

# 基于单拷贝核基因的数字 PCR 定量检测肉制品中羊源性成分

赵新,陈锐,刘娜,王一衡,刘双,李瑞环,王永,兰青阔\*  
(天津市农业科学院生物技术研究所,天津 300381)

**摘要:** GeneBank 搜索牛、绵羊、山羊、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂等 15 种动物的单拷贝核基因组序列信息,应用生物信息学分析筛选 15 种动物共有的种间保守区域,设计一对可同时扩增 15 种动物源性 DNA 的内参基因引物和探针;同时分析筛选绵羊和山羊共有且和其余动物种内特异性区域,设计一对只能扩增羊源性 DNA 的特异性基因引物和探针。基于微滴数字 PCR 技术,引入内参基因校正羊种属特异性基因测定方法,建立科学准确的肉制品中羊源性成分量化判定方法。结果表明,所建立方法具有良好的特异性和通用性,内参基因和羊种属特异性基因的最低检出限分别为 32 和 26 copies/ $\mu\text{L}$ ,模拟添加样品的正确度偏差均值为 8.66%,符合数字 PCR 方法制定指南要求不得大于 25%,说明量化判定方法结果具有较高的准确性。

**关键词:** 单拷贝,核基因组,内参基因,羊种属特异性基因,数字 PCR,肉制品

## Quantitative Detection Method for Ovine-derived Materials in Meat Products using Single Copy Nucleus Genes by Droplet Digital PCR

ZHAO Xin, CHEN Rui, LIU Na, WANG Yiheng, LIU Shuang, LI Ruihuan, WANG Yong, LAN Qingkuo\*

(Biotechnology Research Institute, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300381, China)

**Abstract:** GeneBank was used to search single-copy nuclear genome sequences of 15 animals including cow, sheep, goat, pig, horse, donkey, chicken, duck, goose, turkey, dog, cat, rat, rabbit, mink, etc. A pair of internal reference gene primers and probes were designed based on screening for interspecific conserved areas common to 15 animals applied bioinformatics. A pair of species-specific gene primers and probes were designed based on screening for sheep and goats are common, but separate from other animal species. Based on microdroplet droplet digital PCR technology, internal reference gene was used to correct specific genes of sheep species, a scientific and accurate quantitative determination method for sheep-derived components in meat products was established. The results showed that the method has good specificity and universality. The minimum detection limits of internal reference genes and sheep species specific genes were 32 and 26 copies/ $\mu\text{L}$ , respectively. The mean deviation of accuracy of the simulated added samples was 8.66%, and the deviation of accuracy meeting the requirements of the digital PCR method should not be more than 25%, indicating that the results of the quantitative determination method had high accuracy.

**Key words:** single copy; nucleus genes; internal reference genes; sheep species-specific genes; droplet digital PCR; meat products

中图分类号: TS251.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)06-0260-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040155

**引文格式:** 赵新,陈锐,刘娜,等.基于单拷贝核基因的数字 PCR 定量检测肉制品中羊源性成分[J].食品工业科技,2021,42(6):260-264,281.

ZHAO Xin, CHEN Rui, LIU Na, et al. Quantitative Detection Method for Ovine-derived Materials in Meat Products using Single Copy Nucleus Genes by Droplet Digital PCR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 260-264, 281. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

近年来,各类涉及民生的食品安全问题受到社会各界的广泛关注,在经济利益的驱使下,肉制品的

“掺杂使假”现象屡禁不止,严重扰乱和破坏了市场秩序和社会安定,同时也使消费者对食品产业的信

收稿日期: 2020-04-17

作者简介: 赵新(1983-),女,硕士,副研究员,主要从事农产品分子检测技术方面的研究, E-mail: zhaoxin2008999@126.com。

\*通信作者: 兰青阔(1987-),男,硕士,研究员,主要从事农产品安全质量分子检测技术方面的研究, E-mail: lanqingkuo@163.com。

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCNJC14800)。

心大大降低<sup>[1]</sup>。

实时荧光 PCR 技术是进行肉制品掺伪鉴别的常用方法之一,在市场监管方面发挥了积极作用。随着分子生物学的发展,近年来,微滴数字 PCR (droplet digital PCR, dd PCR) 技术在肉制品掺伪量值判定中逐渐被应用<sup>[2]</sup>。微滴数字 PCR 是通过 PCR 扩增和荧光信号的积累读取阳性微滴数目,相较实时荧光 PCR 技术,具有更高的灵敏度和选择性,且无需标准曲线,实现了 DNA 检测从相对定量到绝对定量的飞跃,是分子水平上的一个里程碑,其应用面也越来越广泛<sup>[3-5]</sup>。

目前国内外广泛使用线粒体 DNA 作为靶基因进行肉制品掺伪的鉴别和定量判定。线粒体 DNA 具有其特殊的母系遗传方式和胞内多拷贝带来的高灵敏度检测的优势<sup>[6-7]</sup>,但线粒体 DNA 的拷贝数在不同物种组织间的稳定性相对于核基因组 DNA 有明显不足,且存在相对变异系数<sup>[8-9]</sup>。因此,亟需科学准确的量化判定技术的建立,为市场监管部门依据掺假情节轻重(即掺假量化数值)针对性地进行处罚和治理提供技术支持<sup>[10-12]</sup>。

核基因组 DNA 与线粒体 DNA 相比,在不同物种组织间更能稳定遗传,而单拷贝核基因组 DNA 相较于其他基因拷贝数少且数量相对恒定,具有准确且稳定的检测优势,是开展肉制品掺伪定量检测的最适 DNA 来源<sup>[13-14]</sup>。本研究基于单拷贝核基因,应用微滴数字 PCR 技术,同时引入内参基因校正种属特异性基因百分含量,省去了现有一些报道中通过建立动物源性成分 DNA 浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )、拷贝数浓度( $\text{copy}/\mu\text{L}$ )与样品质量( $\text{mg}$ )之间的线性关系,进而推导肉制品中动物源性成分量值的过程,实现通过数字 PCR 终点法绝对定量,借助内参基因,以单拷贝核基因组拷贝数直接一步法对肉制品中羊源性成分进行量值判定,更加简便直观的获得食品掺伪数值,有效提高检测方法的灵敏度、准确性和广谱性<sup>[9-10]</sup>,为市场监管提供科学准确的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

牛肉、绵羊肉、山羊肉、猪肉、马肉、鸡肉、鸭肉、火鸡肉 天津市农贸市场,实验室冷冻保存;大豆粉、玉米粉、水稻粉 实验室常温保存;乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50094、金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希氏菌 CMCC(B)44102 实验室冷藏保存;动物基因组提取试剂盒 实验室研制;

Premix Ex Taq(Probe qPCR)预混液 TaKaRa 公司;引物、探针 上海生工生物技术有限公司。

QX-100 微滴数字 PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司;ND-1000 NanoDrop 核酸蛋白测定仪 美国 Bio-Rad 公司;Allegra 21R Centrifuge 高速冷冻离心机 美国 BECKMAN 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 引物与探针的设计 根据 GenBank 网站中公布的牛、绵羊、山羊、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂等 15 种动物的核基因组序列,应用生物信息学分析筛选 15 种动物共有的种间保守区域,应用 Beacon Designer 7 软件,设计一对内参引物和探针,可同时扩增 15 种动物源性 DNA;同时分析筛选绵羊和山羊共有且和其余动物种内特异性区域,设计一对特异性引物和探针,只能扩增羊源性 DNA。引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成,引物和探针序列见表 1。

1.2.2 样品的制备 取待测动物肌肉组织样本清水洗净后,剔去动物组织中的结缔组织和脂肪,剪成约 200 mg 的小块,放入用液氮预冷的研钵中,然后缓缓的向研钵中加入液氮,迅速研磨,直到样品成细微的粉末状为止。

1.2.3 DNA 模板的提取 取 100 mg 动物肌肉组织样本放入 2 mL 离心管,参照本实验室研制的动物基因组提取试剂盒方法提取基因组 DNA<sup>[15]</sup>,在 NanoDrop 核酸蛋白测定仪中进行核酸含量的测定,也可用其他等效动物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。取 100 mg 植物样本放入 2 mL 离心管,参照天根试剂盒植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA;取 2 mL 菌液放入 2 mL 离心管,参照天根试剂盒细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.4 微滴数字 PCR 检测体系的建立 在 20  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系中,包括 2  $\times$  dd PCR Supermix for probes 预混液 10  $\mu\text{L}$ ,上下游引物和探针各 1  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ ,无菌超纯水补足 20  $\mu\text{L}$ ,混匀后离心。将其小心转移至微卡发生器,切忌产生气泡,同时与微卡发生器相应位置加入重油 70  $\mu\text{L}$ ,盖上垫片,放入微滴生成器中生成微滴。吸取 40  $\mu\text{L}$  生成的微滴,小心转移至数字 PCR 96 孔反应板中,170  $^{\circ}\text{C}$  热封后在 PCR 仪上开始循环,PCR 仪爬坡速度设置为 2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ,循环参数为:95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min;40 cycles (94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min);98  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min。

1.2.5 方法特异性检测 用羊种属特异性基因引物

表 1 PCR 引物和探针序列

Table 1 PCR primers and probe sequences

名称	引物序列(5'-3')	片段大小
内参基因	GE-F:5'-AATGATGCACCTTGTGAAGATGA-3'	66 bp
	GE-R:5'-CCCCTCAAAACCCAGTTCTCT-3'	
	GE-P:5'-FAM-AAAAGGCATTTGGTTGCC-BHQ1-3'	
羊源基因	OA-F:5'-AGTTGCCCATGCTGTAG-3'	77 bp
	OA-R:5'-CAGGACTTCTAATTTGCCAGTAAC-3'	
	OA-P:5'-FAM-AGGAGGAATCCCCATCATCACGGC-BHQ1-3'	

和探针扩增 15 种动物源性样品(绵羊、山羊、牛、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂)及其他一些非动物源性样品(大豆、玉米、水稻等植物混合样品、乙型副伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌等细菌混合样品),以灭菌去离子水作为空白对照模板,设立 3 个平行样,重复 3 次实验,按 1.2.3 反应程序及条件进行微滴数字 PCR 扩增。

**1.2.6 内参基因通用性检测** 为了确定内参基因通用性,用内参基因引物和探针扩增 15 种动物源性样品(绵羊、山羊、牛、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂)及其他一些非动物源性样品(大豆、玉米、水稻等植物混合样品、乙型副伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌等细菌混合样品),以灭菌去离子水作为空白对照模板,设立 3 个平行样,重复 3 次实验,按 1.2.3 反应程序及条件进行微滴数字 PCR 扩增。

**1.2.7 羊源性成分定量方法线性动态范围测试** 分别利用羊源性成分定量检测的标准参照物被梯度稀释的 DNA 作为模板,含量为 50~0.001 ng/ $\mu\text{L}$ 。每次设 3 个平行样,重复 3 次实验,计算 PCR 扩增的拷贝数浓度值的标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD),确定方法的线性动态范围和定量限,以及线性动态范围的线性度和精密度。

**1.2.8 对鲜冻畜、禽肉产品中羊源性成分进行方法适用性验证** 准备 5 份方法适用性测试样品,羊源性成分含量为 70%(S1:70%羊肉+30%猪肉),羊源性成分含量为 30%(S2:30%羊肉+70%鸡肉),羊源性成分含量为 10%(S3:10%羊肉+90%鸭肉),羊源性成分含量为 30%(S4:30%羊肉+35%猪肉+35%鸡肉),羊源性成分含量为 70%(S5:70%羊肉+15%猪肉+15%鸭肉),采用该定量方法进行定量分析,同时计算测试样品的正确度偏差。

**1.2.9 市售样品检测** 采用本研究所建立的基于单拷贝基因定量检测肉制品中羊源性成分的数字 PCR 方法对市售肉制品进行羊源性成分定量检测,统计检测结果与市售样品标签标注羊源性成分含量的符合情况。

### 1.3 数据处理

数字 PCR 仪运行结束后,得出每个测试样的内参基因拷贝数浓度和羊种属特异性基因拷贝数浓度,取 3 个平行试验的均值,按照公式  $A(\%) = (B/C) \times 100$  计算测试样的羊源性成分含量,其中 A:羊源性成分含量(%);B:羊种属特异性基因拷贝数浓度(copies/ $\mu\text{L}$ );C:内参基因拷贝数浓度(copies/ $\mu\text{L}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物和探针的特异性试验

用羊种属特异性基因引物扩增 15 种动物源性样品(绵羊、山羊、牛、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂)及其他一些非动物源性样品(植物混合样品、细菌混合样品),以灭菌去离子水作为空白对照模板。扩增结果表明,羊种属特异性基因引物和探针只有以羊源性样品(绵羊、山羊)的 DNA 为模板才能获得阳性微滴和对应的拷贝数含量,且阳

性微滴与阴性微滴均能明显分开,其他样品均无阳性微滴,表明 PCR 扩增体系具有良好的扩增特异性(图 1)。

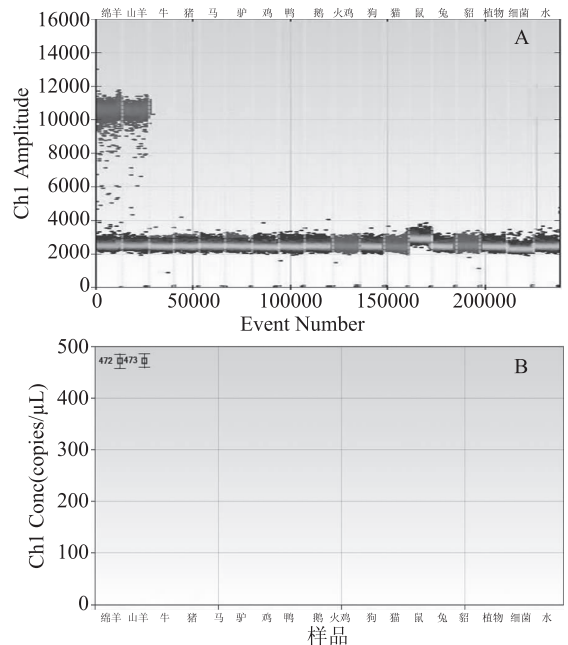


图 1 羊种属特异性基因微滴数字 PCR 特异性扩增结果

Fig.1 Specificity of sheep species-specific genes dd PCR

注:A:微滴散点图;B:拷贝数图;图 2 同。

### 2.2 内参基因通用性检测试验

用内参基因引物扩增 15 种动物源性样品(绵羊、山羊、牛、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂)及其他一些非动物源性样品(植物混合样品、细菌混合样品),以去离子水作为阴性对照模板。扩增结果表明,只有以动物源性样品的 DNA 为模板才有阳性微滴和对应的拷贝数含量,且阳性微滴与阴性微滴均能明显分开,其他样品均没有阳性微滴,表明 PCR 扩增体系对于动物源性成分具有良好的种内通用性和种间特异性(图 2)。

### 2.3 羊源性成分定量方法定量限测试

利用羊源性成分定量检测的标准参照物被梯度稀释的 DNA 作为模板,含量为 50~0.001 ng/ $\mu\text{L}$ ,3 次重复实验的 PCR 反应的拷贝数浓度值统计在表 1、表 2 中,计算发现,随着模板浓度的降低,3 个平行反应的拷贝数浓度值的 SD 值变大,除 0.005、0.001 ng/ $\mu\text{L}$  两个浓度外,其余浓度 RSDr 和 RSDr 均小于 25%,在可接受的范围之内。基于试验稳定性,定义 0.05 ng/ $\mu\text{L}$  浓度为方法定量限,内参基因最低检出限为 32 个拷贝,羊种属特异性基因最低检出限为 26 个拷贝。

### 2.4 对鲜冻畜、禽肉产品中羊源性成分进行方法适用性验证

准备 5 份方法适用性测试样品,采用所建立的微滴数字 PCR 定量方法进行羊源性成分定量检测,5 份测试样品的定量结果分别为 S1 (70% 羊肉 + 30% 猪肉)羊源性成分含量 74.71%,S2 (30% 羊肉 + 70% 鸡肉)羊源性成分含量 32.69%,S3 (10% 羊肉 +

表1 内参基因定量限测试  
Table 1 Quantitative limit test of internal reference genes

DNA 含量 (ng/ $\mu$ L)	拷贝数 (Copies/ $\mu$ L)			拷贝平均数	SDr	RSDr (%)
	1	2	3			
50	1350.000	1333.333	1350.000	1344.444	19.437	1.446
10	268.667	273.667	271.667	271.333	5.745	2.117
5	132.000	138.667	141.667	137.444	5.593	4.069
1	26.467	24.667	25.733	25.622	1.016	3.965
0.5	13.167	15.000	12.933	13.700	1.142	8.338
0.1	3.127	2.693	2.863	2.894	0.239	8.249
0.05	1.743	1.490	1.690	1.641	0.158	9.603
0.01	0.611	0.596	0.610	0.606	0.062	10.279
0.005	0.413	0.531	0.547	0.497	0.167	33.557
0.001	0.408	0.298	0.346	0.351	0.178	50.859

表2 羊种属特异性基因定量限测试  
Table 2 Quantitative limit test of sheep species-specific genes

DNA 含量 (ng/ $\mu$ L)	拷贝数 (Copies/ $\mu$ L)			拷贝平均值	SDr	RSDr (%)
	1	2	3			
50	1276.667	1216.667	1236.667	1243.333	30.414	2.446
10	245.000	249.667	251.333	248.667	3.391	1.364
5	124.667	134.000	128.667	129.111	4.910	3.803
1	23.800	26.467	23.967	24.744	1.609	6.501
0.5	13.533	12.333	12.867	12.911	0.546	4.232
0.1	2.447	2.350	2.497	2.431	0.125	5.131
0.05	1.337	1.353	1.273	1.321	0.107	8.121
0.01	0.646	0.433	0.463	0.514	0.119	23.088
0.005	0.517	0.503	0.700	0.573	0.250	43.630
0.001	0.591	0.381	0.290	0.421	0.505	120.070

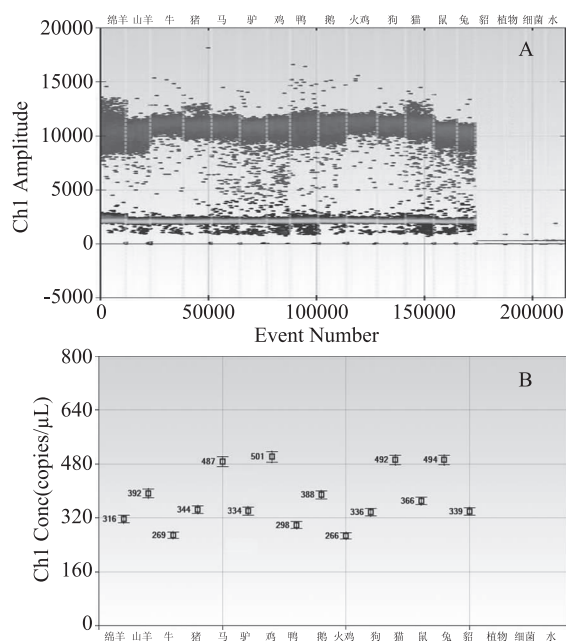


图2 内参基因通用性检测微滴数字 PCR 扩增结果

Fig.2 Generality of internal reference genes dd PCR

90%鸭肉)羊源性成分含量 11.27%, S4(30%羊肉 + 35%猪肉 + 35%鸡肉)羊源性成分含量 32.91%, S5(70%羊肉 + 15%猪肉 + 15%鸭肉)羊源性成分含量

73.65% (表3)。结果表明建立的微滴数字 PCR 定量方法可以准确定量鲜冻畜、禽肉产品中羊源性成分的含量,在整个线性动态范围内,5份测试样品的正确度偏差依次为 6.72%、8.97%、12.70%、9.70%、5.21%,正确度偏差均不超过标准值的 25%,符合数字 PCR 方法制定指南要求。

### 2.5 市售样品检测结果

市售样品标签对于样品含量的标注很少,但都会对样品成分进行详细的标注,比如在市售带包装的羊肉片和羊肉串上,一般标注有“精选羊肉、羊羔肉、羊肉猪肉混合肉、羊肉合成肉”等字样。将标注“精选羊肉、羊羔肉”等单一羊肉字样的样品中羊源性含量视为 100%,标注“混合肉、合成肉”的样品中羊源性含量视为 < 100%。采用本研究所建立的微滴数字 PCR 定量检测方法对市售不同鲜冻畜、禽肉产品进行羊源性成分含量测定,统计检测结果与市售样品标签标注动物源性成分含量的符合情况,验证本试验所建立方法的适用性。经数字 PCR 验证,标注“精选羊肉、羊羔肉”等单一羊肉字样的样品中羊源性成分平均含量为 95.11%,标注“混合肉、合成肉”字样的样品中羊源性成分平均含量为 63.06%,所建立方法的测定结果与市售样品标签标注基本相符,结果见表 4。

表3 方法适用性验证结果  
Table 3 Results of method applicability verification

样品	理论值 (%)	来源	拷贝数(Copies/ $\mu$ L)			拷贝平均值	SD	RSD (%)	实验值 (%)
			1	2	3				
S1	70	羊源	190.00	195.00	197.00	194.00	3.61	1.86	74.71
		内参	259.00	264.00	256.00	259.67	4.04	1.56	
S2	30	羊源	90.60	92.00	93.00	91.87	1.21	1.31	32.69
		内参	296.00	257.00	290.00	281.00	21.00	7.47	
S3	10	羊源	32.00	27.00	29.00	28.67	1.53	5.33	11.27
		内参	243.00	256.00	264.00	254.33	10.60	4.17	
S4	30	羊源	92.00	90.80	93.00	91.93	1.10	1.20	32.91
		内参	273.00	284.00	281.00	279.33	5.69	2.04	
S5	70	羊源	189.00	192.00	178.00	186.33	7.37	3.96	73.65
		内参	248.00	252.00	259.00	253.00	5.57	2.20	

表4 本研究建立的微滴数字 PCR 方法和市售样品标签标注成分含量比对结果

Table 4 Comparison of results detected by dd PCR and commercial sample the label ingredients

序号	样品名称	采样地点	标签标注成分	测定含量 (%)
1	羊肉片	大型超市	羊肉	85.10
2	羊肉片	大型超市	羊肉合成肉	67.32
3	羊肉片	大型超市	羊肉	98.63
4	羊肉片	农贸市场	羊肉合成肉	62.78
5	羊肉片	农贸市场	羊肉混合肉	72.67
6	羊肉片	农贸市场	羊肉	100.95
7	羊肉串	大型超市	羊肉	99.24
8	羊肉串	大型超市	羊肉	91.63
9	羊肉串	大型超市	羊肉合成肉	67.21
10	羊肉串	大型超市	羊肉合成肉	45.32

### 3 讨论与结论

本研究根据 GenBank 网站中公布的牛、绵羊、山羊、猪、马、驴、鸡、鸭、鹅、火鸡、狗、猫、鼠、兔、貂等 15 种常见肉源掺伪检测的动物核基因组序列,应用生物信息学手段,从中筛选 15 种动物的单拷贝核基因组序列设计引物和探针。相关研究报道中指出<sup>[16-19]</sup>,核基因组 DNA 相对于线粒体 DNA 在不同组织间相对稳定遗传,而单拷贝核基因组 DNA 相较于其他基因组 DNA 拷贝数少且数量相对恒定,具有更加准确且稳定的检测优势,是开展肉及肉制品掺假定量检测的最适 DNA 来源。

基于 15 种动物的单拷贝核基因组序列,进一步应用生物信息学手段,从中筛选 15 种动物共有的种间保守区域,设计内参基因引物和探针,该内参基因可在 15 种动物中稳定扩增。内参基因的成功引入,对肉源品种的整体 DNA 损伤程度和提取效率实现了有效的监控,同时校正了种属特异性基因的百分含量,消除了结果的量值偏差,无需构建样品质量百分比含量与拷贝数的关系系数<sup>[20-21]</sup>,同时也打破了对掺伪样品种类数量的局限,由此获得的食品掺假数值真实可信。

本研究应用微滴数字 PCR 技术的绝对定量原

理,通过种属特异性单拷贝核基因组 DNA 拷贝数浓度与内参基因拷贝数浓度之比,无需构建标准曲线,实现一步法确定待测样品中羊源性成分的百分含量,且微滴数字 PCR 技术在低浓度的核酸含量下,也可高度灵敏和准确的对核酸的拷贝数进行绝对定量,提高了检测方法的灵敏度和准确性。为相关监管和执法部门进一步加强监管、减少掺伪欺诈等行为的发生提供了可靠的技术支撑。

#### 参考文献

- [1] 王萍,乔勇升,韩芷玲.猪源性成分检测中 3 种 DNA 提取方法比较[J].生物加工过程,2015(6):1-64.
- [2] 史艳宇,王莹,石虹,等.微滴数字 PCR 方法检测猪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.
- [3] Hayden R T, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(2):540-546.
- [4] 胡伟,陈荣华,张晨,等.微滴式数字 PCR 技术用于生物样品种属鉴定和绝对定量[J].法医学杂志,2014,30(5):342-345.
- [5] 王珊,李志娟,苗丽.微滴式数字 PCR 与实时荧光 PCR 检测羊肉制品中羊源和猪源性成分方法的比较[J].肉类工业,2015(7):38-41.
- [6] 刘少宁,陈智,高迎春,等.一种利用线粒体 DNA 鉴别牛羊肉中猪肉的 LAMP 检测方法:中国,ZL20151041167-1[Z].2015-11-04.
- [7] Sunutcha S, Lawan C, Montri S. Identification of sea snake meat adulteration in meat products using PCR-RFLP of mitochondrial DNA[J]. Food Science and Human Wellness, 2018, 7(2):170-174.
- [8] 刘二龙,卢丽,凌莉,等.红薯源性成分微滴式数字 PCR 的检测与定量分析[J].现代食品科技,2019,35(7):273-277.
- [9] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR(dd PCR)[J]. Food Chemistry, 2015, 173:1054-1058.
- [10] Zual Kesmen, Ahmet E Yetiman, Fikretin Sahin, et al. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using

(下转第 281 页)

gamma and electron beam irradiation on the physicochemical and nutritional properties of mushrooms: A review [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 641-650.

[5] Cardoso R V C, Fernandes Â, Barreira J C M, et al. Effectiveness of gamma and electron beam irradiation as preserving technologies of fresh *Agaricus bisporus* Portobello: A comparative study. Food Chemistry, 2019, 278(11): 760-766.

[6] 杨伟, 徐莹, 樊燕, 等. 海藻酸钠涂膜及<sup>60</sup>Co-γ 辐照处理对小枣的保鲜作用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 343-347.

[7] 杨俊丽, 乔勇进, 王海宏, 等. 高能电子束与<sup>60</sup>Co-γ 射线对大蒜辐照保鲜效果的比较研究[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 260-265.

[8] 周任佳, 乔勇进, 王海宏, 等. 高能电子束辐照对鲜切哈密瓜生理生化品质的影响[J]. 核农学报, 2012, 26(2): 300-305, 323.

[9] 龙明秀, 吴凤玉, 田竹希, 等. <sup>60</sup>Co-γ 辐照处理对蓝莓保鲜效果的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(11): 2165-2176.

[10] 周冉冉, 高虹, 范秀芝, 等. <sup>60</sup>Co-γ 射线和电子束辐照对鲜香菇保鲜效果的初步研究[J]. 核农学报, 2019, 33(3): 490-497.

[11] 于广伟. 氧化淀粉涂膜对草莓、甜樱桃和巴黎的保鲜效果影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[12] 雷庆, 黄敏, 康菊, 等. 电子束辐照草莓保鲜效果研究[J]. 核农学报, 2011, 25(3): 510-513.

[13] 陈召亮, 方强, 王海宏, 等. 电子束辐照对鲜切西洋芹的保鲜效应[J]. 上海农业学报, 2010, 26(2): 9-13.

[14] 张小康. 早中熟鲜食红枣保鲜措施及其生理机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.

[15] Li H, Xiong Z, Gui D, et al. Effect of aqueous ozone on quality and shelf life of Chinese winter jujube[J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2019, 43(9): 142-145.

[16] 康晨炫. 设施条件下冬枣品质特性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.

[17] 陈召亮, 王海宏, 乔勇进. 电子束辐照对草莓灰霉病菌致病力及致病相关酶活性的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(8): 1156-1161.

(上接第 264 页)

real-time PCR assays[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(2): C167-C173.

[11] Rene Koppel, Ju g Ruf, Jurg Rentsch. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep [J]. Eur Food Res Technol, 2011, 232(1): 151-155.

[12] Ergün Şakalar, Mustafa Fatih Abasiyanik. Qualitative analysis of meat and meat products by multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(46): 9379-9386

[13] 纪艺, 徐晓丽, 姜媛媛, 等. 基于数字 PCR 的不同品种鸭组织中线粒体与核 DNA 拷贝数差异研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 7-13.

[14] Hu L, Yang Y J, Zhao Y, et al. DNA barcoding for molecular identification of *Demodex* based on mitochondrial genes [J]. Parasitology Research, 2017, 116(12): 3285-3290.

[15] 刘娜, 赵新, 陈锐, 等. 动物肌肉组织 DNA 的提取方法及实时荧光定量 PCR 检测[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 74-80.

[18] Zhao Y, Zhu X, Hou Y, et al. Effects of nitric oxide fumigation treatment on retarding cell wall degradation and delaying softening of winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) fruit during storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 156(7): 987-993.

[19] 戚蓉迪, 颜伟强, 岳玲, 等. 电子束辐照对进口甜樱桃保鲜效果的影响[J]. 核农学报, 2014, 28(5): 839-844.

[20] 杨俊丽, 陈召亮, 王海宏, 等. 高能电子束辐照对草莓保鲜效果的影响[J]. 上海农业学报, 2010, 26(3): 8-12.

[21] 周慧娟, 叶正文, 张学英, 等. 电子束辐照对蓝莓品质及生理代谢的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(9): 1308-1316.

[22] Kou X, He Y, Li Y, et al. Effect of abscisic acid (ABA) and chitosan/nano-silica/sodium alginate composite film on the color development and quality of postharvest Chinese winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) [J]. Food Chemistry, 2019, 270(7): 385-394.

[23] 武继芸. 不同涂膜处理对冬枣贮藏品质和抗氧化活性的影响[D]. 天津: 天津大学, 2016.

[24] 王秋芳, 乔勇进, 乔旭光. 高能电子束辐照对巨峰葡萄生理品质的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 571-577.

[25] Deng W, Zhao X H. Calcium maintained higher quality and enhanced resistance against chilling stress by regulating enzymes in reactive oxygen and biofilm metabolism of Chinese winter jujube fruit [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(4): 1-8.

[26] Zhao Y T, Zhu X, Hou Y Y, et al. Postharvest nitric oxide treatment delays the senescence of winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) fruit during cold storage by regulating reactive oxygen species metabolism [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 261(2): 1-9.

[27] Nam H A, Ramakrishnan S R, Kwon J H. Effects of electron-beam irradiation on the quality characteristics of mandarin oranges (*Citrus unshiu* (Swingle) Marcov) during storage [J]. Food Chemistry, 2019, 286(4): 338-345.

[28] 魏征, 张政, 魏佳, 等. 茉莉酸甲酯雾化熏蒸对冬枣采后贮藏品质的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(1): 43-48.

[16] 陈传君, 金鹭, 林华, 等. 食品中羊肉源性成分微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2019, 10(21): 1-13.

[17] Spychaj A, Szalata M S, Omski R, et al. Identification of bovine, pig and duck meat species in mixtures and in meat products on the basis of the mt DNA cytochrome oxidase subunit I (COI) gene sequence [J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2016, 66(1): 31-36.

[18] 赵永才, 高炳宏. 线粒体动力学与细胞能量代谢的关系及运动干预研究进展[J]. 生理学报, 2019, 71(4): 625-636.

[19] 戴纪刚, 肖颖彬, 闵家新, 等. 精确定量肺组织细胞线粒体 DNA 拷贝数方法的建立[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(18): 2033-2034.

[20] 王强, 蔡一村, 张扬, 等. 食品和饲料中鹅源性成分微滴式数字 PCR 检测与定量分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 258-263.

[21] 任君安, 邓婷婷, 黄文胜, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 311-316.