

PCR法检测鱼及其制品中的鱼源性成分

程月花¹, 陆利霞^{1,2,*}, 李壹^{1,2}, 熊晓辉^{1,2}, 陈晓宇¹, 张一青³

(1.南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 210009; 2.江苏省食品安全快速检测公共技术服务中心, 江苏 南京 210009;
3.苏州市食品药品监督管理局, 江苏 苏州 215000)

摘要:目的: 建立一种快速、特异、灵敏的鱼源性成分聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。方法: 根据鱼线粒体基因组12S rRNA中的保守序列设计鱼源性特异性引物, 进行PCR扩增, 建立鱼源性成分检测方法; 对24种鱼及鸡、牛、羊、猪、鸭、虾6种常见的易混于鱼制品的动物源性成分进行特异性检测; 将草鱼肉混入其他动物肉中, 混合均匀后提取DNA进行PCR扩增, 确定肉样水平的检测灵敏度; 将草鱼DNA混入其他动物DNA中, 以混合后的DNA为模板进行PCR扩增, 确定DNA水平的检测灵敏度。结果: 该方法能特异性的对鱼源性成分进行快速检测, 检测灵敏度达0.5%。结论: 该方法能对食品中是否含有鱼源性成分进行初筛, 到达快速检测的目的, 对防止食品掺假、维护消费者利益、规范市场秩序有重要意义。

关键词: 聚合酶链式反应; 12S rRNA基因; 鱼源性成分; 检测; 食品

Establishment of PCR Method for Detection of Fish-Derived Ingredients in Fish and Fish Products

CHENG Yuehua¹, LU Lixia^{1,2,*}, LI Yi^{1,2}, XIONG Xiaohui^{1,2}, CHEN Xiaoyu¹, ZHANG Yiqing³

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China;
2. Jiangsu Public Technical Service Center for Rapid Detection of Food Safety, Nanjing 210009, China;
3. Suzhou Food and Drug Administration, Suzhou 215000, China)

Abstract: Objective: To establish a rapid, specific and sensitive polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of fish-derived ingredients. Methods: A set of primers was used to selectively amplify a short DNA fragment of the fish mitochondrial 12S rRNA gene. The specificity was evaluated by analyzing 24 kinds of fish as well as meat, poultry and shrimp, commonly added in fish products. The sensitivity was evaluated by amplifying DNA extracted from grass carp mixed with meat from other animal species. Results: The method established could specifically detect fish-derived ingredients with a sensitivity of 0.5%. Conclusion: This PCR method is a rapid, sensitive and specific method for preliminary screening of fish-derived ingredients in foods, and is of important significance to safeguard the interests of consumers and standardize the market order.

Key words: polymerase chain reaction (PCR); 12S rRNA gene; fish-derived ingredients; detection; food

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720041

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0279-07

引文格式:

程月花, 陆利霞, 李壹, 等. PCR法检测鱼及其制品中的鱼源性成分[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 279-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720041. <http://www.spkx.net.cn>

CHENG Yuehua, LU Lixia, LI Yi, et al. Establishment of PCR method for detection of fish-derived ingredients in fish and fish products[J]. Food Science, 2017, 38(20): 279-285. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720041. <http://www.spkx.net.cn>

鱼及其制品由于其营养价值和独特的风味深受消费者的喜爱。近年来, 我国鱼及其制品的产量逐年增高, 其中鱼糜制品在水产品加工总量中的占比从2009年的

5.74%上升至2014年的7.39%^[1-2]。与此同时, 一些不法商贩在经济利益的驱使下, “以次充好、以假乱真”, 在制品中掺杂、掺假, 这极大地损害消费者利益和健康,

收稿日期: 2016-09-21

基金项目: 江苏省科技厅重点研发计划项目 (BE20160803); 苏州市科技支撑计划项目 (SS201427)

作者简介: 程月花 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: chengyuehua7@163.com

*通信作者: 陆利霞 (1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全与检测。E-mail: lixialu@njtech.edu.cn

扰乱了市场秩序和发展。我国多部法律法规明文禁止食品的造假掺假行为,但是目前的检测标准不能满足实际需求,因此需要建立新的标准弥补不足。鱼肉掺假检测的现有方法大致可以分为5种:显微镜观察法^[3]、免疫学方法^[4-5]、红外光谱方法^[6-8]、色谱分析法^[9-11]和分子生物学方法^[12-19]。显微镜观察法是在组织学特性的基础上观察样品颗粒形态,检出限低、假阳性率低且热稳定性好,但是依赖于检测人员的经验及肉组织完整性^[3]。免疫学方法基于抗原抗体特异性反应,具有灵敏度高、操作简单、可以实现高通量的特点,但是蛋白质三级结构容易在食品加工过程中受破坏而影响抗体识别^[20]。肉类中的蛋白质、碳水化合物、有机酸等化合物含有大量的带氢基团,红外光谱法利用带氢基团在近、中红外光谱上有倍频和合频吸收的性质对肉中的有机物的成分进行检测,但是红外光谱分析技术需要针对不同的掺假肉建立不同的模型,工作量大,使用范围有局限^[21]。色谱分析是目前应用最为广泛的分离检测技术。肉及其制品中存在的某些蛋白质、肽类和氨基酸因为物种来源不同而存在差异,通过色谱技术的定性、定量分析能够反映肉类的掺假情况^[22]。但是由于肉及其制品中蛋白质含量变化范围广、干扰因素多,导致该方法的灵敏度低、容易出现假阳性^[23]。此外,该方法对设备、样品前处理以及试剂的要求较高,限制了色谱技术在肉及其制品源性成分鉴定中的应用。DNA检测的分子生物学方法是以动物种属间遗传信息的差异作为肉种鉴别的检测靶点,具有特异性高、灵敏度高、不受组织类别限制等优点。相比于蛋白质,DNA的热稳定性高,即使加工过程中有一定的降解,但是仍能满足聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等方法的要求^[20]。草鱼、鲫鱼、鲢鱼等常见的鱼类占我国鱼类总产量的50%以上且常用于鱼制品的生产,但目前相关的检测标准方法不能满足要求。本实验通过比对多种鱼及多种非鱼类动物的线粒体基因序列,选择种内保守、种间特异的序列设计鱼源性成分的特异性引物,旨在建立鱼及其制品中鱼源性成分PCR检测方法,为鱼及其制品的掺假检测提供技术保障。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

淡水鱼包括黑鱼(*Channa argus*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、鲶鱼(*Silurus asotus*)、河鲀(*Takifugu obscurus*)、巴沙鱼(*Pangasius larnaudii*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)、罗非鱼(*Oreochromis*

niloticus),海水鱼包括鲑鱼(*Salmo salar*)、鳕鱼(*Gadus morhua*)、鲱鱼(*Pampus argenteus*)、青占鱼(*Scomber japonicus*)、多宝鱼(*Psetta maxima*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、鮫鰈鱼(*Lophius litulon*)、金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、鳗鱼(*Anguilla japonica*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、黄盖鲽鱼(*Pseudopleuronectes yokohamae*)及鸡肉、牛肉、羊肉、猪肉、鸭肉、虾均购自南京当地农贸市场;鱼片、鱼丸、鱼肠、鱼罐头、鸡肉火腿肠、猪肉火腿肠等食品均购自南京当地超市。

High Pure PCR Template Preparation Kit 瑞士Roche公司; 10×Reaction Buffer、BioReady rTaq、dNTP Mixture 杭州博日技术有限公司; 溴化乙锭 国药集团化学试剂有限公司; DL500 DNA Marker、6×Loading Buffer 宝生物工程(大连)有限公司; PCR引物合成 上海生工生物有限公司。

1.2 仪器与设备

1-14高速离心机 德国Sigma公司; Life Express Thermal Cycler PCR仪、GE-100凝胶电泳仪 杭州博日技术有限公司; Biophotometer D30核酸蛋白测定仪 德国Eppendorf公司; JS-680B全自动凝胶成像仪 上海培清科技有限公司; HH-6数字恒温水浴锅 常州国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取

参照High Pure PCR Template Preparation Kit试剂盒的说明书提取基因组DNA。将提取好的DNA置于-20℃保存,待后续PCR扩增使用。

1.3.2 DNA质量浓度及纯度的测定

用核酸蛋白测定仪检测提取的DNA纯度($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 、 $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$)及制成质量浓度^[24]。纯净的DNA $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值在1.8;比值大于1.8考虑为RNA污染,DNA变性或降解;比值小于1.7考虑为蛋白质、酚污染^[25]。实验中所用到的DNA质量浓度在25.1~77.2 ng/μL之间, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 在1.6~1.8之间。

1.3.3 引物设计

在GenBank中查找我国产量高且常见鱼的线粒体基因序列,通过DNAMAN软件进行序列同源性比较分析,以NC-010288.1为参考序列,选择同源性较高部分用Primer Premier 5.0设计引物,将设计的各组引物所扩增的目标序列分别与牛、猪、羊等常见畜肉以及鸡、鸭、鹅、鸽等常见禽肉已发表的线粒体全基因序列进行比较,选择种内保守、种间特异的一对引物,同时通过BLAST验证引物的特异性。

1.3.4 PCR条件和体系

PCR条件：94 °C 预变性5 min；94 °C 变性30 s；67 °C 退火30 s；72 °C 延伸20 s，共35 个循环；72 °C 延伸5 min；PCR体系（共25 μL）：10×Reaction Buffer 2.5 μL、dNTP Mixture（各2.5 mmol/L）2 μL、BioReady rTaq 0.2 μL（1 U）、上下游引物（10 μmol/L）各2 μL、模板DNA 5 μL，双蒸水补足至25 μL。

1.3.5 PCR扩增产物电泳检测

取6.5 μL PCR扩增产物，加1 μL 6×上样缓冲液点样进行琼脂糖凝胶电泳。电泳所用的琼脂糖质量分数为1.5%。

1.3.6 基因测序

利用设计的引物进行PCR扩增，将目的片段回收后，送大连宝生物工程有限公司测序。

1.3.7 特异性实验

选取11种淡水鱼、13种海水鱼及鸡、牛、羊、猪、鸭、虾6种常见的易混入鱼制品的动物肉作为样品，提取DNA后以此为模板采用建立的PCR方法进行扩增，验证该方法的特异性。

1.3.8 灵敏度实验

分别制备DNA水平和肉样水平混合样品进行检测，以考察所建立方法的检测灵敏度。

1.3.8.1 鱼肉样检出限

将草鱼肉分别与鸡、牛、羊、猪、鸭肉混合，制成含鱼肉10%、1%、0.5%、0.1%、0.05%的混合样后分成两份，一份新鲜肉样，一份经过121 °C处理15 min。提取混合肉样DNA后，以此为模板，进行PCR扩增。以确定本检测方法对混合鱼肉样的检出限。

1.3.8.2 DNA检出限

将草鱼及鸡、牛、羊、猪、鸭肉的DNA稀释到25 ng/μL，然后将草鱼DNA分别与鸡、牛、羊、猪、鸭的DNA混合，制成含草鱼DNA 10%、1%、0.5%、0.1%、0.05%的混合DNA样。以混合DNA样为模板，进行PCR扩增，以确定本方法对不同物种混合DNA的检出限。

1.3.9 市售食品中鱼源性成分的检测

购置市售的配料表中标明含有鱼成分的食品样品30份；标明具体鱼类的食品样品18份；配料表中不含鱼成分的食品样品20份。使用所建立的PCR方法检测其鱼源性成分。

2 结果与分析

2.1 引物设计

通过对GenBank中部分鱼线粒体基因序列的同源性比较分析，通过Primer Premier 5.0共设计了11组引物（表1），将各组引物所扩增的目标序列分别与鸭（NC-022418.1）、鹅（KT427463.1）、鸡（NC-007236.1）、虾（NC-026834.1）、猪（NC-012095.1）、驴（NC-001788.1）、羊（NC-001941.1）、牛（AY526085.1）、鸽（NC-013978.1）和鹧鸪（NC-011817.1）的线粒体全基因序列进行比较，选取引物的3'端和鱼源序列完全匹配而与其他非鱼类的序列不能互补的一组引物（图1）。该组引物针对扩增12S rRNA区的一段约98 bp的保守片段。上游引物NC-617/641F：CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCG，下游引物NC-693/714R：TTCACAGGGTAAGCTGACGACGG。

表1 本研究PCR的引物
Table 1 PCR primer sequences used in this study

引物名称	引物序列5'→3'	引物长度/bp	扩增片段长度/bp
NC-617/641F	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCG	25	98
NC-693/714R	TTCACAGGGTAAGCTGACGACGG	23	
NC-696/715F	CGTCAGCTTACCCGTGAAGG	20	102
NC-779/798R	AATGTAGCCCAATTTCTTCCC	20	
NC-1247/1271F	GCTGAAAGAGAATGAAACAACCCA	25	196
NC-1420/1443R	TCTTCCCACTCTTTTGCCACAGAG	24	
NC-1431/1450F	GGCAAAAGAGTGGGAAGAGC	20	88
NC-1496/1518R	GAAGTCTATCCATTTCTCAGGC	23	
NC-1478/1497F	GTGATAGCTGGTTGCCTGAG	20	118
NC-1578/1595R	GGGCTGTACCCCTTTRA	18	
NC-2023/2046F	TCGCCTGTTACCAAAAACATCGC	24	113
NC-2114/2135R	GCGCTACCTTTGCACGGTCAAA	23	
NC-2117/2140F	GGTAGCGCAATCACTGTCTTTTA	24	147
NC-2241/2263R	AAGTCCASAGGGTCTTCTCGTC	23	
NC-2484/2503F	ATAACAGCGCAATCTCTCC	20	197
NC-2658/2680R	CTTTCGTAAGGAAAAGTAGCG	23	
NC-5136/5159F	GAAGTGAATCTTCTAGTCCCTG	24	131
NC-5233/5255R	CTAAGAGTTGTAGGATCGAGGC	23	
NC-6907/6925F	TGAGAAGCCTTCGCCGYA	19	157
NC-7044/7066R	GGTCAATTCCTCTCTCTGT	23	
NC-7240/7260F	CMCCCGTTATAGAAGAACTTC	21	148
NC-7374/7391R	ATTCRATTCTTGGGAG	18	

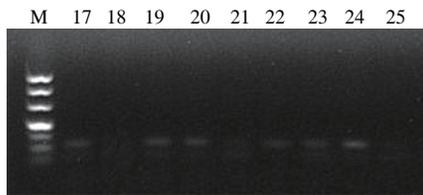
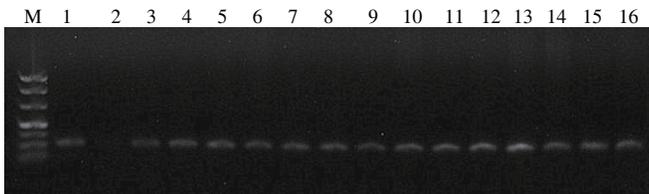


图1 鱼源性成分检测引物NC-617/641F和NC-693/714R扩增片段与其他物种线粒体DNA相应片段的相似性比较

Fig. 1 Identity comparison between sequences amplified by fish specific primers (NC-617/641F and NC-693/714R) and corresponding region of mtDNA of other animals

2.2 引物特异性实验结果

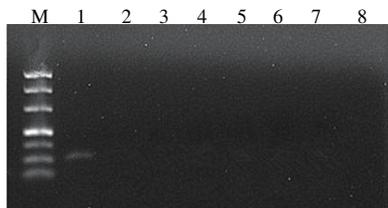
为验证引物对于鱼源性成分的特异性, 将11种淡水鱼、13种海水鱼及鸡、牛、羊、猪、鸭、虾6种常见的易混于鱼制品的动物DNA作为模板进行扩增。从图2可以看出, 11种淡水鱼均有特异性扩增条带, 大小约98 bp, 与预期大小相符, 13种海水鱼中除鲳鱼、鳗鱼、带鱼外, 其他10种海水鱼有特异扩增条带。表明该引物对于少数鱼类无法检测, 使用时具有一定的局限性。从图3可以看出, 鸡、牛、羊、猪、鸭、虾6种非鱼类DNA模板的PCR扩增均为阴性, 表明该对引物特异性良好。



M. 500 bp Marker; 1.黑鱼; 2.鲳鱼; 3.青占鱼; 4.多宝鱼; 5.黄颡鱼; 6.草鱼; 7.鲫鱼; 8.鲤鱼; 9.鳊鱼; 10.鲢鱼; 11.鲈鱼; 12.小黄鱼; 13.鲑鱼; 14.鮫鱈鱼; 15.金枪鱼; 16.石斑鱼; 17.河鲀; 18.鳗鱼; 19.巴沙鱼; 20.鲱鱼; 21.带鱼; 22.鳙鱼; 23.黄盖鲮鱼; 24.罗非鱼; 25.阴性对照。

图2 24种鱼类的鱼源性成分特异性检测电泳图

Fig. 2 Specific detection of fish-derived ingredients from 24 species of fish



M. 500 bp Marker; 1.草鱼; 2.鸡; 3.牛; 4.羊; 5.猪; 6.鸭; 7.虾; 8.阴性对照。

图3 6种非鱼类鱼源性成分特异性检测电泳图

Fig. 3 Specific detection of six non-fish-derived ingredients

2.3 PCR产物测序结果

将部分常见鱼类的PCR扩增产物进行纯化后送测序公司测序, 结果见表2, 测序结果进一步证明设计的引物特异性强、准确度高。

表2 部分鱼PCR扩增产物测序结果

Table 2 Sequencing results of PCR amplified products of DNA extracted from several fish species

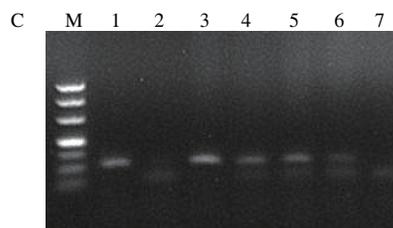
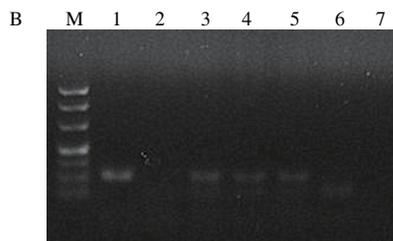
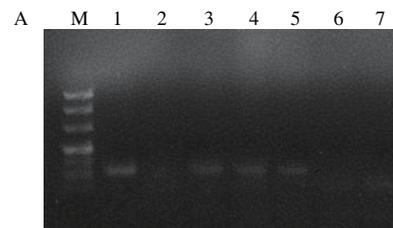
鱼类	测序结果
草鱼	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCGATAACCCCGTT AAACCTCACCCTTCTAGCCATCCCAGCCTATATACCG CCGTCGTCAGCTTACCCTGTGAA
鲫鱼	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCGATAACCCCGTT AAACCTCACCCTTCTAGCCATCCCAGCCTATATACCG CCGTCGTCAGCTTACCCTGTGAA
鳊鱼	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCGATAACCCCGTT AAACCTCACCCTTCTAGCCATCCCAGCCTATATACCG CCGTCGTCAGCTTACCCTGTGAA
鲢鱼	CCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCGATAACCCCGTT AAACCTCACCCTTCTAGCCATCCCAGCCTATATACCG CCGTCGTCAGCTTACCCTGTGAA

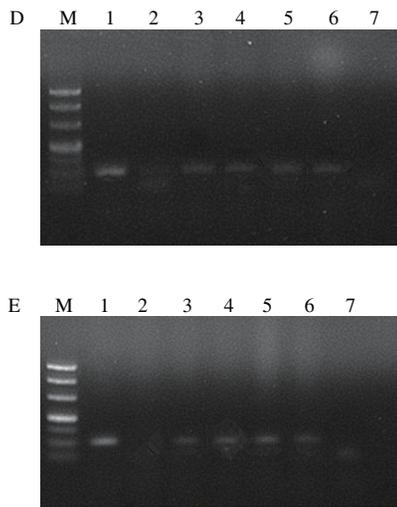
2.4 方法灵敏度实验结果

为了确定该方法的混样检出限, 分别从肉样水平和DNA水平进行实验确认。

2.4.1 鱼肉样品检出限

将新鲜草鱼肉按不同比例掺入其他动物肉中, 混合后提取DNA进行PCR扩增。从图4可以看出, 草鱼肉混合鸡肉和牛肉时, 该方法检测鱼源性成分的检出限为0.5%, 混合羊肉、猪肉、鸭肉时, 该方法检测鱼源性成分的检出限为0.1%。从图5可以看出, 在对混合肉样高温处理(121 °C处理15 min)后提取DNA进行PCR扩增, 其中混合羊肉的样品检出限为0.1%, 混合鸡、牛、猪、鸭的样品检出限为0.5%。因此, 确定该方法用于混合肉样检测鱼源性成分时的检出限为0.5%。





M. 500 bp Marker; 1. 100%鱼; 2. 100%非鱼类动物; 3. 10%鱼; 4. 1%鱼; 5. 0.5%鱼; 6. 0.1%鱼; 7.阴性对照。A~E分别为鱼肉混合鸡肉、牛肉、羊肉、猪肉、鸭肉提取DNA扩增后的电泳图。图5、6同。

图4 新鲜肉样混合水平灵敏性检测结果

Fig. 4 Sensitivity of PCR for detecting mixed fresh meat samples

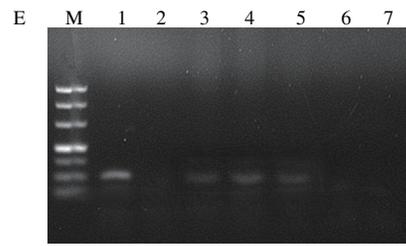
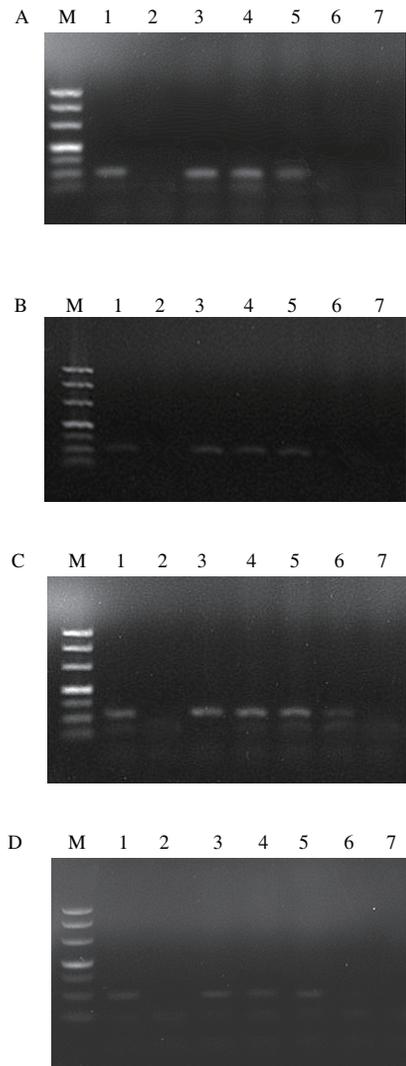


图5 经过高温高压处理的肉样混合水平灵敏性检测结果

Fig. 5 Sensitivity of PCR for detecting mixed cooked meat samples

2.4.2 DNA检出限实验结果

草鱼DNA混合不同动物DNA制成含鱼DNA不同质量浓度梯度的DNA混合样, 从图6可以看出, 草鱼DNA混合鸡、牛、羊、猪、鸭DNA在0.5%水平时, 能看到目的扩增条带。在0.1%水平时, PCR扩增结果均为阴性。因此该方法对DNA混样的检出限为0.5%。

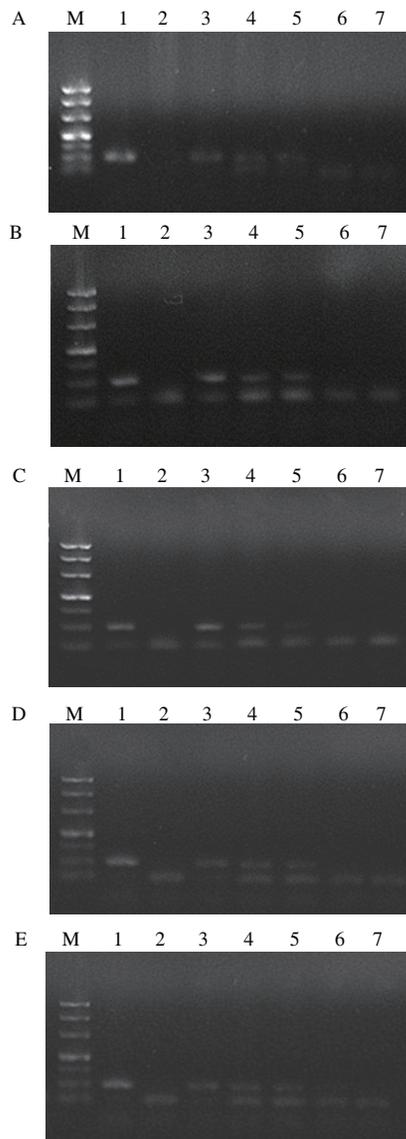


图6 DNA混合水平灵敏性检测结果

Fig. 6 Sensitivity of PCR for detecting mixed DNA

2.5 市售食品中鱼源性成分的检测结果

表3 市售食品中鱼源性成分的检测结果
Table 3 Detection of fish-derived ingredients in commercial foods

样品	数量	鱼源性阳性数量
含鱼成分食品	30	27
含具体鱼类食品	18	18
不含鱼成分食品	20	0

使用本研究建立的PCR方法对市售样品中的鱼源性成分进行检测。从表3可以看出,在随机采购的30种配料表中标明含有鱼成分的食品样品中,27个样品检出阳性,其中3个标明含有海水鱼成分的鱼制品检测结果为阴性,这与所建立的方法特异性实验中部分海水鱼不能检出的结果一致。配料表中标明含某种鱼类的18个食品样品均能检出鱼源性成分。配料表中不含鱼成分的20种食品样品中均未检出鱼源性成分。所采购的食品样品或出自大型食品制造商或具有完整的鱼肉组织,一定程度上避免了食品的掺假,因此可以看出所建立的方法在实际产品中的应用中只有少数鱼类无法检出,基本满足在检测中进行初筛的要求。

3 讨论

肉制品掺假是主要的食品掺假问题之一,利用PCR方法检测牛、羊、猪等源性成分的研究已经很成熟^[26-28]。然而,目前国内利用PCR方法检测鱼源性成分的研究较少,贺云霞等^[29]建立的检测饲料中鱼源性成分的PCR方法能有效检出鲤鱼、鳊鱼、鲢鱼等10种鱼类,庞杰等^[30]建立的检测饲料中鱼源性成分定量检测的实时荧光PCR技术能有效检出四大家鱼(青鱼、草鱼、鲢鱼、鳊鱼)和鲤鱼、鲫鱼、框鲤、武昌鱼、鲶鱼,但对石斑鱼、鳕鱼、鳙鱼等不能检出。国外利用PCR方法检测鱼源性成分的研究主要是针对海洋鱼类^[31-32]。本研究建立的检测鱼及其制品中鱼源性成分的PCR方法特异性强,能检出的淡水鱼类占我国淡水养殖总量的70%以上,能检出的海水鱼类占我国海水鱼产量的15%以上^[2],不能检出所有鱼类,这是因为鱼类所处的生态环境、繁殖方式各异,遗传变异方式多样,采用一对引物特异性检测所有鱼类具有一定的困难^[33],但是可以作为前人建立的PCR方法的补充,进一步扩大检测鱼的种类。我国为当今世界上淡水养殖最为发达的国家之一以及考虑到国人的饮食习惯,鱼制品多采用产量高且廉价的淡水鱼类,因此本方法适用于检测大多数鱼制品中的鱼源性成分。

所建立的食品中鱼源性成分PCR检测方法的灵敏度较高,无论是肉样混合还是DNA混合均可做到0.5%水平

而SB/T 10379—2012《速冻调制食品》中规定鱼类速冻调制食品的命名中应含主料不小于8%^[34],该方法的检出限满足要求,可对食品标签的真实性进行监控,从而保障消费者的权益和健康,维护市场秩序,同时为鱼制品中鱼源性成分检测方法的标准化提供了依据。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 2010中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 84.
- [2] 农业部渔业局. 2015中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 29-45; 95.
- [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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201601043.
- [4] MACEDO-SILVA A, BARBOSA S F C, ALKMIN M G A, et al. Hamburger meat identification by dot-ELISA[J]. Meat Science, 2000, 56(2): 189-192. DOI:10.1016/S0309-1740(00)00039-5.
- [5] 李轶, 范大明, 顾震南, 等. 冷冻鱼糜中微生物谷氨酰胺转氨酶ELISA检测方法的建立及应用[J]. 现代食品科技, 2014(9): 275-279. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.045.
- [6] WISSIACK R, CALLE B D L, BORDIN G, et al. Screening test to detect meat adulteration through the determination of hemoglobin by cation exchange chromatography with diode array detection[J]. Meat Science, 2003, 64(4): 427-432. DOI:10.1016/S0309-1740(02)00211-5.
- [7] 由昭红, 刘子豪, 龚朝勇, 等. 基于衰减全反射红外光谱(ATR-MIR)的混合鱼糜及其制品的鉴别分析研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015(10): 2930-2939. DOI:10.3964/j.isn.1000-0593(2015)10-2930-10.
- [8] 陆焯, 王锡昌, 刘源. 近红外光谱技术在鱼糜定性和定量上的应用[C]//中国水产学会学术年会会议论文集. 2010: 1273-1279. DOI:10.3724/SP.J.1231.2011.17105.
- [9] GIARETTA N, GIUSEPPE A M A D, LIPPERT M, et al. Myoglobin as marker in meat adulteration: a UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1814-1820. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.04.124.
- [10] ARISTOY M C, TOLDRÁ F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants[J]. Meat Science, 2004, 67(2): 211-217. DOI:10.1016/j.meatsci.2003.10.008.
- [11] WISSIACK R, CALLE B D L, BORDIN G, et al. Screening test to detect meat adulteration through the determination of hemoglobin by cation exchange chromatography with diode array detection[J]. Meat Science, 2003, 64(4): 427-432. DOI:10.1016/S0309-1740(02)00211-5.
- [12] 潘海云, 赵文秀, 汪之和, 等. 基于物种特异性PCR对海鳗鱼糜掺假检测技术的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 325-326. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.13.094.
- [13] 董薇, 曹际娟, 邱驰, 等. 实时荧光PCR法检测致敏原鱼成分的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23): 10911-10912. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2009.23.034.
- [14] 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, 2011(11): 114-116.
- [15] 李新光, 王璐, 赵峰, 等. DNA条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 337-342. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201318069.
- [16] ARMANI A, CASTIGLIEGO L, TINACCI L, et al. Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification

- of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products[J]. Food Chemistry, 2012, 133(1): 184-192. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.12.076.
- [17] DALMASSO A, FONTANELLA E, PIATTI P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs[J]. Molecular & Cellular Probes, 2004, 18(2): 81-87. DOI:10.1016/j.mcp.2003.09.006.
- [18] ESPÍÑEIRA M, VIEITES J M. Detection of dog and cat traces in food, pet food and farm animal feed by real-time PCR[J]. European Food Research & Technology, 2015, 241(2): 233-238. DOI:10.1007/s00217-015-2448-4.
- [19] YIN R H, BAI W L, WANG J M, et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique[J]. Meat Science, 2009, 83(1): 38-44. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.03.008.
- [20] 李宗梦, 赵良娟, 赵宏, 等. 肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(18): 122-127. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2014.18.032.
- [21] 冯永巍, 王琴. 肉类掺假检验技术研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 237-240. DOI:10.3969/j.issn.1003-5788.2013.04.058.
- [22] 张小莉, 魏玲, 李宝明, 等. 肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(10): 3190-3196.
- [23] 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.
- [24] RAMOS-GÓMEZ S, BUSTO M D, PEREZ-MATEOS M, et al. Development of a method to recovery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils[J]. Food Chemistry, 2014, 158(5): 374-383. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.02.142.
- [25] 张楚富. 生物化学原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 162-163.
- [26] 熊蕊, 郭凤柳, 刘晓慧, 等. 牛羊肉中掺杂猪肉的PCR方法的建立和初步应用[J]. 食品工业, 2014(8): 199-202.
- [27] 陈颖, 钱增敏, 徐宝梁, 等. 保健品中牛羊源性成分的PCR检测[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 215-218. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2004.10.050.
- [28] 冯海永, 刘丑生, 何建文, 等. 利用线粒体DNACyt易基因PCR-RFLP分析方法鉴别羊肉和鸭肉[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 319-321. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.13.093.
- [29] 贺云霞, 王加启, 王丽, 等. 应用PCR技术检测饲料中的鱼源性成分[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 953-957. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2007.06.008.
- [30] 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.
- [31] PEGELS N, GONZÁLEZ I, LÓPEZ-CALLEJA I, et al. Detection of fish-derived ingredients in animal feeds by a *TaqMan* real-time PCR assay[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(4): 1040-1048. DOI:10.1007/s12161-012-9555-7.
- [32] BENEDETTO A, ABETE M C, SQUADRONE S. Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1436-1442. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.131.
- [33] 王金玲, 张莹, 王芳, 等. 饲料中鱼源性成分实时荧光PCR检测方法的建立[C]//动物检疫学分会2010年学术年会论文集. 2010: 259-262.
- [34] 商务部. 速冻调制食品: SB/T 10379—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.