“牛肉”制品中牛肉含量的快速检测

柳 彬[1]，杨金易[1]，许 婉[2]，孙远明[1,*]
(1.华南农业大学食品学院，广东省食品质量安全重点实验室，农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(广州)，广东 广州 510642；2.华南农业大学动物科学学院，广东 广州 510642)

摘 要：以牛源性DNA为对象，利用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)-SYBR GreenⅠ技术建立“牛肉丸”制品中牛源性DNA含量的快速定量检测方法，以标准品中牛肉含量的对数值为横坐标，Ct差值为纵坐标，建立标准曲线，通过Ct(SB)–Ct(TM)或Ct(TB)–Ct(TM)的大小，判定“牛肉丸”中牛肉占“牛肉丸”中总肉量的百分比。结果表明：该法牛肉含量检出限均为0.1%，定量线性范围均为0.1%～90%。

关键词：牛肉；鉴伪；荧光定量聚合酶链式反应；SYBR-GreenⅠ

Development and Application of a Method for Rapid Detection of Beef Content in Commercial Beef Products

LIU Bin[1]，YANG Jin-yi[1]，XU Wan[2]，SUN Yuan-ming[1,*]
(1. Key Laboratory of Risk Assessment to Post-harvested Product Storage, Ministry of Agriculture, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China；2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract：In this study, a SYBR Green Ⅰ-based real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was established to rapidly determine bovine DNA in commercial beef meatballs. Two pairs of primers for bovine DNA (SB and TB) and the primer pair TM for mammalian DNA were designed. A standard calibration curve of the logarithm of beef content against cycle threshold (Ct) was plotted. The percentage of beef meat in meatball samples was calculated based on Ct(SB)–Ct(TM) or Ct(TB)–Ct(TM), minusing Ct (TM) with Ct (SB) and Ct (TB), respectively. The limit of detection (LOD) was 0.1% for beef content, and the linear range for quantitative determination was in the range of 0.1% to 90%.

Key words：beef；identification；fluorescent quantitative PCR；SYBR-GreenⅠ
中图分类号：TS251.5.2 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)24-0148-06
doi:10.7506/spkx1002-6630-201324031

牛肉丸制品为常见的容易受到掺假的产品之一[1-2]。现有肉制品检测主要注重是否注水[3]，而对主料真实含量的检测方法不完善[4-6]，有些不法商贩添加很少的主料或不添加主料，诸如添加经过“牛肉膏”腌制和染色的具有牛肉香味和色泽的猪肉，却冠以牛肉制品(如牛肉丸)的名称来欺骗消费者，以牟取较高的利润[7]。

为保证消费者的切身利益[1]，使消费者购买到放心产品，国家行业标准SB/T 10379—2004《速冻调制食品》对主料的含量规定和商务部实施的SB/T 10610—2011《肉丸》对牛肉丸(所用牛肉符合GB/T 17238—2008《鲜冻分割牛肉》)制品中主料含量的质量分数有着明确的规定：1)特级：含肉量不低于65%；2)优级，含肉量不低于55%；3)普通级：含肉量不低于45%。目前对肉制品的检测主要是对物种的鉴别[8-12]，但是目前国内外均无对牛肉丸中真实的牛肉含量(牛肉占“牛肉丸”中总肉量的质量分数)测定的相关检测方法。

本实验以牛源性DNA为对象，研究实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)方法的SYBR-GreenⅠ法，旨在建立“牛肉丸”制品中牛源性DNA含量的快速定量检测方法，为假冒牛肉制品的监督与控制提供技术支持[13-16]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

各种动物肉的样品(猪、牛、羊、狗、鸡、鸭、鹅和鱼)以及牛肉丸、牛肉干等牛肉产品均采自广州市各超市或农贸市场。

收稿日期：2012-12-31
基金项目：农业部公益性行业(农业)科研专项(201003008-08)；广东省科技计划项目(2010A032000001-4；2011A090200029)
作者简介：柳彬(1986—)，男，硕士研究生，研究方向为食品质量与安全。E-mail：liubin2066960@126.com
*通信作者：孙远明(1956—)，男，教授，博士，研究方向为食品安全和营养。E-mail：ymsun@scau.edu.cn

SYBR Premix Ex *Taq*™Ⅱ 宝生物工程(大连)有限公司；动物组织DNA试剂盒 生工生物工程(上海)股份有限公司。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 仪器与设备

AP800荧光PCR仪 宝生物工程(大连)有限公司；Nanophotometer核酸蛋白分析仪 德国Implen公司；打浆机 荷兰飞利浦公司。

1.3 方法

1.3.1 牛肉丸标准品制备

牛肉丸标准品为尽可能还原真实牛肉丸的制作方法，将90%的碎肉(牛肉或者猪肉)和10%的小麦淀粉、以及适量的盐、水均匀混合，配制成牛肉含量(牛肉占“牛肉丸”中总肉量的质量分数)分别为0%、0.1%、1%、3%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%和100%的牛肉丸标准品(猪肉作为掺假肉)，见表1。反复捏揉并做成球形，最后于沸水中煮20min。

表1 100g肉丸中牛肉占“牛肉丸”中总肉量的质量分数

Table 1 Percentage of beef meat in meatballs

组分	牛肉含量/%														
	0	0.1	1	3	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
牛肉	0	0.09	0.9	2.7	4.5	9	18	27	36	45.0	54	63	72	81	90
猪肉	90	89.91	89.1	87.3	85.5	81	72	63	54	45.0	36	27	18	9	0
淀粉	10														

1.3.2 引物设计

根据文献[12-18]设计引物序列，见表2。其中引物SB和TB是针对牛源性基因设计的，引物TM是针对哺乳动物源性基因设计的，因此引物TM对牛源性或者猪源性DNA的扩增效率基本相似且稳定。

表2 引物的序列

Table 2 Sequences of primers used for real-time PCR

目标基因	引物名称		引物序列(5′→3′)	产物片段大小/bp
牛源性基因	SB	F	CGG AGT AAT CCT TCT GCT CAC AGT	116
		R	GGA TTG CTG ATA AGA GGT TGG TG	
	TB	F	AACCAAATATTACAAACACCACTAGCT	76
		R	CCTTGCGTAGGTAATTCATTCTG	
哺乳动物源性基因	TM	F	AAAGGACTTGGCGGTGCTT	119
		R	GGGTTTGCTGAAGATGGCG	

1.3.3 DNA模板制备和质量浓度检测

DNA从25mg的样品中提取，样品包括牛肉丸标准品和市场上购买的肉丸产品。操作步骤根据提取试剂盒说明书进行。将提取的DNA溶液用核酸蛋白分析仪进行测定，以双重蒸馏水作为空白，记录其质量浓度以及OD_{260nm}/OD_{280nm}值。

1.3.4 PCR检测体系的建立

1.3.4.1 程序设置

反应使用1～100ng范围的DNA作为模板，每一扩增体系为25μL，含DNA模板1μL，上、下游引物各0.5μL(10μmol)。在SYBR-Green Ⅰ法中，每个扩增体系加入2×SYBR Premix EX *Taq*™Ⅱ 12.5μL，以灭菌蒸馏水补足体积。反应包括3个步骤：95℃预变性30s；95℃变性5s，60℃退火30s，进行40个循环。溶解曲线温度程序为95℃反应15s，60℃反应30s，95℃反应15s。

1.3.4.2 SYBR-Green Ⅰ法特异性检测

分别用牛源性引物SB、TB和 TM对提取的牛、猪、鱼、鸭、鸡、羊肉等的DNA通过荧光PCR仪检测特异性，同时以未添加引物的模板DNA作为阴性对照。

1.3.4.3 SYBR-Green Ⅰ法灵敏性检测

分别用牛源性引物SB、TB和TM对提取的牛、猪、鱼、鸭、鸡、羊肉等的DNA通过荧光PCR仪检测灵敏性，同时以未添加引物的模板DNA作为阴性对照。

1.3.4.4 检测牛肉含量标准曲线的建立

各样品通过荧光PCR仪测定后，分别得到Ct(SB)、Ct(TB)和Ct(TM)。分别以Ct(SB)和Ct(TB)对Ct(TM)做差，以得到的差值Ct(SB)–Ct(TM)和Ct(TB)–Ct(TM)为纵坐标，标准品中牛肉含量的对数值为横坐标，建立标准曲线。理想的标准曲线应呈线性相关且相关系数R^2不小于0.99。其中每个样品做2个平行。Ct的差值和牛肉丸中牛肉含量的对数值具有半对数关系：

$$Ct(SB)-Ct(TM)=b\lg x+a$$

$$或Ct(TB)-Ct(TM)=b\lg x+a \quad (1)$$

式中：b为斜率；a为截距；x为牛肉含量/%。

扩增效率的E值为：

$$E=10(-1/S)-1 \quad (2)$$

式中：S为斜率。

1.3.4.5 SYBR-Green Ⅰ法回收率的验证

为确定本方法的准确性，制作牛肉含量为15%、35%、55%和75%的模拟牛肉丸，每个含量设3个平行，进行荧光PCR扩增，将Ct(SB)–Ct(TM)或Ct(TB)–Ct(TM)代入所绘制的标准曲线，计算样品中主料含量的实际测量值，并通过检测结果计算平均回收率及变异系数CV。

$$回收率/\%=测量值/添加值\times100 \quad (3)$$

1.3.4.6 SYBR-Green Ⅰ法对市场牛肉丸样品的检测

提取商品化牛肉丸样品的DNA，将其荧光PCR扩增所得Ct差值代入所绘制的标准曲线，得出样品中牛肉成分的含量。

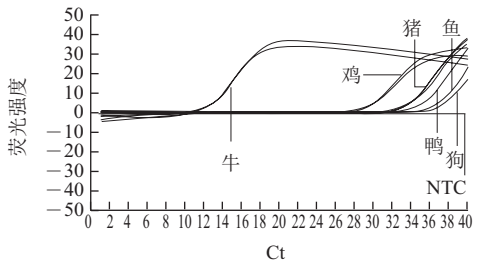
2 结果与分析

2.1 引物SB、TB和TM对不同物种DNA的扩增效果

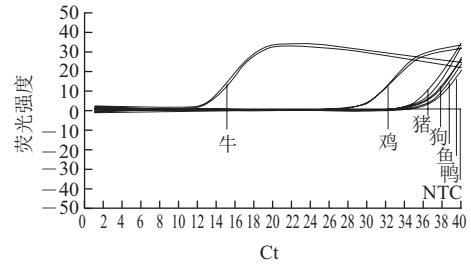
提取的总DNA的OD_{260nm}/OD_{280nm}值在1.8～2.0之间，质量浓度在20～300ng/μL，适合PCR反应。

通过引物SB、TB和TM对不同物种进行荧光定量扩

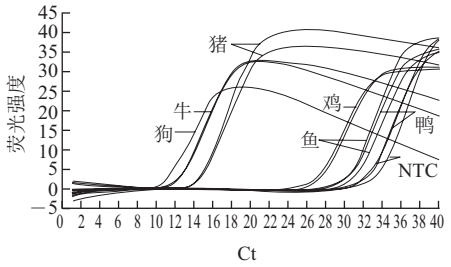
增，扩增图如图1所示。引物SB和TB对含牛源性成分样品的特异性强(Ct值均在13～14范围内)，但是对于猪肉样品的扩增效率差(Ct值接近37)，具有显著性差异。对其他类样品扩增效率差(Ct值大于30)，引物特异性较强，因此可应用于本研究中牛源性成分检测。引物TM对牛、猪和狗源性样品的扩增效率好(Ct值在11～15范围内)，当利用引物TM对总DNA含量进行测定时，其对牛源性和猪源性的扩增效率相近，能减小牛源性和猪源性扩增的差别，能近似测定对牛源性和猪源性总DNA。虽然TM对狗肉DNA的扩增效果也较好，但是狗肉比牛肉贵，使用狗肉掺假在牛肉中不常见，因此方案设计操作可行性强。



a.引物SB



b.引物TB



c.引物TM

NTC为阴性对照。下同。

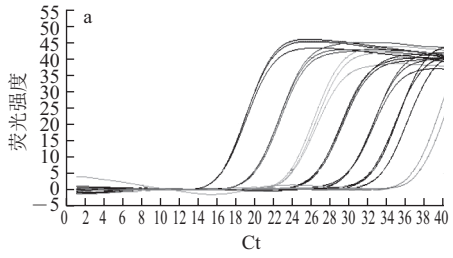
图 1 3种引物对不同物种DNA的荧光定量PCR扩增图

Fig.1 Amplification plots of DNA samples derived from different animals using three different primers

2.2 引物SB、TB和TM对牛源性DNA的灵敏性检测

2.2.1 引物SB对牛源性DNA的灵敏性检测

图2为以引物SB通过SYBR-Green Ⅰ法对一系列不同质量浓度牛源性DNA灵敏度检测结果。由图2a可知，当牛源性DNA质量浓度为3.83×10^{-5}ng/μL时，仍然有较好的扩增效果。得到相应的标准曲线，扩增效率(E)102.7%，线性方程为$y=-3.260\lg x+13.58$，$R^2=0.995$。在溶解曲线图(图2b)中有唯一的溶解曲线峰，可知引物SB具有较好的特异性。



曲线从左到右依次为模板DNA质量浓度3.83、3.83×10^{-1}、3.83×10^{-2}、3.83×10^{-3}、3.83×10^{-4}、3.83×10^{-5}ng/μL和NTC。

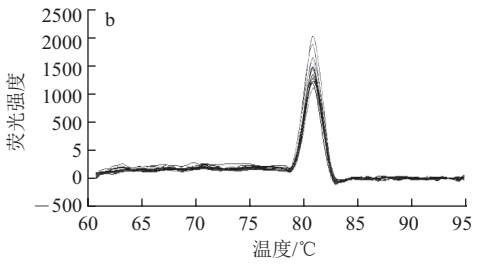
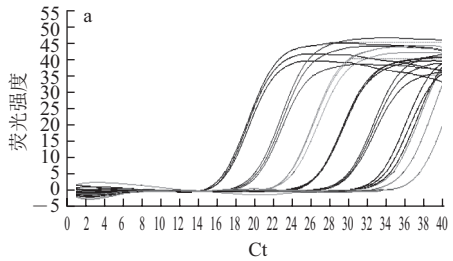


图 2 引物SB对牛源性DNA的灵敏性扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.2 Sensitive amplification and melting curves with primer SB for bovine DNA

2.2.2 引物TB对牛源性DNA的灵敏性检测



曲线从左到右依次为模板DNA质量浓度3.83、3.83×10^{-1}、3.83×10^{-2}、3.83×10^{-3}、3.83×10^{-4}、3.83×10^{-5}ng/μL和NTC。

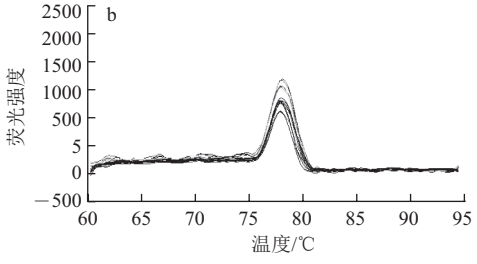


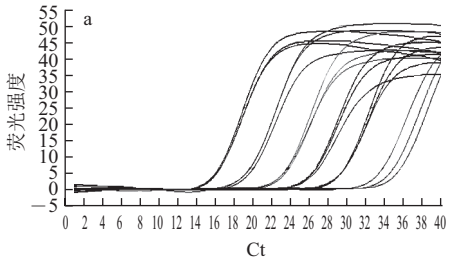
图 3 引物TB对牛源性DNA的灵敏性扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.3 Sensitive amplification and melting curves with primer TB for bovine DNA

图3为以引物TB通过SYBR-Green Ⅰ法对一系列不同质量浓度牛源性DNA灵敏度的检测结果。由图3a可知，

当牛源性DNA质量浓度为3.83×10^{-5}ng/μL时，仍然有较好的扩增效果。得到相应的标准曲线，扩增效率99.4%，线性方程为y=－3.336lg$x$＋13.69，R^2=0.998。在溶解曲线图(图3b)中有唯一的1个溶解曲线峰，可知引物TB具有较好的特异性。

2.2.3 引物TM对牛源性DNA的灵敏性检测



曲线从左到右依次为模板DNA质量浓度3.83、3.83×10^{-1}、3.83×10^{-2}、3.83×10^{-3}、3.83×10^{-4}ng/μL和NTC。

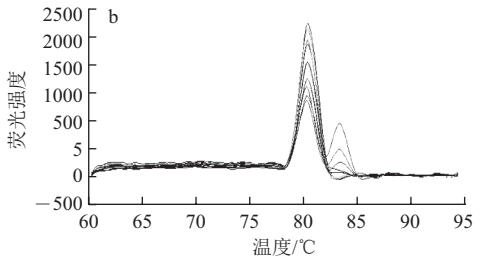


图4 引物TM对牛源性DNA的灵敏性扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.4 Sensitive amplification and melting curves with primer TM for bovine DNA

图4为以引物TM通过SYBR-Green Ⅰ法对一系列不同质量浓度牛源性DNA灵敏度的检测结果。由图4a可知，当牛源性DNA质量浓度为3.83×10^{-4}ng/μL时，仍然有较好的扩增效果。得到相应的标准曲线，扩增效率99.1%，线性方程为y=－3.343lg$x$＋13.27，R^2=0.997。在溶解曲线图(图4b)中除明显的1个峰以外，还有1个小峰，可能由引物二聚体的扩增或者操作中代入的杂质引起。

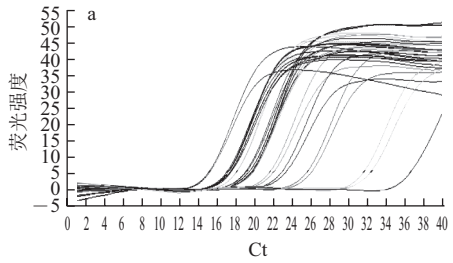
2.3 牛肉丸标准品模板DNA提取质量浓度检测

通过试剂盒对不同梯度牛肉含量的标准品肉丸提取DNA并检测，牛肉含量分别为100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、3%、1%、0.1%、0%，其对应的模板DNA质量浓度分别为：87.2、74.8、74.8、87.2、52.3、34.9、94.7、125、122、130、125、79.8、99.7、110、125ng/μL。

2.4 SYBR-Green Ⅰ法检测掺假牛肉丸标准曲线的建立

2.4.1 引物SB对不同牛肉含量标准品的扩增效果

由图5可知，溶解曲线图有唯一的1个峰，可知引物SB具有较好的特异性。



曲线从左到右依次为牛肉含量100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、3%、1%、0.1%、0%和NTC。

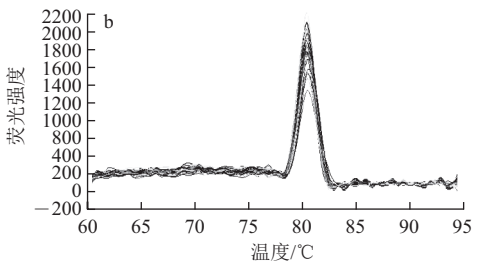
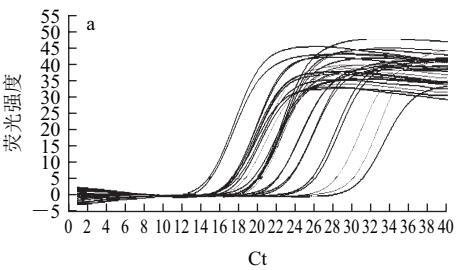


图5 引物SB对不同牛肉含量标准品的荧光定量PCR扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.5 Amplification and melting plots with primer SB for different concentrations of beef standard

2.4.2 引物TB对不同牛肉含量标准品的扩增效果



曲线从左到右依次为牛肉含量100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、3%、1%、0.1%、0%和NTC。

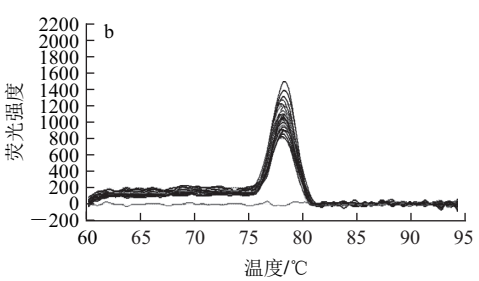


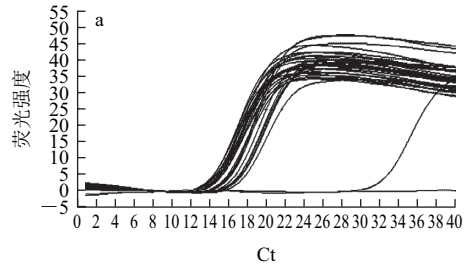
图6 引物TB对不同牛肉含量标准品的荧光定量PCR扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.6 Amplification and melting plots with primer TB for different concentrations of beef standard

由图6可知，溶解曲线图有唯一的1个峰，可知引物TB具有较好的特异性。

2.4.3 引物TM对不同牛肉含量标准品的扩增效果

图7为引物TM对15个不同DNA质量浓度的扩增曲线图和溶解曲线图，每个质量浓度做两个平行。



曲线从左到右依次为牛肉含量100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、3%、1%、0.1%、0%和NTC。

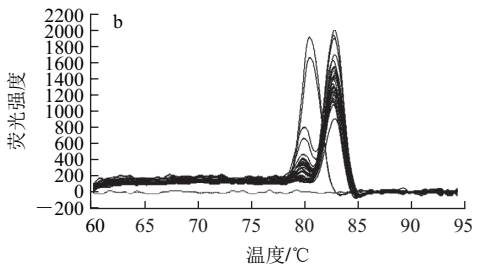


图 7 引物TM对不同牛肉含量标准品的荧光定量PCR扩增曲线图(a)和溶解曲线图(b)

Fig.7 Amplification and melting plots with primer TM for different concentrations of beef standard

由图7可知，溶解曲线图有唯一的1个峰，溶解曲线图出现2个扩增峰，小峰可能由二聚体扩增引起。

2.4.4 牛肉丸标准品检测数据和Ct差值的线性关系

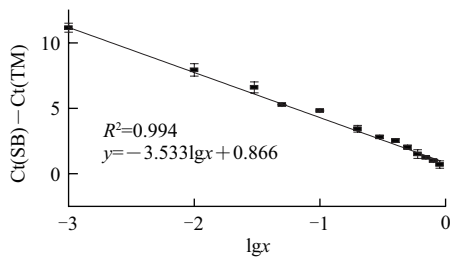


图 8 Ct(SB)–Ct(TM)值与牛肉含量的标准曲线

Fig.8 Standard curve for beef content versus Ct(SB)–Ct(TM)

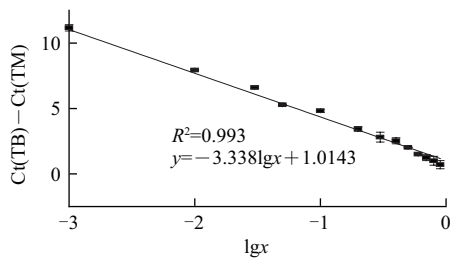


图 9 Ct(TB)–Ct(TM)值与牛肉含量的标准曲线

Fig.9 Standard curve for beef content versus Ct(TB)–Ct(TM)

由图8、9可见，各标准品的荧光PCR扩增差值Ct(SB)–Ct(TM)或Ct(TB)–Ct(TM)随主料成分增加而递减，其递减程度与标准品中主料含量的对数值呈线性相关关系，且线性程度良好(R^2>0.99)，符合实验要求。

因此，当牛肉丸牛肉含量占总肉量0.1%～90%时，荧光PCR的标准曲线具有较好的线性相关性，可以作为定量依据。当Ct(SB)–Ct(TM)<0.7或Ct(TB)–Ct(TM)<0.9时，可判定牛肉含量>90%；当Ct(SB)–Ct(TM)或Ct(TB)–Ct(TM)>8时，可判定牛肉含量<1%。

2.5 SYBR-GreenⅠ法回收率的验证

选取4组不同梯度牛肉含量分别为15%、35%、55%、75%的样品，根据SB和TM、TB和TM所建立的标准曲线得到的回收率分别为：91.32%～100.66%，89.56%～107.68%。平均每组模拟样品中测定的牛肉含量变异系数均在3%以下，说明实验的回收率和重复性良好，均符合实验要求。

2.6 SYBR-GreenⅠ法对市场牛肉丸样品的检测

由该方法对市场购买的牛肉丸、牛肉制品以及生鲜牛肉、猪肉等样品进行检测，得到的数据见表3。通过两组平行对照，得到的变异系数在3%以下，说明实验重复性良好，均符合实验要求。

表 3 市场牛肉丸样品中牛肉含量的检测结果

Table 3 The tested results for beef contents in the beef meatball samples colleted from the markets

序号	DNA质量浓度/(ng/μL)	价格	Ct(SB)–Ct(TM)	测得牛肉含量/%	Ct(TB)–Ct(TM)	测得牛肉含量/%
1	11.4	40元/500g	1.97	48.86	2.49	36.26
2	11.9	28元/500g	2.76	29.2	4.43	9.51
3	12.9	12元/500g	13.84	0.02	15.51	0.00
4	11.9	12元/500g	13.00	0.04	16.44	0.00
5	66.6	12元/500g	12.71	0.04	17.97	0.00
6	39.3	自制，无定价	12.01	0.07	14.40	0.01
7	19.4	17元/500g	14.01	0.02	15.07	0.01
8	38.3	17元/500g	13.54	0.03	15.05	0.01
9	53.2	39元/500g	0.08	100.00	0.70	100.00
10	32.8	39元/500g	0.06	100.00	0.59	100.00
11	160	18元/500g	6.67	2.28	9.13	0.37
12	244	12元/500g	6.53	2.49	10.41	0.15
13	244	18元/500g	18.42	0.00	16.80	0.00
14	314	2.3元/根	3.83	14.49	5.54	4.42
15	249	2.3元/根	5.68	4.33	9.94	0.21
16	763	1元/根	13.97	0.02	15.12	0.01
17	204	8.2元/包	7.45	1.37	7.355	1.26
18	107	8.2元/包	7.79	1.09	7.95	0.84
19	160	29元/300g	15.72	0.00	16.59	0.00
20	165	28元/240g	1.12	84.74	1.86	55.99
21	47.4	自制，无定价	13.41	0.03	13.79	0.01

由表3知，当测得牛肉含量≥100%，则为纯牛肉的样品；当Ct(SB)–Ct(TM)<0.7或Ct(TB)–Ct(TM)<0.9时，则可判定牛肉含量(牛肉占“牛肉丸”中总肉量的质量分数)>90%；当Ct(SB)–Ct(TM)或Ct(TB)–Ct(TM)>8时，

则可判定牛肉含量＜1%。价格越贵的牛肉丸及牛肉相关制品，其牛肉含量越高，而牛肉的成本价格在40元/500g左右，当牛肉丸的价格低于15元/500g的时候，部分样品检测不到牛肉，则很可能该“牛肉丸”为“牛肉香精丸”。由表3还可知，以引物SB所检测的牛肉丸含量稍大于以引物TB所测的数值。

3 结 论

与巢式PCR[19]、PCR-酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA)、竞争PCR、多重PCR等方法相比较[20-21]，荧光PCR法是在指数增长期进行定量的，因此该法可避免严重的终点误差，定量准确度较高[22]。与DNA序列测定的方法相比，其检测速度较快、无需序列拼接等优点也十分突出。ELISA 方法则仅适用于常规处理的样本，对于经过高温、脱脂等步骤处理的样品来说，由于其中的蛋白质大多已经发生变性，ELISA法无法发挥其检测特点。

荧光PCR法在饲料中动物源性成分[23-24]和微生物含量检测方面已有报道[25]，本研究利用具有高灵敏度和特异性的引物，并模拟牛肉丸生产加工工序，制作一系列不同牛肉含量的混合肉丸的标准曲线，该法牛肉含量检出限均为0.1%，牛肉含量定量线性范围均为0.1%～90%。

由于样品DNA受各种因素的影响，如牛的性别、年龄、部位以及加工过程所采用的加工工艺，配料(增稠剂、防腐剂等)的不同，可能导致牛肉丸中DNA得率不同，导致配制的标准品中牛肉含量与实际情况不符，因此需根据具体情况制作标准曲线。

参考文献：

[1] 李巧玲, 刘景艳. 市场鲜猪肉掺假状况的调查监测[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 273-276.

[2] 王晔君. 国务院要求严打肉类产品掺假售假[J]. 农产品加工: 上, 2013(5): 73.

[3] 马晓艳, 王春民, 蒋建荣, 等. 2010年江苏省苏州市注水猪肉监测及分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011(10): 2536-2537.

[4] 曲勤凤, 黄青山, 段文锋, 等. 鱼糜制品中主料含量的实时荧光定量PCR法测定[J]. 食品工业, 2012(11): 114-116.

[5] KUNG H, LEE Y, HUANG Y, et al. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products[J]. Food Control, 2010, 21(7): 977-982.

[6] ROHMAN A, SISMINDARI, ERWANTO Y, et al. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy[J]. Meat Science, 2011, 88(1): 91-95.

[7] 蒋曙辉. “牛肉膏”可怕, 监管意识更可怕[J]. 社会与公益, 2011(5): 36-37.

[8] 柳彬, 孔德彬, 伍志权, 等. PCR法快速检测超市生鲜牛肉卷和腌制牛肉片[J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 295-298.

[9] 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.

[10] 范丽丽, 李培, 傅春玲, 等. 实时荧光聚合酶链式反应法检测食品中猪源性成分[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 224-227.

[11] 张驰, 邱皓璞, 张筠. 荧光定量PCR检测肉制品中鸭源性成分[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 154-157.

[12] 何玮玲, 黄明, 张驰. 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.

[13] 周巍, 周正, 刘东, 等. 实时荧光PCR在鉴别鸡精中鸡源性成分的应用研究[J]. 中国调味品, 2011(10): 22-25.

[14] 李通. 基于分子生物学的肉类鉴定方法研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.

[15] 郑新. 微卫星标记技术鉴别动物源性成份的应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.

[16] PEGELS N, GONZ A L I, MART I N I, et al. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs[J]. Food Control, 2011, 22(8): 1189-1196.

[17] ZHANG C L, FOWLER M R, SCOTT N W, et al. A *Taq*Man real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. Food Control, 2007, 18(9): 1149-1158.

[18] LÓPEZ-CALLEJA I, GONZÁLEZ I, FAJARDO V, et al. Quantitative detection of goats’ milk in sheep’s milk by real-time PCR[J]. Food Control, 2007, 18(11): 1466-1473.

[19] 张琳, 胡北侠, 颜世敢, 等. 鸭黄病毒巢式PCR检测方法的建立和应用[J]. 福建农业学报, 2012, 27(2): 124-129.

[20] 程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 5种食源性致病菌多重PCR检测方法的建立[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 97-103.

[21] ALI M E, HASHIM U, MUSTAFA S, et al. Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome b gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products[J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(3): 613-623.

[22] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中4种肉类成分多重PCR的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012(9): 1873-1880.

[23] 刘彦泓, 穆春, 孙屏, 等. 实时荧光PCR和常规PCR方法检测饲料中鸡源性成分[J]. 饲料工业, 2010(7): 45-47.

[24] 庞杰, 王金玲, 张莹, 等. 饲料中鱼源性成分定量检测的实时荧光PCR技术的建立[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(5): 690-692.

[25] 张伊, 戴贤君. 沙门氏菌SYBR Green Ⅰ实时定量PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国科技博览, 2010(35): 602.