

文章编号: 1673-1689(2011)05-0767-06

用于分子溯源的鱼糜 DNA 随加工过程的质量变化分析

赵文秀, 潘海云, 王锡昌, 潘迎捷, 汪之和, 赵勇*

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: DNA 溯源是食品质量安全管理控制的新兴有效手段之一。而经深加工的产品, 其 DNA 受到破坏、含量低、质量下降, 可能会影响到后续的物种鉴定、检测及溯源。作者采用酚-氯仿法抽提大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)在鱼糜制作主要加工工序中的 DNA, 利用紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳、18S rDNA 扩增和微卫星(SSR)扩增对产物 DNA 的质量进行评价。结果显示, 虽然随着加工的深入进行, DNA 产物质量逐渐下降, 但仍能满足后续原料的物种鉴定以及用于 DNA 溯源的要求。

关键词: 鱼糜加工; DNA 降解; 质量检测; 分子追溯

中图分类号: S 917, Q 33

文献标识码: A

Quality Changes of DNA during Processing to Surimi Used for Traceability

ZHAO Wen-xiu, PAN Hai-yun, WANG Xi-chang, PAN Ying-jie,
WANG Zhi-he, ZHAO Yong*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: DNA traceability is one of the emerging and efficient means for the management and control of food quality and safety. However, deep processing products suffered DNA destruction, which directly affected the follow-up species detection and traceability. In this study, different stages of *Pseudosciaena crocea* and *Ctenopharyngodon idellus* processing Surimi's DNA were extracted by phenol chloroform and the the DNA quality evaluated by UV spectrophotometer, agarose gel electrophoresis, 18SrRNA amplification as well as microsatellite (SSR) amplification. The results showed that, with the processing of the product, DNA quality was gradually declined, but the genomic DNA was still competent for species identification and DNA traceability.

Key words: surimi processing, DNA degradation, quality detection, molecular traceability

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2006 第 10-5 号、2009 第 6-1 号); 江苏检验检疫局科技计划项目(2011KJ42); 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704)。

* 通信作者: 赵勇(1975-), 男, 湖北英山人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全学方面的研究。Email: yzhao@shou.edu.cn

水产品质量安全一直受到国内外广泛关注,随着我国水产加工业的发展,特别是鱼糜制品产量的不断增加,水产加工原料的品质控制变得尤为重要,因此建立和完善对水产品及其加工制品具有国际化水平的溯源管理体系及食品安全追溯技术体系势在必行。

传统的溯源技术存在着一定的不足,如标签技术容易丢失或更换,有机物溯源技术操作复杂或影响因素太多,虹膜特征溯源技术只能用于完整生物个体溯源。而现代分子生物学技术因其易分型、重复性好、检测手段简单快捷、成本低廉等成为目前国际上被公认的最具发展潜力和应用价值的快速溯源技术,即DNA溯源技术,主要有AFLP(扩增片段长度多态性)标记、SSR(微卫星)标记和SNP(单核苷酸多态性)标记等^[1]。

AFLP标记常被用来鉴定物种以及对一些未知鱼种和海产品的真实性测试^[2]。Nakamura等^[3]对名古屋鸡的4个家系,使用了25个微卫星标记做到追溯。Goffaux^[4]等对比利时具有代表性的96头杂交猪和32头纯种猪进行SNP分型,结果显示每头猪都有自己独特的基因型,可见SNP分型为今后猪肉制品的追溯提供了有效的方法。但这些基于DNA的溯源研究只局限于对生物个体的鉴定。而对深加工动物食品的追溯研究还不多见。Manuela^[5]等利用8对微卫星引物分析了新鲜番茄和经过不同加工方式处理后的番茄制品DNA产物,结果显示,即使是加工制品也可以根据多个等位基因变异而被鉴定,从而为加工制品中对番茄品种的追溯提供了一定的基础。Negrini等^[6]采用AFLP标记对牛肉产品进行原始个体的溯源研究,分析结果显示,AFLP标记技术与贝叶斯理论的结合是一种不错的肉产品溯源方法。Ricardo等^[7]也利用微卫星标记进行了牛肉产品的追溯。但是目前利用微卫星等分子标记对鱼糜制品等海洋深加工食品进行物种鉴定以达到对原料鱼追溯的研究尚未见报道。

提取高质量的基因组DNA是进行分子溯源的技术关键。由于食品中所含化学成分易受产地、气候和采收时间等因素的影响,而且其化学成分非常复杂,其中的蛋白质、脂肪、多糖、多酚、单宁、色素及其它次生代谢物质都会影响DNA的提取质量^[8],尤其是深加工的食品经过了破碎、搅拌、高温、高压、化学以及生物反应等多种多样的加工过程,原料外观已经改变,部分成分也发生了改变,已无法辨别其原料品质的优劣及其组成成分^[9]。

作者对一种淡水鱼(草鱼)和一种海水鱼(大黄

鱼)在加工成鱼糜的过程中,每个加工环节提取的DNA质量进行比较分析,旨在验证经加工后的鱼糜产物是否适用于后续的DNA追溯研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

草鱼、大黄鱼:购自上海芦潮港水产市场;DS蛋白酶K、氯仿异戊醇、RNA酶A、EDTA、Tris平衡酚(80)、TE 8.0:上海生工生物工程有限公司;1 mol/L Tris-HCl:上海申能博彩生物科技有限公司;DK-8D型电热恒温水槽:上海一恒科技有限公司;DYY-6C型电泳仪:北京六一仪器厂;高速冷冻离心机:德国Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 冷冻鱼糜的生产工艺 原料鱼→去头、去内脏→清洗→采肉→漂洗→精滤→脱水→斩拌(添加剂:蔗糖、山梨醇等)→称重、包装→冻结→冷藏^[10]。

本次实验由于用量较少,用手工制作代替了机器生产,用绞肉机采肉。两种鱼分别取6个样:1原料鱼肉、2搅碎一次、3搅碎二次、4漂洗一次、5漂洗二次、6漂洗三次。

1.2.2 鱼肌肉组织DNA提取方法—改进的酚-氯仿抽提法 取鱼肌肉组织0.15 g,置于2 mL离心管中,剪碎组织。向离心管中依次加入1 mL的细胞裂解液(10 mmol/L Tris-Base,0.1 mol/L EDTA(pH 8.0),50 μL 10% SDS,15 μL 蛋白酶K),充分混匀之后,55℃水浴至澄清(pH 8)。向离心管中加入200 μL平衡酚,充分混匀之后,离心,吸取上清液,向上清液中加入200 μL氯仿异戊醇,混匀离心。再吸取上清液,加入15 μL RNA酶,在37℃下水浴45 min。重复提取步骤,加入两倍体积的100%冰冻乙醇,摇动以沉淀DNA,离心,用滤纸将乙醇吸尽。加入1 mL 70%乙醇洗涤2次。倒掉上清液,室温干燥,最后加50 μL TE溶解DNA。-20℃贮存备用^[11]。

1.2.3 分光光度法检测 用TE做空白,在紫外分光光度计上测定,记录DNA的浓度和 A_{260} 与 A_{280} 比值。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 将DNA提取液和标准DNA样品点样在1 g/dL的琼脂糖凝胶上电泳,电压100 V。室温下电泳35 min。产物经溴化乙锭染色后在紫外光下凝胶成像。

1.2.5 18S rDNA-PCR扩增反应 从NCBI中检索到鱼类18S rDNA的部分序列,用Primer 5.0软

件设计引物得 forward: 5'-ATTACCCATTTC-CGACAG-3'; Reverse: 5'-TCTCCCGAGATG-CAACTA-3'。目的片段约 230 bp, 引物由上海生物工程公司合成。扩增在型号为 TG-24/H(b) 的 PCR 仪上进行。18S rDNA 的扩增条件为^[12]: 每次扩增采用 25 μ L 体系, 反应混合液含有 2 μ L 模板 DNA, 0.25 μ L Taq 酶(1 U/ μ L, 购自 TAKARA 公司), 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 引物各 0.5 μ L (25 mol/L)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后在紫外光下凝胶成像。

表 1 4 对草鱼微卫星分子标记及其引物

Tab. 1 Four pairs of microsatellite markers and their primers in *Ctenopharyngodon idellus*

GenBank 登录号	核心序列	引物序列 (5'-3')	期望产物大小/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
Ci09 EF408900	(CA) ₁₀	FAM-TGGCCTTCACTACCATCACTT AATGTCCCCACAATTCATAAAA	117~139	50.5
Ci10 EF408901	(AC) ₁₅	HEX-AATGCTTCCCATCTCACTGC TCAGAGCCACACCAACAATG	188~214	60
Ci13 EF408904	(GT) ₁₆	FAM-GAATAAAGCGGATGCCTTGAAT TTTCCCAAACCTTAGCACACTTT	209~215	58
Ci14 EF408905	(TG) ₁₀	HEX-AAATGGTCTGCTCAAAAATGTA TTTACTCACTGGCTTCTTCA	122~128	60

表 2 4 对大黄鱼微卫星分子标记及其引物

Tab. 2 Four pairs of microsatellite markers and their primers in *Pseudosciaena crocea*

GenBank 登录号	核心序列	引物序列 (5'-3')	期望产物大小/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
EF635867	(GT) ₁₂	F: AGTGAGGAGTGAAGGCAGGA R: TTGACCGTTGTGTTGTGTT	233	51
EF635869	(TC) ₉ ...(CTT) ₆	F: CATCTCCCCACTCATATCG R: TTCAGACTGCTGCCCTGTC	299	52
EF635875	(CT) ₂₂	F: CCTGTGTCATTTTGTGTTTC R: AGACTGGAGCTGTCTCTG	212	53
EF635876	(CT) ₁₂ ...(CT) ₄	F: CTTTCTGTGAGGCTTTTCC R: TCGCAGACAGAATCTCCAAG	254	50

2 结果与分析

2.1 鱼糜不同加工阶段 DNA 质量的琼脂糖凝胶电泳分析

由图 1、2 中可以看出, 该方法均可以有效地提取主要加工阶段的 DNA。而且草鱼的 DNA 条带清晰明亮, 蛋白质和 RNA 污染少, 而大黄鱼中提取的 DNA 有明显的弥散带。这可能是由于加工鱼糜的过程中, 基因组 DNA 受到机械损伤、加工时 pH 值改变以及细胞破损与核酸酶作用等因素促使

PCR 产物送至生工进行测序。

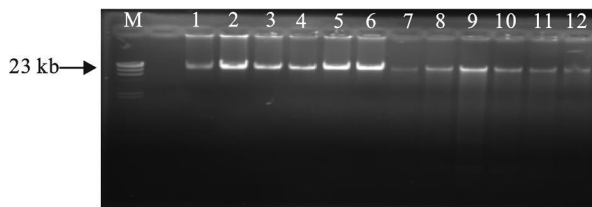
1.2.6 SSR-PCR 扩增反应 从文献[13-14]中随机选用 4 对草鱼微卫星引物(见表 1)和 4 对大黄鱼微卫星引物^[14](见表 2)对加工中主要加工工序的 DNA 产物进行 SSR-PCR 扩增。每次扩增采用 25 μ L 体系, 反应混合液含有 1.5 μ L 模板 DNA, 0.3 μ L Taq 酶(1 U/ μ L, 购自 TAKARA 公司), 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 引物各 0.3 μ L (25 mol/L)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 25 个循环 (95 $^{\circ}$ C 30 s, 50.5~61.0 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后在紫外光下凝胶成像。

DNA 降解, 因此条带逐渐变暗, 从而可以初步推测 DNA 质量有所下降。

而从图 1、2 比较来看, 草鱼 DNA 的提取质量要优于大黄鱼的质量。这可能是由于海水鱼中蛋白质含量比较高, 而且其本身的干扰离子比淡水鱼的要高。

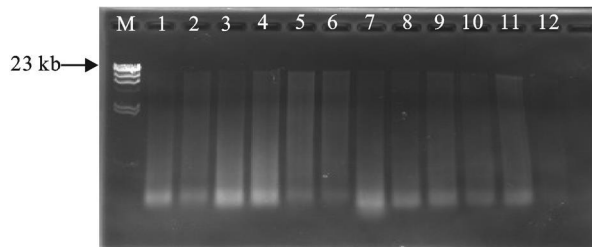
2.2 鱼糜不同加工阶段 DNA 质量的紫外分光光度分析

由表 3、表 4 可以看出, 加工过程中 DNA 质量浓度和纯度都有所降解。



M: λ HindIII marker; 1, 2: 原料鱼; 3, 4: 一次绞肉; 5, 6: 二次绞肉; 7, 8: 一次漂洗; 9, 10: 二次漂洗; 11, 12: 三次漂洗

图1 普通酚-氯仿抽提草鱼中基因组DNA电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis of *Ctenopharyngodon idellus* genomic DNA extracted by phenol-chloroform



M: λ HindIII marker; 1, 2: 原料鱼; 3, 4: 一次绞肉; 5, 6: 二次绞肉; 7, 8: 一次漂洗; 9, 10: 二次漂洗; 11, 12: 三次漂洗

图2 普通酚-氯仿抽提大黄鱼基因组DNA电泳图谱
Fig. 2 Electrophoresis of *Pseudosciaena crocea* genomic DNA extracted by phenol-chloroform

表3 草鱼DNA产物紫外检测结果

Tab. 3 Results of *Ctenopharyngodon idellus* DNA ultraviolet spectrophotometer (UV)

加工过程	A_{260}/A_{280}	质量浓度/ (ng/ μ L)	DNA产量/ (ng/g组织)
直接采肉	1.80 \pm 0.03	72.87 \pm 0.45	24288.89 \pm 150.31 ^a
一次搅碎	1.71 \pm 0.01	65.67 \pm 0.90	21888.89 \pm 300.62 ^b
二次搅碎	1.68 \pm 0.00	50.20 \pm 0.46	16733.33 \pm 152.75 ^c
一次漂洗	1.74 \pm 0.03	49.27 \pm 0.31	16422.22 \pm 101.83 ^c
二次漂洗	1.69 \pm 0.07	46.60 \pm 2.25	15522.11 \pm 751.30 ^d
三次漂洗	1.57 \pm 0.01	36.83 \pm 0.51	12277.78 \pm 171.05 ^e

所得数值是3次重复平均值 \pm 标准差;同一列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 是核酸纯度的指示值。纯度好的DNA,在pH 7~8.5下 A_{260}/A_{280} 的比值应该在1.8左右。如果比值低于1.8,表示存在蛋白质或者酚类物质的影响。 A_{230} 表示样品中存在一些碳水化合物、盐(胍盐)等杂质,较纯净的核酸 A_{260}/A_{230} 的比值应大于2.0。从草鱼肌肉中提取的DNA质量浓度分别为36.83~72.87 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 为1.57~1.80,从大黄鱼肌肉中提取的DNA

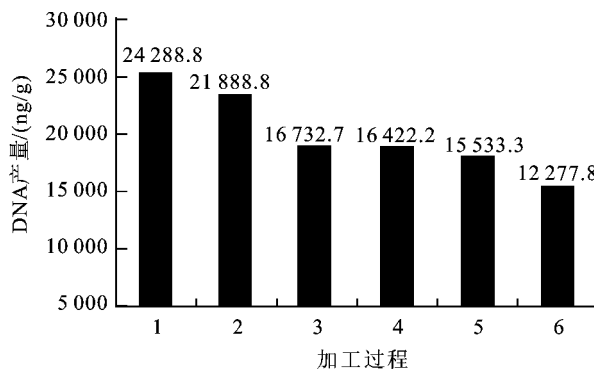
质量浓度分别为36.60~105.83 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 为1.72~1.82,在加工后期质量浓度和纯度都有下降。图3也可以直观地看出,在鱼糜加工过程中DNA产量存在明显的下降趋势。

表4 大黄鱼DNA产物紫外检测结果

Tab. 4 Results of *Pseudosciaena crocea* DNA ultraviolet spectrophotometer (UV)

加工过程	A_{260}/A_{280}	质量浓度/ (ng/ μ L)	DNA产量/ (ng/g组织)
直接采肉	1.72 \pm 0.02	105.83 \pm 0.96	35277.78 \pm 320.30 ^a
一次搅碎	1.80 \pm 0.02	87.80 \pm 0.66	29266.67 \pm 218.58 ^b
二次搅碎	1.82 \pm 0.01	72.60 \pm 0.50	24200.00 \pm 166.67 ^c
一次漂洗	1.79 \pm 0.02	64.00 \pm 0.17	21333.33 \pm 57.74 ^d
二次漂洗	1.80 \pm 0.02	51.63 \pm 1.02	17211.11 \pm 340.48 ^e
三次漂洗	1.72 \pm 0.00	36.60 \pm 1.10	12233.33 \pm 366.67 ^f

所得数值是3次重复平均值 \pm 标准差;同一列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。



1. 原料鱼肉; 2. 搅碎1次; 3. 搅碎2次; 4. 漂洗1次; 5. 漂洗2次; 6. 漂洗3次

图3 鱼糜加工过程中DNA产量变化

Fig. 3 Change of DNA concentration in Surimi processing

2.3 基于PCR技术对鱼糜不同加工阶段DNA质量的评价

不同加工阶段的DNA是否能用于PCR扩增是进行DNA溯源的技术关键。18S rDNA在真核生物中是最为保守的基因之一,所以常作为进行生物分类的依据。18S rDNA经测序比对后,可初步判定生物种属。由于微卫星在真核生物基因组DNA中数量多且均匀分布,据估计,在基因组中平均30~50 kb就存在一个SSR,因此SSR资源极为丰富,且具有特异性的PCR扩增、多态信息容量(PIC)高、引物通用性好、突变率高、共显性等特点,

尤其为近缘物种和个体的身份识别提供了巨大的筛选空间和追溯依据。因此作者根据 18S rDNA 扩增和 SSR 扩增来对鱼糜不同加工工艺阶段 DNA 质量进行评价。

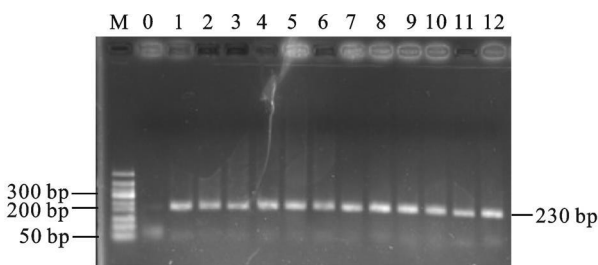
草鱼和大黄鱼的 18S rDNA 特异片段扩增效果良好,说明提取所得的基因组 DNA 具有较好的质量,无抑制 Taq 酶活性的物质,适用于后续的 PCR 扩增。将样品送至上海生工生物工程公司进行测序。经分析比对,结果与预期片段完全符合。表明提取的 DNA 产物质量均达到后续物种鉴定、分子溯源等实验的要求,见图 4~ 5。



M: 100 bp Marker; 0: 阴性对照; 1, 2: 原料鱼; 3, 4: 一次绞肉; 5, 6: 二次绞肉; 7, 8: 一次漂洗; 9, 10: 二次漂洗; 11, 12: 三次漂洗

图 4 草鱼 18S rDNA PCR 产物扩增结果

Fig. 4 Electrophoresis analysis of partial 18s rDNA PCR products of *Ctenopharyngodon idellus* genomic DNA

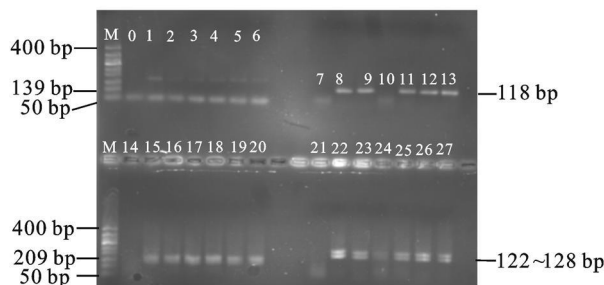


M: 50 bp Marker; 0: 阴性对照; 1, 2: 原料鱼; 3, 4: 一次绞肉; 5, 6: 二次绞肉; 7, 8: 一次漂洗; 9, 10: 二次漂洗; 11, 12: 三次漂洗

图 5 大黄鱼 18S rDNA PCR 产物扩增结果

Fig. 5 Electrophoresis analysis of partial 18s rDNA PCR products of *Pseudosciaena crocea* genomic DNA

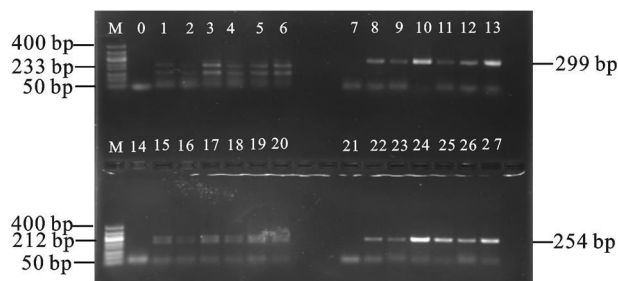
作者通过随机选用 4 对草鱼和 4 对大黄鱼的微卫星引物,对不同加工阶段的样品进行 PCR 扩增。其结果见图 6、7。图谱条带清晰、明亮,提取的 DNA 无论是在新鲜鱼糜还是经过加工的鱼糜制品中都未出现位点缺失现象,说明在加工过程中虽然 DNA 质量下降,但仍可以对加工产品做物种鉴定及分子溯源,而且通过增加筛选微卫星位点就可以在加工中的任意环节达到鉴定所用鱼种的目的。



M: 50 bp Marker; 0, 7, 14, 21: 阴性对照; 1, 8, 15, 22: 原料鱼; 2, 9, 16, 23: 一次绞肉; 3, 10, 17, 24: 二次绞肉; 4, 11, 18, 25: 一次漂洗; 5, 12, 19, 26: 二次漂洗; 6, 13, 20, 27: 三次漂洗
0~ 6: 引物 1; 7~ 13: 引物 2; 14~ 20: 引物 3; 21~ 27: 引物 4

图 6 草鱼 SSR-PCR 产物扩增结果

Fig. 6 Results of PCR amplification of four SSR loci from *Ctenopharyngodon idellus*



M: 50 bp Marker; 0, 7, 14, 21: 阴性对照; 1, 8, 15, 22: 原料鱼; 2, 9, 16, 23: 一次绞肉; 3, 10, 17, 24: 二次绞肉; 4, 11, 18, 25: 一次漂洗; 5, 12, 19, 26: 二次漂洗; 6, 13, 20, 27: 三次漂洗
0~ 6: 引物 1; 7~ 13: 引物 2; 14~ 20: 引物 3; 21~ 27: 引物 4

图 7 大黄鱼 SSR-PCR 产物扩增结果

Fig. 7 Results of PCR amplification of four SSR loci from *Pseudosciaena crocea*

3 结 语

食用农产品溯源技术是食品安全风险管理的一项有效措施。它是建立于农产品生产、加工、贮运、销售和消费过程的信息记录和信息追溯体系。DNA 溯源技术是基于 DNA 指纹图谱的生物学技术,它的唯一性和高度精确性使其成为一种新兴的溯源方法。

实验中,大黄鱼的 DNA 产物质量不及草鱼,主要是因为海淡水鱼的组成成分有所差异,鱼肉含有丰富的镁元素,尤其是海水鱼。镁是多种酶的激活剂,同样也会促进 DNA 酶发挥作用。除鱼种本身对 DNA 提取质量的影响外,可能还有以下 3 方面的因素会影响 DNA 产量和质量: 1) 鱼糜制作过程中有比较严重的机械加工,而且其本身所含的多糖、脂肪、色素及其它次生代谢产物均会对 DNA 的提取产生影响,如多糖与 DNA 结合成粘稠的胶状物,而且加工中出现的某些物理、化学变化及酶因

子也会影响 DNA 的质量。2) 细胞核内的 DNA 在死后开始自溶性降解, 有实验发现随死后间隔时间延长, 肾组织细胞核 DNA 发生断裂加重, 且断裂的 DNA 片断在碱性环境中电泳时迁移速度加快, 脱离未断裂的双链 DNA, 形成明显的“拖尾”现象。而且死后细胞内部酶解作用增强, 使核 DNA 的酶解片段逐渐变小^[15]。不同物种的自溶速率不同, 可能大黄鱼较之草鱼自溶更快。3) 环境温度对死后细胞核 DNA 降解的影响很大^[16]。

结果显示, 随着鱼糜加工阶段的深入, 提取的 DNA 产物质量逐渐下降, 但仍满足后续物种鉴定及分子溯源等操作的要求。可以看出, 淡水鱼的 DNA 提取产物质量较海水鱼高, 因此在以后的实验操作中, 可以根据海水鱼自身的特性来改进自己的实验方案。而且本研究显示, 通过增加筛选微卫星位点即可对加工中的鱼糜进行原料溯源, 此方法具有很好的应用前景。

参考文献(References):

- [1] 吴 潇, 张小波. 肉产品分子溯源标记的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 308– 311.
Wu Xiao, Zhang Xiao-bo. Research progress on molecular markers for meat products traceability[J]. **Journal of Food Science**, 2010, 31(7): 308– 311. (in Chinese)
- [2] Yu Z, Guo X. Genetic analysis of selected strains of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) using AFLP and microsatellite markers[J]. **Mar Biotechnol**, 2004, 6: 575– 586.
- [3] Nakamura A, Kino K, Minezawa M, et al. A method for discriminating a Japanese chicken, the Nagoya breed, using microsatellite markers[J]. **Poultry Science**, 2006, 85(12): 2124– 2129.
- [4] Goffaux F, China B, Dams L, et al. Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection[J]. **Forensic Science International**, 2005, 151: 239– 247.
- [5] Manuela T, Maria L, Savo S, et al. Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products [J]. **Food Control**, 2010, 21: 143– 149.
- [6] Negrini R, Milanesi E, Colli L, et al. Breed assignment of Italian cattle using biallelic AFLP markers[J]. **Animal Genetics**, 2007, 38(2): 147– 153.
- [7] Ricardo F D, Boris S D, Renato C R, et al. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers[J]. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 2008, 68(4): 342– 351.
- [8] Bernardo Di, Galderisi G, Cipollaro U, et al. Methods to improve the yield and quality of DNA from dried and processed figs [J]. **Biotechnology Progress**, 2005, 21, 546– 549.
- [9] Bauer T, Weller P, Hammes W. et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food [J]. **European Food Research Technology**, 2003, 217: 338– 343.
- [10] 王锡昌, 汪之和. 鱼糜制品加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 42.
- [11] 刘臻, 鲁双庆, 肖调义. 鲫鱼基因 DNA 提取方法的探讨[J]. 水利渔业, 2004, 24(6): 20– 22.
LIU Zhen, LU Shuang-qing, XIAO Tiao-yi. Discussion on method for extraction of high quality of genomic DNA from crucian carp[J]. **Reservoir Fisheries**, 2004, 24(6): 20– 22. (in Chinese)
- [12] 罗巍. 近江牡蛎核糖体 DNA 片段基因序列及其分子分类研究[J]. 台湾海峡, 2005, 3: 322– 330.
LUO Wei. Phylogenetic analysis of *Crassostrea rivularis* based sequences of DNA segments[J]. **Journal of Oceanography in Tai Wan Strait**, 2005, 3: 322– 330. (in Chinese)
- [13] Li J L, Zhu Z Y, Wang G L, et al. Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellites in grass carp [J]. **Molecular Ecology Notes**, 2007, 7, 1114– 1116.
- [14] 林能锋, 苏永全, 丁少雄, 等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 237– 243.
LIN Neng-feng, SU Yong-quan, DING Shao-xiong, et al. Cross-species amplification of microsatellite markers from *Pseudosciaena crocea* in *Sciaenidae*[J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 2008, 15(2): 237– 243. (in Chinese)
- [15] 李晓娜, 郑吉龙, 张晓东, 等. 死后小鼠肾组织细胞核 DNA 变化规律的研究[J]. 中国医科大学学报, 2007, 5(36): 64– 566.
LI Xiao-na, ZHENG Ji-long, ZHANG Xiao-dong, et al. Study on the rule of postmortem DNA degradation of kidney cells in mice[J]. **Journal of China Medical University**, 2007, 5(36): 564– 566. (in Chinese)
- [16] 李春香, 杨群. 模拟沉积环境下的温度、湿度对叶片降解的影响[J]. 生命科学研究, 2003, 7(3): 249– 254.
LI Chun-xiang, YANG Qun. Influence of temperature and humidity on leaf DNA degradation in simulated sedimentary environment[J]. **Life Science Research**, 2003, 7(3): 249– 254. (in Chinese)