

# SYBR Green 实时荧光 PCR 检测食品中鲨鱼源性成分真实性方法的建立

郭云霞<sup>1,2</sup>, 张舒亚<sup>\*1</sup>, 谌鸿超<sup>1</sup>, 任硕<sup>1</sup>, 黄文胜<sup>3</sup>, 包建强<sup>2</sup>, 陈颖<sup>3</sup>

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

**摘要:** 为确保鲨鱼产品的真实性, 作者研究建立了食品中鲨鱼源性成分的 SYBR Green 实时荧光 PCR 鉴定方法。运用建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法对 9 种鲨鱼及 48 种常见非鲨鱼类动植物样品进行检测, 9 种鲨鱼样品均出现扩增曲线, 且熔解曲线在  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$  内出现峰值; 其他非鲨鱼样品中均未出现扩增曲线, 熔解曲线在  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$  也未出现峰值。该检测方法的检测限为  $0.0001 \text{ ng}/\mu\text{L}$  鲨鱼 DNA 和质量分数  $0.01\%$  狗鲨肉粉。运用建立的方法对 20 种常见的鲨鱼产品进行 PCR 检测, 除仿鱼翅和鲨鱼肝油外所有产品中均能检测出鲨鱼成分。结果表明, 该检测方法特异性强, 灵敏度高, 能够用于食品中鲨鱼源性成分的真实性鉴别。

**关键词:** SYBR Green 实时荧光 PCR; 食品; 鲨鱼源性成分; 真实性

中图分类号: Q 789 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)12—1300—07

## Authentication of Shark Derived Material in Food Using SYBR Green Fluorescence Real-Time PCR

GUO Yun-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Shu-ya<sup>\*1</sup>, CHEN Hong-chao<sup>1</sup>, REN Shuo<sup>1</sup>, HUANG Wen-sheng<sup>3</sup>,  
BAO Jian-qiang<sup>2</sup>, CHEN Ying<sup>3</sup>

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine, Shanghai 200135, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

**Abstract:** A specific and sensitive SYBR Green real-time fluorescence PCR method was developed to determine of the shark derived material in food. The specificity and sensitivity of this method was examined. The results showed 9 kinds of shark samples displayed the amplified curves and the highest point of melt curves at  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$ , whereas other 48 kinds of common plants and animals displayed no amplified curves and the highest point of melt curves at temperatures out of  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$ . The detection limit of the method was  $0.0001 \text{ ng}/\mu\text{L}$  DNA and  $0.01\%$  shark meat powder. The 20 commercial shark products samples were analyzed by SYBR Green PCR and all the products

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 国家质检总局科研项目(2010IK191)。

\* 通信作者: 张舒亚(1978—), 女, 河南商丘人, 农学硕士, 高级工程师, 主要从事食品与动植物分子生物学检测技术方面的研究。

E-mail: zhangshuya@shciq.gov.cn

indicated existence of shark DNA except the artificial shark fin and shark liver oil. The results indicated that the detection method is highly specific and sensitive, and can be used to the identification of shark derived material in food.

**Keywords:** SYBR green real-time fluorescence PCR, food, shark derived material, authentication

鲨鱼指软骨鱼纲板鳃亚纲鲨鱼总目的鱼类,是位于海洋生物链最高层的重要经济鱼类<sup>[1]</sup>。市场上的鲨鱼产品主要包括鱼翅、鲨鱼硫酸软骨素、鲨鱼肉以及鲨鱼肝油等<sup>[2-6]</sup>。由鲨鱼鱼鳍制成的干鱼翅、湿鱼翅及翅针因富含大量的胶原蛋白,且加工成鱼翅汤后肉肥味美,成为大型聚会和商业晚宴的必点菜肴<sup>[7]</sup>。从鲨鱼软骨中提取的鲨鱼硫酸软骨素,因可降低血脂,防治冠心病和心肌梗塞等心脑血管疾病,深受中老年朋友的喜爱<sup>[8]</sup>。从鲨鱼肝脏中经精深加工提炼而成的鲨鱼肝油,因富含大量的 EPA、DHA 及脂溶性维生素而广受消费者的青睐<sup>[9]</sup>。近年来,鲨鱼产品的广阔市场和巨大经济利益驱动了其造假掺假现象的不断发生,且尤以鱼翅的造假最为严重。目前,我国对鲨鱼产品的检测并没有相关国家标准和行业标准,但市场对鱼翅等鲨鱼产品的需求量非常巨大,急需需要相关的检测方法对其进行真假鉴别。

SYBR Green (SG) 是一种荧光染料,能与双链 DNA 结合并发出荧光,是荧光定量 PCR 最常用的 DNA 结合染料。处于游离状态的 SYBR Green 发出微弱的荧光,一旦结合到双链 DNA 之后,荧光可增强至游离状态的 1 000 倍,可根据荧光信号检测 PCR 体系存在的双链 DNA 数量<sup>[10]</sup>。在整个 PCR 完成后,将温度从 60 ℃ 升至 95 ℃,每升高单位温度,仪器会自动收集荧光信号,将温度与荧光强度的变化求导即可得到熔解曲线<sup>[11]</sup>。通过熔解曲线分析可以对反应特异性以及引物与模板的匹配程度进行评价。SYBR Green 实时荧光 PCR 是一种快速、准确的分子生物学检测方法,目前已广泛应用于猪肉、饮料等食品的真假鉴别<sup>[12-13]</sup>。作者从 GenBank 数据库中查找相关序列并设计鲨鱼特异的 PCR 引物,应用 SYBR Green 实时荧光 PCR 技术建立食品中鲨鱼源性成分真实性快速、准确的鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

舒氏星鲨、鼠鲨、尖吻鲭鲨、大青鲨、尖吻斜锯

牙鲨、澳洲半沙条鲨、加勒比斜锯牙鲨、路氏双髻鲨 DNA: 由中国检验检疫科学院提供。狗鲨: 由上海松江检验检疫局提供。

黄鱼、黑鱼、带鱼、鲳鱼、罗非鱼、秋刀鱼、黄姑鱼、白姑鱼、剑鱼、鲟鱼、长江茴鱼、鲫鱼、巴沙鱼、黄鳍金枪鱼、蓝鳍金枪鱼、凤尾鱼、真鲷、白水鱼、鳕鱼、鲈鱼、鳊鱼、鳙鱼、石斑鱼、多宝鱼、竹荚鱼、大西洋鲑、马鲛鱼、鳓鱼、鳗鱼、鲐鱼、黄盖鲿、鳌虾、猪、牛、山羊、鸡、鸭、鹅、兔、狗、大豆、绿豆、琼脂、玉米、小麦、马铃薯、红薯及海带等 48 种常见非鲨鱼动植物样品: 购自上海家乐福、易初莲花等大型超市及农贸市场。

用于方法应用的 5 个泡发鱼翅: 分别购自上海人家饭店、上海馥园杨姐食品公司、上海小南国饭店和由上海波特曼丽嘉酒店和上海松江检验检疫局提供; 2 个鲨鱼肉: 分别购自大连中天水产有限公司和大连汇能海产品有限公司; 干鲨鱼鳍: 由上海机场检验检疫局提供; 4 个干鱼翅: 分别由上海波特曼丽嘉酒店、上海松江检验检疫局提供和购自上海铜川水产品市场和上海家乐福超市; 冻干鱼翅: 购自上海养中堂生物科技有限公司; 鲨鱼源硫酸软骨素初级加工品: 由上海祥源生物科技有限公司提供; 美国天然元鲨鱼软骨素胶囊: 购自上海家乐福超市; 日本百傲鲨鲨鱼软骨素胶囊: 购自上海易初莲花超市。

### 1.2 样品制备

使用冷冻研磨机将上述组织样品磨成粉末状,提取 DNA 后用于特异性检测。

将草鱼肉和狗鲨肉于 80 ℃ 隔离烘干 48 h 后研磨成草鱼肉粉和狗鲨肉粉。用草鱼肉粉将上述狗鲨肉粉配制成质量分数 10%、1%、0.1%、0.01% 的梯度预混样品,提取 DNA 后用于质量灵敏度测试。

### 1.3 样品 DNA 提取

使用天根海洋动物基因组提取试剂盒: 天根生化科技有限公司,目录号: DP324; 提取鲨鱼及硬骨鱼类样本 DNA、动物基因组提取试剂盒: 目录号: DP323; 提取动物样本 DNA、植物基因组提取试剂

盒:目录号:DP305;提取植物样本 DNA 提取方法详见试剂盒操作说明书。用 BioPhotometer plus 核酸蛋白含量测定仪(Eppendorf)测定 DNA 浓度,置于-20℃保存备用。

### 1.4 引物设计

查阅和整理国内外有关鲨鱼的文献资料,通过 Blast 比对 GenBank 数据库中的相关序列,运用 Primer5 设计 PCR 引物,引物序列为:Primer1:5'-CACCTTTAGGCAAACCAGCAC -3'; Primer2:5'-GGGCCAGGGTCGAATCTCT-3'。

### 1.5 PCR 扩增

使用 18S rRNA 基因扩增真核生物内源基因,以确保所提取的 DNA 适合于 PCR 扩增。检测所用 18S rRNA 基因引物序列为:5'-TCTGCCCTATCAACT TTCGATGGTA-3'和 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'。PCR 反应体系为:1×PCR 缓冲液,2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>,1 U Taq 酶,200 μmol/L dNTPs,引物 100 nmol/L,模板 50~100 ng,反应体积为 25 μL。扩增条件为:94℃ 3 min,94℃ 20 s,54℃ 40 s,72℃ 40 s,40 个循环。

运用建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法对相应的 DNA 进行扩增 (ABI 7300 实时荧光 PCR 仪),反应体系为:12.5 μL SYBY Green Pre Mix,1 μL Primer1 (5 μmol/L),1 μL Primer2 (5 μmol/L),8.5 μL 无菌去离子水,2 μL 模板 DNA,反应体积为 25 μL。扩增条件为:95℃ 10 min、95℃ 30 s、64℃

40 s、72℃ 45 s、35 个循环;95℃ 15 s、64℃ 30 s、99℃ 15 s。64℃ 收集荧光信号。

### 1.6 普通 PCR 产物的检测

取 10 μL 18S rRNA 基因扩增产物,加 1 μL 10×上样缓冲液点样进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统记录电泳图谱。琼脂糖凝胶质量浓度为 2 g/dL。

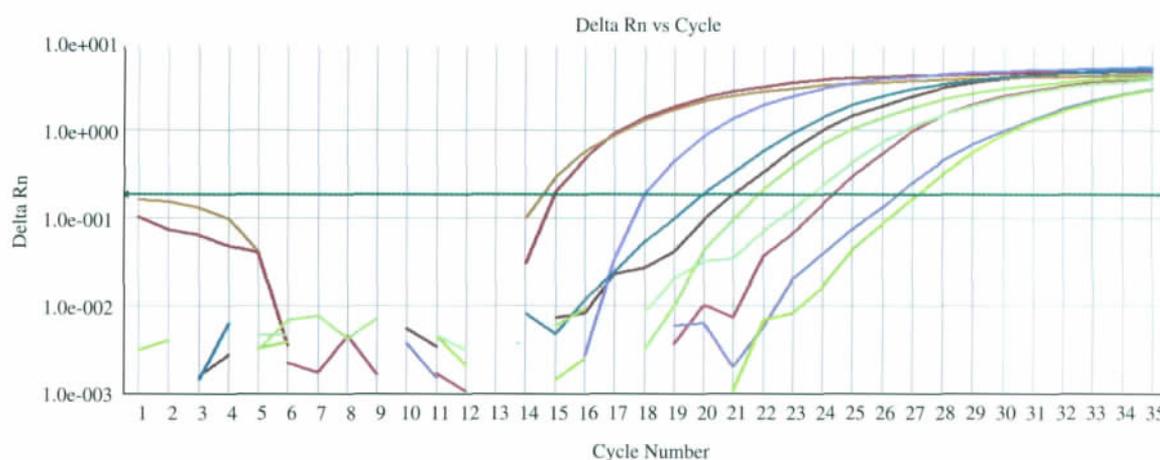
## 2 结果与分析

### 2.1 真核生物 18SrRNA 特异引物的检测

用真核生物 18S rRNA 特异性引物对本研究提取的所有 DNA 进行普通 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳结果显示,除鲨鱼肝油外,所有 DNA 样品均出现 137 bp 的特异性扩增条带。结果表明,除鲨鱼肝油因精加工程度过高 DNA 遭到破坏外,所有抽提的 DNA 溶液均适用于 PCR 测试。

### 2.2 鲨鱼源性成分引物的特异性检测

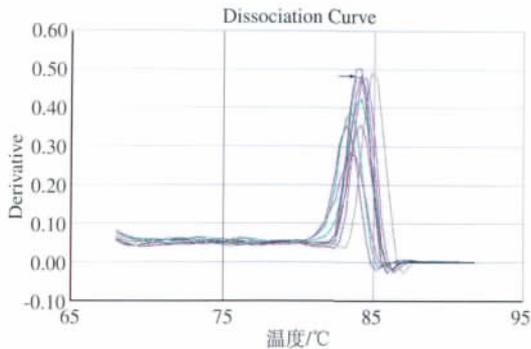
用建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法对 9 种鲨鱼样品 DNA 进行检测,所有样品均出现特异性扩增曲线,见图 1。且溶解曲线在(84±1.5)℃的温度范围内出现峰值,见图 2。用该方法对 48 种非鲨鱼类常见动植物样品 DNA 进行 PCR 检测,所有样品均未出现扩增曲线,见图 3。且溶解曲线在(84±1.5)℃的温度范围内未出现峰值,见图 4。实验表明,实验室建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法对 9 种供试鲨鱼种类具有特异性。



图中曲线从左到右依次为: 1: 鲨鱼阳性对照; 2: 狗鲨; 3: 加勒比斜锯牙鲨; 4: 鼠鲨; 5: 大青鲨; 6: 澳洲半沙条鲨; 7: 路氏双髻鲨; 8: 尖吻斜锯牙鲨; 9: 尖吻鲭鲨; 10: 舒氏星鲨

图 1 鲨鱼成分的实时荧光 PCR 扩增曲线

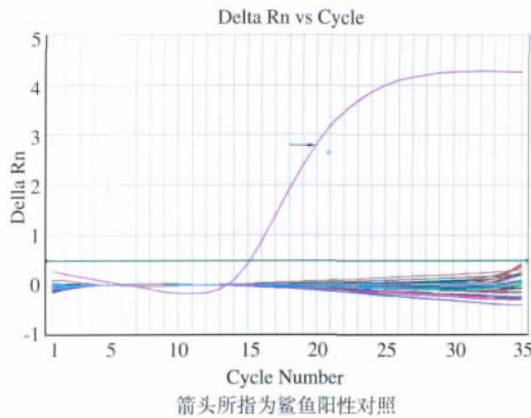
Fig.1 Specific detection of real-time PCR for shark



箭头所指为鲨鱼阳性对照

图 2 鲨鱼 DNA 的 SG-PCR 熔解曲线

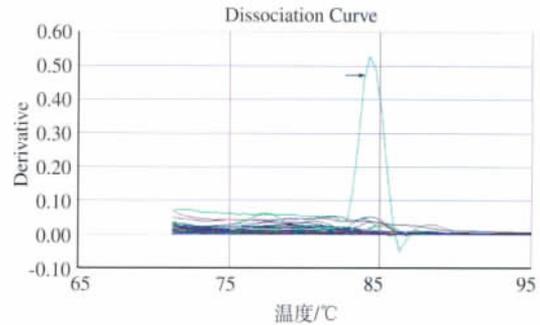
Fig.2 SG-PCR melting curves of PCR product from shark



箭头所指为鲨鱼阳性对照

图 3 48 种非鲨鱼动植物的实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.3 Specific detection of real-time PCR for non-shark materials



箭头所指为鲨鱼阳性对照

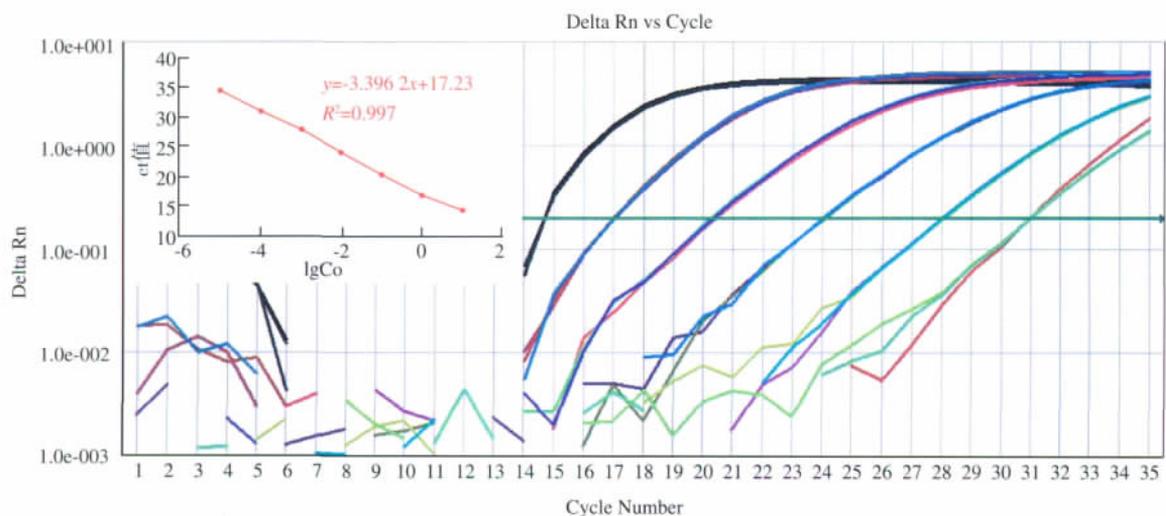
图 4 48 种非鲨鱼动植物的 SG-PCR 熔解曲线

Fig.4 SG-PCR melting curves of PCR product from non-shark materials

### 2.3 鲨鱼源性成分引物的灵敏度检测

用 1×TE 缓冲液将提取的狗鲨样品 DNA 溶液稀释至 10、1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> ng/μL, 按照建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法对其进行扩增, 并进行 3 次重复实验, 以确定该检测方法的灵敏度。实验表明: 10、1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> ng/μL DNA 稀释液均出现稳定扩增曲线, 该方法的检测灵敏度可达到 10<sup>-4</sup> ng/μL, 见图 5。

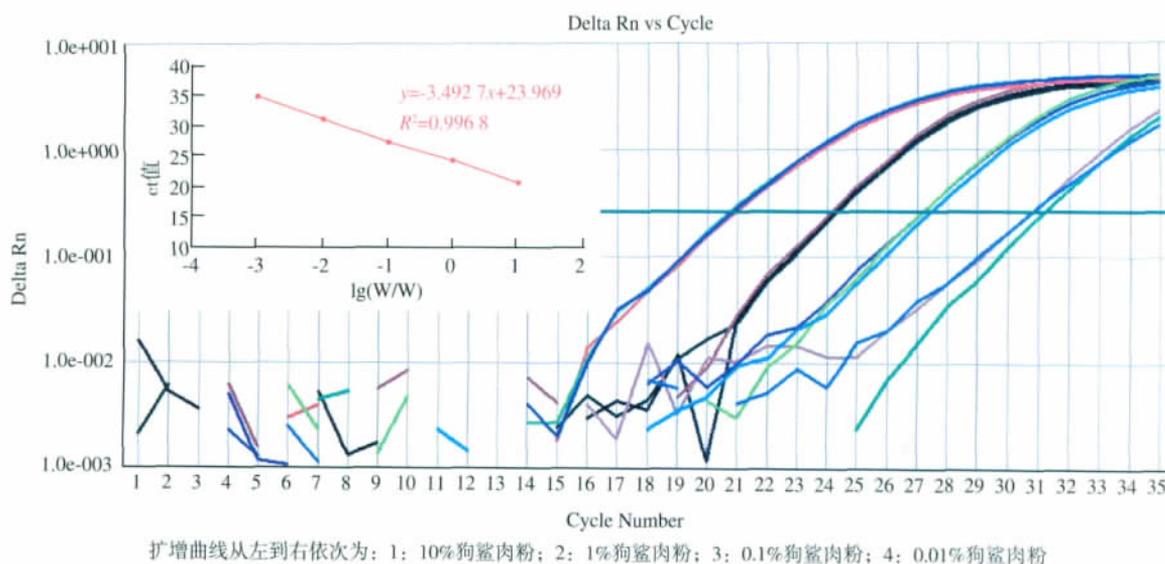
用草鱼肉粉将狗鲨肉粉配制成质量分数 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 的肉粉样品, 提取 DNA 后进行 3 次 SYBR Green 实时荧光 PCR, 10%、1%、0.1%、0.01% 的预混样品 DNA 均出现稳定扩增曲线, 0.001% 预混样品未出现稳定扩增曲线, 见图 6。



扩增曲线从左到右依次为: 1: 10 ng/μL; 2: 1 ng/μL; 3: 10<sup>-1</sup> ng/μL; 4: 10<sup>-2</sup> ng/μL; 5: 10<sup>-3</sup> ng/μL; 6: 10<sup>-4</sup> ng/μL

图 5 鲨鱼 DNA 检测灵敏度实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.5 Amplification curves generated by serial dilution of shark DNA



扩增曲线从左到右依次为: 1: 10%狗鲨肉粉; 2: 1%狗鲨肉粉; 3: 0.1%狗鲨肉粉; 4: 0.01%狗鲨肉粉

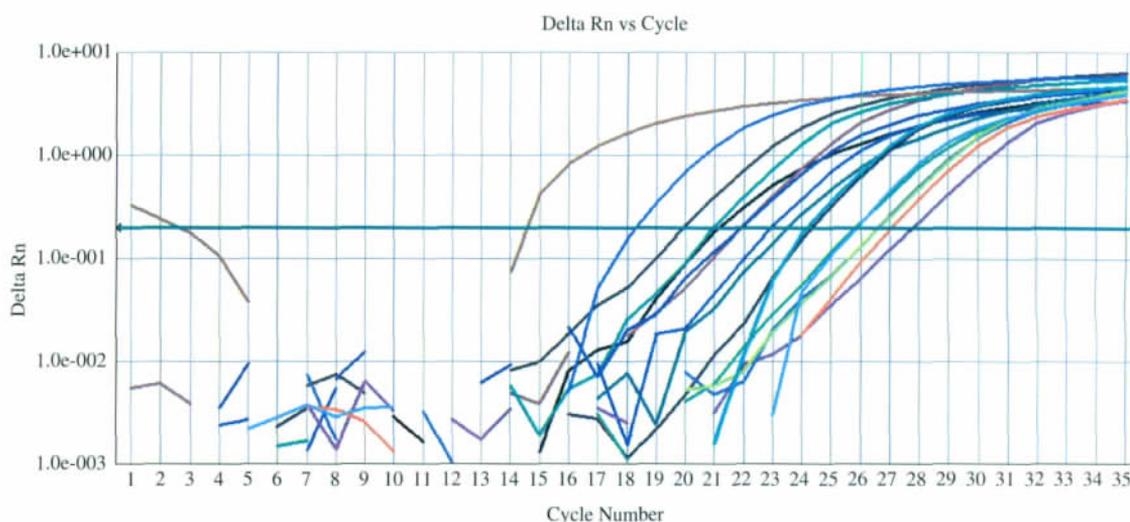
图 6 鲨鱼肉粉(W/W)检测灵敏度实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.6 Amplification curves generated by different shark percentage content

#### 2.4 食品中鲨鱼源性成分检测的应用

应用该方法对市场上常见的鲨鱼产品: 鲨鱼肉、干鱼鳍、干鱼翅、泡发鱼翅、鲨鱼源硫酸软骨素初级加工品、鲨鱼软骨素胶囊、鲨鱼肝油、仿干鱼翅和泡发仿鱼翅样品进行检测。其中, 鲨鱼肉、干鱼鳍、干鱼翅、泡发鱼翅、鲨鱼源硫酸软骨素初级加工品、鲨鱼软骨素胶囊等含有鲨鱼 DNA 的样品均能

出现特异性扩增曲线见图 7, 且熔解曲线在  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$  内出现峰值(见图 8), 能检测出鲨鱼成分; 不含鲨鱼成分的仿干鱼翅和泡发的仿鱼翅 DNA 样品以及精加工鲨鱼肝油样品均未出现特异性扩增曲线, 且熔解曲线在  $(84 \pm 1.5)^\circ\text{C}$  内未出现峰值, 不能检测出鲨鱼成分。



扩增曲线从左到右依次是: 1: 鲨鱼阳性对照(本实验室人工构建的含有PCR扩增序列的质粒); 2: 泡发鱼翅1(购自上海人家饭店); 3: 泡发鱼翅2(由上海波特曼丽嘉酒店提供); 4: 泡发鱼翅3(购自上海馥园杨姐食品公司); 5: 泡发鱼翅4(由上海松江检验检疫局提供); 6: 泡发鱼翅5(购自上海小南国饭店); 7: 鲨鱼肉(购自大连中天水产有限公司); 8: 鲨鱼片(购自大连汇能海产品有限公司); 9: 干鲨鱼鳍(由上海机场检验检疫局提供); 10: 干鱼翅1(由上海波特曼丽嘉酒店提供); 11: 干鱼翅2(由上海松江检验检疫局提供); 12: 干鱼翅3(购自上海铜川水产品市场); 13: 干鱼翅4(购自上海家乐福超市); 14: 冻干鱼翅(上海养中堂生物科技有限公司); 15: 鲨鱼源硫酸软骨素初级加工品(由上海祥源生物科技有限公司提供); 16: 美国天然元鲨鱼软骨素胶囊(购自上海家乐福超市); 17: 日本百傲鲨鲨鱼软骨素胶囊(购自上海易初莲花超市)。

图 7 常见鲨鱼产品实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.7 Amplification curves generated by commercial shark products

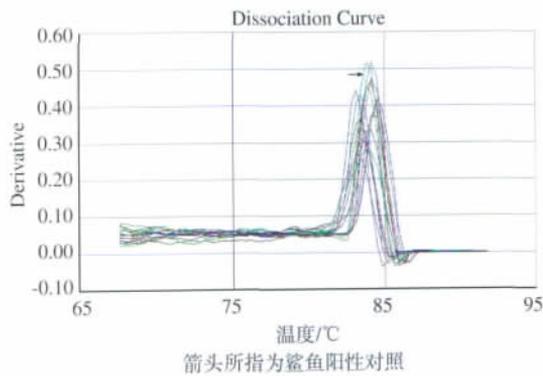


图 8 常见鲨鱼产品 SG-PCR 熔解曲线

Fig.8 SG-PCR melting curves generated by commercial shark products

### 3 结 语

实验过程中分别运用多种 DNA 提取试剂盒多次提取鲨鱼肝油 DNA, 用真核生物 18S rRNA 对所有抽提 DNA 进行普通 PCR 扩增, 均未出现扩增条带, 这极可能与鲨鱼肝油的加工过程有关。鲨鱼肝油的生产经历了淡碱水解、离心、盐洗、压滤等一系

列复杂的精细加工过程, DNA 在加工过程中受到很大程度的破坏<sup>[4]</sup>。故该方法不能应用于鲨鱼肝油的中鲨鱼源性成分真实性的鉴定。

SYBR Green 实时荧光 PCR 因实验设计简单、无需设计探针、实验成本低、且能够进行熔解曲线分析检验扩增反映的特异性, 目前已广泛应用于临床、食品、分子生物学及遗传学领域<sup>[15-17]</sup>。由于 SYBR Green 染料与所有的双链 DNA 分子都可以结合, 引物二聚体、单链二级结构以及错误扩增产物的出现会增加荧光值, 因而对引物的特异性及反应体系中模板的加入量要求较高<sup>[18]</sup>。作者所在实验室对所设计引物进行普通 PCR 验证后, 分别对引物的模板量和反应的退火温度进行了优化, 确定了最佳模板量和最适退火温度。

该 SYBT Green 实时荧光 PCR 检测方法应用于食品中鲨鱼源性成分真实性检测, DNA 浓度灵敏度可达  $10^{-4}$  ng/ $\mu$ L, 鲨鱼肉粉质量灵敏度可达 0.01%, 具有很高的可操作性和很强的实用性。除鲨鱼肝油外, 可广泛应用于市场上常见鲨鱼产品的真实性检测。

### 参考文献:

- [1] 朱江峰, 戴小杰. 中国鲨鱼资源生物学研究现状与保护对策[J]. 生物学通报, 2007, 42(5): 19-21.  
ZHU Jiang-feng, DAI Xiao-jie. Biological research situation of shark resource in China and the protection countermeasure[J]. **Bulletin of Biology**, 2007, 42(5): 19-21. (in Chinese)
- [2] 张世义, 伍玉明. 鲨鱼[J]. 生物学通报, 2006, 41(9): 20-22.  
ZHAGN Shi-yu, WU Yu-ming. Sharks[J]. **Bulletin of Biology**, 2006, 41(9): 20-22. (in Chinese)
- [3] Clarke S C, Magnussen J E, Abercrombie D L, et al. Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records[J]. **Conservation Biology**, 2005, 20: 1201-1211.
- [4] Fong Q SW, Anderson J L. International shark fin markets and shark management: an integrated market preference-cohort analysis of the blacktip shark[J]. **Ecological Economics**, 2002, 40: 117-130.
- [5] Hosmilloa M, Jeonga Y, Kim H, et al. Development of universal SYBR Green real-time RT-PCR for the rapid detection and quantitation of bovine and porcine toroviruses[J]. **Journal of Virological Methods**, 2010, 168: 212-217.
- [6] ZHENG Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Shi-yu. Comparative studies on the characteristics of the fourier-transform infrared spectra between sturgeon and shark chondroitin sulfates[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2008, 28(1): 45-47. (in Chinese)
- [7] Miter R, Cheminade C, Allaupe P, et al. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm[J]. **Theriogenology**, 2004, 62: 1557-1566.
- [8] Amer H M, Almajhdi F N. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine corona virus[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2011, 25: 101-107.
- [9] Parka S, Parka D, Saif L J, et al. Development of SYBR green real-time RT-PCR for rapid detection, quantization and diagnosis of unclassified bovine enteric calicivirus[J]. **Journal of Virological Methods**, 2009, 159: 64-68.
- [10] Akalar E S, Abas1yan1k M F. The development of duplex real-time PCR based on SYBR green florescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in food stuff[J]. **Food Chemistry**, 2012, 130: 1050-1054.
- [11] 张慧霞, 宗卉, 吴建平, 等. 应用 SYBR Green 实时荧光 PCR 熔解曲线检测鹌鹑源性成分[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17):

70-72.

ZHANG Hui-xia, ZONG Hui, WU Jian-ping, et al. The detection of common quail derived elements through the melt curve of SYBR Green I real-time PCR[J]. **Chinese Journal of Animal Science**, 2010, 46(17):70-72. (in Chinese)

- [12] 鲍伦军, 杨建成, 何振华, 等. 鱼翅中硫酸软骨素的酶解-高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2002, 21(5):59-61.

BAO Lun-jun, YANG Jian-cheng, HE Zheng-hua, et al. Determination of chondroitin sulfate in shark's fins by Enzymolysis-HPLC[J]. **Journal of Instrumental Analysis**, 2002, 21(5):59-61. (in Chinese)

- [13] CHEN Jian, LIU Ye-bing, ZHANG Zhi-gang, et al. Establishment of SYBR Green real-time PCR assay for the detection of porcine parvovirus[J]. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, 2011, 47(8):6-8. (in Chinese)

- [14] 班付国, 刘宏伟, 高延玲, 等. 运用 SYBR Green 熔解曲线法检测饲料中牛、羊源性成分的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 389(2):128-130.

BAN Fu-guo, LIU Hong-wei, GAO Yan-ling, et al. Research of SYBR Green melting curve detection for derived materials in feed in bovine and sheep[J]. **China Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2011, 389(2):128-130. (in Chinese)

- [15] McIntosh K A, Tumber A, Harding J C S, et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues[J]. **Veterinary Microbiology**, 2009, 133:23-33.

- [16] 吴晨璐, 施春雷, 周敏, 等. 食源性肠球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立与评价[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(5):779-787.

WU Chen-lu, SHI Chun-lei, ZHOU Min, et al. Development and evaluation of a real-time PCR system for *Enterococcus spp.* detection in food samples[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5):779-787. (in Chinese)

- [17] 赵文静, 李妍, 高鹏飞, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4):433-437.

ZHAO Wen-jing, LI Yan, GAO Peng-fei, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4):433-437. (in Chinese)

- [18] Hosmilloa M D T, Jeonga Y, Kim H, et al. Development of universal SYBR Green real-time RT-PCR for the rapid detection and quantitation of bovine and porcine toroviruses[J]. **Journal of Virological Methods**, 2010, 168:212-217.