

肉制品中鸭源性成分 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用

刘立兵^{1#}, 陈敏娜^{1#}, 付琦¹, 项佳林¹, 王金凤¹, 苗丽², 孙晓霞¹,
艾连峰¹, 王建昌^{1*}

(1. 石家庄海关技术中心, 石家庄 050051; 2. 郑州海关技术中心, 郑州 450000)

摘要: **目的** 建立 TaqMan 探针实时荧光 PCR 法快速检测肉制品中鸭源性成分的分析方法。**方法** 以鸭生长激素(growth hormone, GH)基因为靶基因, 基于特异性保守序列设计引物和 TaqMan 探针, 优化反应体系和反应条件, 建立了鸭源性成分实时荧光 PCR(real-time PCR)检测方法。**结果** 所建立的 real-time PCR 方法特异性强, 仅对鸭基因组 DNA 出现特异性扩增曲线, 对牛、羊、猪等其他异源性动物基因组 DNA 均无扩增曲线; 灵敏度高, 以鸭基因组 DNA 为模板, 检出限为 1.0 pg; 重复性好, 不同浓度基因组 DNA 测定的 Ct 值变异系数小于 4%。使用建立的 real-time PCR 方法对 200 份市售肉制品进行检测, 在 11 份肉制品中检出鸭源性成分, 同现行行业标准 SN/T 3731.5—2013 检测结果一致。**结论** 本研究所建立的 real-time PCR 方法检测具有特异性强、敏感性高、快速高效等特点, 适用于肉制品中鸭源性成分快速检测。

关键词: 鸭源性成分; 生长激素基因; 实时荧光 PCR; 快速检测

Development and application of a TaqMan real-time PCR assay for rapid detection of duck-derived ingredients in meat products

LIU Li-Bing^{1#}, CHEN Min-Na^{1#}, FU Qi¹, XIANG Jia-Lin¹, WANG JIN-Feng¹, MIAO Li²,
SUN Xiao-Xia¹, AI Lian-Feng¹, WANG Jian-Chang^{1*}

(1. Technology Center of Shijiazhuang Customs, Shijiazhuang, 050051, China;
2. Technology Center of Zhengzhou Customs, Zhengzhou, 450000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid detection method for duck-derived ingredients in meat products by a TaqMan real-time PCR assay. **Methods** Duck growth hormone (GH) gene was used as the target gene, and a real-time PCR method for the detection of duck-derived ingredients was established by designing primers and TaqMan probes based on specific conservative sequences and optimizing the reaction system and reaction conditions. **Results** The established real-time PCR method had strong specificity, only showed a specific amplification curve for duck genomic DNA, and had no amplification curve for genomic DNA of other heterologous animals such as

基金项目: 国家重点研发计划“科技冬奥”重点专项(2020YFF0305000)

Fund: Supported by the National Key R & D Plan Science and Technology Winter Olympics Key Special Projects (2020YFF0305000)

#刘立兵和陈敏娜为共同第一作者。

LIU Li-Bing and CHEN Min-Na are Co-first Authors.

*通信作者: 王建昌, 正高级兽医师, 主要研究方向为动物源性食品掺假、食源性致病菌的分子生物学检测研究。E-mail: jianchangwang1225@126.com

*Corresponding author: WANG Jian-Chang, Senior Veterinarian, Technology Center of Shijiazhuang Customs, No.318, Heping Road, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: jianchangwang1225@126.com

cattle, sheep, pig, and so on. It had high sensitivity, using duck genomic DNA as template, and the detection limit was 1.0 pg; the repeatability was good, and the coefficient of variation of Ct value determined by different concentrations of genomic DNA was less than 4%. A total of 200 commercial meat products were detected using the established real-time PCR method, and duck-derived ingredients were detected in 11 meat products, which were consistent with the detection results in the current industry standard SN/T 3731.5—2013. **Conclusion** The real-time PCR method established in this study has the characteristics of strong specificity, high sensitivity, rapidity and high efficiency, and is suitable for rapid detection of duck-derived ingredients in meat products.

KEY WORDS: duck-derived ingredients; growth hormone gene; real-time PCR; rapid detection

0 引言

随着人们生活水平质量的提高, 大众对肉制品的需求也逐渐增多, 但是国内外市场曝光的肉类掺假事件也多有报道, 如用鸭肉冒充牛羊肉、马肉冒充牛肉或驴肉、猪血替代鸭血等, 从而引发了公众对食品安全和食品欺诈的担忧。部分不法商贩和企业为获得高额利润掺假售假的行为, 不仅给消费者和市场带来经济损失, 还可能造成诸多的安全隐患和民族风俗问题^[1-3]。因此, 建立快速有效的肉制品中动物源性成分检测方法, 实现对肉制品中物种成分的快速鉴定, 对肉制品行业监督管理有重要的意义。

目前国内外对肉制品中动物源性成分的检测主要是针对物种特异性靶基因的核酸检测方法, 主要包括普通 PCR、实时荧光 PCR、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和重组酶介导等温扩增(recombinase-aided amplification, RAA)方法等^[4-10]。Real-time PCR 方法具有特异性强、敏感性高、操作简便、快速高效等特点, 通过反应过程中收集荧光信号, 实现检测结果的实时监测, 无需后续电泳和产物测序分析, 大大缩短了检测周期。目前 real-time PCR 方法在国内外动物源性成分鉴别检测中得到了最为广泛的应用^[3, 11-14]。对于鸭源性成分检测, 目前国内主要采用行业标准 SN/T 3731.5—2013《食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法 第 5 部分: 鸭成分检测 PCR 法》。SN/T 3731.5—2013 规定的鸭源性成分检测方法为普通 PCR 方法, 需要进行 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳和测序确认, 存在步骤复杂、操作烦琐、交叉污染、周期长等不足, 无法满足大批量样品的快速检测需求。

本研究以鸭生长激素基因(growth Hormone, GH)为靶基因, 建立一种有效检测鸭源性成分的 real-time PCR 方法, 实现肉制品中鸭源性成分的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸭、鸡、鹅、牛、羊、猪、马和驴肉由石家庄海关技术中心实验室制备并保存; 羊肉卷(片)、烤羊肉串、肥牛卷、牛肉松、猪肉馅、猪肉香肠等 200 份不同种类的肉制品为石家庄海关技术中心实验室保存的 2019 年 1 月—2020 年 11 月客户送检样品。

食品基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司); Trans Start Probe qPCR Super Mix(2×)(北京全式金生物技术有限公司); 2×Taq PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司); Nano Drop 2000C 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司); T100TM Thermal cycler 型 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); Fusion Fx5 凝胶成像系统(法国 VIBER LOURMAT 公司); SL 202 电子天平(德国赛多利斯公司); 1-14 台式离心机(德国 Sigma 公司); BT-20T 恒温金属浴(上海本亭仪器有限公司)。

1.3 引物与探针的设计

根据 GeneBank 上收录的鸭基因序列, 分析确定鸭生长激素(GH)基因(JN408702.2、EF521443.1)保守序列, 通过软件 Primer Express 3.0 设计特异性引物和 TaqMan 探针, 序列见表 1。引物探针由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 本研究引物探针信息

Table 1 Information for the primers and probe used in this study

名称	引物探针序列(5'-3')	扩增片段大小	目的基因
Duck-F	GCCTCCACCCCTGATCCT	85 bp	GH 基因
Duck-R	CGCTCCCCACAGCTCTCA		
Duck-P	FAM-TGCCCCACCCAAACCCACCAC-Eclipse		

1.4 肉粉的制备与基因组 DNA 的提取

对于不同种类的肉制品,分别使用高压灭菌的无菌剪刀取肉样 200 mg 置于研钵中剪碎,液氮充分研磨,取 50 mg 肉粉于洁净的 1.5 mL 离心管中备用。

使用食品基因组 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行不同肉样的基因组 DNA 提取,最终以 100 μ L 无菌水溶解 DNA,并用 Nano Drop 2000C 超微量分光光度计测定 DNA 浓度,将其稀释至 50~100 ng/ μ L,放置于-20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.5 Real-time PCR 方法的建立及优化

以提取的鸭基因组 DNA 为模板,取不同浓度的引物和探针组合,以能给出最低 Ct 值和最高荧光强度的组合为最佳组合。反应体系为 25 μ L: Trans Start Probe qPCR Super Mix(2 \times) 12.5 μ L,上游和下游引物终浓度分别为 240、320、400、480 nmol/L,探针终浓度分别为 240、320、400、480 nmol/L,模板 DNA(100 ng/ μ L) 1 μ L,用 ddH₂O 补足体系。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s,退火延伸(分别设定为 58、59 和 60 $^{\circ}$ C) 35 s, 40 个循环,在退火延伸时收集荧光。

1.6 Real-time PCR 方法的特异性和灵敏性实验

以提取的鸭、鸡、鹅、羊、牛、猪、马和驴基因组 DNA 为模板,根据 1.5 中的确定的最佳反应体系和反应条件进行鸭源性成分检测,同时设置空白对照(ddH₂O),对所建立的 real-time PCR 方法进行特异性分析。

将提取的鸭基因组 DNA 浓度稀释至为 1.0×10^5 pg/ μ L,进行 10 倍倍比稀释至 1.0×10^{-2} pg/ μ L,以 1 μ L 不同浓度的基因组 DNA 作为模板,对所建立的 real-time PCR 方法进行灵敏性分析。

1.7 重复性和稳定性实验

取 1.6 中 3 个不同浓度(1.0×10^5 、 1.0×10^3 和 1.0×10^1 pg/ μ L)的鸭基因组 DNA 各 1 μ L 作为模板,进 real-time

PCR 检测,每个浓度分别做 3 个重复。根据不同浓度模板在 real-time PCR 中的 Ct 值(实时荧光 PCR 反应的循环数),计算 Ct 值变异系数(coefficient of variation, CV),评价该方法的重复性和稳定性。

1.8 市售肉制品的检测

将本实验室保存的羊肉卷(片)、烤羊肉串、肥牛卷、牛肉松、猪肉馅、猪肉香肠等不同种类肉制品 200 份,按照 1.4 进行样品的处理和核酸提取。采用建立的 real-time PCR 方法和行业标准 SN/T 3731.5—2013 中的 PCR 方法同时进行鸭源性成分检测,对检测结果进行分析,进一步验证所建立方法的准确性和实际应用效果。

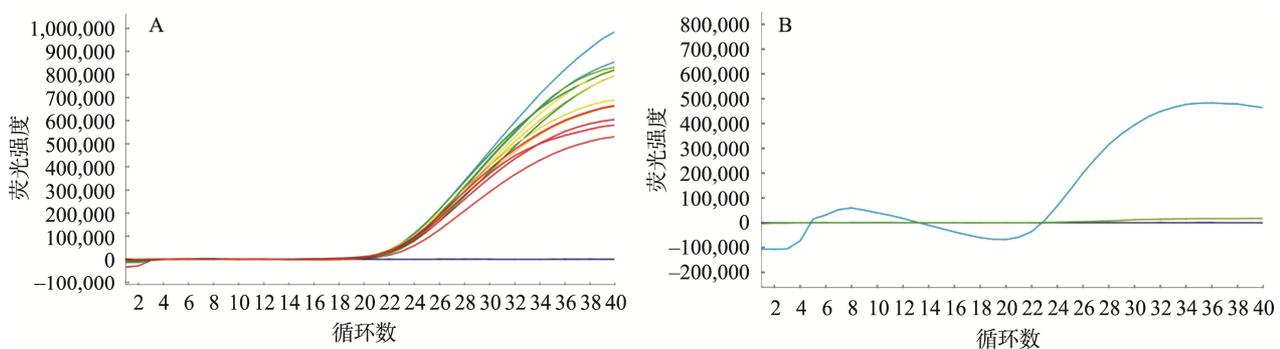
2 结果与分析

2.1 Real-time PCR 反应体系的建立和优化

选择荧光信号最强、扩增曲线出现最早的引物探针组合和退火延伸温度为最佳引物探针浓度和最佳退火延伸温度。当上下游引物终浓度为 400 nmol/L、探针终浓度 400 nmol/L 时,扩增曲线出现最早且荧光信号强度最高(图 1-A);当延伸退火温度为 60 $^{\circ}$ C 时,鸭源性成分特异性扩增曲线的荧光信号最强,出现扩增曲线时间最早,且呈“S”型扩增(图 1-B、C、D)。

2.2 Real-time PCR 方法特异性实验结果

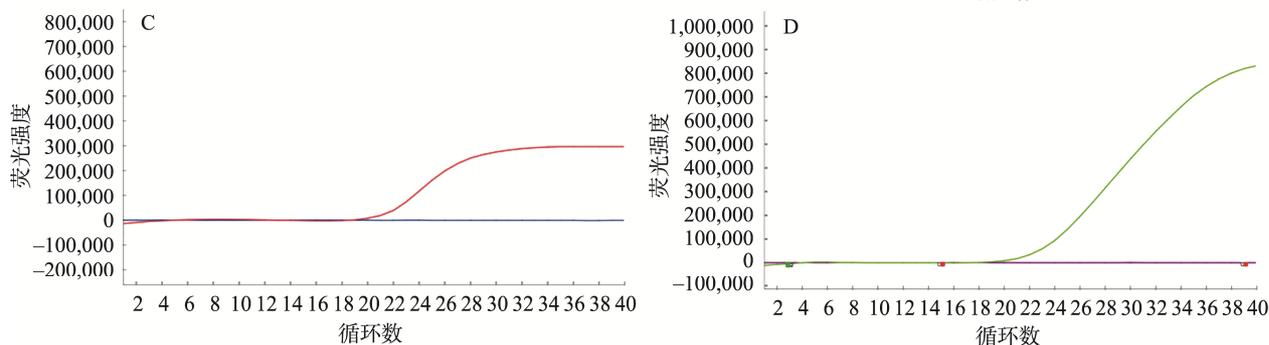
以鸭、鸡、鹅、牛、羊、猪、马和驴基因组 DNA 为模板,以 ddH₂O 为空白对照,进行 real-time PCR 检测。结果显示,空白对照未出现扩增,说明反应体系未受污染;只有鸭基因组 DNA 出现典型的“S”型扩增曲线,而鸡、鹅、牛、羊、猪等其他异源性物种基因组 DNA 无扩增曲线,表明所建立的 real-time PCR 方法具有良好的特异性,结果见图 2。



注: A: 引物和探针浓度的优化; B: 退火温度的优化(58 $^{\circ}$ C); C: 退火温度的优化(59 $^{\circ}$ C); D: 退火温度的优化(60 $^{\circ}$ C)。

图 1 Real-time PCR 反应体系的建立和优化

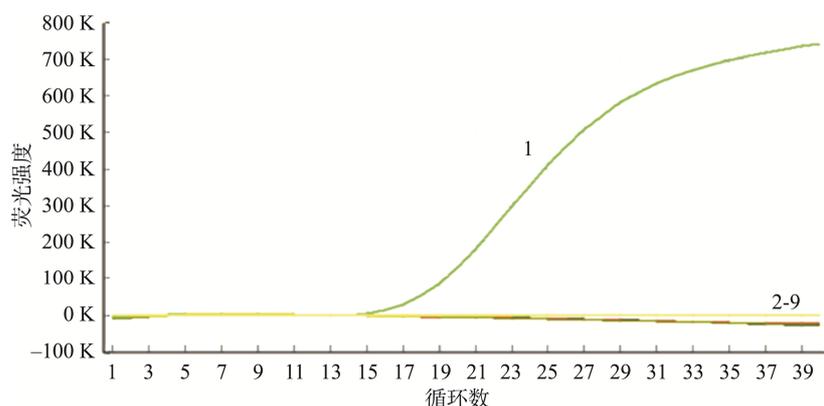
Fig.1 Establishment and optimization of real-time PCR reaction system



注: A: 引物和探针浓度的优化; B: 退火温度的优化(58 °C); C: 退火温度的优化(59 °C); D: 退火温度的优化(60 °C)。

图 1(续) Real-time PCR 反应体系的建立和优化

Fig.1 Establishment and optimization of real-time PCR reaction system



注: 1: 鸭; 2: 鸡; 3: 鹅; 4: 牛; 5: 羊; 6: 猪; 7: 马; 8: 驴; 9: 空白对照。

图 2 鸭源性成分 real-time PCR 检测方法的特异性

Fig.2 Specificity of real-time PCR method for duck-derived ingredients

2.3 Real-time PCR 方法灵敏性实验结果

以 1 μL 浓度范围在 1.0×10^5 ng/μL ~ 1.0×10^{-2} pg/μL 之间的鸭基因组 DNA 作为模板, 进行灵敏性分析。结果显示, 当反应体系中模板量为 1.0 pg 时, 出现典型扩增曲线, Ct 值为 34.62; 当模板量低于 1.0 pg 时, 均没有出现扩增曲线(图 3)。结果表明, 所建立的鸭源性成分 real-time PCR 方法的灵敏性为 1.0 pg 基因组 DNA。

2.4 重复性和稳定性实验结果

以 1 μL 浓度分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^3 和 1.0×10^1 pg/μL 的鸭基因组 DNA 作为模板进行 real-time PCR 方法检测, 以不同浓度基因组 DNA 获得的 Ct 值计算其平均数和变异系数, 进行重复性和稳定性实验分析。结果显示, 批内变异系数在 0.25%~1.82%, 批间变异系数在 0.48%~3.52%, 说明建立的 real-time PCR 方法有很好的重复性和稳定性, 结果见表 2。

2.5 市售肉制品中鸭源性成分的检测

通过建立的 real-time PCR 方法和现行标准 SN/T 3731.5—2013, 对 200 份不同种类的羊肉卷(片)、烤羊肉串、

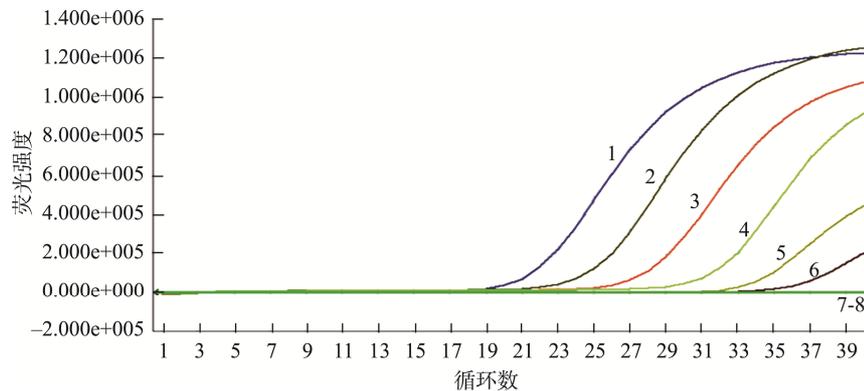
肥牛卷、牛肉松、猪肉馅、猪肉香肠等进行了鸭源性成分检测。结果显示, 在 real-time PCR 方法中, 阳性样品 Ct 值在 19.56~32.35 之间(表 3); SN/T 3731.5—2013 方法中, PCR 阳性样品测序结果同标准序列的同源性在 98.5%~100% 之间。2 种方法检测结果一致, real-time PCR 方法能够实现对肉制品中鸭源性成分的快速检测。其中, 在 11 份肉制品中检出鸭源性成分, 羊肉制品中鸭源性成分检出比例最高(6/11), 在 2 份猪肉馅和猪肉香肠中, 也检出鸭源性成分。说明这些肉制品中掺入了不同比例的鸭肉成分。

3 结论与讨论

近年来, 肉类掺假问题越来越受到公众的关注, 建立有效的动物源性成分检测方法, 实现肉制品中物种成分的快速检测, 为执法监管部门提供技术支撑和维护消费者利益具有重要意义^[15-19]。随着分子生物学等技术的飞速发展, 动物源性成分的分子生物学检测手段不断涌现, PCR 和 real-time PCR 方法在肉类成分掺假检测方面日益成熟。但随着不法商家掺假手段的提高, 以及一些深加工肉制品复杂的成分, PCR 方法已经不能满足动物源性成分检测的需

求。其次, PCR 方法需要进行电泳分析, 阳性样品需要通过测序分析进一步确认, 检测周期较长, 而且电泳液中的溴化乙锭会给检测人员的身体带来危害。Real-time PCR 方法

通过对荧光信号的实时监测, 2 h 内就可以得到结果, 在灵敏度和特异性方面都高于普通 PCR, 尤其面对大批源性成分检测时, real-time PCR 方法的优势更为明显^[6,17-19]。



注: 1: 1.0×10^5 pg/ μ L; 2: 1.0×10^4 pg/ μ L; 3: 1.0×10^3 pg/ μ L; 4: 1.0×10^2 pg/ μ L; 5: 1.0×10^1 pg/ μ L; 6: 1.0×10^0 pg/ μ L; 7: 1.0×10^{-1} pg/ μ L; 8: 1.0×10^{-2} pg/ μ L。

图 3 鸭源性成分 real-time PCR 检测方法的灵敏性

Fig.3 Sensitivity of real-time PCR method for duck-derived ingredients

表 2 不同 DNA 浓度的鸭 DNA 模板的批内和批间重复性实验
Table 2 Intra-batch and inter-batch reproducibility experiments of duck DNA templates with different DNA concentrations

	DNA 浓度/(pg/ μ L)	Ct 值平均值	变异系数/%
批内重复	1.0×10^5	19.21 \pm 0.12	0.25
	1.0×10^3	24.86 \pm 0.15	1.32
	1.0×10^1	31.55 \pm 0.44	1.82
批间重复	1.0×10^5	19.35 \pm 0.18	0.48
	1.0×10^3	24.75 \pm 0.20	1.86
	1.0×10^1	31.62 \pm 0.52	3.52

表 3 市售肉制品鸭源性成分检测结果
Table 3 Results of duck-derived ingredients in meat products for sale

编号	样品名称	real-time PCR 检测结果 (Ct 值)	PCR 检测结果
1	羊肉卷	28.65	+
2	羊肉卷	25.93	+
3	羊肉卷	23.65	+
4	羊肉片	21.02	+
5	羊肉片	20.35	+
6	烤羊肉串	19.56	+
7	牛柳	32.35	+
8	肥牛卷	29.12	+
9	猪肉馅	25.66	+
10	猪肉馅	30.78	+
11	香肠	28.35	+

目前, 国内研究人员针对鸭 CytB 基因和 COX 基因建立了针对不同种类样品中鸭源性成分的 real-time PCR 方法^[20-21]。本研究建立的 real-time PCR 方法基于鸭生长激素基因, 该基因位于鸭核基因组, 属于单拷贝基因, 而 CytB 基因和 COX 基因均为位于线粒体上的多拷贝基因。基于多拷贝基因的检测方法灵敏性更高, 但在不同组织中具有高变异性, 在分析中会存在测量误差, 从而易对异源物种成分含量极低的“无意污染”样品(小于 1%)出现阳性结果, 后续可能造成纠纷。以单拷贝核基因设计引物和探针, 能够有效控制因不同细胞中线粒体基因拷贝数不同带来的误差。基于单拷贝基因的检测方法, 虽然检出限低于多拷贝基因, 但是对于“无意污染”异源物种成分的肉制品检测, 可以有效避免判定结果的不确定性。微滴式数字 PCR 作为一种新型的检测手段, 在鸭源性成分检测中也有应用, 如史艳宇、张秀平等分别采用微滴式数字 PCR 技术建立了肉制品中鸭源性成分的定量检测方法^[22-23]。与 real-time PCR 方法相比, 微滴式数字 PCR 具有一定的局限性, 如昂贵的仪器和检测试剂, 以及专业的操作人员, 不适合实验室大批样品的检测^[24]。

本研究中, real-time PCR 和 SN/T 3731.5—2013 方法在 11 份不同种类的牛肉、羊肉和猪肉制品中检出了鸭源性成分。所建立的 real-time PCR 方法检测速度快, 能够根据荧光信号和扩增曲线直接判定检测结果; 现行标准 SN/T 3731.5—2013 需要对 PCR 产物进行测序和比对, 同源性达 97% 以上才能确定为阳性, 存在检测周期长的不足。通过大量的临床样品检测结果可以说明, 在羊肉卷、羊肉片和猪肉馅等肉制品中掺入鸭肉的可能性更大, 掺假风险较高, 需要重点关注。

4 结 论

本研究通过对引物、探针和退火温度的优化, 建立了鸭源性成分 real-time PCR 检测方法。该方法具有特异性强、灵敏性高、重复性和稳定性好等优势, 为肉制品中鸭源性成分的检测提供了快速、高效的检测方法, 为有效打击非法肉制品掺假欺诈、规范市场秩序和保障人民食品安全提供了技术支持。

参考文献

- [1] ALI ME, RAZZAK MA, HAMID SBA, *et al.* Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [J]. *Food Chem*, 2015, 177: 214–224.
- [2] INES L, JUTTA Z, HERMANN B. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2007, 42: 336–341.
- [3] 任君安, 黄文胜, 葛毅强, 等. 肉制品真伪鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 247–257.
REN JA, HUANG WS, GE YQ, *et al.* Progress in meat adulteration detection techniques [J]. *Food Sci*, 2016, 37(1): 247–257.
- [4] LIU L, CHEN FC, DORSEY JL, *et al.* Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products [J]. *J Food Sci*, 2006, 71(1): 1–6.
- [5] MONTOWSKA M, POSPIECH E. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3): 1461–1469.
- [6] 高红霞. 荧光定量 PCR 方法鉴别肉制品中羊源性成分[J]. *食品安全导刊*, 2017, (27): 103.
GAO HX. Real-time PCR detection of sheep derived materials in meat product [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2017, (27): 103.
- [7] 陈珍金, 张璜, 石磊, 等. 利用 LAMP 技术快速检测羊肉制品中的鼠源性成分 [J/OL]. *食品科学*: 1-12 [2021-03-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201229.0940.032.html>.
CHEN ZJ, ZHANG H, SHI L, *et al.* Rapid detection of mouse-derived components in mutton products using by LAMP technology [J/OL]. *Food Sci*: 1-12 [2021-03-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201229.0940.032.html>.
- [8] 苗丽, 张秀平, 王建昌, 等. 肉制品中鸡源性成分重组酶介导等温扩增检测方法的建立及应用[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(4): 954–959.
MAO L, ZHANG XP, WANG JC, *et al.* Establishment and application of real-time recombinase-aided amplification assay to detect chicken-derived ingredients in meat products [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2019, 35(4): 954–959.
- [9] 郭燕华, 王德莲, 王强, 等. 重组酶介导等温扩增技术快速检测牛肉及牛肉制品中的牛源性成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(5): 1745–1749.
GUO YH, WANG DL, WANG Q, *et al.* Determination of bovine ingredient in beef and its derivatives with recombinase polymerase mediated isothermal amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(5): 1745–1749.
- [10] 柳毅, 尹斯雅. 食品中驴源性成分环介导等温扩增检测方法的建立[J]. *食品工业*, 2020, 41(2): 288–292.
LIU Y, YIN SY. Establishment of loop-mediated isothermal amplification method for detection of donkey components in foods [J]. *Food Ind*, 2020, 41(2): 288–292.
- [11] 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, 41(2): 309–313.
XU Q, ZHANG YN, GU WJ, *et al.* Establishment of quantitative TaqMan real-time PCR targeting the swine-derived in raw meat [J]. *Food Sci Technol*, 2016, 41(2): 309–313.
- [12] 范丽丽, 李培, 傅春玲, 等. 食品中鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2014, 35(2): 248–251.
FAN LL, LI P, FU CL, *et al.* Detection of chicken-derived ingredients in foods by fluorescence-based quantitative real-time PCR [J]. *Food Sci*, 2014, 35(2): 248–251.
- [13] 王玮, 吕青裴, 朱卢玺, 等. 食品中马源性成分的实时荧光 PCR 检测[J]. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(9): 961–964.
WANG W, LV QQ, ZHU LX, *et al.* Detection for horse-derived components in foods by real-time polymerase chain reaction [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2015, 34(9): 961–964.
- [14] 史艳宇, 刘金华, 吴月丹, 等. 荧光定量 PCR 方法检测畜肉食品中鸭源性成分[J]. *食品安全质量检报*, 2013, 4(6): 1859–1864.
SHI YY, LIU JH, WU YD, *et al.* Rapid detection of duck-derived materials in meat products by real time PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(6): 1859–1864.
- [15] 李家鹏, 乔晓玲, 田寒友, 等. 食品和饲料中动物源性成分检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 340–347.
LI JP, QIAO XL, TIAN HY, *et al.* Research progress of identification techniques for animal-derived materials in food and feed [J]. *Food Sci*, 2011, 32(9): 340–347.
- [16] 何伟玲, 黄明, 张弛, 等. 食品中肉类成分种属鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 304–307.
HE WL, HUANG M, ZHANG C, *et al.* Recent technological advances for identification of meat species in food products [J]. *Food Sci*, 2012, 33(3): 304–307.
- [17] 邵建宏, 罗宝正, 薄清如, 等. TaqMan 探针荧光 PCR 法检测熊源性成分[J]. *野生动物学报*, 2017, 38(4): 575–579.
SHAO JH, LUO BZ, BO QR, *et al.* Detection of ursus-derived ingredients by TaqMan probe fluorescent PCR [J]. *Chin J Wildlife*, 2017, 38(4): 575–579.
- [18] 熊蕊, 郭凤柳, 刘晓慧, 等. 肉制品中犬源性成分 PCR 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(8): 9–12.
XIONG R, GUO FL, LIU XH, *et al.* Establishment of PCR Method for Detection of canine ingredient in meat products[J]. *Progress Vet Med*, 2014, 35(8): 9–12.
- [19] 邵彪, 周小兰, 王琳琳, 等. 肉制品中植源性转基因成分多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *肉类研究*, 2018, 32(1): 41–45.
SHAO B, ZHOU XL, WANG LL, *et al.* Development of a multiplex fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay for detecting added genetically modified ingredients derived from plants in meat products [J]. *Meat Res*, 2018, 32(1): 41–45.
- [20] 张秀平, 苗丽. 实时荧光聚合酶链式反应检测肉制品中的鸭源性成分[J]. *肉类研究*, 2018, 32(7): 37–41.
ZHANG XP, MIAO L. Detection of duck-derived ingredients in meat products by real-time fluorescent polymerase chain reaction [J]. *Meat Res*,

(责任编辑: 张晓寒)

2018, 32(7): 37-41.

- [21] 刘国强, 海小, 罗建兴, 等. 基于 TaqMan 实时荧光 PCR 检测鲜肉及加工制品中的鸭源性成分[J]. 农业与技术, 2020, 40(14): 21-26.

LIU GQ, HAI X, LUO JX, *et al.* Detection of duck-derived components in fresh meat and processed products by TaqMan real-time PCR [J]. *Agric Technol*, 2020, 40(14): 21-26.

- [22] 史艳宇, 王莹, 石虹, 等. 微滴数字 PCR 方法检测畜肉食品中鸭源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(3): 583-588.

SHI YY, WANG Y, SHI H, *et al.* Detection of duck-derived materials in meat products by droplet digital PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(3): 583-588.

- [23] 张秀平, 苗丽, 黄世英, 等. 食品中鸭源性成分的微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(6): 29-34.

ZHANG XP, MIAO L, HUANG SY, *et al.* Development of quantitative analysis of duck-derived ingredients by droplet digital PCR [J]. *Chin J Vet Med*, 2020, 56(6): 29-34.

- [24] 牛会敏, 王静怡, 姚晓洁, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应在食品安全检测领域的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9295-9300.

NIU HM, WANG JY, YAO XJ, *et al.* Application of droplet digital polymerase chain reaction in food safety detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9295-9300.

作者简介



刘立兵, 兽医师, 主要研究方向为食源性致病菌、动物源性食品掺假的分子生物学检测研究。

E-mail: bing521564@163.com



陈敏娜, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: 929368952@qq.com



王建昌, 正高级兽医师, 主要研究方向为动物源性食品掺假、食源性致病菌的分子生物学检测研究。

E-mail: jianchangwang1225@126.com