

实验技术与方法

基于 LAMP 法快速检测羊肉及其制品中的猪、鸭和羊源性成分

李向丽¹, 刘焱^{2,3}, 谭贵良^{2,3}, 张璜⁴, 曹炜伟⁴

(1. 中山火炬职业技术学院生物医药系, 广东 中山 528436; 2. 广东省中山市质量计量监督检测所, 广东 中山 528403; 3. 中山市食品药品检验所, 广东 中山 528437; 4. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东 广州 510663)

摘要:目的 建立肉制品中猪、鸭和羊源性成分的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法, 对市售羊肉片、羊肉卷、羊肉串进行猪、鸭和羊源性成分检测分析。方法 针对猪、鸭和羊线粒体 *Cytb* 基因分别设计 2 条外引物、2 条内引物和 2 条环引物, 优化 LAMP 反应条件, 对猪、鸭和羊源性成分进行特异性和灵敏度试验, 对羊肉制品进行上述动物源性成分监测。结果 在 0.2 μmol/L 外引物(*F3* 和 *B3*)、1.6 μmol/L 内引物(*FIP* 和 *BIP*)、0.8 μmol/L 环引物(*FLP* 和 *BLP*)、1 mol/L 甜菜碱、6 mmol/L MgSO₄、1.6 mmol/L dNTP 等参数的优化条件下, LAMP 法对肉制品中猪、鸭和羊源性成分的检测灵敏度达 0.5%。SYTO-9 荧光染料的荧光实时检测结果与 SYBR Green I 染料肉眼观察结果一致。调查发现, 该批市售羊肉及制品中存在掺假现象, 掺假率为 34.5%。结论 LAMP 法具有操作简便、特异性强、灵敏度高、检测结果准确的特点, 能有效地对肉制品中的猪、鸭和羊源性成分进行检测, 可作为羊肉制品掺假的一种快速检测方法。

关键词: 环介导等温扩增技术; 动物源性成分; 肉制品; 掺假; 鉴别; 核酸提取; 食品安全; 羊肉

中图分类号: R155; R15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2015)03-0247-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.03.006

Identification of porcine, duck and sheep-derived materials in mutton and its products by LAMP assay

LI Xiang-li, LIU Yao, TAN Gui-liang, ZHANG Huang, CAO Wei-wei

(Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Polytechnic, Guangdong Zhongshan 528436, China)

Abstract: Objective Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed to detect porcine, duck and sheep-derived materials in meat products (lamb chops, lamb meat roll, lamb shashlik). **Methods** A set of four specific primers (*F3*, *B3*, *FIP*, *BIP*) and two loop primers (*FLP* and *BLP*) were designed, respectively. Optimization reaction was confirmed, and two different measurement platforms were compared. 29 samples of meat products were collected from local markets and the detection of porcine, duck and sheep-derived materials was carried out. **Results** The optimized condition was 0.2 μmol/L each of *F3* and *B3*, 1.6 μmol/L each of *FIP* and *BIP*, 0.8 μmol/L each of *FLP* and *BLP*, 1 mol/L betaine, 6 mmol/L Mg²⁺, 1.6 mmol/L dNTP. The limit of detection was up to 0.5% animal-derived materials in meat products under the platform of real time fluorescence and naked-eye inspection with SYBR Green I. The current results of LAMP obtained on the two measurement platforms were in good accordance. With the LAMP assay, meat products were successfully screened for porcine, duck and sheep-derived materials. **Conclusion** This method is a highly specific and sensitive detection system, and could be a very useful tool for animal components detection.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification; animal-derived materials; meat products; adulteration; identification; DNA extraction; food safety; mutton

近年来,不法商家由于利益的驱动,羊肉和牛肉中掺假事件时有发生,特别是近期接二连三曝光

的制售假羊肉案件,引发了社会的广泛关注。目前羊肉掺假主要有两种方式:一是在羊肉中掺入鸭肉、猪肉、狐狸肉等其他价值较低的肉类;二是直接用猪肉、鸭肉掺上羊油、香精、羊肉粉以及添加明胶、胭脂红、硝酸盐、保水剂等。掺假现象经常发生在烤肉和羊肉卷等食品中。为了严格进行食品安全监管,严厉打击羊肉等肉类产品掺假售假等违法行为,动物源性成分的检测鉴别显得尤为重要,动物源性成分的检测是一种重要的识别掺假的手段。

收稿日期:2015-01-21

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2013QK274);广东省高等学校优秀青年教师培养计划资助项目(Yq2013196)

作者简介:李向丽 女 副教授 研究方向为食品安全

E-mail:bluecloudli@126.com

通讯作者:谭贵良 男 高级工程师 研究方向为食品安全

E-mail:joe88tan@126.com

目前肉制品及其他食品中动物源性成分的属性鉴别已成为一个非常活跃的研究领域。

早在20世纪80年代,国外就开展了动物源性成分的检测鉴别研究。至今已经发展出物理、化学、免疫学和分子生物学等检测方法,其中尤以分子生物学方法最为快速、灵敏。就动物源性成分检测而言,目前的主要检测方法有光谱法^[1]、免疫学方法^[2]、DNA杂交^[3-4]、基因芯片技术^[5]、常规PCR技术^[6-7]、多重PCR技术^[8-9]、荧光PCR^[10-13]等。这些方法中常规PCR和荧光PCR法仍然是羊肉等肉制品属性鉴别的主要方法,基于时效性和准确性上的优势,实时荧光定量PCR技术已经逐步取代了普通PCR方法,成为检测动物源性成分最常用的分子生物学方法。但是该方法的不足之处是需要昂贵的荧光定量PCR仪,检测成本较高。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是近年来兴起的一项新的DNA扩增技术^[14]。该技术根据靶序列设计两对特异性内引物(*FIP/BIP*引物对)和外引物(*F3/B3*引物对),特异识别靶序列上的6个独立区域。为缩短反应时间,还可设计两条环引物(*FLP*和*BLP*)。LAMP技术克服了传统PCR反应需要通过反复热循环扩增的缺点,避免了反复升降温的耗时过程,可实现恒温条件下的连续快速扩增,具有操作简单、快速、特异性强的特点。Ahmed等^[15]开发出了基于LAMP和电化学芯片技术联用的动物源性成分生物传感鉴定技术,用于检测混合样品中的猪肉、鸡肉以及牛肉成分。至今国内外采用LAMP技术对食品中猪、鸭和羊源性成分检测鉴别的研究鲜有报道。本研究根据线粒体*Cytb*基因设计LAMP引物,通过试验条件的优化,首次建立了肉制品中猪、鸭和羊源性成分的LAMP检测方法,旨在为羊肉的掺假鉴别检测提供方法依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源及处理

羊肉片、羊肉卷、羊肉串、鸡、鸭、鹅、猪、牛、龟、马、竹鼠、驴、骡、梅花鹿、家鼠、狗、狐狸、貂、猫、章鱼、锦鲤、鸽、鹌鹑、家兔、青蛙、虾、麻雀、鳄鱼、蛇等动物组织均购自中山市超市或农贸市场。

将生鲜羊肉和生鲜鸭肉按不同质量比例混合制备标准样品,用于确定样品中羊和鸭源性成分的最低检出限;将生鲜猪肉和生鲜羊肉按不同质量比例混合制备标准样品,用于确定肉制品中猪源性成分的最低检出限。

1.1.2 主要仪器与试剂

实时荧光PCR仪(ABI 7500,美国Applied Biosystems)、恒温荧光检测仪(DEAOU-308C,广州迪澳生物科技有限公司)、高速冷冻离心机、超纯水系统。

Bst DNA聚合酶(8 U/μl,美国NEB),CTAB、Tris、NaCl、Na₂EDTA、甜菜碱等溶液均购自美国Sigma, *Taq*酶、dNTP等均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 LAMP引物设计与合成

根据GenBank数据库中猪、鸭和山羊的线粒体基因序列(KC505411.1、EU755252.1和KJ940969.1),通过BLAST在线比对软件进行分析,利用LAMP引物在线设计软件Primer Explorer Version 4设计了猪、鸭和羊LAMP扩增引物。在羊LAMP扩增引物的设计过程中,由于所选择的山羊线粒体基因序列与绵羊、岩羊、塔尔羊等具有较高的同源性,因此该段序列可作为羊物种成分的扩增序列。羊源性成分的LAMP扩增引物设计,见图1。包括*F3*、*B3*两条外引物,*FIP*(*F1c*+*F2*)、*BIP*(*B1c*+*B2*)两条内引物和*FLP*、*BLP*两条环引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成, PAGE纯化。3种动物源成分的引物序列,见表1。

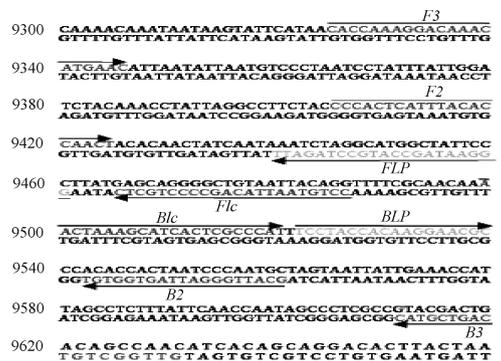


图1 羊源性成分LAMP引物设计

Figure 1 Primer design of sheep-derived ingredients for LAMP

1.2.2 DNA的提取

准确称取0.1 g样品于玻璃匀浆器中,加入800 μl TE溶液,匀浆15 min;吸出200 μl匀浆液,加入800 μl动物裂解液[5 mol/L异硫氰酸胍,0.05 mol/L Tris-HCl (pH=6.4),0.02 mol/L EDTA (pH=8.0),1.3% Triton X-100]^[16],65℃水浴2 h;冷却后加入5 μl 20 mg/ml RNAase,混匀后室温反应5 min;加入1 ml 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V/V),12 000 r/m离心15 min;取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1, V/V),12 000 r/m离心15 min;取上清液,加入1/10体积乙酸钠(pH=5.2)及等体积异丙醇,-20℃沉淀30 min;12 000 r/m离心15 min,弃上清液,加入500 μl 70%乙醇溶液,颠倒混匀,12 000 r/m离心

表 1 检测猪、鸭和羊源性成分的 LAMP 引物设计

Table 1 LAMP primers used for detection of porcine, duck, sheep-derived ingredients

物种	引物	引物序列(5'-3')
猪	<i>P-F3</i>	GCCTAATCTTGCAAGTCCTAA
	<i>P-B3</i>	GGCTGTTGCTATAACGGTAA
	<i>P-FIP</i>	ACGCTCGACAGATGTGTCTAA-GGCCTGTTCTT AGCAATACA
	<i>P-BIP</i>	CGCTACCTACATGCAAACGGA-ATCCGCTAGTATA GACCTCGG
	<i>P-FLP</i>	GCTGTTGTTGTCTGTGATGTG
	<i>P-BLP</i>	TTGCTATTTCATCCACGTAGG
鸭	<i>D-F3</i>	ACACAGCCATCCTCCTAG
	<i>D-B3</i>	TAGGAAGGTGGATCCGATG
	<i>D-FIP</i>	GTTAGGGCGTGGATGGCAT-CTCAGGCCTAACT GTCAC
	<i>D-BIP</i>	AGGATTCTACTTCACCGCCCTA-TGTCGGCGATT GAGAATG
	<i>D-FLP</i>	CCTTCTGTGATGCTGTGGT
	<i>D-BLP</i>	AGCAATAGACTACCATGAAGCC
羊	<i>S-F3</i>	CACCAAAGGACAAACATGAAC
	<i>S-B3</i>	GTTGGCTGTCACTGATC
	<i>S-FIP</i>	CCTGTAATTACAGCCCTGTCCCACTCATTT- ACACCAACT
	<i>S-BIP</i>	AACTAAAGCATCACTCGCCCATGCATGCGGAT- TAGTGGTGT
	<i>S-FLP</i>	GGGAATAGCCATGCCTAGATT
	<i>S-BLP</i>	TCCTACCACAAGGAACGC

1 min;弃上清液,加入 500 μl 70% 乙醇溶液,颠倒混匀洗涤 DNA,12 000 r/min 离心 1 min;空干后加 100 μl 灭菌去离子水溶解,-20 ℃ 保存。用紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.3 LAMP 检测

25 μl LAMP 反应体系中含有 1.2 ~ 2.4 μmol/L *FIP*、1.2 ~ 2.4 μmol/L *BIP*、0.2 μmol/L *F3*、0.2 μmol/L *B3*、0.8 ~ 1.6 mol/L 甜菜碱、4 ~ 10 mmol/L MgSO₄、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μl 10 × Thermopol Buffer、1 μl *Bst* DNA 聚合酶及 2 μl DNA 模板。反应条件为 63 ℃,反应 60 min。以双蒸水作为阴性对照。将 LAMP 反应体系配制完成后置于 0.2 ml 离心管中,在离心管中加入 1 滴石蜡油以避免反应体系挥发和污染。

采用恒温实时荧光法检测,在反应体系中加入 0.2 μmol/L SYTO-9,通过实时荧光 PCR 仪设定保温阶段 63 ℃ 30 s,1 个循环;循环阶段 63 ℃ 15 s,63 ℃ 45 s,60 个循环,于 63 ℃ 45 s 处收集荧光信号,荧光通道为 FAM。在恒温荧光检测仪中,在程序界面把试验时间设为 60 min,温度设为 63 ℃,放入样品管点击“开始”即可进行反应。也可通过向 LAMP 产物中加入 1 μl 稀释倍数为 100 的 SYBR Green I 染料肉眼观察扩增情况,颜色变绿表明发生了扩增,橙色表明未发生扩增。

1.2.4 荧光 PCR 检测

分别参照 SN/T 2051—2008《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时 PCR 法》^[17] 和 SN/T 2727—2010《饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法》^[18] 对羊、猪和鸭源性成分进行检测。

1.2.5 实际样品检测

用建立的 LAMP 检测方法以及实时荧光 PCR 定性检测方法对市售的羊肉含量标称 100% 的羊肉片、羊肉卷、羊肉串样品进行猪、鸭和羊源性成分检测。

2 结果与分析

2.1 引物设计的优化

LAMP 反应最少需要 *F3*、*B3*、*FIP* 和 *BIP* 4 条引物(见表 1)。本研究针对猪、鸭和羊线粒体基因序列分别设计了上述 4 条引物。为了缩短检测时间,同时还设计 *FLP* 和 *BLP* 两条环引物。环引物使用后,可在 60 min 内获得检测结果。

2.2 DNA 模板提取结果

对鸡、鹅、牛、龟、马、竹鼠、驴、骡、梅花鹿、家鼠、狗、狐狸、貂、猫、章鱼、锦鲤、鸽、鹌鹑、家兔、青蛙、虾、麻雀、鳄鱼、蛇等对照试验样品以及标准样品(羊肉与鸭肉,羊肉与猪肉,按不同比例混合而成)的 DNA 提取结果表明,获得的 DNA 模板的 260/280 比值均在 1.8 ~ 2.0 之间,浓度在 200 ~ 500 ng/μl。说明提取方法较为合适,提取的 DNA 质量和浓度较高,适合后续的扩增反应。

2.3 LAMP 试验条件优化结果

本研究主要对 *FIP*、*BIP*、甜菜碱、Mg²⁺ 浓度等参数进行了优化。经过优化后,确定的 LAMP 反应体系(25 μl)为:内引物 *FIP* 和 *BIP* 各 1.6 μmol/L,外引物 *F3* 和 *B3* 各 0.2 μmol/L,环引物 *FLP* 和 *BLP* 各 0.8 μmol/L,1 × Thermo Pol 缓冲液,1 mol/L 甜菜碱,6 mmol/L MgSO₄,1.6 mmol/L dNTP,0.32 U/μl *Bst* DNA 聚合酶,DNA 模板 200 ng。优化体系下的扩增结果(采用 ABI 7500 荧光 PCR 仪),见图 2。

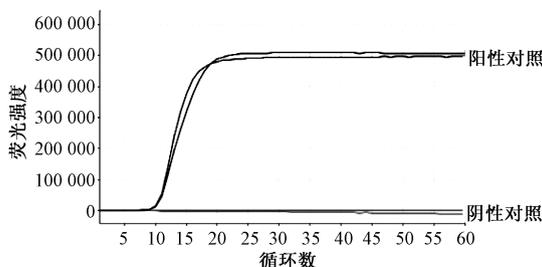
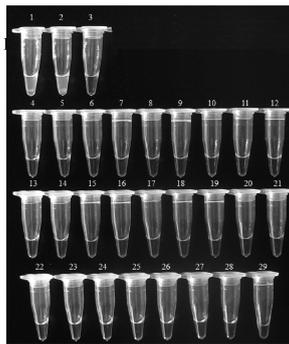
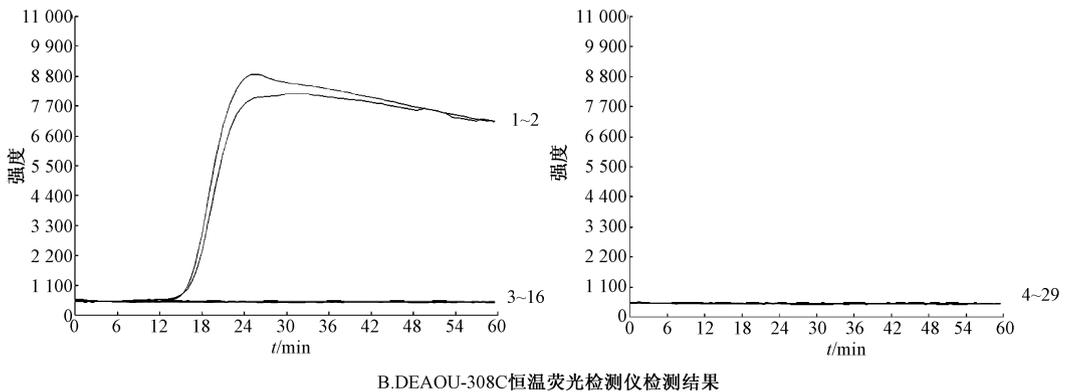
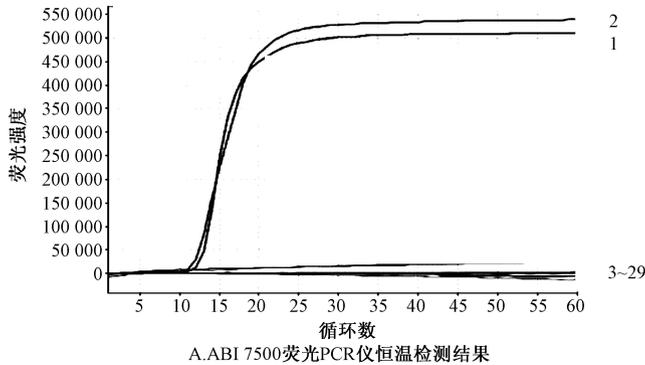


图 2 LAMP 扩增图
Figure 2 LAMP reaction

2.4 特异性试验结果

为了验证设计的引物对羊、猪和鸭源性成分检测的特异性,本研究利用优化好的 LAMP 方法对鸡、鹅、牛、龟、马、竹鼠、驴、骡、梅花鹿、家鼠、狗、狐狸、貂、猫、章鱼、锦鲤、鸽、鹌鹑、家兔、青蛙、虾、麻雀、

鳄鱼、蛇等 24 个对照样品进行了 LAMP 扩增。羊源性成分扩增产物采用实时荧光法及染色法进行了检测和判别,见图 3。空白对照和上述对照动物样品均未发生扩增,表明设计的两对引物对 3 种动物源性成分检测具有很好的特异性,见图 4、5。



注: 1.山羊; 2.绵羊; 3.阴性对照; 4.猪; 5.牛; 6.龟; 7.马; 8.竹鼠; 9.驴; 10.骡; 11.梅花鹿; 12.家鼠; 13.狗; 14.狐狸; 15.貂; 16.猫; 17.章鱼; 18.锦鲤; 19.鸽; 20.鹌鹑; 21.家兔; 22.青蛙; 23.虾; 24.麻雀; 25.鳄鱼; 26.蛇; 27.鸡; 28.鸭; 29.鹅

图 3 羊源性成分的特异性试验结果

Figure 3 Specificity analysis of sheep-derived ingredients

2.5 灵敏度试验

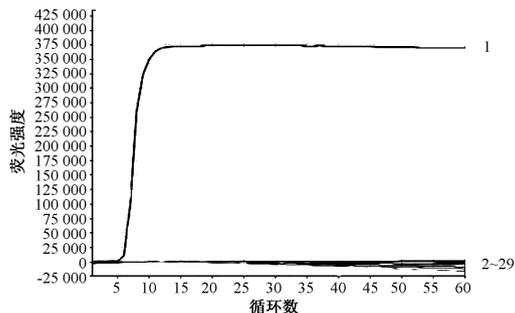
为确定本方法的相对灵敏度,取羊肉、猪肉和鸭肉含量分别为 100%、50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1% 的混合肉标准样品提取 DNA 后,进行 LAMP 检测分析,见图 6~8。

由图 6~8 可知,LAMP 可以检测到 0.5% 的羊、猪和鸭源性成分。随着动物源性成分含量的增大,其出峰时间也逐步提前,表明出峰时间与模板 DNA

浓度成线性相关。在 DEAOU-308C 恒温荧光检测仪和 SYBR Green I 染料染色观察到的结果与在 ABI 7500 荧光 PCR 结果相似。

2.6 样品检测结果

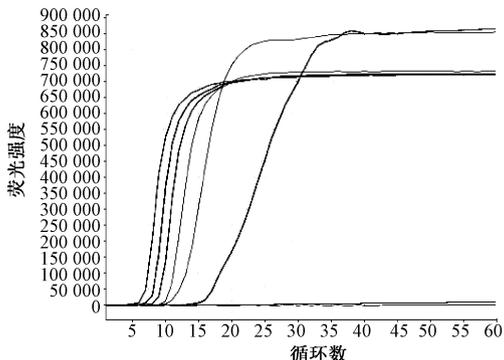
猪、鸭成分为羊肉制品中最为常见的掺假成分^[19]。采用本研究建立的方法对市场上销售的 10 份羊肉片、12 份羊肉卷、7 份羊肉串样品进行了检测分析,并与荧光 PCR 法标准方法所得的数据进



注: 1.猪; 2.阴性对照; 3.山羊; 4.绵羊; 5.牛; 6.龟; 7.马; 8.竹鼠; 9.驴; 10.骡; 11.梅花鹿; 12.家鼠; 13.狗; 14.狐狸; 15.貂; 16.猫; 17.章鱼; 18.锦鲤; 19.鸽; 20.鹌鹑; 21.家兔; 22.青蛙; 23.虾; 24.麻雀; 25.鳄鱼; 26.蛇; 27.鸡; 28.鸭; 29.鹅

图4 猪源性成分的特异性

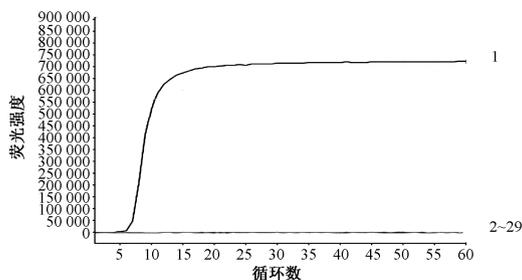
Figure 4 Specificity analysis of porcine-derived ingredients



注: 由于本杂志为黑白印刷, 实际试验结果未能完全体现, 图中出峰时间由早到晚分别对应猪源性成分含量为100%、50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%及空白样品的扩增曲线

图7 猪源性成分的检测灵敏度

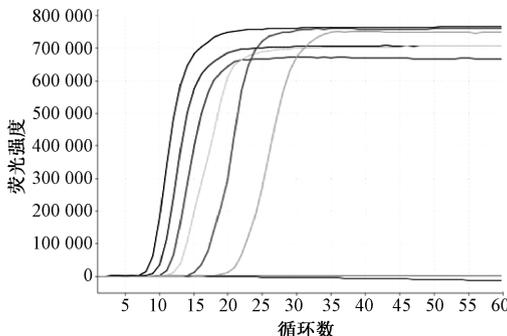
Figure 7 Sensitivity analysis of porcine-derived ingredients



注: 1.鸭; 2.阴性对照; 3.山羊; 4.绵羊; 5.猪; 6.牛; 7.龟; 8.马; 9.竹鼠; 10.驴; 11.骡; 12.梅花鹿; 13.家鼠; 14.狗; 15.狐狸; 16.貂; 17.猫; 18.章鱼; 19.锦鲤; 20.鸽; 21.鹌鹑; 22.家兔; 23.青蛙; 24.虾; 25.麻雀; 26.鳄鱼; 27.蛇; 28.鸡; 29.鹅

图5 鸭源性成分的特异性

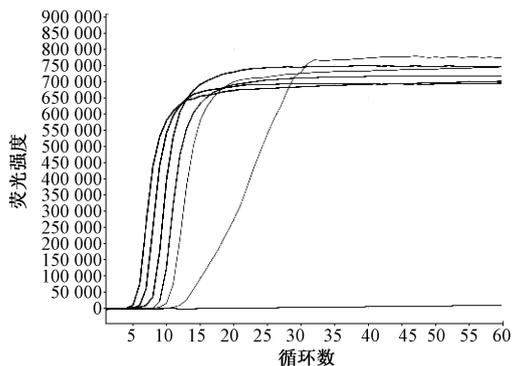
Figure 5 Specificity analysis of duck-derived ingredients



注: 由于本杂志为黑白印刷, 实际试验结果未能完全体现, 图中出峰时间由早到晚分别对应鸭源性成分含量为100%、50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%及空白样品的扩增曲线

图8 鸭源性成分的检测灵敏度

Figure 8 Sensitivity analysis of duck-derived ingredients



注: 由于本杂志为黑白印刷, 实际试验结果未能完全体现, 图中出峰时间由早到晚分别对应羊源性成分含量为100%、50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%及空白样品的扩增曲线

图6 羊源性成分的检测灵敏度

Figure 6 Sensitivity analysis of sheep-derived ingredients

行了比较,两种方法的检测结果见表2。试验结果表明,供试羊肉片、羊肉卷、羊肉串除均检出羊源性成分外,还检测到了猪或鸭源性成分。由此说明,这些标称“100%羊肉成分”的样品中存在掺假现象,羊肉片、羊肉卷、羊肉串中的掺假率分别为20.0% (2/10)、41.7% (5/12)、42.9% (3/7)。LAMP检测结果与PCR方法的检测结果一致,未出现假阳性或假阴性结果。

表2 不同类别羊肉制品中猪、鸭和羊源性成分的检测结果(份)

Table 2 Results of porcine, duck and sheep-derived materials

食物类别	样品数	含猪、鸭成分样品数	
		LAMP法	荧光PCR法
羊肉片	10	2	2
羊肉卷	12	5	5
羊肉串	7	3	3

3 小结

线粒体DNA是高等动物唯一的核外遗传物质,是一个比较理想的用于检测的分子标记靶基因,而且在所有组织细胞中均含有大量的线粒体^[20]。在线粒体DNA中,Cytb基因是线粒体基因组中研究较多的基因,进化速度适中,既含有保守序列,又含有可变序列,且拷贝数多,被广泛用于种类鉴定中^[21]。本研究以动物线粒体Cytb基因作为目的基因设计LAMP引物,以确定羊肉制品中是否含有猪、鸭和羊源性成分。结果表明,针对Cytb基因序列设计的引物具有较好的特异性。

LAMP 扩增产物的检测主要通过 SYBR Green I 染色法、实时浊度法^[22]。实时浊度检测主要是依赖 LAMP 浊度仪来完成。目前,在 LAMP 检测分析中,已经开始引入荧光检测设备对扩增产物进行分析。本研究采用自行研制的恒温荧光检测仪实现了 LAMP 扩增产物的实时检测,与 SYBR Green I 染色法检测结果相比,两者检测结果相似。

本研究通过恒温荧光检测模式,建立了利用 LAMP 法检测羊肉制品中猪、鸭和羊源性成分的新方法。本方法可以快速、准确地检测出羊肉制品中 0.5% 的动物源性成分,对羊肉制品掺伪检测提供了方法支撑和依据,可作为肉制品中猪、鸭和羊源性成分检测的有效工具,将来随着更多动物源成分引物的设计和 LAMP 技术(如与微流控芯片技术相结合)的发展,LAMP 方法在食品安全检测领域还将会有更大的应用前景。

参考文献

[1] DING H B, XU R J. Near-infrared spectroscopy technique for detection of beef hamburger adulteration[J]. Agric Food Chem, 2000,48(6):2193-2198.

[2] RAO Q C, Hsieh Y H. Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats[J]. Meat Sci, 2007,76(3):489-494.

[3] Buntjer J B, Lenstra J A, Haagsma N. Rapid species identification in meat by using satellite DNA probes[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1995, 201(6):577-582.

[4] Janssen F W, Hagele G H, Buntjer J B, et al. Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes[J]. J Ind Microbiol, 1998,21(3):115-120.

[5] 石丰运, 缪建锟, 张利平, 等. 运用基因芯片技术检测牛、山羊、猪和鸡源性成分[J]. 生物工程学报, 2010, 26(6):823-829.

[6] 孙艳华, 张智禹, 牛晋阳, 等. PCR 法快速检测熟肉制品中肉类来源[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5):139-142.

[7] 李林, 徐江涛, 张永强, 等. PCR 方法鉴别肉骨粉中的动物成份种类[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(4):29-31.

[8] 曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 等. 多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1):139-146.

[9] 冯海永, 韩建林. 羊肉产品中若干动物源性成分的七重 PCR 检测技术应用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9):85-90.

[10] Laube I, Zagon J, Broll H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR[J]. Int J of Food Sci Tech, 2007, 42(3):336-341.

[11] 赵新, 王永, 兰青阔, 等. 荧光定量 PCR 方法鉴别肉制品中羊源性成分[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1):299-302.

[12] 沈丽, 贺平丽, 冯涛, 等. 基于磁珠核酸提取法的动物源性成分检测研究[J]. 饲料加工与检测, 2012, 48(21):71-74.

[13] 赵冉, 蔡振鸿, 陈永锋. 动物产品及饲料中牛源和羊源性成分三重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(7):18-22.

[14] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12):e63.

[15] Ahmed M U, Hasan Q, Hossain M M, et al. Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor[J]. Food Control, 2010, 21(5):599-605.

[16] 邵碧英, 杨婕, 张体银. 动物产品的 DNA 提取方法[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(9):47-49.

[17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2051—2008 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时 PCR 法[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.

[18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2727—2010 饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.

[19] 李楠, 王佳慧, 沈青, 等. 北京地区牛、羊肉片中鸭、鸡、猪源性成分调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3):227-232.

[20] Momcilovic D, Rasooly A. Detection and analysis of animal materials in food and feed[J]. J Food Protect, 2000, 63(11):1602-1609.

[21] Sevilla R G, Diez A, Norén M, et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(5):730-734.

[22] 李向丽, 谭贵良, 刘垚, 等. 实时 LAMP 法快速检测食用植物油中的转基因成分 CaMV-35S[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2):244-248.

· 资讯 ·

印度发布《2014 版食品安全及标准》等 3 部修订法案

2015 年 4 月 16 日,印度公布《2011 版食品安全及标准(卵磷脂)》修订法案、《2014 版食品安全及标准(污染物、毒素和残留)》修订法、《2015 版食品安全及标准(食品标准和食品添加剂)》修订法案。分别批准卵磷脂作为饼干食品添加剂并修改其使用标准,修订在各种食品中污染物、毒素及其残留水平以及甜叶菊糖苷在各种食品中的使用标准等。(来源:国家质检总局)

(相关链接:<http://www.chinabeverage.org/news.php?id=6383>)