

# 聚合酶链式反应技术在食品源性分析中的应用

姚艳玲 (嘉兴市食品药品检验检测院, 浙江嘉兴 314001)

**摘要** [目的]比较不同聚合酶链式反应(PCR)技术在食品源性分析中的应用,分析引物、荧光染料和探针的特点及其发展前景。[方法]介绍 PCR、荧光定量 PCR 技术,比较该技术及荧光标记基因的特性,及其在食品源性成分鉴定方面的实际应用。[结果]通过完善 DNA 提取方法、优化反应体系、设计特异性引物或探针均能有效提高 PCR 检测的灵敏度及准确性。[结论]采用 PCR、荧光定量 PCR 技术能有效地实现食品中源性成分鉴定,且方法具有高灵敏度、高特异性、高效率等优势,能满足实验室对食品中源性成分的检测分析。

**关键词** 聚合酶链式反应;荧光定量聚合酶链式反应;源性成分

中图分类号 TS207.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)09-0098-03

## Application of Polymerase Chain Reaction in Food Derived Materials Determination

YAO Yan-ling (Jiaxing Testing Institute for Food and Drug Control, Jiaxing, Zhejiang 314001)

**Abstract** [Objective] The application of different polymerase chain reactions (PCRs) in food derived materials' determination were compared, in order to analyze the diversification and prospect of the primer, dye and probe in PCR. [Method] The techniques of PCR and fluorogenic quantitative PCR were introduced, and the characters and the applications of these techniques in the determination of food derived materials were compared. [Result] The sensitivity and availability of the technology of PCR can be improved by improving extraction methods of DNA, optimizing the reaction systems, and designing the distinct primes or probes. [Conclusion] The technologies of PCR and fluorogenic quantitative PCR can be used in the determinations of food derived materials, and they have the characteristics of sensitive, efficient and specific.

**Key words** Polymerase chain reaction; Fluorogenic quantitative PCR; Derived materials

近年来,食品中掺假、造假事件屡见不鲜,以鸭肉代替牛羊羊肉,用果葡糖浆充当蜂蜜,以海藻酸钠、明矾、明胶等为主要原料制作的假鸡蛋,用地沟油代替食用植物油等事件屡遭曝光,却屡禁不止。为了追求更高的商业利益,制造商不惜铤而走险,不仅破坏了市场消费信誉,降低了人们对食品安全的信心,很大程度上也增加了食品安全监管的压力。目前,对掺假食品的检验方法还不尽完善,甚至还有缺失。

对于物种源性鉴别常采用感官检验和免疫学方法,但肉奶制品经热加工处理,导致其感官性状、蛋白质成分和其他免疫原性物质被破坏而难以鉴别<sup>[1]</sup>,而聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术刚好可以弥补这个缺陷。正确选择物种的特异性基因进行源性成分鉴定,不受食品深加工工艺的影响,大大提高了检测的准确性和有效性。PCR 技术早在 1985 年由科学家 Kary Mullis 和 Cetus 研究发明,是最基本的扩增 DNA 或增加样品中特殊核苷酸片段数量的方法<sup>[2]</sup>,它可看作是模拟体内 DNA 复制的原理在体外酶促合成特异 DNA 片段<sup>[3]</sup>,在短时间内使微量 DNA 呈指数型增长,从而达到检测目的。该技术快速准确、灵敏度高,已被广泛应用于食品源性分析的研究中,为完善食品源性成分鉴定检验的标准体系积累了一定的技术基础。

## 1 PCR 技术

**1.1 PCR 反应体系** PCR 技术是对特定核苷酸片段进行指数级扩增,在扩增反应结束之后,通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行定性或定量分析,进而对产物进行测序比对。该方法迅速发展和广泛应用源于反应体系的建立,PCR 反应体系主要包括缓冲液、氯化镁溶液、dNTP、Taq DNA 聚合酶(Taq DNA Polymerase)、引物和 DNA 模板等。其中的 Taq 酶

具有热稳定性,在 PCR 循环的高温条件下仍能保持较高的活性,促进体外扩增有效进行,大大提高了扩增的效率,使 PCR 技术得到快速发展。反应体系中的特异性引物是目标 DNA 扩增的直接影响因素,通常试验者利用软件进行引物设计。目前常用的引物设计软件有 Premier Primer、Oligo 6、Vector NTI Suit、DNAsis、Omiga 和 Dnastar 等,这些软件都带有引物自动搜索功能,同时结合人工分析便能更有效地设计特异性引物。除了引物和 Taq 酶以外,dNTP、DNA 模板和 Mg<sup>2+</sup> 的含量均会影响扩增结果。因此,在建立 PCR 反应体系时,可以通过优化各反应条件,以得到更高的灵敏度和准确性。

**1.2 荧光定量 PCR** 荧光定量 PCR 是在普通 PCR 的基础上发展起来的分析方法,该方法在反应体系中加入荧光染料或探针等荧光物质,通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物的荧光信号进行实时检测,实现对起始模板定量及定性分析。根据荧光化学模式不同,可分为荧光染料法和荧光探针法,常见的荧光标记基因的特性见表 1。

SYBR Green I 是应用最广泛的一种荧光染料,能结合所有 DNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。在游离状态下,SYBR Green I 发出微弱的荧光,一旦与双链 DNA 结合后,荧光大大增强,而未结合的染料不能发射荧光信号。但是,在做染料法荧光定量 PCR 时,要注意区分假阳性现象,非特异性扩增和引物二聚体均能结合 SYBR Green I 而干扰检验结果。目前的荧光染料除了 SYBR Green I 以外,还有 LC Green TM1 和 Pico Green 等新型荧光染料<sup>[4]</sup>。

目前应用最广泛的荧光探针是 TaqMan 水解探针,探针上 5'端和 3'端分别标记了 1 个报告荧光基团和 1 个淬灭荧光基团。在反应初始时,系统激发供体而产生的荧光信号被邻近的淬灭基团吸收,所以此时检测不到供体荧光信号;而当 PCR 过程中聚合酶扩增到探针结合模板的位点时,其

表 1 常见荧光标记基因特性  
Table 1 Characters of usual fluorescent tags group

基因 Gene	引物 Primer	探针 Probe	特异性 Specificity	荧光信号 Fluorescent signal
SYBR Green I 染料 SYBR Green I dye	寡核苷酸引物	—	通用	非累积
TaqMan 探针 TaqMan probe	寡核苷酸引物	水解探针	专一	累积
FRET 探针 FRET probe	寡核苷酸引物	双杂交探针	专一	非累积
分子信标 Molecular beacon	寡核苷酸引物	发夹结构探针	专一	累积
LUX 引物 LUX primer	发夹结构引物	—	专一	累积

5'~3'核酸外切酶酶切探针 5'端的报告基因,此时游离的报告基因远离淬灭基团,产生荧光信号而被检测到。该水解探针法中,一旦报告基因水解离开淬灭基团,就一直游离于反应体系中可被检测,所以检测的是累积荧光,信号不可逆。而杂交探针 FRET 不同,上游探针的 3'端和下游探针的 5'端分别标记供体荧光基团和受体荧光基团,复性时 2 条特异性探针杂交到模板上,相互靠近而产生荧光信号;升温变性时 2 条特异性探针又远离模板,此时供体和受体荧光基团分开,荧光信号消失,所以利用该法检测到的是实时信号,而非累积信号,信号可逆。除了以上两者以外,荧光探针还有 TaqMan MGB 探针、分子信标等<sup>[5]</sup>。

## 2 PCR 在物种源性成分鉴定方面的应用

### 2.1 利用 PCR 进行物种源性成分分析

动物源性分析时主要针对其各自线粒体基因保守序列设计引物,优化反应体系,建立分析方法。于卫霞等<sup>[6]</sup>利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对鱼种进行鉴定。试验人员从基因库中找到 8 种海鱼以及其他 12 种参照海鱼鱼种的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 III 基因(MT-co3),通过比对分析自行设计通用引物进行 DNA 扩增,对扩增产物进行克隆、测序,然后根据生物信息软件提供的限制性内切酶酶切信息,筛选出 *Nla* III 和 *Hinf* I 2 种内切酶组合体系,对 10 种海鱼的 PCR 产物进行酶切分析,获得了各种鱼类特异的酶切片段图谱。试验结果表明,引物 MT-co3 对 10 种海洋鱼的通用性较高,经测序分析发现,选用 MT-co3 基因作为分子标记鉴定的鱼种与形态学鉴定的鱼种相似度不低于 99%,同时试验获得了基因库中未找到的另外 2 种海鱼的 MT-co3 全序列。通过酶切图谱分析,使用单一的 *Hinf* I 或 *Nla* III 酶切都不能将 10 种海鱼进行区分,但依次使用 *Hinf* I 或 *Nla* III 2 种酶酶切,可将这 10 种海鱼进行有效区分。该试验方法首次采用 MT-co3 基因作为分子标记,采用 PCR 技术进行鱼类种属的鉴别,结合适宜的限制性内切酶酶切分析技术,可对 10 种海鱼进行种源性鉴别。

尚柯等<sup>[7]</sup>通过在基因库中分析和比对猪、牛、羊的线粒体基因保守序列,确定了针对不同物种线粒体 *cyt-b* 基因中的特定片段,分别设计相同的上游引物和具有各自物种特异性的下游引物。通过多次优化反应体系及引物配比,确定多重 PCR 试验条件,所扩增得到的猪、牛、羊的基因片段大小分别为 384、258 和 318 bp,通过基因片段大小差异对样品肉的源性进行鉴定。同时,他们还进行了检测限试验,通过设

定不同的模板比例,最终确定该多重 PCR 体系对猪牛肉、猪羊肉混合样品的最低检测限可达 10%。该研究确定了针对以上 3 种动物的共同序列及其特异性序列,建立了这 3 类常见畜肉的特异性检测引物体系,能有效进行猪、牛、羊源性分析。

曲莉等<sup>[8]</sup>采用改良盐析法和柱层析法有效提取鸭肉、鸡肉、猪肉、牛肉、羊肉、马肉和驴肉的 mtDNA,通过在 GenBank 中下载绿头鸭线粒体细胞色素 b(A Y676201.1) 基因序列,进行引物设计,通过反复梯度 PCR 试验,确定最佳退火温度为 62 ℃;同时,以提取的 7 种肉类 mtDNA 为模板,验证所设计的鸭肉引物的特异性。结果表明,设计的引物仅在鸭肉模板上有明显扩增,扩增产物大小为 223 bp。该研究改良了 2 种 DNA 提取方法,采用 PCR 技术对肉类产品中的鸭源性成分进行鉴定,比起商品化试剂盒的提取更能缩短提取时间、降低试验成本。

国外在这方面的研究比国内开展得更早,如 Tartaglia 等<sup>[9]</sup>根据牛线粒体 DNA 中的特异性序列设计引物,通过试验后建立了适用于饲料中牛源性成分的检测方法,该方法灵敏度可达 0.125%。Arslan 等<sup>[10]</sup>以经烹饪、蒸烤、压力等处理过的牛肉制品为研究对象,经试验证明经水烹饪过后的牛肉制品仍可提取其线粒体 DNA 片段,后经 PCR 扩增可以对其牛源性成分进行鉴别,因此以牛线粒体 DNA 为模板,采用 PCR 技术可以对经水烹饪后的牛肉制品进行牛源性分析。

综上所述,采用 PCR 技术可对鱼类、畜肉、禽肉、熟肉制品和饲料等进行肉源性分析,方法检出限、灵敏度均能满足要求。但该方法后续均需进行凝胶电泳,并对电泳结果进行成像分析,使用试剂多、耗时长,不能实时检测,对日常监督检验要求来说显得较为冗长滞后。

### 2.2 利用荧光定量 PCR 进行物种源性成分分析

荧光定量 PCR 主要采用荧光染料或者标记各种不同荧光基团及荧光淬灭基团的探针来实现实时荧光检测。

杨丽霞等<sup>[11]</sup>根据鸭线粒体基因序列的位点差异设计特异性引物,采用 SYBR Green I 染料,通过溶解曲线分析,建立荧光定量 PCR 检测方法。试验以鸭肉、牛肉混合样品为试验对象,结果表明,试验针对鸭线粒体基因设计的引物特异性较好,扩增试验中仅鸭线粒体 DNA 有扩增,其 Ct 值为 12.82,而牛线粒体 DNA 未扩增;鸭基因组检测灵敏度为 1 pg DNA;溶解曲线试验显示,鸭 DNA 扩增产物的溶解温度为 79.15 ℃,可以有效区分目的片段、非特异性扩增和引物二聚

体。试验将牛肉、鸭肉以 9:1 的比例混合后在 100 ℃ 加热 15 min, 采用试验中建立的方法进行检测, 鸭肉 DNA 扩增 Ct 值为 26.99, 产物溶解温度亦为 79.15 ℃, 说明该方法也适用于熟鸭肉的检测, 灵敏度及特异性均可满足实验室鸭肉源性成分鉴定。

赵冉<sup>[12]</sup> 选取 GenBank 上已发表的猪、牛源性 mtDNA D-loop 序列, 在 NCBI 中进行比对后, 分别针对猪、牛线粒体 DNA 种间保守基因, 设计特异性引物与 *TaqMan* 探针、猪探针报告荧光基团 ROX、荧光淬灭基团 BHQ2; 牛探针报告荧光基团 HEX、荧光淬灭基团 BHQ1。通过对反应体系和反应条件的优化筛选, 利用以上 2 种发射波长相差较大的报告荧光基团, 在 ROX、HEX 荧光通道搜集信号, 建立了猪、牛双重荧光 PCR 检测方法。试验通过对 16 种不同来源的动物源性核酸进行检测, 确定该方法所设计的猪牛引物的特异性, 同时对猪、牛 DNA 模板进行梯度稀释, 确定其方法最低检出限均达  $10^{-5}$ 。试验对不同状态的样品进行检测, 结果显示, 建立的双重荧光 PCR 法还适用于蒸煮、腌制肉制品、动物血液、奶制品及饲料中猪牛源性分析检测。

史艳宇等<sup>[13]</sup> 以鸭线粒体基因全序列为靶位点设计引物和探针, 经 Blast 软件对相似序列搜索后, 筛选出最优且与常见畜禽肉无交叉反应的引物及探针, 所用到的探针为 *TaqMan* 水解探针, 报告荧光基团 FAM, 荧光淬灭基团 TAMRA, 采用荧光定量 PCR 仪进行检测。试验分别用羊肉、牛肉、鸡肉、鹅肉、猪肉、兔肉、马肉和鹿肉等对引物进行特异性试验, 同时, 用羊肉 DNA 溶液对鸭肉 DNA 进行梯度稀释, 再进行鸭肉检测灵敏度试验。通过优化 PCR 反应体系, 最终建立了鸭源性成分检测方法, 该方法具有较强特异性, 所设计的引物及探针检测灵敏度可达  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 并且高浓度羊肉成分的存在对鸭肉灵敏度检测没有影响。

范丽丽等<sup>[14]</sup> 以鸡线粒体细胞色素 b 为目的基因, 设计特异性引物和 *TaqMan* 水解探针, 探针的报告荧光基团 FAM, 荧光淬灭基团 TAMRA。利用所设计的特异性引物对鸡 DNA 模板进行扩增, 所得产物片段为 110 bp。在特异性试验中, 试验人员将鸡、猪、牛、羊、鸭、火鸡、鹌鹑和鸽子等 DNA 模板进行 PCR 反应, 结果显示设计的引物探针体系只对鸡 DNA 模板进行扩增, Ct 值为 35, 其他源性成分均未有效扩增; 灵敏度试验显示该方法最低可检测  $3.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$  鸡肉 DNA, 可用于对食品中鸡源性成分的掺假鉴别。

综上, 荧光定量 PCR 目前较常用的荧光基团较集中于 SYBR Green I 和 *TaqMan* 探针, SYBR Green I 信号可逆, 利用该特性结合溶解曲线分析可实现多重检测; *TaqMan* 探针上标记的荧光报告基团和淬灭基团可根据检测通道不同分别进行设计, 在同一反应体系中加入标记不同荧光基团的探针也可实现多通道检测, 因此在荧光定量 PCR 检测时, 引物及探针的设计至关重要, 在今后的工作中有待更深入的探索试验。在已发表的文献中, 利用双杂交探针 FRET、分子信标及 LUX 引物在源性鉴定分析方面应用还较少。使用杂交探针在探针合成时标记较为复杂, 且杂交时探针不能完全与模板

结合, 稳定性较差; 而 LUX 引物在合成时不需要专门设计探针, 其特异性要弱于探针技术, 但非特异性扩增或引物二聚体没有影响, 其特异性又优于 SYBR Green I。鉴于各染料、探针及引物的特性不同, 在食品源性成分分析鉴定方面的应用还有待更深入的研究与探索。

### 3 前景与展望

利用 PCR、荧光定量 PCR 技术, 从分子角度进行物种源性分析检测, 是当前食品安全检测的新兴行业, 近年来发展尤为迅速。PCR 技术在源性成分分析时, 针对目标 DNA 设计特异性引物以实现 DNA 模板的扩增; 多重检测时, 通过设计通用性的上游引物及特异性的下游引物, 或在同一反应体系中设计各自不同的上下游引物, 以实现物种鉴定的多重快速检测。荧光定量 PCR 技术以实时、快速、简捷的特性在食品源性成分鉴定方面也得到了迅速发展。除了嵌入式荧光染料的使用外, *TaqMan* 探针的应用最为常见, 利用标记不同的荧光报告基团及淬灭基团的 *TaqMan* 探针, 可实现多通道实时检测。在荧光淬灭物质设计方面, 有研究者利用一种单层的、二维的碳纳米材料——氧化石墨烯作为反应时的淬灭剂, 该物质能吸附单链 DNA, 对标记在单链核酸上的荧光染料具有很强的淬灭作用<sup>[15]</sup>, 这在荧光定量 PCR 技术应用方面又开拓了新的发展方向。由于目前检测仪器的通道限制, 多通道检测目前多局限于双重或三重, 在今后的研究工作中, 随着荧光标记物质的不断开发, 相应仪器的检测通道会不断增加, 多重检测必将是 PCR 技术发展的主要方向。

食品源性成分检测方法的建立, 通过改良 DNA 提取技术以提高目标 DNA 提取效率, 采用限制性内切酶酶切技术以实现物种多态性分析, 优化扩增反应体系及温度条件以提高检测灵敏度, 设计不同引物、标记荧光基团的探针以提高检测专一性等, 这些技术在一定程度上不断开发 PCR 技术的潜力, 延伸其在物种鉴定方面的发展空间。今后, 通过对双杂交探针 FRET、分子信标及 LUX 引物等技术研究的不断深入, 食品源性鉴定分析的方法必将朝着多元化的方向发展。

### 参考文献

- [1] 卜登攀, 王加启, 贺云霞, 等. 动物源性饲料检测技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(2): 54-59
- [2] BEJ A K, MAHBUBANI M H, BOYCE M J, et al. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR[J]. Applied and environmental microbiology, 1994, 60(1): 368-373.
- [3] 李勤. 食品微生物检测技术和方法概论[J]. 食品工程, 2006(4): 44-46.
- [4] LIN C N, CHIEN C H, CHIOU M T, et al. Development of SYBR green-based real-time PCR for the detection of canine, feline and porcine parvoviruses[J]. Taiwan veterinary journal, 2014, 40(1): 1-9.
- [5] WONG M L, MEDRANO J F. Real-time PCR for mRNA quantitation[J]. Biotechniques, 2005, 39(1): 75.
- [6] 于卫霞, 刘晓玲, 王敏强, 等. 基于线粒体 DNA 多态性鉴定烟台海鲜市场鱼种[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2015, 28(2): 97-102.
- [7] 尚柯, 段庆梓, 张玉, 等. 多重 PCR 法用于畜肉源性鉴定的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 83-85, 96.
- [8] 曲莉, 李潇涵, 王雪松, 等. 7 种肉类线粒体 DNA 的提取及鸭源性成分检测[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(20): 107-110.

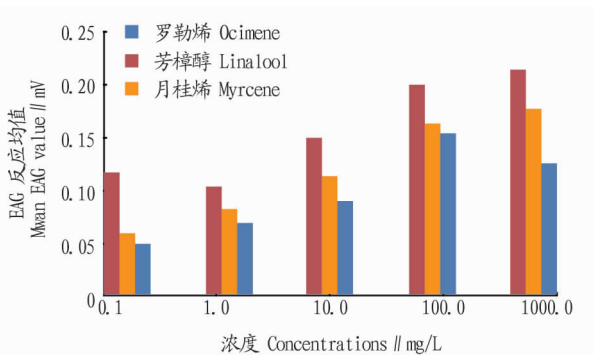


图2 梨叶斑蛾雌蛾对3种挥发物不同剂量的EAG反应

Fig.2 EAG responses of female adults of *Illiberis pruni* to the different concentrations of three volatiles

自然状态下,梨叶斑蛾经过选择寄主、聚集并最终定殖,完成其生活史。不同种的昆虫具有不同的寄主搜索行为,目前尚未明确梨叶斑蛾的定位机制。笔者在保定果园调查发现,梨叶斑蛾幼虫在梨树上大量发生,而不为害紧邻梨树的樱花等绿化树木。据此推断,梨树叶挥发物中可能含有梨叶斑蛾用来寻找并定位寄主的关键物质。该研究发现,梨叶斑蛾对包括芳樟醇、月桂烯、罗勒烯、反-2-己烯醛等在内的多种被测化合物有较强的触角电位反应。有文献报道,上述化合物可引起华北大黑鳃金龟、绿盲蝽、橘小实蝇以及油橄榄果实蝇等昆虫产生较强的EAG反应<sup>[12-15]</sup>。与其他昆虫类似,梨叶斑蛾对寄主挥发物的EAG反应具有明显的剂量效应,当刺激物达到一定浓度后,EAG值趋于恒定或降低,说明该测试浓度达到其反应阈值。Contreras等<sup>[16]</sup>认为触角电位反应指示该刺激物对测试昆虫有引诱或趋避作用,该研究结果可为筛选对梨叶斑蛾具有引诱或趋避作用的活性物质提供依据。

有学者指出,寄主挥发物的混合组分对昆虫的引诱效果比单组分挥发物对昆虫的引诱效果更显著<sup>[17]</sup>。该研究测定了梨叶斑蛾对梨树挥发物单组分的触角电位效应,但各单组分混合后对昆虫的作用效果可能不同,这种有效混合组分的

配比及其作用机制等尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 张洪喜,张江民. 梨叶斑蛾(梨星毛虫)生活习性及其防治[J]. 河北果树, 1990(2):17-19.
- [2] 李冬梅,李连昌,任自立,等. 梨星毛虫性信息素的研究 I:求偶与交配行为的观察[J]. 山西农业科学,1996,24(3):47-50.
- [3] 杜家纬. 植物-昆虫间的化学通讯及其行为控制[J]. 植物生理学报, 2001,27(3):193-200.
- [4] 蔡晓明,孙晓玲,董文霞,等. 虫害诱导植物挥发物(HIPVs):从诱导到生态功能[J]. 生态学报,2008,28(8):3969-3980.
- [5] NGUMBI E, CHEN L, FADAMIRO H Y. Comparative GC-EAD Responses of a specialist (*Microplitis croceipes*) and a generalist (*Cotesia marginiventris*) parasitoid to cotton volatiles induced by two caterpillar species [J]. Journal of chemical ecology, 2009,35(9):1009-1020.
- [6] 邓思思,尹姣,曹雅忠,等. 华北大黑鳃金龟对20种植物源挥发物的电生理和行为反应[J]. 植物保护,2011,37(5):62-66.
- [7] BHOWMIK B, LAKARE S, SEN A, et al. Olfactory stimulation of *Apis cerana indica* towards different doses of volatile constituents: SEM and EAG approaches [J]. Journal of Asia-Pacific entomology, 2016, 19(3):847-859.
- [8] YANG M W, DONG S L, CHEN L. Electrophysiological and behavioral responses of female beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) to the conspecific female sex pheromone [J]. Journal of insect behavior, 2009,22(2):153-164.
- [9] 王明,伍德明,阎云花,等. 新疆棉铃虫性信息素的电生理研究[J]. 华中农业大学学报,1999,18(4):311-316.
- [10] 李典谟,周立阳. 协同进化:昆虫与植物的关系[J]. 昆虫知识,1997,34(1):45-49.
- [11] BRUCE T J A, WADHAMS L J, WOODCOCK C M. Insect host location: A volatile situation [J]. Trends in plant science, 2005,10(6):269-274.
- [12] 隋学良,许志春,田呈明. 杏树挥发物成分的鉴定及其对杏树皱小蠹的触角电位的测定[J]. 应用昆虫学报,2012,49(4):980-985.
- [13] 张国娜,王进军. 桔小实蝇对几种寄主挥发物的触角电位反应[J]. 环境昆虫学报,2016,38(1):126-131.
- [14] 张俊宇,林克剑,黄欣蒸,等. 绿盲蝽对七种锦葵科植物挥发物的EAG和趋向行为反应[J]. 中国生物防治学报,2016,32(2):135-141.
- [15] MALHEIRO R, ORTIZ A, CASAL S, et al. Electrophysiological response of *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera:Tephritidae) adults to olive leaves essential oils from different cultivars and olive tree volatiles [J]. Industrial crops and products, 2015,77:81-88.
- [16] CONTRERAS M L, PEREZ D, ROZAS R. Empirical correlations between electroantennograms and bioassays for *Periplaneta americana* [J]. Journal of chemical ecology, 1989,15(11):2539-2548.
- [17] WEBSTER B, BRUCE T, PICKETT J, et al. Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid [J]. Animal behaviour, 2010,79(2):451-457.
- [9] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, et al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. Journal of food protection, 1998, 61(5):513-518.
- [10] ARSLAN A, IHHAK O I, CALICIOGLU M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique [J]. Meat science, 2006,72(2):326-330.
- [11] 杨丽霞,宋海平,谢晓红,等. SYBR Green I 实时 PCR 技术鉴定鸭源性成分的研究 [J]. 中国农业通报,2013,29(11):16-19.
- [12] 赵冉. 动物产品中猪源性和牛源性成分双重荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与饲料科学,2012,33(10):1-4.
- [13] 史艳宇,刘金华,吴丹丹,等. 荧光定量 PCR 方法检测畜肉食品中鸭源性成分 [J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(6):1859-1864.
- [14] 范丽丽,李培,傅春玲,等. 食品中鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品科学,2014,35(2):248-251.
- [15] 郑爱华,朱庆,向东山,等. 基于荧光标记核酸探针及核酸染料 SYBR Green I 定量检测单链 DNA [J]. 分析化学,2013,41(3):325-329.

(上接第100页)