

实时荧光 PCR 法鉴定野生食用菌中白牛肝菌成分

陈丽萍¹, 赵迎春², 李 芳¹, 戚思杰³, 范效英¹, 丁元明^{1*}

(1. 昆明海关技术中心, 昆明 650200; 2. 云南省食品药品监督检验研究院, 昆明 650106;
3. 西南林业大学化学化工学院, 昆明 650224)

摘要: 目的 建立野生食用菌中白牛肝菌(*Boletus bainiugan* Dentinger)成分的荧光 PCR 检测方法。**方法** 根据白牛肝菌的内源转录间隔区(internally transcribed spacer, ITS)基因序列设计白牛肝菌物种的特异性引物和探针, 对样品中的靶标基因片段进行检测, 并进行物种特异性检测、稳定性检测、灵敏度检测和实际应用检测。**结果** 通过对供试的 24 种食用菌、动、植物材料进行检测, 只有白牛肝菌出现特异性扩增, 说明方法具有物种特异性; 方法对白牛肝菌成分的检测灵敏度为 1×10^{-4} ng/ μ L 白牛肝菌 DNA 或 0.1%(m/m)白牛肝菌粉。**结论** 该方法简单、灵敏、快速、准确, 能应用于野生食用菌和食品中白牛肝菌的成分检测。

关键词: 野生食用菌; 白牛肝菌; 实时荧光 PCR

Identification of *Boletus bainiugan* Dentinger in wild edible fungi by real-time fluorescence PCR

CHEN Li-Ping¹, ZHAO Ying-Chun², LI Fang¹, QI Si-Jie³, FAN Xiao-Ying¹, DING Yuan-Ming^{1*}

(1. Technical Center of Kunming Customs District, Kunming 650200, China; 2. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106, China; 3. College of Chemical Engineering of Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for identification of *Boletus bainiugan* Dentinger ingredients in wild edible fungus by real-time fluorescence PCR. **Methods** Specific primers and probe were designed according to highly conserved sequence of internally transcribed spacer (ITS) gene of *Boletus bainiugan* Dentinger to test the target gene fragment in the samples, and the specificity, sensitivity and practical application test were carried out. **Results** The specificity of the method was verified, and only *Boletus bainiugan* Dentinger had specific amplification among 24 kinds of tested edible fungus, animal and plant materials. The limit of detection was 1×10^{-4} ng/ μ L *Boletus bainiugan* Dentinger DNA or 0.1% (m/m) *Boletus bainiugan* Dentinger powder. **Conclusion** This method is simple, sensitive, fast and accurate, which can be used for the identification of *Boletus bainiugan* Dentinger ingredients in wild edible fungus and foods.

KEY WORDS: wild edible fungus; *Boletus bainiugan* Dentinger; real-time fluorescence PCR

1 引言

白牛肝菌(*Boletus bainiugan* Dentinger), 俗称美味牛

肝菌, 是菌物界(中担子菌亚门(Basidiomycotina)的重要类群, 属牛肝菌科(Boletineae), 牛肝菌属(*Boletus*)^[1-3]。白牛肝菌营养丰富, 药用价值高, 长期食用能增强机体免疫能

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2017YFF0211300, 2017YFF0211301)

Fund: Supported by the “13th Five-year Plan” National Key Research and Development Plan (2017YFF0211300, 2017YFF0211301)

*通讯作者: 丁元明, 研究员, 主要研究方向为物种鉴定。E-mail: 1583695848@qq.com

*Corresponding author: DING Yuan-Ming, Professor, Technical Center of Kunming Customs District, Kunming 650200, China. E-mail: 1583695848@qq.com

力、具有抗肿瘤、抗突变、降血脂、抗病毒等作用^[4,5]。该菌菌体较大,肉肥厚,柄粗壮,食味香甜可口,菌肉厚而细软,是一种世界性著名野生食用菌^[6]。

中国牛肝菌资源非常丰富,在中国发现的具菌管或具菌褶的牛肝菌目的种类多达 390 种以上,其中 199 种是可食用的,以云南的种类为最多,有 219 种,占总种数的 55.2%^[7]。得天独厚的气候和土壤等条件,使得云南成为中国乃至世界野生菌物种最丰富的地区^[8]。作为全国野生菌自然产量和贸易量最大的省份,世界野生菌贸易的主要出产地,云南省大力发展食用菌产业,食用菌产业也成为近年来云南农业经济中的支柱产业^[8]。在国际市场上,订购需求巨大的菌类为:松茸、白牛肝菌、块菌、羊肚菌、鸡油菌,这些菌类产品主要销售至日本和欧盟,其中,云南的白牛肝菌主要外销欧盟,在整体野生菌产业链中所占的比重非常大,是对外贸易,外汇增收的主打产品之一^[9,10]。

在经济利益的驱使下,一些不法商家在食品的加工及售卖过程中,常常替代或掺入价格低廉的原料,甚至根本不添加标识的原料成分,造假掺假以次充好的情况存在。这不仅损害了消费者健康,还影响食品行业的健康发展。因此建立一种快速地野生食用菌中白牛肝菌成分很有必要。

荧光 PCR 具有特异性高、快速简便、结果判断直观的特点,已有文献报道关于肉类、坚果类、水果类、乳制品等成分的荧光 PCR 检测方法^[10-15],目前国内外未见有白牛肝菌成分的荧光 PCR 鉴定方法以及标准化的检测方法。本研究建立一种白牛肝菌(*Boletus bainiugan* Dentinger)成分的荧光 PCR 鉴定检测方法,旨在为食品中白牛肝菌成分的检测提供准确的技术依据。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

2.1.1 样品来源

白牛肝菌(*Boletus bainiugan* Dentinger)新鲜子实体,其他野生食用菌新鲜子实体样品:黄褐牛肝菌(*Baorangia pseudocalopus* (Hongo) G. Wu & Zhu L. Yang)、琥珀乳牛肝菌(*Suillus placidus* (Bonord.) Singer)、紫牛肝菌(*Suillellus subamygdalinus* Kuan Zhao & Zhu L. Yang)、白葱菌(*Butyriboletus roseoflavus* (Hai B. Li & Hai L. Wei) D. Arora & J.L. Frank)、红粉牛肝菌(*Pulveroboletus subrufus* N.K. Zeng & Zhu L. Yang)、黑牛肝(*Neoboletus obscureumbrinus* (Hongo) N.K. Zeng, H. Chai & Zhi Q. Liang)、见手青(*Lanmaoa asiatica* G. Wu & Zhu L. Yang)、鸡枞(*Termitomyces eurhizus* (Berk.) R. Heim)、羊肚菌(*Morchella esculenta*)、黑块菌(*Tuber excavatum* Vittad.)、虎掌菌(*Albatrellus confluens* (Alb. & Schwein.) Kotl. & Pouzar)、松茸(*Tricholoma matsutake*(Ito et Imai)Singer)、姬

松茸(*Agaricus blazei*)(云南省各野生菌农贸市场,均由中科院昆明植物研究所进行物种鉴定作为本研究样品)。

常见白牛肝菌制品:真空冻干白牛肝菌、速冻白牛肝菌、白牛肝菌菌粉、白牛肝菌干片、速冻美味牛肝菌块(野生菌出口企业昆明春鸾商贸有限公司)。

其他常见动植物材料有小麦粉、白菜、饼干、牛肉粉、花生、核桃。以上实验材料均为市售,用于白牛肝菌的特异性检测以及灵敏度的检测。

2.1.2 试剂与仪器

商品化基因组提取试剂盒(美国 Promega 公司);实时荧光 PCR 混合液(2× AceQ U+ Probe Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司)。

ABI7500 定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);Eppendorf Centrifuge 5417R 台式高速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Promega MX3031 全自动核酸提取系(美国 Promega 公司);GE GeneQuant 100 核酸蛋白含量测定仪(英国 BIOCHROM 公司);LE204E/02 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2.2 实验方法

2.2.1 样品的制备

将各类白牛肝菌样品以及其他野生菌样品,用研钵研磨均匀,用于物种特异性检测。

用小麦粉配制 100%、10%、1%、0.1%、0.01%(m/m)不同含量的白牛肝菌的 1 g 预混样品;用白葱菌和紫牛肝菌配制 100%、10%、1%、0.1%、0.01%(m/m)不同含量的白牛肝菌的 1 g 预混样品;将白牛肝菌用白菜、饼干、牛肉粉、花生、核桃分别配制成白牛肝菌质量分数为 10%、1%、0.1%的混合样品。使用研钵将上述各种混合样品充分混匀,分别提取 DNA,进行灵敏度测试。

2.2.2 DNA 的提取

使用基因组提取试剂盒提取样品中的 DNA,提取方法详见试剂盒操作说明书。使用核酸蛋白含量测定仪检测提取的 DNA,分别计算 DNA 的纯度和浓度,计算见式(1)、(2):

(1)DNA 纯度 = OD_{260} / OD_{280} ; (注: OD 表示最大吸收峰)

(2)双链 DNA 浓度($ng/\mu L$) = $50 \times OD_{260}$

在波长 260 nm 处测定的 OD 值记为 OD_{260} ,在波长 280 nm 处测定的 OD 值记为 OD_{280} , $1OD_{260}$ 相当于 50 $\mu g/mL$ 双链 DNA,当 DNA 纯度控制在 1.8 ~ 2.0 之间时, DNA 模板适宜于 PCR 扩增。

2.2.3 引物和探针序列

比对白牛肝菌及近似物种 ITS 基因序列,设计白牛肝菌物种鉴别的靶序列设计引物及探针序列。正向引物:5'-TCCAGAACGTATACATACA-3',反向引物:5'-TCCAGAACGTATACATACA-3',探针:5'-(HEX)ACGGATCTCTT

GGCTCTCGC(Eclipse)-3'。

采用 18SrRNA 真核生物通用引物鉴定所提取的动植物样品的 DNA 提取质量。18SrRNA 引物序列为: 正向引物: 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'; 反向引物: 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'; 探针: 5'-(FAM)-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTC CGGAATCGAACC-(TAMRA)-3'。

2.2.4 实时荧光 PCR 反应

实时荧光 PCR 采用 25 μL 反应体系: 2 \times PCR 反应预混液 12.5 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 探针(5 $\mu\text{mol/L}$)1 μL , 模板 DNA(10~100 ng/ μL) 2.0 μL , 去离子水补足体系。扩增条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 40 个循环。使用实时荧光 PCR 仪进行定性检测。

3 结果与分析

3.1 真核生物特异引物 18SrRNA 引物的检测结果

用真核生物 18S rRNA 通用引物扩增本实验提取的所有样品 DNA 溶液, 所有样品 DNA 溶液均出现扩增曲线, 说明用于白牛肝菌成分特异性检测和方法实际应用的样品 DNA 溶液均适合于 PCR 测试(图 1)。

3.2 白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 特异性检测

使用白牛肝菌引物和探针对待试的所有样品进行实时荧光 PCR 检测。只有白牛肝菌新鲜子实体和白牛肝菌制品出现明显的扩增曲线, C_t 值范围为 16~18, 其他样品均无扩增检测结果(图 2), 不同物种间没有交叉反应。说明该检测方法具有物种特异性。

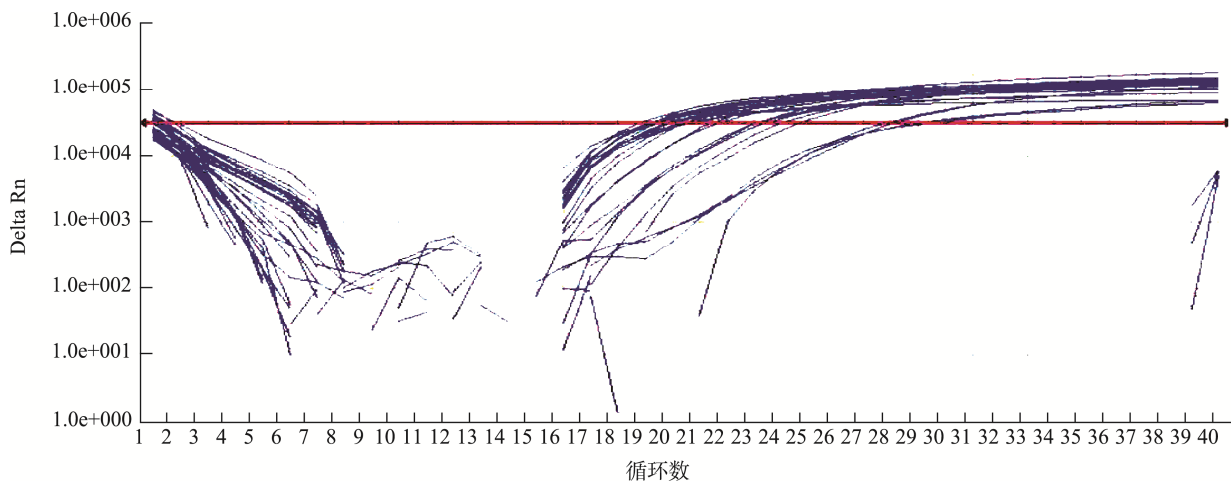
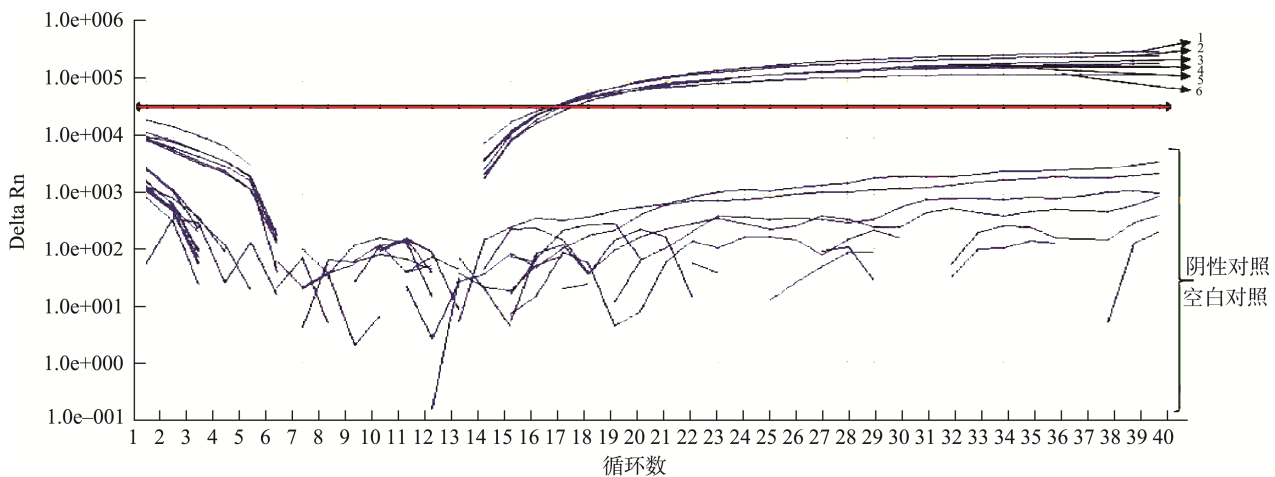


图 1 24 种真核生物样品 18SrRNA 引物的检测结果

Fig.1 Results of 18SrRNA primers in 24 samples of eukaryotes



注: 箭头所指 1: 白牛肝菌新鲜子实体; 2: 真空冻干白牛肝菌; 3: 速冻白牛肝菌; 4: 白牛肝菌菌粉; 5: 白牛肝菌干片; 6: 速冻美味牛肝菌块; 阴性对照: 黄褐牛肝菌、琥珀乳牛肝菌、紫牛肝菌、白葱菌、红粉牛肝菌、黑牛肝、见手青、鸡枞、羊肚菌、黑块菌、虎掌菌、松茸、姬松茸、小麦粉、白菜、饼干、牛肉粉、花生、核桃; 空白对照: ddH₂O。

图 2 白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 特异性检测检测结果

Fig.2 Result of specific detection for *boletus bainiugan* Dentinger ingredients by real-time PCR

3.3 白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 检测灵敏度

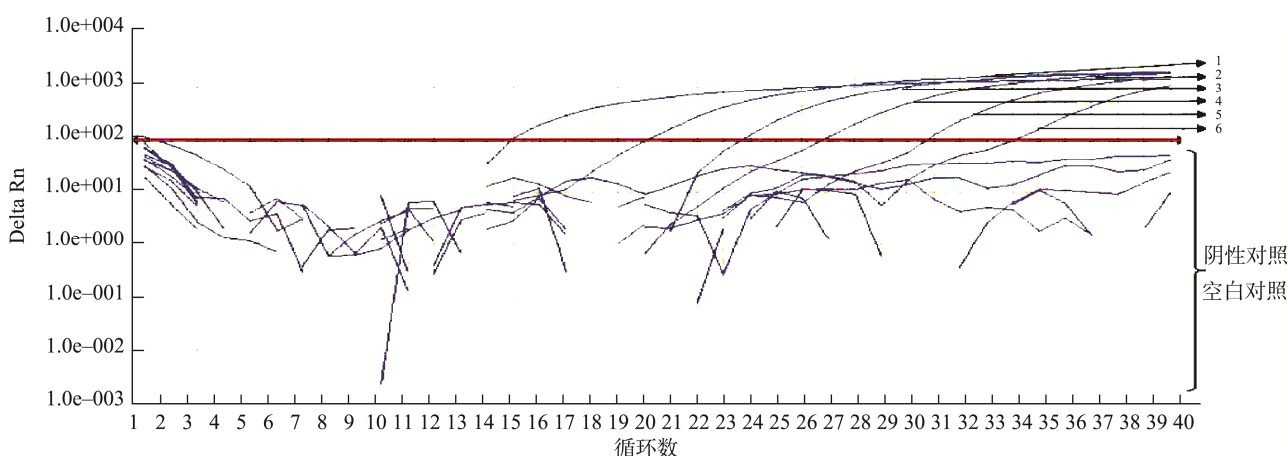
用 ddH₂O 对 100 ng/μL 白牛肝菌 DNA 溶液进行梯度稀释, 配成 100、1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001 ng/μL 的白牛肝菌 DNA 溶液, 使用白牛肝菌成分引物和探针白牛肝菌的 DNA 系列溶液进行检测。100、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 ng/μL 白牛肝菌 DNA 均出现扩增, 而 0.00001 ng/μL 的白牛肝菌的 DNA 未出现扩增。实验表明, 白牛肝菌检测方法的灵敏度为 0.0001 ng/μL 白牛肝菌 DNA(图 3)。

用小麦粉、白葱菌和紫牛肝菌 10 倍系列混合配制不同含量的白牛肝菌粉样品, 白牛肝菌质量浓度分别为 100%、10%、1%、0.1%、0.01%。使用白牛肝菌成分引物

和探针针对不同白牛肝菌含量的样品 DNA 进行检测。100%、10%、1%、0.1%白牛肝菌出现扩增(图 4~5), 0.01%白牛肝菌未出现扩增。实验表明, 白牛肝菌检测方法的灵敏度为 0.1%白牛肝菌粉(m/m)。

3.4 白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 重复性检测

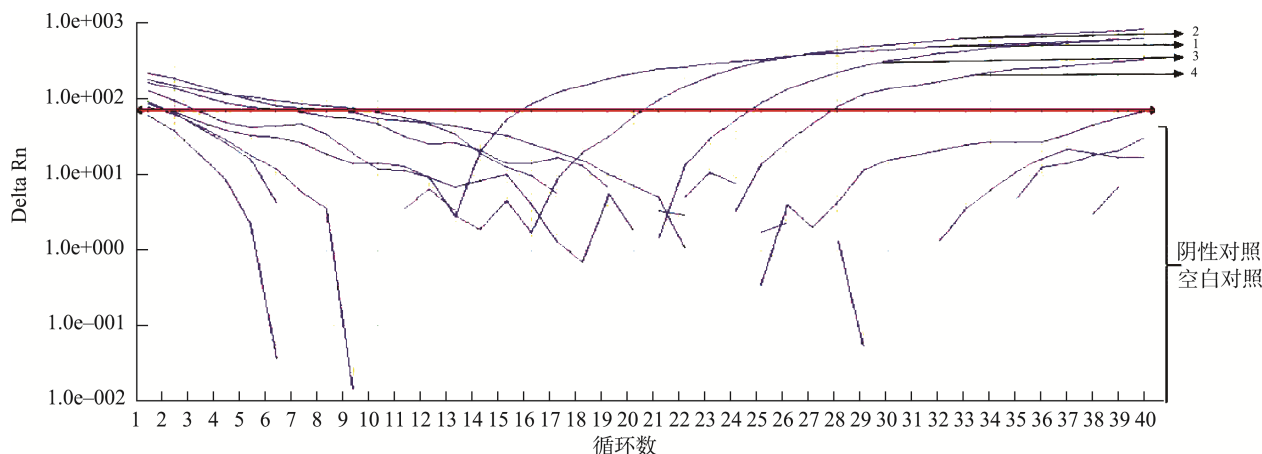
将系列稀释的浓度为 100、10、1 ng/μL 的白牛肝菌 DNA 使用实时荧光 PCR 进行检测, 每个稀释度重复 6 管, 重复测定 2 次, 结果如表 1 所示。由表 1 可知用该方法检测的批内和批间变异系数分别为 0.46%~2.85%和 1.54%~2.98%, 说明该方法具有较好的可重复性和再现性。



注: 箭头所指 1~6 分别为 100、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 ng/μL 浓度的白牛肝菌 DNA; 阴性对照: 鸡枞、羊肚菌、黑块菌、虎掌菌、松茸、姬松茸; 空白对照: ddH₂O。

图 3 不同 DNA 浓度白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 检测灵敏度检测结果

Fig.3 Result of specific detection of *Boletus bainiugan* Dentinger with different DNA concentrations by real-time PCR



注: 箭头所指 1. 100%白牛肝菌; 2. 10%白牛肝菌; 3. 1%白牛肝菌; 4. 0.1%白牛肝菌; 阴性对照: 小麦粉、鸡枞、黑块菌、虎掌菌; 空白对照: ddH₂O。

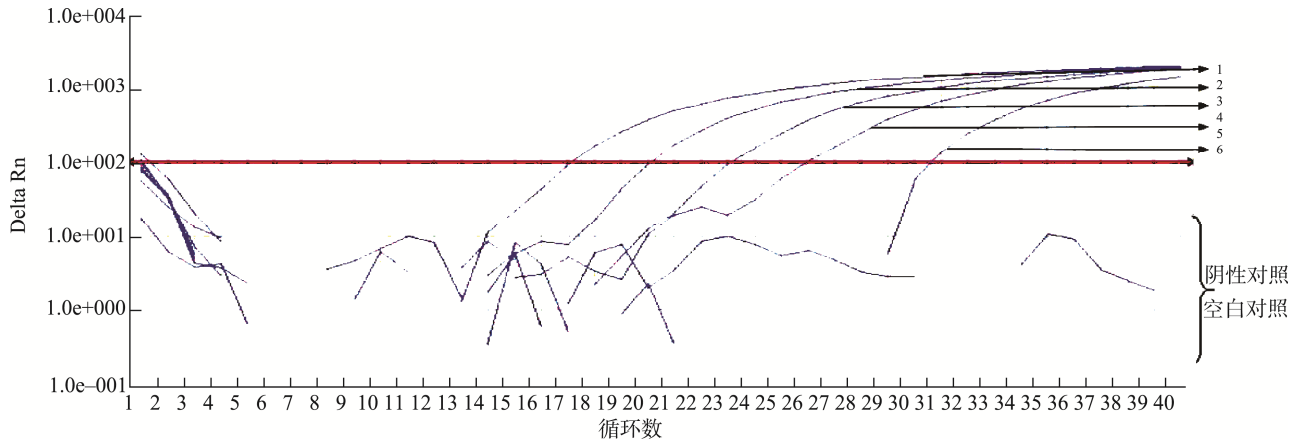
图 4 用小麦粉混合不同含量白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 检测灵敏度检测结果

Fig.4 Result of specific detection of *Boletus bainiugan* Dentinger with different contents mixed with wheat flour mixed by real-time PCR

3.5 不同基质的白牛肝菌成分检测

用白菜、饼干、牛肉粉、花生、核桃将白牛肝菌分别制成质量分数为 10%、1%、0.1%白牛肝菌混合样品。使用白牛肝菌成分引物和探针对提取的白牛肝菌混合样品

DNA 进行检测。检测结果显示, 所有混样 DNA 均出现扩增(图 6~8)。实验表明, 该方法适用于动植物加工产品, 且检测灵敏度达到 0.1%白牛肝菌(m/m)。



注: 箭头所指 1. 100%白牛肝菌; 2. 10%白牛肝菌; 3. 1%白牛肝菌; 4. 0.1%白牛肝菌; 5. 0.01%白牛肝菌; 阴性对照: 白葱菌、紫牛肝菌; 空白对照: ddH₂O。

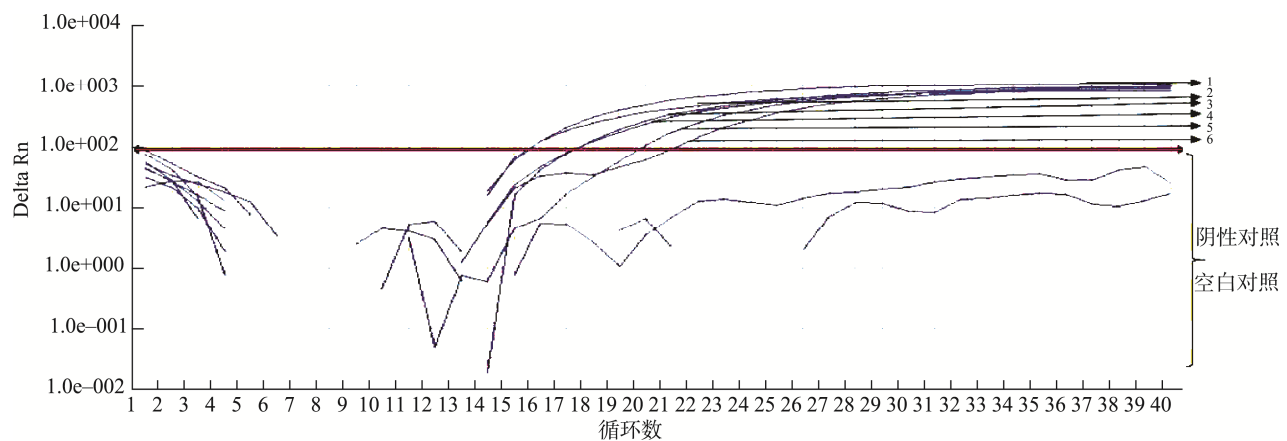
图 5 用白葱菌和紫牛肝菌混合不同含量白牛肝菌成分的实时荧光 PCR 检测灵敏度检测结果

Fig.4 Results of specific detection of *Boletus bainiugan* Dentinger with different content mixed with *Butyriboletus roseoflavus* and *Suillellus subamygdalinus* by real-time PCR

表 1 白牛肝菌实时荧光 PCR 重复性实验分析(%)

Table 1 Analysis of the repeatability of real-time fluorescent PCR in *Boletus bainiugan* Dentinger(%)

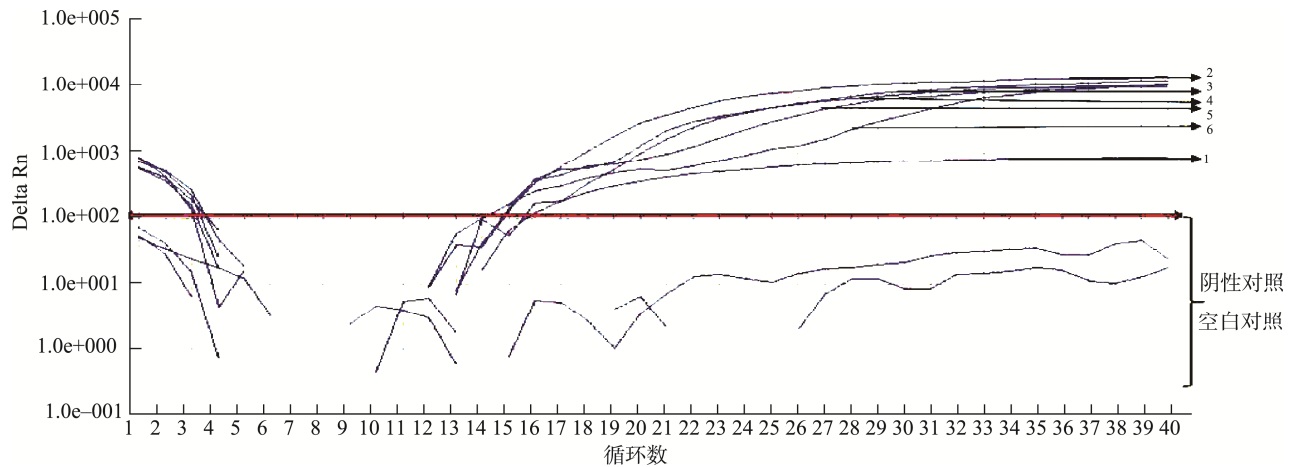
DNA 浓度	100 ng/ μ L		10 ng/ μ L		1 ng/ μ L	
批内变异系数	0.64	0.55	2.03	2.85	2.44	1.27
批间变异系数	1.54		2.56		2.98	



注: 箭头所指 1. 阳性对照; 2. 10%白牛肝菌-白菜; 3. 10%白牛肝菌-饼干; 4. 10%白牛肝菌-牛肉粉; 5. 10%白牛肝菌-花生; 6. 10%白牛肝菌-核桃; 阴性对照: 块菌; 空白对照: ddH₂O。

图 6 10%白牛肝菌成分不同基质的荧光 PCR 检测

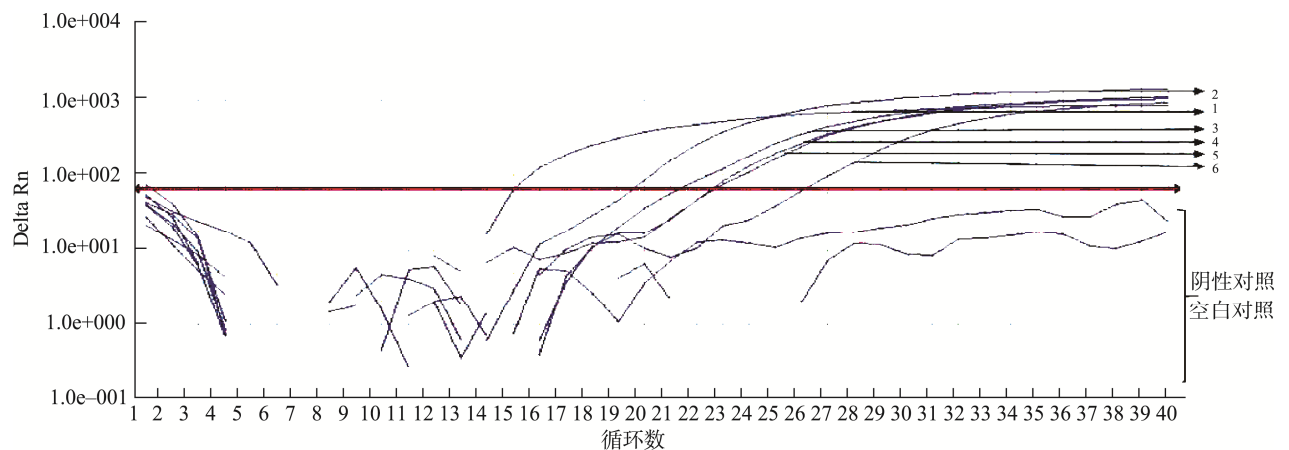
Fig.6 Real-time PCR detection of 10% *Boletus bainiugan* Dentinger in various matrixes



注: 箭头所指 1. 阳性对照; 2. 1%白牛肝菌-白菜; 3. 1%白牛肝菌-饼干; 4. 1%白牛肝菌-牛肉粉; 5. 1%白牛肝菌-花生; 6. 1%白牛肝菌-核桃; 阴性对照: 块菌; 空白对照: ddH₂O。

图 7 1%白牛肝菌成分不同基质的荧光 PCR 检测

Fig.7 Real-time PCR detection of 1% *Boletus bainiugan* Dentinger in various matrixes



注: 箭头所指 1. 阳性对照; 2. 0.1%白牛肝菌-白菜; 3. 0.1%白牛肝菌-饼干; 4. 0.1%白牛肝菌-牛肉粉; 5. 0.1%白牛肝菌-花生; 6. 0.1%白牛肝菌-核桃; 阴性对照: 块菌; 空白对照: ddH₂O。

图 8 0.1%白牛肝菌成分不同基质的荧光 PCR 检测

Fig.8 Real-time PCR detection of 0.1% *Boletus bainiugan* Dentinger in various matrixes

4 结论与讨论

本研究通过验证样品的真实代表性、测试样品 DNA 质量、验证样品 DNA 无荧光 PCR 体系抑制物、测试白牛肝菌荧光 PCR 体系的物种特异性、测试白牛肝菌 DNA 浓度梯度稀释后的荧光 PCR 灵敏度、测试干扰性物质(小麦粉以及易混菌——白葱菌和紫牛肝菌)与白牛肝菌梯度混合后的荧光 PCR 灵敏度、测试白牛肝菌荧光 PCR 实验的重复性和稳定性、测试混合不同干扰基质(白菜、饼干、花生、牛肉粉、核桃)后的荧光 PCR 灵敏度,说明本文研究建立的野生食用菌中白牛肝菌成分实时荧光 PCR 检测方法,具有物种特异性,与对照组无交叉反应,检测灵敏度为白

牛肝菌粉 0.1%(m/m)和 1×10^{-4} ng/ μ L 白牛肝菌 DNA,建立的检测方法特异性强、灵敏度高,能准确应用于野生食用菌中白牛肝菌成分的定性检测,能够为出入境商品中有无白牛肝菌成分的快速鉴定、拓展国内外贸易所需的野生菌种类物种身份甄别、打造地方特色地理性标志产品等需求提供技术支撑,同时为食品中白牛肝菌成分检测的标准化提供了技术依据,为今后其他野生菌成分的鉴定提供一种技术参考。

参考文献

[1] 邓百万, 陈文强, 刘开辉, 等. 美味牛肝菌的研究现状及应用展望[J]. 中国食用菌, 2012, 31(4): 8-11.

- Deng BW, Chen WQ, Liu KH, *et al.* The status and application prospects of *Boletus edulis* [J]. *Edible Fungi China*, 2012, 31(4): 8–11.
- [2] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 1–21.
Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, *et al.* A revised checklist of edible fungi in China [J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 1–21.
- [3] 余金凤, 陈正启, 周汐, 等. 云南省美味牛肝菌的遗传多样性分析[J]. *北方园艺*, 2018, (6): 139–144.
Yu JF, Chen ZQ, Zhou Xi, *et al.* Genetic diversity analysis of flavor *Boletus* from Yunnan province [J]. *North Horticulture*, 2018, (6): 139–144.
- [4] 邓加聪, 曾锈华, 陈婕, 等. 牛肝菌多糖的提取及抗氧化性研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(10): 158–161.
Deng JC, Zeng RW, Chen J, *et al.* Extraction and antioxidant activity of polysaccharide from *Boletus* [J]. *Chin Brew*, 2019, 38(10): 158–161.
- [5] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. *菌物学报*, 2008, (6): 801–824.
Dai YC, Yang ZL. A revised checklist of medicinal fungi in China [J]. *Mycosystema*, 2008, (6): 801–824.
- [6] 顾可飞, 李亚莉, 刘海燕, 等. 牛肝菌、羊肚菌营养功能特性及利用价值浅析[J]. *食品工业*, 2018, 39(5): 287–291.
Gu KF, Li YL, Liu HY, *et al.* Initial analysis on the nutritional and functional properties and utilization of *Bolete* and *Toadstool* [J]. *Food Chem*, 2018, 39(5): 287–291.
- [7] 杨祝良. 野生菌王国-云南野生食用菌的物种多样性[C]. 中国科学院微生物研究所、中国菌物学会、楚雄州林业局、云南省南华县人民政府, 2016: 1.
Yang ZL. Species Diversity of Wild Edible Fungi in Wild Fungi Kingdom-Yunnan [C]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences Mycological Society of China, Forestry in Chuxiong Prefecture, people's government of Nanhua county, Yunnan province. the wild mushroom conference Nanhua China, 2016: 1.
- [8] 张良, 张黎. 云南野生菌产业发展的调研思考[J]. *林业建设*, 2019, (1): 46–49.
Zhang L, Zhang L. Consideration on development of wild mushroom industry in Yunnan province [J]. *Forest Constr*, 2019, (1): 46–49
- [9] 刘冬梅, 李俊生, 肖能文. “一带一路”倡议下云南生物遗传资源保护与可持续利用[J]. *环境与可持续发展*, 2018, 43(5): 108–111.
Liu DM, Li JS, Xiao NW. One belt, one road initiative, Yunnan's protection and sustainable utilization of genetic resources in biology [J]. *Environ Sus Dev*, 2018, 43(5): 108–111.
- [10] 熊永生. 昆明野生食用菌资源保护与利用发展对策研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
Xiong YS. Studies on strategies and countermeasures of Kunming wild edible fungi resource protection and utilization [D]. Beijing Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [11] 程欣, 何玮玲, 黄明. 实时荧光 PCR 法检测食品中鸭肉成分[J]. *食品科学*, 2013, 34(24): 92–96
Cheng X, He WL, Huang M. Establishment and application of fluorescent real-time PCR for the detection of duck meat in foods [J]. *Food Sci*, 2013, 34(24): 92–96
- [12] 王凤军, 叶素丹, 包永华, 等. 多重实时荧光 PCR 快速检测转基因大豆及其加工产品[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(9): 135–141.
Wang FJ, Ye SD, Bao YH, *et al.* Establishment of a multiplex fluorescence quantitative PCR for detection of genetically modified soybeans and processed products [J]. *J Chin Cere Oil Ass*, 2018, 33(9): 135–141.
- [13] 蒋丹, 刘淑燕, 徐君怡, 等. 巴西果仁致敏原的实时荧光 PCR 检测[J]. *分子科学学报*, 2009, 25(4): 294–296.
Jiang D, Liu SY, Xu JY, *et al.* Detection of brazil nut allergen by real-time PCR [J]. *J Mol Sci*, 2009, 25(4): 294–296.
- [14] 李富威, 张舒亚, 叶军, 等. 食品中木瓜成分实时荧光 PCR 检测方法[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(11): 51–56.
Li FW, Zhang SY, Ye J, *et al.* Real-time PCR for the detection papaya ingredients in food [J]. *Food Res Dev*, 2013, 34(11): 51–56.
- [15] 李富威, 张舒亚, 曾庆坤, 等. 乳制品中水牛乳成分的实时荧光 PCR 检测技术[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(2): 247–252.
Li FW, Zhang SY, Zeng QK, *et al.* Real-time PCR Detection for buffalo(*Bubalus bubalus*) ingredients in dairy products [J]. *J Agric Biotechnol*, 2013, 21(2): 247–252.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



陈丽萍, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为物种鉴定。
E-mail: 55490875@qq.com



丁元明, 研究员, 主要研究方向为物种鉴定。
E-mail: 1583695848@qq.com