

荧光 PCR 方法定量检测食品中香菇成分

马 豪¹, 高宏伟^{1*}, 王 萍¹, 孙雯娴¹, 马振华¹, 李东元¹, 孟昭宇², 郭亚辉³
(1. 青岛海关技术中心, 青岛 266000; 2. 黄岛海关, 青岛 266400; 3. 江南大学食品学院, 无锡 214000)

摘要: 目的 建立定量检测食品中香菇成分的荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法, 以辨别出口商品和国内市场中谎报香菇成分含量、以次充好的菌菇产品。**方法** 选取香菇基因组单拷贝核基因 *Hydrophobin Protein* 设计香菇种属特异性引物, 扩增 107 bp 的片段, 用于荧光 PCR 定量检测。分别以 3 种香菇作为阳性对照和 14 种非香菇菌种、植物产品作为阴性对照, 测试实时荧光 PCR 引物和探针的特异性。以香菇标准 DNA 进行 8 个浓度梯度稀释, 测试的方法绝对定量限, 并制备 12 个梯度含量的香菇 DNA 样品, 测试香菇相对含量的标准曲线。**结果** 本研究建立的香菇荧光 PCR 定量检测方法对香菇物种的特异性好, 与其他食品物种无交叉结果, 荧光 PCR 扩增效率为 0.90, 绝对定量限(limit of quantitation, LOQ)为 0.01 pg/ μ L, 含量检测 LOQ 为 0.05%。**结论** 本方法重复性和实用性好, 可以满足食品和调味料中香菇含量定量检测要求。**关键词:** 香菇; 实时荧光聚合酶链式反应法; 单拷贝基因; 定量检测

Quantitative PCR methods for the detection of *Lentinus edodes* in food

MA Hao¹, GAO Hong-Wei^{1*}, WANG Ping¹, SUN Wen-Xian¹, MA Zhen-Hua¹,
LI Dong-Yuan¹, MENG Zhao-Yu², GUO Ya-Hui³

1. Qingdao Customs Technology Center, Qingdao 266000, China; 2. Huangdao Customs, Qingdao 266400, China,
3. School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fluorescence polymerase chain reaction (PCR) method for the quantitative detection of *Lentinus edodes* in food, so as to identify the falsely reported *Lentinus edodes* in export commodities and domestic market. **Methods** A single copy nuclear gene of *Hydrophobin Protein* from *Lentinus edodes* genome was used to design a pairs species-specific primers and probe for fluorescent PCR quantitative detection of *Lentinus edodes*, and a 107 bp fragment was amplified for quantitative detection by fluorescence PCR. Three species of *Lentinus edodes* samples were used as a positive control and 14 species of non-*Lentinus edodes* strains and plant products were used as negative controls to test the specificity of the primers and probes. Eight concentration gradient dilutions were carried out by the standard DNA of *Lentinus edodes* for the absolutely quantified test, and 12 gradients of different *Lentinus edodes* content samples were prepared for test standard curve of the relative content of the *Lentinus edodes*. **Results** This fluorescence PCR quantitative detection method established in this study had good specificity for *Lentinus edodes* species, and there was no crossover between *Lentinus edodes* species and other food species. The amplification efficiency of fluorescent PCR was 0.90, and the absolute value limit of quantitation (LOQ)

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1601704)、青岛海关组阁揭榜项目(QK202103)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1601704), and the Qingdao Customs Unveiling Project (QK202103)

*通信作者: 高宏伟, 博士, 研究员, 主要研究方向为分子生物学检测技术。E-mail: ghw75@126.com

*Corresponding author: GAO Hong-Wei, Ph.D, Professor, Qingdao Customs Technology Center, Qingdao 266000, China. E-mail: ghw75@126.com

was 0.01 pg/ μ L and the content detection LOQ was 0.05%. **Conclusion** This method has good repeatability and operability, which can meet the quantitative detection requirements of *Lentinus edodes* content in food.

KEY WORDS: *Lentinus edodes*; real-time fluorescent polymerase chain reaction; single copy gene; quantitative detection

0 引言

香菇是担子菌纲(Basidiomycetes)、伞菌目(Agaricales)、口蘑科(Tricholomataceae)、香菇属(*Lentinus*)的大型食用菌, 学名 *Lentinus edodes*^[1]。香菇起源于我国, 是世界第二大菇类, 肉质肥厚细嫩、味道鲜美、香气独特、具有很高的营养、药用和保健价值, 是一种常见的药食同源的食物^[2]。

由于香菇具有较高食用价值, 市场上拥有大量香菇加工产品。香菇初加工产品包括保鲜香菇、香菇干制品和腌制品等。香菇精加工产品包括干食香菇、香菇粉等。香菇深加工产品包括香菇调味品、香菇饮料、香菇多糖等。香菇产品因香菇原料的含量不同而价格差异较大, 在国内市场和出口商品中有以次充好, 也有使用其他价格便宜的菌菇, 如杏鲍菇假冒香菇作为食品原料的现象。香菇粉中香菇成分含量少, 掺杂大量廉价物质的出口香菇产品屡有出现, 高报出口产品价格, 获得高额出口退税补贴, 给国家造成重大经济损失。因此急需开发能够定量检测食品和香菇粉中香菇含量的方法, 为稳定市场秩序和执法把关提供技术支持。

PCR 技术是检测食品物种来源的可靠技术^[3]。已有中国学者报道了使用 PCR 技术鉴定猴头菇物种和使用 DNA 条形码技术鉴别有毒鹅膏菌属物种的方法^[4-5]。TSURUDA 等^[6]研究开发了使用复合荧光 PCR 技术鉴别有毒的日本类脐菇(*Omphalotus guepiniformis*)和香菇(*L. edodes*)的方法。但是目前对大型食用真菌的物种鉴定研究主要集中在种质资源鉴定和亲缘分析方面, 并且研究的菌种较少, 尤其是针对食品中大型食用菌成分及其含量的检测方法未见报导。

液滴数字 PCR 是绝对定量方法, 可用于定量检测肉制品中牛、猪、马和鸡成分的含量^[7-8], 但数字 PCR 仪器相对昂贵, 相比之下实时荧光 PCR 检测方法灵敏准确, 仪器使用普遍、易于操作, 被广泛用于识别食品中各种动物和植物成分^[9-12]。在特异性 PCR 的物种鉴定中, 最广泛使用的是线粒体 DNA 序列。但由于不同物种或个体之间线粒体 DNA 的拷贝数不同, 线粒体 DNA 序列不适合用于定量分析^[13]。而核基因的 DNA 序列多为单拷贝, 更适合于定量检测。一些核基因 DNA 序列已用于定量检测肉制品中猪肉、羊肉和禽肉物种成分的含量^[14-15]。

为满足市场对食品和调味品中香菇成分含量检测的需求, 本研究使用荧光 PCR 方法并选取香菇基因组高度保守的单拷贝核基因 DNA 序列开发了检测香菇成分含量的方法, 以为食品中香菇含量测定提供准确可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品包括 3 种香菇样品作为阳性对照, 10 个其他担子菌纲的食用菌和 4 种植物材料作为阴性对照样品, 另有 2 种真实样品和 5 种模拟样品作为试剂检测样品。样品来源见表 1, 实验用食用菌样品如图 1 所示。

表 1 实验用香菇样品和非香菇样品来源
Table 1 Sources of positive and negative *Lentinus edodes* samples

编号	名称	来源
1	新鲜香菇	市购
2	干香菇	市购
3	香菇粉	市购
4	平菇	市购
5	金针菇	市购
6	杏鲍菇	市购
7	双孢蘑菇	市购
8	红菌菇	市购
9	羊肚菌	市购
10	竹荪	市购
11	姬松茸	市购
12	茶树菇	市购
13	猴头菌	市购
14	面粉	市购
15	大米	市购
16	玉米粉	市购
17	马铃薯粉	市购
18	香菇粉末	市购
19	香菇素肉	市购
20	自配香菇粉 1	100%香菇粉(<i>m:m</i> , 下同)
21	自配香菇粉 2	80%香菇粉+20%面粉
22	自配香菇粉 3	50%香菇粉+50%面粉
23	自配香菇粉 4	40%香菇粉+60%面粉
24	自配香菇粉 5	10%香菇粉+90%面粉



注: 样品从第 1 排自左向右分别为: 新鲜香菇、干香菇、平菇、金针菇、杏鲍菇、双孢蘑菇、红菌菇、羊肚菌、竹荪、姬松茸、茶树菇、猴头菌。

图 1 实验用食用菌样品

Fig.1 Samples of edible fungus in this test

1.2 试剂与仪器

植物组织基因组 DNA 核酸提取试剂盒(西安天隆科技有限公司); 特异性引物、探针由北京擎科生物有限公司合成; TransStart Probe qPCR SuperMix 试剂盒(Lot#O10911, 北京全式金工程有限公司); NucleoSpin Food DNA 提取试剂盒(德国 MN 公司)

5810R 台式离心机、U-3010 紫外-可见分光光度计(德国 Eppendorf 公司); CFX96 荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); GZX-9076 干燥箱(上海博迅公司); BSA124S 电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.3 提取样品 DNA

所有样品各取 50 g 制样。非粉状样品, 洗净后切成薄片, 粉状样品直接烘干。所有样品于干燥箱中 60 °C 烘干

8 h。充分研磨, 过 200 目筛, 筛下物取 2 个平行样, 各精确称量 50 mg 用于提取样品 DNA。采用德国 NucleoSpin Food DNA 提取试剂盒, 按照操作说明提取基因组 DNA。将 DNA 预混液分别取少部分用分光光度计测量质量浓度及纯度, 在波长 260 nm 处测量预混液 DNA 浓度, 并用光密度(optical density, OD)的比值($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$)作为衡量 DNA 纯度的标志, 当 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.7~1.9 之间时可以用于本实验, 配制成质量浓度为 10 ng/ μL 的 DNA 模板液, 为荧光 PCR 做准备。

1.4 配制绝对定量限测定用梯度 DNA 溶液

根据 GenBank:GCA_015476405.1, 香菇基因组大小为 45870312 bp。并且香菇基因 *hydrophobin1 (Hyd1)* 为单拷贝基因^[16], 在一个基因组中检测到的所有特定片段都等同于一个基因组。通过分光光度法确定的香菇基因组双链 DNA 浓度为 10 ng/ μL 时, 含有 1.0×10^7 拷贝数/ μL 的目标 DNA 序列。将香菇 DNA 提取液与大豆 DNA 提取溶液按照体积分数进行混合, 分别配制成绝对定量限测定梯度标准 DNA 溶液和香菇相对含量测定梯度 DNA 溶液。

以 10 ng/ μL 质量浓度 DNA 溶液为起始浓度, 稀释 7 个梯度, 每个梯度之间 10 倍稀释, 每个浓度梯度的拷贝数见表 2。梯度配制方法为: 100% 的香菇预混液用 1000 μL 的香菇基因组提取液的上清液和 0 μL 的等质量大豆提取液的上清液进行混合获得。10% 的香菇预混液用 100 μL 的香菇基因组提取液上清和 900 μL 的等质量大豆提取液的上清液进行混合获得, 以此类推。

1.5 配制香菇成分相对含量测定用 DNA 溶液

测定梯度 DNA 溶液设置 12 个浓度梯度, 使用 10 ng/ μL 质量浓度的香菇 DNA 溶液和 10 ng/ μL 质量浓度的大豆 DNA 溶液, 进行 2 倍梯度稀释(表 3)。梯度配制方法为: 100% 的香菇预混液用 1000 μL 的香菇基因组提取液的上清液和 0 μL 的大豆提取液的上清液进行混合获得; 50% 的香菇预混液用 500 μL 的香菇基因组提取液上清和 500 μL 的大豆提取液的上清液进行混合获得, 以此类推。

表 2 香菇绝对定量限标准曲线的 DNA 梯度设置

Table 2 DNA gradient settings for the absolute quantitative standard curve of *Lentinus edodes*

浓度	10 ng/ μL	1 ng/ μL	100 pg/ μL	10 pg/ μL	1 pg/ μL	0.1 pg/ μL	0.01 pg/ μL	0.001 pg/ μL
拷贝/ μL	1.0×10^7	1.0×10^6	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2	10.0	1.0

表 3 香菇含量测定的标准曲线的梯度设置

Table 3 Gradient setting of the standard curve for the determination of *Lentinus edodes* content

标准品	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5	梯度 6
含量/%	100	50	25	12.5	6.25	3.13
标准品	梯度 7	梯度 8	梯度 9	梯度 10	梯度 11	梯度 12
含量/%	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05

真实样品和模拟样品检测实验室中, 配制质量分数为 100%、80%、50%、40%、10%香菇 DNA 浓度样品液, 每个样品加样 5 个平行, 做荧光 PCR 的 DNA 模板。

1.6 实时荧光 PCR 引物探针与反应条件

根据 Genbank 香菇基因 *hydrophobin1* (*Hyd1*) AF217807.1 的 DNA 序列, 经过与其他物种序列比对, 选出香菇种属特异性 DNA 序列, 使用 Primer 3 软件, 设计香菇物种特异性引物和探针, *hyd1F*: 5'-AATGGAGCGGTGGAGGA-3'; *hyd1R*: 5'-AGTAGGAGAAGAGCGGTGA-3'; *hyd1P*: "FAM-TCGCTGTTACTAACCGTCGT-BHQ1"。DNA 扩增长度为 107 bp。

方法绝对定量限测定梯度标准 DNA 液和香菇含量测定梯度 DNA 溶液, 每个梯度做 4 个荧光 PCR 平行样。每个 DNA 样品在 0.2 mL PCR 反应管中进行扩增, 最终反应体系为 25 μ L, 包括: 正向引物(10 μ mol/L) 1 μ L、反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L、探针(10 μ mol/L) 1 μ L、模板 DNA 50 ng 反应, 2 \times RealMaster Mix 12.5 μ L, 超纯水补足至 25 μ L。实时 PCR 反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 45 s; 45 个循环。

1.7 测定方法绝对定量限

为了测试开发方法的绝对定量限, 测定的 7 个连续浓度梯度 DNA 溶液的荧光 PCR 扩增循环阈值(cycle threshold, Ct), 使用梯度 DNA 溶液的 Mean Ct 作标准曲线。根据 8 个连续浓度确定绝对定量极限(limit of quantitation, LOQ)。通过计算阳性反应的数量来确定和验证 LOQ^[15,17]。因为荧光 PCR 方法绝对定量低限的浓度范围常落在 0.1.00~0.001 pg/ μ L 内^[14-15], 所以只需在这个范围内测定置信区间。因此 8 个梯度浓度的标准 DNA, 前 5 个梯度每梯度做 5 个荧光 PCR 的平行样, 后 3 个梯度每梯度做 20 个荧光 PCR 的平行样。如果 LOQ 的置信区间应大于等于 95%, 表示阳性扩增数应至少为 20 个总反应中的 19 个^[17]。以各浓度的 Ct 值平均值为 Y 轴, 基因组 DNA 浓度的对数为 X 轴做图。同时计算该 PCR 反应的扩增效率(*E*)和回归系数(*R*²)。扩增效率(*E*)计算公式如公式(1)所示。

$$E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100\% \quad (1)$$

式中, slope 为曲线斜率。

通过计算前 5 个浓度各 5 个平行样和后 3 个浓度的各 20 个平行样的标准偏差(standard deviation, SD)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)以及 3 个重复实验的 SD^[17]。

1.8 测定香菇成分的相对含量和检出限

将香菇含量测定梯度 DNA 溶液和样品荧光 PCR 扩增 Ct 值填入 Excel 表, 以 Ct 值为 Y 轴, 标准品百分浓度以 10 为底的对数为 X 轴做图, 得到 $Y = KX + b$ 的线性方程, 其中 *K* 为斜率, 并得出相关系数 *r*²。如果扩增效率在 0.9 到 1.05 之

间, 相关相关系数 *r*² 为 0.9~1.0, 说明标准曲线可用^[18-20]。物种相对含量测定的低限常落在 0.01%~1.00%^[14-15], 在此范内需要计算置信区间, 所以测定香菇相对含量实验的前 7 个梯度浓度的标准品做 5 个荧光 PCR 平行样, 后 5 个梯度浓度的标准品做 20 个荧光 PCR 平行样, 以准确计算香菇相对含量的 LOQ 的置信区间。为了验证所开发方法的适用性, 使用 2 个市购样品和 5 个实验室模拟样品, 测定该方法的准确性, 确定测量值和真实值。每个样品做 5 个 PCR 重复。

2 结果与分析

2.1 荧光 PCR 方法的物种特异性

本研究设计的香菇特异性引物和探针, 在荧光 PCR 的在 40 个循环内反应中, 3 个香菇物种阳性样品为明显扩增的“S”型曲线, 其余较为平直的为阴性对样品。实验证明引物探针不会与种属关系相近的担子菌和其他植物发生假阳性的扩增, 只针对香菇这单一物种产生清晰的扩增曲线, 具有良好的种属特异性。

2.2 方法的绝对定量限

由图 2 可见, 荧光 PCR 的扩增曲线自左向右“S”型曲线所代表的香菇含量分别为 10、1 ng/ μ L 和 100、10、1、0.1、0.01、0.001 pg/ μ L (没有全部平行孔扩增, 图 2 中未作显示)。质量浓度为 0.001 pg/ μ L 的香菇 DNA (约 1 拷贝), 20 个平行 PCR 反应中 17 个出现阳性。质量浓度为 0.01 pg/ μ L 的香菇 DNA, 20 个平行 PCR 反应有 PCR 扩增的荧光信号, 表明本方法的绝对 LOQ 为 0.01 pg/ μ L, 约 10 拷贝, 20 个重复反应的 Ct 值的 SD 为 0.22, 小于 0.25, 方法灵敏度高, 可以满足定量检测的需要。

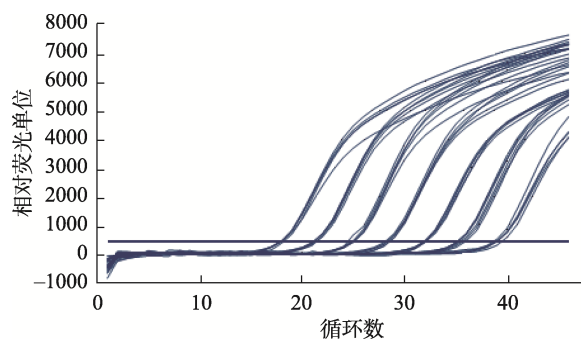


图 2 本方法绝对定量限的荧光 PCR 扩增曲线
Fig.2 Fluorescence PCR amplification curves of absolute quantitative limit of this method

根据 7 个 10 倍梯度稀释浓度标准品的 Ct 值绘制标准曲线, 标准曲线方程为 $Y = 3.5861X + 13.933$, $r^2 = 0.9992$ 。标准曲线方程的斜率接近于理论值 3.32, R^2 接近 1, 说明标准曲线的试验数据与拟合函数之间的拟合度高, 有良好的线

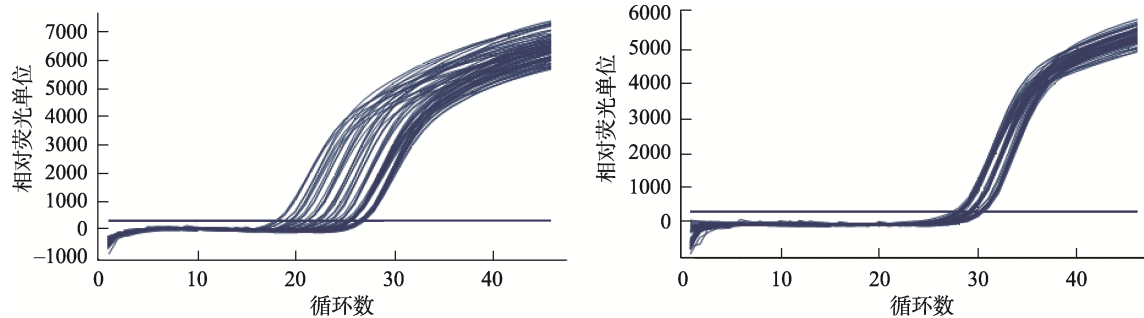
性。扩增效率 E 值为 0.90, 说明标准曲线具有良好的线性和较高的 PCR 效率, 结果表明本方法可用于食品中的香菇成分定量检测。

2.3 香菇成分相对含量标准曲线和样品香菇含量测定

使用香菇相对含量测定梯度 DNA 模板的平均 Ct 值作标准曲线, 即相对浓度 2 倍梯度稀释浓度标准品的 Ct 值为 Y 轴, 标准品百分浓度以 2 为底的对数为 X 轴做图。得到的线性方程 $Y=1.0786X+18.216$, 相关系数 r^2 为 0.989, 方法线

性较好。从实验结果可知包括 0.05% 和以上含量的 20 个平行 PCR 反应均为阳性, 所以相对含量方法的绝对 LOQ 为 0.05%, 方法灵敏度高。扩增曲线见图 3。

将模拟样品和真实样品检测的 Ct 值作为 Y 值带入方程 $Y=1.0786X+18.216$, 求得 X 值, 再将 X 值带入方程香菇质量百分含量 $=100 \times 2^{-X}\%$, 可以计算得到样品中香菇成分的质量百分含量。模拟样品和真实样品中的香菇含量测量值、真实值和 SD, 结果如表 4 所示。所有偏差结果均在 25% 的可接受水平之内, 方法准确性高。



注: A 前 9 个梯度的扩增曲线。B: 后 3 个梯度的扩增曲线。

图 3 香菇相对含量定量的扩增曲线

Fig.3 Quantitative amplification curves of relative content of *Lentinus edodes*

表 4 真实样品和模拟样品含量测定结果($n=3$)

Table 4 Content determination results of real samples and simulated samples ($n=3$)

样品	平均 Ct	SD	实测含量/%	标识含量/%
香菇粉末	18.35	0.20	100.00	100
香菇素肉	21.64	0.14	11.09	10
自配香菇粉 1	18.26	0.15	97.13	100
自配香菇粉 2	18.61	0.25	77.57	80
自配香菇粉 3	19.13	0.17	55.40	50
自配香菇粉 4	19.60	0.24	41.00	40
自配香菇粉 5	21.35	0.18	13.38	10

3 结论与讨论

本研究以香菇单拷贝核基因的 DNA 片段模板设计了香菇物种特异性引物, 建立了荧光 PCR 方法定量检测食品中香菇成分的方法。研究表明, 本方法具有特异性、灵敏性、重现性和准确性好的特点, 适用于使用香菇子实体作原料或者添加料的食品和调味品中香菇成分的定量检测。并且荧光 PCR 仪已经普遍使用, 操作相对简单, 本方法可广泛应用于食品安全质量检测、进出口检验检疫等领域, 对维护市场秩序和打击出口骗税, 有巨大的社会和经济意义。

参考文献

- [1] YANG W, PU H, WANG L, *et al.* Effect of bound water on the quality of dried *Lentinus edodes* during storage [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(5): 1971–1979.
- [2] HU D, CHEN W, LI X, *et al.* Ultraviolet irradiation increased the concentration of vitamin D₂ and decreased the concentration of ergosterol in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder in ethanol suspension [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(13): 7361–7368.
- [3] KUMAR A, KUMAR R, SHARMA D, *et al.* Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(10): 1340–1351.
- [4] 皇甫永冠, 闫宝松, 张跃新, 等. 猴头菇 DNA 条形码的构建及验证[J]. *中国林副特产*, 2017, 32(5): 11–15.
HUANGPU YG, YAN B, ZHANG YX, *et al.* Construction and verification of DNA barcode for *Hericium erinaceus* [J]. *Forest By-prod Spec China*, 2017, 32(5): 11–15.
- [5] 白文明, 邢冉冉, 陈丽萍, 等. 基于 DNA 条形码技术鉴别有毒鹅膏菌属物种 [J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 279–282.
BAI WM, XING RR, CHEN LP, *et al.* DNA barcoding for identification of toxic amanita species [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 279–282.
- [6] TSURUDA S, AKAKI K, HIWAKI H, *et al.* Multiplex real-time per assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniformis* and *Lentinula edodes* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 76(7): 1343–1349.
- [7] CAI YC, LI X, LV R, *et al.* Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 810209.

- [8] FLOREN C, WIEDEMANN I, BRENI G B, *et al.* Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 1054–1058.
- [9] WECK S, PETERSEIL V, MAYER HK, *et al.* Development and validation of a real-time PCR assay to detect *Cannabis sativa* in food [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4748.
- [10] VELASCO A, RAMILO-FERNÁNDEZ G, SOTELO CG. A real-time PCR method for the authentication of common cuttlefish (*Sepia officinalis*) in food products [J]. *Foods*, 2020, 9(3): 9030286.
- [11] YANG YG, LIU MC, NIU N, *et al.* Identification of small berry species in food and juice using TaqMan-based real-time PCR [J]. *J AOAC Int*, 2019, 102(5): 1552–1566.
- [12] 刘艳, 王鸣秋, 李诗瑶, 等. 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[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 254–260.
LIU Y, WANG MQ, LI SY, *et al.* Detection of bovine-derived components in meat products based on real-time fluorescent quantitative PCR and digital PCR [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(7): 254–260.
- [13] ZHAO J, ZHANG T, LIU YF, *et al.* Qualitative and quantitative assessment of DNA quality of frozen beef based on DNA yield, gel electrophoresis and PCR amplification and their correlations to beef quality [J]. *Food Chem*, 2018, 260: 160–165.
- [14] WANG WJ, FU M, ZHANG QD, *et al.* A novel quantitative real-time PCR method for the detection of mammalian and poultry species based on a shared single-copy nuclear DNA sequence [J]. *Food Chem*, 2021, 341(2): 128170.
- [15] LI TT, WANG JS, WANG ZY, *et al.* Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR [J]. *Food Chem*, 2021, 344: 128622.
- [16] MA AIM, SHAN LJ, WANG NJ, *et al.* Characterization of a *Pleurotus ostreatus* fruiting body-specific hydrophobin gene, Po.hyd [J]. *J Basic Microbiol*, 2007, 47(4): 317–324.
- [17] LI X, PAN LW, LI JY, *et al.* Establishment and application of event-specific polymerase chain reaction methods for two genetically modified soybean events, A2704-12 and A5547-127 [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(24): 13188–13194.
- [18] LINACERO R, BALLESTEROS I, SANCHIZ A, *et al.* Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods [J]. *Food Chem*, 2016, 202: 334–340.
- [19] CHENG JH, CHOU HT, LEE MS, *et al.* Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 336–342.
- [20] 陈丽萍, 赵迎春, 李芳, 等. 实时荧光 PCR 法鉴定野生食用菌中白牛肝菌成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(10): 3244–3250.
CHEN LP, ZHAO YC, LI F, *et al.* Identification of *Boletus bainiugan* Dentinger in wild edible fungi by real-time fluorescence PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(10): 3244–3250.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



马 豪, 助理工程师, 主要研究方向为基因检测方向。
E-mail: 921566995@qq.com



高宏伟, 博士, 研究员, 主要研究方向为分子生物学检测技术。
E-mail: ghw75@126.com