其他肉类干扰时, 仍可准确监测出牛源性, 两种方法的最大误差分别为 3.8% 和 4.0%; 可定量检测不同肉制品中牛源性成分, 两种方法均未检测出样品 10 牛肉丸中牛源性成分, 验证了市面上确实存在假肉情况。说明所用方法能够准确、快速地检测出肉制品中的牛源性成分, 适用于市场中肉制品的检测, 对保障消费者的权益和健康具有十分重要的意义。

关键词: 荧光定量 PCR; 数字 PCR; 肉制品; 牛源性成分; 检测; 特异性

文章编号: 1673-9078(2019)07-254-260

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.035

Detection of Bovine Components in Meat Products Based on Real-time Fluorescence Quantitative PCR and Digital PCR

LIU Yan^{1,2}, WANG Ming-qiu^{1,2}, LI Shi-yao^{1,2}, ZHU Bi-ting^{1,2}, YANG Shuo^{1,2}, MA Yi^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}

(1.Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test Wuhan 430073, China)(2.Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

Abstract: In order to detect bovine-derived components in meat products quickly and effectively, real-time fluorescence quantitative PCR and digital PCR were used to detect bovine-derived components in meat products. Firstly, the specific primers and probes were designed by multiple sequence alignment according to the specific region of beef single replication genome, then the standard genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method. Real-time fluorescence quantitative PCR and digital PCR reaction conditions were established. The purity and concentration of DNA template were determined and the extracted DNA solution was free of impurities. On this basis, the fluorescence quantitative analysis of bovine-derived components was constructed. The specificity, anti-interference and bovine-derived components in meat products were detected by standard curve of PCR. The results showed that both primers and probes have fluorescence signals for beef. The two methods have bovine origin specificity, the detection values are basically consistent with the actual sample values. The two methods have good anti-interference ability. When there are other meat disturbances, the bovine origin can still be accurately monitored. The maximum errors of the two methods were 3.8% and 4%, respectively. The bovine origin components in different meat products can be quantitatively detected. The bovine origin components in 10 beef balls of samples can not be detected by all methods, which verifies the market. Fake meat does exist. It showed that the proposed method can accurately and rapidly detect bovine-derived ingredients in meat products, and is suitable for the detection of meat products in the market. It is of great significance to protect the rights and health of consumers.

Key words: fluorescent quantitative PCR; digital PCR; meat products; cattle components; testing; specificity

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 湖北省食品质量安全监督检验研究院基金项目 (ZZLX2015004)

作者简介: 刘艳 (1985-), 女, 研究生, 工程师, 研究方向: 食品微生物及分子生物学检测

随着社会与经济的发展, 人们越来越重视自身健康, 对饮食的要求也越来越高^[1]。牛肉中含有丰富的维生素、蛋白质以及高含量的叶酸, 成为人们餐桌上最常见的肉类。但随着牛肉价格不断上涨, 一些不法

商贩为谋取利润,在牛肉中加入以猪肉、鸡肉等处理过的廉价肉类充当牛肉,造成恶劣的社会影响。因此检测肉制品中牛源性的方法具有重要的意义^[2,3]。

目前,已经有大量的研究学者对食品中的牛源性成分进行抽样检测,并取得了一定的研究成果。如苗丽^[4]等提出了一种基于微滴数字 PCR 法的肉制品成分定量分析方法,对实验样本进行检测,得出真实值与测量值之间基本保持一致,能够检测出肉制品中各种成分的含量,但是运用该方法进行检测时,对相关操作人员的技术要求较高,在实用性方面欠佳。赵良娟^[5]等采用免疫磁珠-PCR 试纸条方法对食品中的牛源性成分进行检测,能够快速得出牛源性成分含量,但是提取的纯度较低,结果可靠性不高。

针对上述传统方法存在的问题,本文将采用实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 方法对市场中的各种肉类成分进行检测与分析。实时荧光定量 PCR 技术已渐渐取代普通 PCR 技术,近年来被广泛用于检测各种肉类源成分,通过该方法可有效鉴别肉制品掺假情况。数字 PCR 检测方法利用微滴发生器微滴化处理肉类样本,对生成的微滴实施 PCR 反应,通过数字 PCR 检测器检测微滴,获取肉制品的 DNA 浓度。数字 PCR 检测方法近年来已应用于病源检测、物种鉴定以及各类肉源成分检测等各领域。本文将两种方法融合起来,检测肉制品中牛源性成分。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

实时荧光定量 PCR 仪选择 Bio-Rad 伯乐 PCR 仪 T100,美国 BIO-RAD 公司;SpectraMax QuickDrop 核酸蛋白定量仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;DY-501 型核酸电泳仪,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 材料与试剂

实验材料:生鲜牛肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、猪肉、羊肉、驴肉、鲫鱼和肥牛卷等,均购于某市农贸市场;含牛肉成分的肉制品,如牛肉酱、牛肉罐头、牛肉粒、爆牛肉片、腌熏牛肉、牛肉味香肠、牛肉灌肠、牛肉干、午餐肉与牛肉丸等,均购于某市各大型超市。

主要试剂:NaOH、NaCl,天津市人船化学试剂科技有限公司;自行配制组织裂解液、氯仿-异戊醇(24:1)、醋酸钠溶液(3 mol/L);Tris、EDTA、十二烷基磺酸钠,美国 sigma 公司;Tris 平衡酚,北京索莱宝生物科技有限公司;ddPCR Master Mix、Droplet Generation Oil、Droplet Reader Oil,美国 Bio-Rad 公司;

异丙醇、乙醇,上海中锂实业有限公司;Premix Ex2×Taq™(ProbecqPCR)、pMD-18-T 载体、工程菌 DH5 α 感受态细胞,康为世纪生物科技有限公司;引物、探针,上海生工生物技术有限公司。

1.3 引物与探针

依据 Genbank 内公布的牛肉单拷贝 β -actin 基因组特异区域,利用 Megalign 软件实施多序列比对,利用保守区域与 16S rDNA 基因序列设计特异性引物与探针。将探针的 5'端与 3'端分别用 FAM 荧光染料基团 FAM 与非荧光淬灭基团 BHQ 标记,确保探针符合实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 要求。从上海生工生物技术有限公司采购引物与探针。

1.4 制备样品

将新鲜肉类肌肉组织绞碎后置于烤箱中取温度 80 °C 烘干 72 h,通过组织匀浆机将样品混合均匀,混合后的样品作为标准样品进行实验。为防止差异肉类组织受到污染,混合处理过程中各肉类分开处理。

1.5 提取 DNA

利用苯酚-氯仿法提取标准品基因组 DNA。将 700 μ L 组织裂解液与 20 μ L 蛋白酶 K 加入待提取样品中,将混合液振荡混匀,56 °C 水浴 2 h,添加同样份量饱和酚后混匀,利用 Allegra 21R Centrifuge 高速冷冻离心机以 10000 r/min 速度离心 10 min;将同样一半体积的饱和酚与氯仿-异戊醇(24:1)加进提取的上清液中,以同样速度混合均匀;再取混合后的上清液,将同体积氯仿加入,混合均匀;将 2.5 倍体积与 1/10 体积的无水乙醇与 3 mol/L 的醋酸钠溶液加入上步骤上清液中,混合均匀后在零下 20 °C 环境中静置两小时,以 12000 r/min 速度在 4 °C 环境下离心 30 min 混合均匀;将 1 mL 75%乙醇溶液加入上步骤去掉上清液后混合溶液中,以 12000 r/min 速度在 4 °C 环境下离心 10 min 混合均匀;将上清液去掉后,将 ddH₂O 100 μ L 溶解 DNA 加入干燥后样品中。利用 Nanodrop ND-2000 核酸蛋白定量仪与 DY-501 型核酸电泳仪检测提取样品 DNA 含量,将样品置于零下 20 °C 存放。

1.6 实时荧光定量 PCR 方法反应条件

利用引物与探针可得实时荧光定量 PCR 反应体系:2×Premix Ex Taq™(Probe qPCR) 12.5 μ L,最终浓度分别为 0.25 μ mol/L、0.5 μ mol/L、1.05 μ mol/L,2 μ mol/L 的 DNA 模板,不足量的部分加入双氧水使最终实验反应体系容量达到 20 μ mol/L。

实时荧光定量 PCR 反应过程为: 95 °C 10 s、95 °C 5 s、60 °C 20 s, 循环 40 次; 35 °C 10 s。实验结果 Ct 值小于 30 时, 判定结果呈阳性; 实验结果 Ct 值大于 40 时, 判定结果呈阴性; 结果值在 30 到 40 间时, 再次实验检测; 结果与前次实验相同且结果为对数增长时, 判定结果呈阳性, 否则判定结果呈阴性。

1.7 数字 PCR 方法反应条件

数字 PCR 反应体系为: 浓度为 900 nmol/L 的上游引物 1.8 μL; 浓度为 900 nmol/L 的下游引物 1.8 μL; 250 nmol/L 的探针 0.5 μL; 数字 PCR 组合 10 μL; DNA 模板 4 μL; 双蒸水补齐至 20 μL。利用微滴生成仪生成微滴数量为 20000。

数字 PCR 反应过程为: 95 °C 10 min、94 °C 30 s、60 °C 1 min、98 °C 10 min, 循环 40 次; 利用 QX100TM Droplet, Digital TM PCR 系统分析扩增产物^[6,7]。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性和灵敏度

通过对牛肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、猪肉、羊肉、驴肉、鲫鱼 8 种肉类 DNA 实施荧光定量 PCR 扩增, 检测牛源性成分特异性^[8]。

设定不同标准质粒梯度, 利用实时荧光定量方法对利用双蒸水稀释的不同浓度 DNA 样本分别进行扩增, 该方法能够扩增的最低稀释浓度即为实时荧光定量 PCR 检测方法灵敏度^[9,10]。

1.9 实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 检测方法

抗干扰性

在牛肉样品最低含量为 10% 时加入 10 个质量分数 10%~100% 的混合肉类样品, 总质量 50 mg。采用 1.5 小节方法提取混合肉类样品 DNA, 10 倍稀释混合肉类样品后, 取 4 μL 分别利用实时荧光定量 PCR 检测方法和数字 PCR 检测方法检测其抗干扰性。

1.10 实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 检测肉

制品中牛源性成分

为验证两种方法在肉制品中检测牛源性成分准确性, 取牛肉酱、牛肉罐头、牛肉粒、爆牛肉片、腌熏牛肉、牛肉味香肠、牛肉灌肠、牛肉干、午餐肉与牛肉丸十种肉制品通过两种方法分别进行检测^[11,12]。

1.11 数据统计分析

采用 foxtable 软件对测试数据进行统计, 并且在实验中运用 Matlab 软件对相关数据进行预测分析, 根据数据分析结果得出相关结论。

2 结果与讨论

2.1 测定 DNA 模版纯度及浓度

实验过程中, 在对实验样本的 DNA 进行检测时, 由于各种外在因素可能会存在碳水化合物和蛋白质等杂质, 因此不能直接判定该样本是否能够直接进行检测, 需要对其进行判断, 判断其 DNA 溶液是否超过污染标准, 只有符合条件的样本才能进行下一步的实验, 具体的判断标准如表 1 所示。

表 1 DNA 溶液污染标准

Table 1 DNA solution contamination standards

项目	DNA 溶液有污染	DNA 溶液无污染
A260/A280>1.8		无蛋白质污染
A260/A280≤1.8	有蛋白质污染	
A260/A230>2.0		无碳水化合物污染
A260/A230≤2.0	有碳水化合物污染	

以表 1 中的判断标准为依据对待测样本进行 DNA 浓度检测, 检测结果如表 2 所示。

表 2 不同肉源品种 DNA 浓度

Table 2 DNA concentration of different meat source varieties

样品名称	浓度/(ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
生鲜牛肉	211.62	1.92	2.51
生鲜鸡肉	151.35	1.95	2.21
生鲜鸭肉	163.55	1.92	2.39
生鲜鹅肉	184.95	1.92	2.39
生鲜猪肉	169.87	1.92	2.32
生鲜羊肉	411.07	1.88	2.43
生鲜驴肉	314.54	1.89	2.41
生鲜鲫鱼	142.56	1.96	2.19

分析表 2 中数据可知, 在有无蛋白质污染的检测中, 所有样本的数值均大于 1.8, 表明样本无蛋白质污染; 在有无碳水化合物污染的检测中, 所有样本的数值均大于 2.0, 表明样本无碳水化合物污染。上述数据表明不同肉源品种的 DNA 浓度值均符合标准, 说明样本中均不含有蛋白质和碳水化合物等杂质, 符合检测标准, 可以用于检测肉制品中牛源性成分的实验中。

2.2 构建牛源性成分荧光定量 PCR 标准曲线

实验中反应管里荧光信号实现设定域值大小时重

复次数为实验品的 Ct 值, 利用 Bio-Rad 伯乐 PCR 仪 T100 中软件获取实验原始浓度对数值与 Ct 值间关系。牛特异性基因最终标准曲线为: $y = -3.4046x + 29.708$, $R^2 = 0.994$ $E = 96.6\%$, E 表示扩增效率。内参 16S rDNA 标准曲线为:

$y = -3.4074x + 21.250$, $R^2 = 0.998$ $E = 96.6\%$ 。检测样品内牛肉含量利用以下公式计算:

$$cDNA(meat_{beef}) = 10^{[(Ct_{beef} - d_{beef}) / slope_{beef}]} \quad (1)$$

$$cDNA(meat_{total}) = 10^{[(Ct_{16s} - d_{16s}) / slope_{16s}]} \quad (2)$$

$$meat_{beef} \text{ content}(\%) = \frac{cDNA(meat_{beef})}{cDNA(meat_{total})} \times 100 \quad (3)$$

其中: $cDNA(meat_{beef})$ 与 $cDNA(meat_{total})$ 表示检测样品内牛肉与全部肉类 DNA 含量, 单位为 (ng/μL); Ct_{beef} 与 Ct_{16s} 表示引物为牛特异性 Rdl 与 16 s 时实验品 Ct 值; d_{beef} 表示引物为牛肉时标准曲线截距; d_{16s} 表示引物为 16 s 时标准曲线截距; $slope_{beef}$ 表示引物为牛肉时标准曲线斜率; $slope_{16s}$ 表示引物为 16 s 时标准曲线斜率^[13,14]。

2.3 实时荧光定量 PCR 与数字 PCR 检测方法的牛源性成分特异性

以牛肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、猪肉、羊肉、驴肉和鲫鱼各种肉类基因实施荧光定量 PCR 与数字 PCR 扩增, 实验结果见图 1 与图 2。

分析图 1 可知, 运用实时荧光定量 PCR 方法对各种肉类进行检测时, 当循环数达到 14 次时, 对牛肉有荧光信号显示, 可以进行特异性扩增, 但是对其他肉类品种并没有有效扩增; 分析图 2 可知, 运用数字 PCR 方法对各种肉类进行检测时, 当循环数达到 22 次时, 对牛肉的荧光信号显示逐渐明显, 可以进行特异性扩

增, 但是对鸡肉、鸭肉、鹅肉、猪肉、羊肉、驴肉、鲫鱼并没有有效扩增。说明实验所用引物与探针在两种方法中均仅对牛肉有荧光信号显示, 可进行特异性扩增, 可用于肉制品中牛源性成分的有效检测^[15-17]。

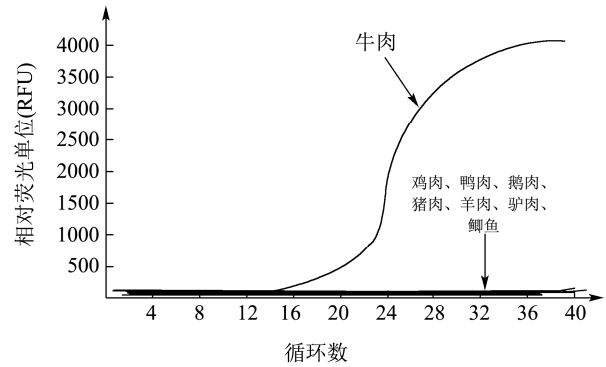


图 1 牛源性成分实时荧光定量 PCR 方法特异性实验

Fig.1 Specificity test of real-time fluorescence quantitative PCR for bovine derived components

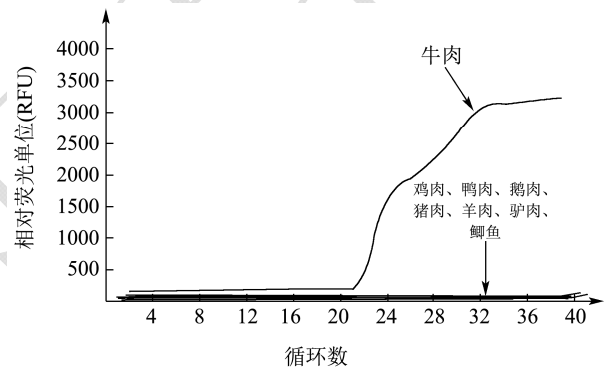


图 2 牛源性成分数字 PCR 方法特异性实验

Fig.2 Specificity of bovine-derived components by digital PCR

2.4 实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 检测方法的抗干扰性

抗干扰性

表 3 实时荧光定量 PCR 方法检测结果

Table 3 Real-time fluorescence quantitative PCR detection results

样品编号	实际牛肉含量/mg	实际其它肉类含量/mg	检测牛肉含量/mg	检测其它肉类含量/mg	检测误差/%
1	5	45	4.8	45.2	4
2	10	40	10.1	39.9	1
3	15	35	14.9	35.1	0.7
4	20	30	19.9	30.1	0.5
5	25	25	24.8	25.2	0.8
6	30	20	30.2	19.8	0.67
7	35	15	34.9	15.1	0.28
8	40	10	40.2	9.8	0.5
9	45	5	44.8	5.2	0.5
10	50	0	50	0	0

表4 数字PCR方法检测结果

Table 4 Detection results of digital PCR

样品编号	实际牛肉含量/mg	实际其它肉类含量/mg	检测牛肉含量/mg	检测其它肉类含量/mg	检测误差/%
1	5	45	5.2	44.8	3.8
2	10	40	10.2	39.8	1.9
3	15	35	15.3	34.7	1.9
4	20	30	19.7	30.3	1.5
5	25	25	25.3	24.7	1.1
6	30	20	30.3	19.7	0.1
7	35	15	35.2	14.8	0.56
8	40	10	40.3	9.7	0.74
9	45	5	44.9	5.1	0.22
10	50	0	50	0	0

为了进一步验证实时荧光定量PCR和数字PCR检测方法的有效性,将对实时荧光定量PCR和数字PCR检测方法的抗干扰性进行验证,结果见表3、4。

分析表3和表4中的数据可知,同样选取十种样本,并且样本的实际牛肉含量、实际其它肉类含量、检测牛肉含量以及检测其它肉类含量基本保持一致,在这种情况下,实时荧光定量PCR检测方法除了对样本1和样本2进行检测时,检测误差相对较大,除此之外,检测误差均低于1%,误差率较低;数字PCR检测方法虽然检测误差较实时荧光定量PCR检测方法的检测误差较大,但是其检测误差也处于较低水平。上述数据说明两种方法均不受其他肉类样品干扰,实时荧光定量PCR与数字PCR检测方法都可实现不同肉制品中牛源性成分定量检测^[18]。

2.5 实时荧光定量PCR和数字PCR检测肉制品中牛源性成分结果

表5 实时荧光定量PCR方法检测结果

Table 5 Detection results of real-time fluorescence quantitative PCR

样品序号	样品名称	测定含量/%
1	牛肉酱	99.57
2	牛肉罐头	98.95
3	牛肉粒	97.85
4	爆牛肉片	98.52
5	腌熏牛肉	97.52
6	牛肉味香肠	54.28
7	牛肉灌肠	87.95
8	牛肉干	32.48
9	午餐肉	48.59
10	牛肉丸	0

表6 数字PCR方法检测结果

Table 6 Detection results of digital PCR

样品序号	样品名称	测定含量/%
1	牛肉酱	99.87
2	牛肉罐头	98.62
3	牛肉粒	97.72
4	爆牛肉片	98.11
5	腌熏牛肉	96.98
6	牛肉味香肠	52.19
7	牛肉灌肠	89.58
8	牛肉干	33.18
9	午餐肉	46.48
10	牛肉丸	0

以上述实验结果为基础,运用两种方法检测市面上十种肉制成品牛源性成分含量,结果见表5、6。

通过表5与表6可以看出,运用实时荧光定量PCR和数字PCR两种检测方法对十种样本进行牛源性成分检测时,各种食品的牛源性成分含量均有所不同,但是两种方法的结果大致相同,说明检测结果具有可靠性。在检测结果中,可以看出运用两种均没有检测出样品10牛肉丸中牛源性成分,因此说明该牛肉丸中并无牛肉成分^[19],说明市面上确实存在假肉情况,也验证了两种方法的检测结果的准确性。

3 结论

通过对牛肉单拷贝 β -actin基因组特异区域合成了基因序列特异性引物与探针,利用该引物与探针通过实时荧光定量PCR方法和数字PCR方法对实验材料中肉制品中牛源性成分进行检测。结果表明,两种方法可准确检测出肉制品中牛源性成分含量,不受其他肉类干扰;对市面上十种牛肉制品进行牛源性检测,检测到部分牛肉制品不存在牛源性成分,说明了市面

上确实存在假肉现象,说明实时荧光定量 PCR 与数字 PCR 检测方法都可实现不同肉制品中牛源性成分定量检测,是有效的肉制品中牛源成分检测方法。

参考文献

- [1] 林彦星,张彩虹,阮周曦,等.实时荧光定量 PCR 检测畜禽肉制品中鸭源性成分[J].动物医学进展,2016,37(11):48-53
LIN Yan-xing, ZHANG Cai-hong, RUAN Zhou-xi, et al. A real-time fluorescent PCR for detection of duck-derived ingredients in meat products of livestock and poultry [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(11): 48-53
- [2] 李洁,童锐,李向伟,等.实时荧光定量 PCR 法鉴别生鲜羊乳中牛源性成分[J].中国乳品工业,2016,44(10):38-39
LI Jie, TONG Rui, LI Xiang-wei, et al. Study on identification of bovine derived substance in raw ovine milk by real-time PCR assay [J]. China Dairy Industry, 2016, 44(10): 38-39
- [3] 高志强,汪琳,蒲静,等.双重实时荧光 PCR 定量检测动物产品中牛源性成分[J].生物技术通报,2018,34(9):190-194
GAO Zhi-qiang, WANG Lin, PU Jing, et al. Duplex real-time PCR methods for quantitative detection of bovine derived materials in animal products [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(9): 190-194
- [4] 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
- [5] 赵良娟,李宗梦,王淞,等.免疫磁珠-PCR 试纸条快速检测食品中牛源成分方法的建立[J].食品研究与开发,2018,39(3):127-131
ZHAO Liang-juan, LI Zong-meng, WANG Song, et al. Method of immunomagnetic separation and PCR-lateral flow dipstick for Fast detecting bovine ingredient in food [J]. Food Research and Development, 2018, 39(3): 127-131
- [6] 唐修君,樊艳凤,葛庆联,等.基于线粒体 DNA CO I 基因鉴别畜禽肉中鸡源性成分[J].肉类研究,2017,31(8):44-48
TANG Xiu-jun, FAN Yan-feng, GE Qing-lian, et al. Identification of chicken origin ingredients in livestock and poultry meat based on mitochondrial DNA COI gene [J]. Meat Research, 2017, 31(8): 44-48
- [7] 赵新,刘娜,陈锐,等.应用通用引物量化检测鲜肉及其制品中羊源性成分[J].食品研究与开发,2016,37(16):179-184
ZHAO Xin, LIU Na, CHEN Rui, et al. Quantitative detection method for ovine-derived materials in fresh meat and meat products using universal primer [J]. Food Research and Development, 2016, 37(16): 179-184
- [8] 高新桃,贾红,侯绍华,等.细胞因子 IL-17 作为牛结核病诊断标志物的研究及实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2018,45(6):1447-1453
GAO Xin-tao, JIA Hong, HOU Shao-hua, et al. Research on the potential of IL-17 as a biomarker of bovine tuberculosis and establishment of its real-time PCR assay [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(6): 1447-1453
- [9] 杨华,汪小福,肖英平,等.牛肉及其制品中掺入鸡肉、鸭肉和猪肉的多重数字 PCR 快速检测方法研究[J].浙江农业学报,2017,29(6):994-1000
YANG Hua, WANG Xiao-fu, XIAO Ying-ping, et al. Rapid detection of chicken, duck and pork blending in beef products by multiple digital PCR [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(6): 994-1000
- [10] 李建,高航飞,安维雪,等.牛支原体 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医学报,2017,37(6):1059-1064
LI Jian, GAO Hang-fei, AN Wei-xue, et al. The construction of the TaqMan real-time fluorescent quantitation PCR detection method for the Mycoplasma bovis [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37(6): 1059-1064
- [11] 吴迪,郭青.TaqMan 实时荧光定量 PCR 法检测紫河车掺伪的研究[J].中药材,2017,40(1):38-41
WU Di, GUO Qing. Detection of other animal species in placenta Hominis by using TaqMan real time PCR [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(1): 38-41
- [12] 刘文哲,牛明月,李秀云,等.光皮桦实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J].林业科学,2016,52(8):29-37
LIU Wen-zhe, NIU Ming-yue, LI Xiu-yun, et al. The selection of reference genes for quantitative PCR in *Betula luminifera* [J]. Forestry Science, 2016, 52(8): 29-37
- [13] 洗钰茵,易敏英,张璜,等.环介导等温扩增技术快速检测肉及肉制品中的牛源性成分[J].食品工业科技,2016,37(7):278-282
XIAN Yu-yin, YI Min-ying, ZHANG Huang, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of bovine in meat and meat products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(7): 278-282
- [14] 黄艳艳,高丹丹,许传田,等.鸡三种天然免疫相关受体和配体荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].动物医学进

- 展,2016,37(4):12-17
- HUANG Yan-yan, GAO Dan-dan, XU Chuan-tian, et al. Development and application of quantitative PCR assay for detection of three innate immunity-related cellular receptors and ligands in chickens [J]. *Advances in Animal Medicine*, 2016, 37(4): 12-17
- [15] 刘艳艳,霍胜楠,梁水美,等.化妆品中动物源性成分多重实时荧光 PCR 检测方法的研究[J].日用化学工业,2016,46(8): 479-484
- LIU Yan-yan, HUO Sheng-nan, LIANG Shui-mei, et al. Study of multiplex real - time fluorescent PCR detection method for animal originated components in cosmetics [J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2016, 46(8): 479-484
- [16] 冯波,郭前爽,毛必鹏.松墨天牛化学感受组织荧光定量 PCR 内参基因的鉴定与筛选[J].昆虫学报,2016,59(4):427-437
- FENG Bo, GUO Qian-shuang, MAO Bi-peng. Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-qPCR [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(4): 427-437
- [17] 白泉阳,徐磊,傅光华,等.检测猪源牛病毒性腹泻病毒荧光 RT-PCR 方法的建立与监测分析[J].福建农业学报,2017, 32(8):828-832
- BAI Quan-yang, XU Lei, FU Guang-hua, et al. Establishment and monitoring analysis of fluorescence RT-PCR for detection of bovine viral diarrhea virus in swine [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32(8): 828-832
- [18] 程月花,陆利霞,李壹,等.PCR 法检测鱼及其制品中的鱼源性成分[J].食品科学,2017,38(20):286-292
- CHENG Yue-hua, LU Li-xia, LI Yi, et al. Establishment of PCR method for detection of fish-derived ingredients in fish and fish products [J]. *Food Science*, 2017, 38(20): 286-292
- [19] 林露,严维凌,朱祖琪,等.实时荧光 PCR 技术快速检测混合肉制品中牛肉含量[J].中国食品学报,2016,16(3):152-159
- LIN Lu, YAN Wei-ling, ZHU Zhu-qi, et al. Fast quantitative detection of beef meat in meat mixtures using real-time fluorescence PCR [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(3): 152-159
-
- (上接第 300 页)
- [5] 刘莉莉,蒲亦非,周激流,等.基于分数阶微积分图像处理技术的食品防伪溯源系统[J].成都大学学报(自然科学版), 2015,34(1):56-58
- LIU Li-li, PU Yi-fei, ZHOU Ji-liu, et al. Anti-counterfeit and traceability system for food and drug based on fractional calculus image processing technique [J]. *Journal of Chengdu University (Natural Science)*, 2015, 34(1): 56-58
- [6] 闫丽梅,祝玉松,徐建军,等.基于分数阶微积分理论的线路模型建模方法[J].电工技术学报,2014,29(9):260-268
- YAN Li-mei, ZHU Yu-song, XU Jian-jun, et al. Transmission lines modeling method based on fractional order calculus theory [J]. *Transactions of China Electrotechnical Society*, 2014, 29(9): 260-268
- [7] 陈安,邢航.基于反馈放大器的微积分电路设计研究仿真[J].计算机仿真,2017,34(6):213-217
- CHEN An, XING Hang. Research and simulation of circuit design based on feedback amplifier [J]. *Computer Simulation*, 2017, 34(6): 213-217
- [8] Bai L, Ning X, Zhao Y, et al. Dual-mode emission of single-layered graphene quantum dots in confined nanospace: Anti-counterfeiting and sensor applications [J]. *Nano Research*, 2018, 11(4): 2034-2045
- [9] 赵丹,杜仁鹏,刘鹏飞,等.代谢组学技术在植物源性食品研究中的应用研究进展[J].食品科学,2015,36(3):212-216
- ZHAO Dan, DU Ren-peng, LIU Peng-fei, et al. A review of applications of metabolomics techniques in plant-derived food research [J]. *Food Science*, 2015, 36(3): 212-216
- [10] Li D, Tang L, Wang J, et al. Multidimensional SERS barcodes on flexible patterned plasmonic metafilm for anticounterfeiting applications [J]. *Advanced Optical Materials*, 2016, 4(10): 1475-1480
- [11] 张晟昱,刘焱,刘伦伦,等.发酵食品可追溯管理研究进展[J].中国酿造,2016,35(4):7-10
- ZHANG Sheng-yu, LIU Yan, LIU Lun-lun, et al. Research progress on fermented food traceability management [J]. *China Brewing*, 2016, 35(4): 7-10