

# 交叉引物等温扩增检测猪肉源性成分

冯涛<sup>1,2</sup>, 李素芳<sup>1,2</sup>, 毛梦娇<sup>1,2</sup>, 邵柔铭<sup>1,2</sup>, 潘家荣<sup>\*1,2</sup>

(1. 中国计量大学 浙江省海洋食品品质及危害物控制技术重点实验室, 浙江 杭州 310018; 2. 中国计量大学 海洋食品加工质量控制技术与仪器国家地方联合工程实验室, 浙江 杭州 310018)

**摘要:** 肉制品掺假现象已成为我国食品行业重点关注的问题。本研究使用交叉引物恒温扩增技术(Cross priming amplification, CPA)和核酸试纸条检测相结合的方法快速检测肉制品中猪肉成分。对猪线粒体的D-loop基因序列设计特异性的引物和探针,通过优化引物浓度及反应条件,确立最佳反应体系。实验结果表明,CPA扩增系统对猪肉源性成分的检测特异性良好,对单猪肉源性成分的检出限为1 ng/μL,对混合肉制品中猪肉源性成分的检出比例为10%(相当于10 ng/μL)。同时核酸试纸条可以快速检测CPA扩增产物,结果与凝胶电泳系统检测保持一致。本研究建立的CPA-核酸试纸条检测方法是一种特异、高效的肉制品中猪肉成分检测方法,可以为肉制品质量控制提供有效的新手段。

**关键词:** 交叉引物恒温扩增;核酸试纸条;D-loop基因;猪

**中图分类号:** Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)11-1207-06

## Cross Priming Amplification with Nucleic Acid Test Strip Analysis of Pork in Meat Mixtures

FENG Tao<sup>1,2</sup>, LI Sufang<sup>1,2</sup>, MAO Mengjiao<sup>1,2</sup>, ZHANG Yingjie<sup>1,2</sup>, PAN Jiarong<sup>\*1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Food Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. National & Local United Engineering Lab of Quality Controlling Technology and Instrumentation for Marine Food, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The phenomenon of meat adulteration has become the concerned problems of the food industry in China. In this study, the cross priming amplification (CPA) and nucleic acid test strip detection method were used together to rapid detect the component of pork meat in the meat product. Specific primers and probes were designed according to the D-loop gene sequence of the pork mitochondria (mtDNA), then the concentration of primers and reaction condition were optimized to establish the best system eventually. The results showed that the amplification system had good specificity for the pork-derived component as the detection limit of the single pork-derived component reached 1 ng/μL, while detection ratio of the pork meat component was 10% (equivalent to 10 ng/μL). Nucleic acid test strips could quickly get the amplification products, and the result of

收稿日期: 2016-03-02

基金项目: 浙江省食品药品监督管理局项目(2014020); 浙江省大学生科技创新计划(新苗人才计划)项目(2015R409009); 浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)。

\* 通信作者: 潘家荣(1964—), 男, 广东高州人, 农学博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事食品科学研究。E-mail: panjr@263.net

引用本文: 冯涛, 李素芳, 毛梦娇, 等. 交叉引物等温扩增检测猪肉源性成分[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(11): 1207-1212.

test strips was as same as that of gel electrophoresis system. The CPA- nucleic acid test strip method established by this study was a specific and efficient method to detect the component of pork meat, which could provide a new effective approach for the quality control of meat products.

**Keywords:** cross priming amplification, nucleic acid test strip, D-loop gene, pork

肉制品掺假现象已成为我国食品行业重点关注的问题。诸多媒体报道,不法商贩使用廉价肉类掺入或直接代替价值更高的牛羊肉进行食品加工及销售,严重侵害消费者的利益。猪肉是我国食用最广泛的肉类之一,其价格相对于牛羊肉更便宜。而信仰伊斯兰教的穆斯林民族的饮食习惯又严禁猪肉源性成分的混入。肉类加工制品琳琅满目、种类繁多,难以通过感官进行分辨。因此对工商、食品安全部门而言,建立有效的肉类加工制品中猪源性成分的定性鉴定方法,对掺假不法行为的监管与打击十分必要。这有助于保证广大消费者的健康及促进民族和谐。

核酸扩增技术<sup>[1]</sup>是有效鉴别动物源性成分的方法。高琳等利用线粒体 DNA Cyt b 基因 PCR-RFLP 技术成功鉴别猪肉和牛肉<sup>[2]</sup>,周彤等使用荧光定量 PCR 方法检测肉制品中猪源性成分<sup>[3]</sup>,国外也有诸多利用 PCR 方法对鸭、牛、羊等动物进行物种鉴定的报道<sup>[4-6]</sup>。核酸等温扩增技术也越来越多地应用于动物源性成分的鉴定,以 LAMP 为基础的扩增方法被广泛使用和研发<sup>[7-8]</sup>。

交叉引物等温扩增 (Cross priming amplification, CPA) 是一种新型的核酸等温扩增技术。通过对 CPA 的两条特定引物进行分子标记,使扩增产物成为拥有两个特定结合位点的“抗原”<sup>[9]</sup>。这种方法具有灵敏度高、特异性强、操作过程简单等优点,已经被大量用于检测细菌、病毒、病原体等<sup>[10-13]</sup>。但在动植物鉴定方面还少有报道,因此 CPA-核酸试纸条检测技术在食品掺假方面具有研究和应用前景。

mtDNA 是高等动物的核外遗传物质,单细胞中含有多个线粒体,线粒体中,基因的数量少,基因拷贝数多,且具有种内和种间多态性<sup>[14-15]</sup>,拷贝数大。而细胞核 DNA 中基因的数量庞大,单拷贝的基因居多,在深加工肉制品<sup>[16]</sup>中单拷贝的基因更容易丢失。因此 mtDNA 较细胞核 DNA 更适合作检测目标。本研究在分析牛、羊、猪、鸭、鸡线粒体 DNA D-loop 基因<sup>[17]</sup>序列的基础上,设计用于肉制品中猪源

性成分检测的 CPA 引物体系,拟建立猪源性成分定性检测的交叉引物等温扩增-核酸试纸条检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究所使用的动物样本(牛、羊、鸡、鸭、猪)购自杭州大型超市;实验用引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成;核酸试纸条购自杭州尤思达生物技术有限公司。

实验所用核酸试纸条为胶体金免疫试纸条,其中加样区包含胶体金-亲和素复合物,检测线(T线)包埋荧光素的抗体,质控线(C线)包埋生物素。使用时,用移液器吸取 10  $\mu$ L 的扩增产物滴入试纸条加样区,将试纸条插入 2 $\times$ SSC 缓冲液中进行检测。

### 1.2 仪器和设备

PCR 扩增仪、Nanodrop-2000 电泳仪、凝胶成像系统。

### 1.3 总 DNA 的制备

用 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA,方法参照使用手册。将制备好的 DNA 用 ND-2000 核酸蛋白分析仪检测,并将其质量浓度调整为约 100 ng/ $\mu$ L。-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 基因比对和 CPA 引物设计

在 GenBank 上整理鸭、牛、羊、鸡、猪线粒体 DNA D-loop 基因的序列。同种动物不同个体之间的 D-loop 基因存在一定水平的遗传多样性,在 CPA 引物设计中需要考虑到这种差异。故通过比对 GenBank 上已公布的猪 D-loop 基因序列,在 CPA 引物设计时尽量避开突变位点,以保证 CPA 系统的通用性和有效性。对猪源 D-loop 基因上特异性片段序列设计 CPA 引物组并实验筛选。

### 1.5 CPA 引物与探针的筛选及体系优化

**1.5.1 引物与探针的筛选** 对 1.4 节中设计的 CPA 引物组进行初步筛选,将 1.3 节中提取的猪 DNA 作为阳性对照,将提取的牛、羊、鸭、鸡 4 种常见畜禽肉的总 DNA 以及无菌水作为阴性对照,所有 DNA

模板均使用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至 100 ng/μL。筛选反应体系见表 1,反应温度预设 63 ℃,反应 60 min。扩增结束,取 10 μL 扩增产物用核酸电泳和试纸条分别进行检测。

表 1 20 μL CPA 初始反应体系  
Table 1 20 μL CPA initial reaction system

| 试剂                           | 加入量/μL |
|------------------------------|--------|
| 10× Bst Buffer               | 2.0    |
| 3 mol/L Betaine              | 3.0    |
| 100 mmol/L MgSO <sub>4</sub> | 1.2    |
| 10mmol/L dNTPs (each)        | 0.6    |
| 10 μmol/L Primer 4s          | 0.2    |
| 10 μmol/L Primer 5a          | 0.2    |
| 10 μmol/L Primer 2a1s        | 1.2    |
| 10 μmol/L Primer 3a          | 0.6    |
| 10 μmol/L Primer 2a          | 0.6    |
| 8 U/μL Bst pol               | 1.0    |
| ddH <sub>2</sub> O           | 补足     |
| DNA template                 | 3.0    |

**1.5.2 引物与探针浓度的优化** 以 CPA 反应体系中的交叉引物 2a1s 和探针(2a/3a)的质量浓度作为变量,设计引物质量浓度交叉实验。在研究中发现当交叉引物 2a1s 质量浓度 ≥ 探针 2a/3a 质量浓度时扩增效果较好,设计 18 组质量浓度配比实验(见表 2),每个实验组中设立 3 个平行阴性实验(以无菌水为模板)和 3 个平行阳性实验(以 100 ng/μL 猪的总 DNA 为模板)。

表 2 CPA 引物浓度交叉实验设计

Table 2 Concentration cross experiment of CPA primers

| 探针浓度/<br>(μmol/L) | 交叉引物浓度 |     |     |     |     |     |
|-------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 0.4    | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| 0.2               | 1      |     |     |     |     |     |
| 0.3               | 2      | 3   | 4   |     |     |     |
| 0.4               | 5      | 6   | 7   | 8   | 9   |     |
| 0.5               |        | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  |
| 0.6               |        |     | 15  | 16  | 17  | 18  |

**1.5.3 引物体系的特异性及稳定性实验** 对 1.5.2 节中扩增结果理想的引物浓度组合,以猪的总 DNA 作为阳性对照,以牛、羊、鸭、鸡的总 DNA 以及无菌水作为阴性对照,进行 CPA 扩增引物特异性实验。反应产物分别用琼脂糖凝胶电泳和核酸试纸条进行检测,比较结果。

对特异性良好的实验组,后续进行稳定性实验。设立 3 个重复组,每个重复组分别设立 6 个平行阴性实验和 6 个平行阳性实验。总计 18 个阴性实验及 18 个阳性实验结果均正确的实验组为本次

研究的最佳引物体系。

## 1.6 CPA 扩增灵敏度实验

将保存的猪 DNA 样品梯度稀释(10 倍稀释)成 100、10、1、1×10<sup>-1</sup> ng/μL。用 1.5 节中筛选优化的 CPA 反应体系进行扩增灵敏度实验。反应产物用电泳和试纸条分别进行检测,以确定 CPA 反应体系对单一成分猪肉 DNA 的灵敏度。

## 1.7 混合肉中猪肉成分的检测

将猪肉按比例(50%、20%、10%、5%、1%、0%)与牛肉进行混合,用 SDS 动物组织 DNA 提取方法<sup>[18-19]</sup>提取总 DNA,并将混合 DNA 质量浓度调整至 100 ng/μL,作为模板进行 CPA 扩增,产物使用核酸试纸条进行检测,研究肉类混合对检出限的影响。

# 2 结果与讨论

## 2.1 特异性片段序列及 CPA 引物

1.4 节中设计的 CPA 引物组,经过 1.5 节实验筛选后最终的引物组合见表 3。图 1 为设计引物所使用的特异性片段序列,同时各引物在序列上对应的位置也如图 1 所示。比较图中牛、羊、猪的片段序列可以发现,本引物系统的特异性主要体现在引物 Sus Dlp 2s1a 的 3 端。

表 3 猪源检测 CPA 系统引物表

Table 3 Nucleotide sequences of the primers of Sus CPA

| 名称           | 引物(5-3)                                          | 长度/<br>bp | 标记           |
|--------------|--------------------------------------------------|-----------|--------------|
| Sus Dlp 4s   | CTTAATTACCATGCCGCGTGA                            | 21        |              |
| Sus Dlp 5a   | TCCTGAAGTAAGAACCAGATG                            | 21        |              |
| Sus Dlp 2s1a | TGGCAGGGATCCCTCTTCTCCTG<br>TTAAAGTTCATCAGTAGAAAC | 44        |              |
| Sus Dlp 3s   | TCCGGGCCCCATAAATCG                               | 17        | Biotin<br>标记 |
| Sus Dlp 2s   | TGGCAGGGATCCCTCTTCTC                             | 20        | FAM<br>标记    |

表 4 为通过 1.5 节筛选及反应体系优化后确定的最佳反应体系。

## 2.2 CPA 扩增特异性实验结果

以鸭、羊、牛、猪、鸡 DNA 为模板按表 4 最佳反应条件进行 CPA 扩增实验,电泳结果如图 2 所示。以水为模板的阴性对照电泳图中无扩增产物,说明引物间不发生扩增反应;以猪 DNA 为模板的 CPA

```

CTTAATTACCATGCCGCTGAACCAAGCAACCCGCTAGGCAGGATCCCTCTCTCGCTCGGGCCCAATAACCGTGGGGTCGCTATCCAATGAATTTACCAAGCATCTGGTTCTTTCTTCAGG Bos
TTGTTACCATGCCGCTGAACCAAGCAACCCGCTAGGCAGGATCCCTCTCTCGCTCGGGCCCAATAACCGTGGGGTAACCTATTTAATGAACTTTAAACAGGCATCTGGTTCTTTCTTCAGG Ovis
CTTAATTACCATGCCGCTGAACCAAGCAACCCGCTAGGCAGGATCCCTCTCTCGCTCGGGCCCAATAACCGTGGGGTTTCTACTGATGAACTTTAAACAGGCATCTGGTTCTTTCTTCAGG Sus
..... GTTCTACTGATGAACTTTAAACAG..... seq. 1a
..... TCGGGCCCAATAACG..... seq. 3a
..... TGGCAGGATCCCTCTCTC..... seq. 2a
CTTAATTACCATGCCGCTGA..... CATCTGGTTCTTTCTTCAGG seq. 5a

```

图 1 猪线粒体 D-loop 基因中目标片段及引物位置

Fig. 1 Nucleotide sequence alignment of the target regions of D-loop gene in pork mtDNA. Arrows indicate the primers used for CPA assays

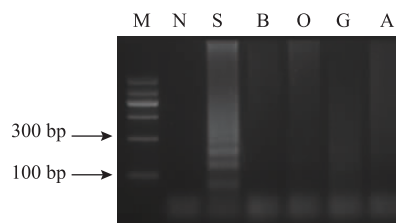
表 4 20  $\mu$ L CPA 最佳反应体系  
Table 4 20  $\mu$ L CPA best reaction system

| 试剂                                | 加入量/ $\mu$ L |
|-----------------------------------|--------------|
| 10 $\times$ Bst Buffer            | 2.0          |
| 3 mol/L Betaine                   | 3.0          |
| 100 mmol/L MgSO <sub>4</sub>      | 0.6          |
| 10 mmol/L dNTPs (each)            | 0.6          |
| 20 $\mu$ mol/L Primer 4s          | 0.1          |
| 20 $\mu$ mol/L Primer 5a          | 0.1          |
| 20 $\mu$ mol/L Primer 2a1s        | 0.6          |
| 20 $\mu$ mol/L Primer 3a          | 0.4          |
| 20 $\mu$ mol/L Primer 2a          | 0.4          |
| 8 U/ $\mu$ L Bst pol              | 1.0          |
| ddH <sub>2</sub> O                | 补足           |
| DNA template                      | 3            |
| 反应温度:63 $^{\circ}$ C,反应时间为 60 min |              |

扩增产物在电泳下检测出阶梯状核酸条带,在 100 bp 左右位置出现两条清晰的电泳条带,此为 CPA 扩增的特征条带,条带的位置根据引物设计位置不同有所差异;以羊、牛、鸭、鸡 DNA 为模板的扩增实验中,产物电泳结果显示有核酸片段产物(弥散亮带),但无 CPA 特征条带。在 2.1 节中已指出,本引物组合的特异性主要体现在引物 Sus Dlp 2s1a 上,其他 4 条引物不具有高特异性,只作为 CPA 必要引物存在。在扩增实验中这 4 条引物也能以羊、牛、鸭、鸡 DNA 为模板进行扩增反应。但在缺少引物 Sus Dlp 2s1a 的扩增产物前提下,羊、牛、鸭、鸡 DNA 扩增产物与猪 DNA 扩增结果不同。结果表明本引物系统具有良好的特异性,只对猪源性成分具有完整的 CPA 扩增,其他模板只能进行部分扩增反应。

核酸试纸条检测结果(图 3)中只有猪 DNA 对应的试纸条上检测线显示为红色,其他模板对应的试纸条上检测线不显示红色。核酸试纸条检测结果与电泳结果一致,核酸试纸条能对猪 DNA 的 CPA 扩增产物正确检测。在 120 V 电压下,电泳系统工

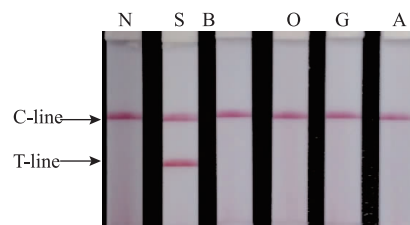
作 30~40 min 后呈现的电泳条带最为理想,而使用核酸试纸条检测,只需 3~5 min 即可完成加样到最终的结果观察的过程。



M-1 kb DNA Marker; N-空白对照; S-猪模板; B-牛模板; O-羊模板; G-鸡模板; A-鸭模板

图 2 猪源 CPA 系统扩增特异性电泳图

Fig. 2 Analysis of pork DNA by CPA with agarose gel electrophoresis



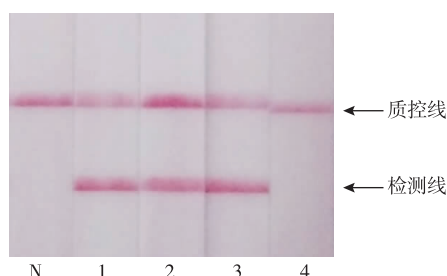
N-空白对照; S-猪模板; B-牛模板; O-羊模板; G-鸡模板; A-鸭模板

图 3 猪源 CPA 系统扩增特异性核酸试纸条检测结果

Fig. 3 Analysis of pork DNA by CPA with nucleic acid test strip

### 2.3 CPA 扩增灵敏度

CPA 反应体系对单一成分猪 DNA 检测的灵敏度实验结果如图 4 所示,模板质量浓度为 100、10、1 ng/ $\mu$ L 时,核酸试纸条检测结果为阳性。实验结果表明在研究设计并优化的 CPA 反应体系下,质量浓度大于等于 1 ng/ $\mu$ L 的猪 DNA 模板能被准确识别并进行扩增,电泳条带及试纸条检测结果明显一致。当模板质量浓度小于 1 ng/ $\mu$ L 时,本系统不能准确进行检测。



N-空白对照;1-100 ng/ $\mu$ L DNA 模板;2-10 ng/ $\mu$ L DNA 模板;3-1 ng/ $\mu$ L DNA 模板;4- $1 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L DNA 模板

图4 猪源 CPA 系统梯度稀释模板扩增产物试纸条检测结果

Fig. 4 Nucleic acid strip test of CPA products targeting the plasmid with different folds

## 2.4 混合肉中猪肉成分检测结果

混合肉中不同猪肉比例的 CPA 检测结果见图 5 及表 5。表 5 中当猪肉含量在 10% 以上时,CPA 扩增方法能够准确地检测出样品中的猪源性成分;当猪肉成分比例在 10% 以下时,检测结果不稳定,表现为检测线颜色很浅或无限色,如图 5 中试纸条 4 的检测线存在少量红色,说明扩增产物中有双标记的 CPA 产物但产量极低。在不考虑取样误差的前提下,100 ng/ $\mu$ L 的 10% 混合样品 DNA 提取液中猪 DNA 的质量浓度为 10 ng/ $\mu$ L,即当检测样品中猪 DNA 的质量浓度大于等于 10 ng/ $\mu$ L 时本方法可以检测出混合样品中的猪源性成分。比较 1.6 与 1.7 节的实验结果,混合肉中猪肉成分的检出限(10 ng/ $\mu$ L)要低于单猪肉成分的检出限(1 ng/ $\mu$ L),相差约为一个数量级(10 倍)。相关的动物源性成分检测研究报道中,混合制品的检出限一般在 10% 以下,杨冬燕等 in 多重荧光 PCR 鉴定羊肉掺假实验中,准确检测出最低掺假比例为 7% 的样品<sup>[20]</sup>;周如华等借助实时荧光定量 PCR 检测羊肉制品中鼠源性成分的检测限则为 1%<sup>[21]</sup>。这是由于本研究中设计的 CPA 引物中部分引物具有通用性,混合肉中的其他肉成分 DNA 能与这部分引物进行反应,与猪 DNA 竞争性反应消耗引物。竞争性消耗在猪 DNA 含量越低

时越明显。在本团队研究的鸭源成分 CPA 检测研究中混合制品的检出限达到 1% (未发表)。因此,猪源 CPA 反应体系仍存在改进空间,检测灵敏度需进一步提高。

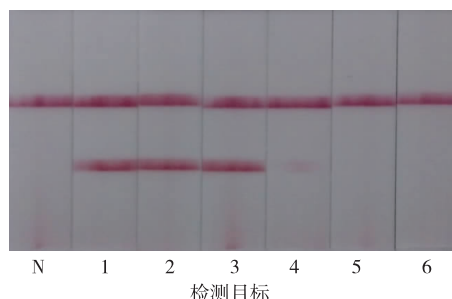


图5 混合肉中不同比例猪肉成分的检出限

Fig. 5 Limit of detection in different ratio meat mixtures

表 5 不同比例混合猪肉的 CPA 检测结果 (n=3)

Table 5 Results of CPA of pork meat mixtures (n=3)

| 检测目标 | 混合肉中猪肉比例/% | 检出  |
|------|------------|-----|
| 1    | 50         | 3/3 |
| 2    | 20         | 3/3 |
| 3    | 10         | 3/3 |
| 4    | 5          | 1/3 |
| 5    | 1          | 0   |
| 6    | 0          | 0   |

注:3/3 表示 3 个平行实验中有 3 个阳性结果。

## 3 结 语

本研究建立了猪源性交叉引物等温扩增-核酸试纸条方法。该方法与鸭、羊、牛、猪、鸡无交叉反应,具有检测特异性,能够正确检测出样品中是否含有猪源性成分。对于单一猪肉源样品,检出限可以达到 1 ng/ $\mu$ L。对混合肉制品中猪源成分占 10% 时,相当于猪 DNA 质量浓度大于 10 ng/ $\mu$ L 时使用本方法可以稳定地检出。本方法仍有较大的改进空间。

## 参考文献:

- [1] 郑文杰. 核酸扩增技术原理及应用[M]. 北京:科学出版社,2013.
- [2] GAO Lin, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Identification of porcine- and bovine-derived materials in meat products by PCR-RFLP assay[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2008 31(2): 135-138. (in Chinese)
- [3] ZHOU Tong, LI Jiapeng, TIAN Hanyou, et al. A RT-PCR method for quantitative determination of pork-derived ingredients in meat and meat products[J]. *Meat Research*, 2013, 27(12): 11-15. (in Chinese)
- [4] KOPPEL R, RUF J, ZIMMERLI F, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork,

- chicken and turkey[J]. **European Food Research and Technology**, 2008, 227(4): 1199-1203.
- [ 5 ] KOPPEL R, DANIELS M, FELDERER N, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork[J]. **European Food Research & Technology**, 2013, 236(6): 1093-1098.
- [ 6 ] PETER C, BRUNEN-NEWELE C, CAMMANN K, et al. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization[J]. **European Food Research and Technology**, 2004, 219(3): 286-293.
- [ 7 ] ABDULMAWJOOD A, GRABOWSKI N, FOHLER S, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive identification of ostrich meat[J]. **PloS One**, 2014, 9(6): e100717.
- [ 8 ] ZAHRADNIK C, MARTZY R, MACH R L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of horse meat in meat and processed meat products[J]. **Food Analytical Methods**, 2014, 8(6): 1576-1581.
- [ 9 ] FANG R, LI X, HU L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens [J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2009, 47(3): 845-847.
- [10] OU X, SONG Y, ZHAO B, et al. A multicenter study of cross-priming amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China[J]. **Tuberculosis (Edinb)**, 2014, 94(4): 428-433.
- [11] YULONG Z, XIA Z, HONGWEI Z, et al. Rapid and sensitive detection of Enterobacter sakazakii by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2010, 24(6): 396-400.
- [12] ZHANG F, WU J, WANG R, et al. Portable pH-inspired electrochemical detection of DNA amplification [J]. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, 2014, 50(61): 8416-8419.
- [13] NICZYPORUK J S, WOZNAKOWSKI G, SAMOREK-SALAMONOWICZ E. Application of cross-priming amplification (CPA) for detection of fowl adenovirus (FAdV) strains[J]. **Archives of Virology**, 2015, 160(4): 1005-1013.
- [14] ZHANG Yaping, SHI Liming. The polymorphism research of animal mitochondrial DNA[J]. **Zoological Research**, 1992, 13(3): 289-298.(in Chinese)
- [15] ZHANG Fang, MI Zhiyong. Advance in molecular biology of animal mitochondrial DNA[J]. **China Biotechnology**, 1998, 18(3): 25-31.(in Chinese)
- [16] MEI Lin, WANG Yuxuan, WANG Feng, et al. Effects of hold-over plate on longissimus dorsi meat quality of pork [J]. **Journal Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(4): 430-433.(in Chinese)
- [17] MOHAMAD N A, SHEIKHA A F E, MUSTAFA S, et al. Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review[J]. **Food Research International**, 2012, 50(1): 330-338.
- [18] QU Li, LI Xiaohan, WANG Xuesong, et al. Extraction of mitochondrial DNA in seven kinds meat and detection of duck meat composition[J]. **Food Research And Development**, 2015, 36(20): 107-110.(in Chinese)
- [19] WANG Wen, SHI Liming. An improved method for isolation of animal mitochondrial DNA [J]. **Zoological Research**, 1993, 14(2): 197-198.(in Chinese)
- [20] YANG Dongyan, WEI Meixia, YANG Yongcun, et al. Identification of mutton adulteration by multiplex fluorescent PCR [J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2015, 6(2): 555-562.(in Chinese)
- [21] ZHOU Ruhua, ZHANG Yuhong, HUANG Hongwu, et al. Detection of mouse-derived ingredients in mutton products by Taqman real-time PCR[J]. **Chinese Journal of Forensic Medicine**, 2014, 29(6): 534-537.(in Chinese)