

双重实时荧光 PCR 法测定食品中大豆、小麦过敏原

Determination of soybean and wheat allergens in food
by dual real-time fluorescence PCR

金萍 丁洪流 张敏 金晓红

JIN Ping DING Hong-liu ZHANG Min JIN Xiao-hong

(苏州市产品质量监督检验院, 江苏 苏州 215104)

(Suzhou Products Quality Supervision and Inspection Institute, Suzhou, Jiangsu 215104, China)

摘要:目的:为食品监管部门有效检测食品中大豆、小麦过敏原提供技术支撑。方法:分别依据小麦醇溶蛋白基因及大豆 *Lectin* 基因为模板设计并创建 *TaqMan* 探针双重荧光 PCR 方法,大豆 *Lectin* 基因检测采用 FAM 标记,小麦醇溶蛋白基因检测采用 HEX 标记,同时以真核生物 18S rRNA 作为内参基因确保检测体系的有效性。结果:所创建的实时多重 *TaqMan* 探针 PCR 体系对大豆、小麦过敏原之外的物种成分无荧光扩增;大豆、小麦混合样品的检出限均能达到 0.01% (质量分数)。结论:所创建的实时多重 *TaqMan* 探针 PCR 体系针对大豆、小麦过敏原有高特异性,可用于食品中过敏原大豆、小麦成分的同步快速检测。

关键词:实时荧光聚合酶链反应;食品过敏原;大豆;小麦

Abstract: Objective: A multiplex fluorescence PCR method based on *TaqMan* probe was developed for simultaneous detection of soybean and wheat allergens in food. **Methods:** *TaqMan* probe dual PCR was designed and established based on wheat gliadin gene and soybean lectin gene, respectively. The soybean *Lectin* gene was detected with FAM marker, and the wheat gliadin gene was detected with HEX marker. Moreover, the eukaryotic 18S rRNA was used as internal reference gene to ensure the effectiveness of the detection system. **Results:** The multiplex fluorescence PCR method for detection of soybean and wheat allergens created in this study had no cross-reaction to ingredients other organisms showing strong specificity. The detection limit of soybean and wheat mixture was up to 0.01% (mass ratio), and the detection sensitivity was high. **Conclusion:** The established *TaqMan* probe

real-time multiplex detection system for soybean and wheat allergens has the characteristics of good specificity and high sensitivity, which can be used for simultaneous and rapid detection of soybean and wheat allergens in food.

Keywords: real-time fluorescence PCR; food allergens; soybean; wheat

近年来,食品过敏事件的报道处于上升趋势^[1],这不但与社会的工业化有关,也与检测、医疗技术的提升有密切关系。过敏原对于正常消费者来说是一种无危害的营养物质,但对于过敏患者来说是一种可能危及生命的物质,食品过敏原的管理和检测无疑成为食品安全的热点问题之一^[2]。

对食源性过敏原的检测研究主要从两个领域入手:对过敏原蛋白以及物种的特异性核酸片段^[3-6]进行检测。基于过敏原蛋白特异性反应的检测方法主要有酶联免疫(ELISA)法^[7-8]、试纸条法^[9]和蛋白芯片法^[10]等。ELISA法和试纸条法操作简便,且方法的灵敏度高,目前已被许多国家接受成为标准方法,市场上也有比较成熟的商品化试剂盒产品。然而,该方法通常只能检测一种过敏原,由于抗体生产的批间稳定性差,常产生交叉反应,容易导致假阳性结果^[11]。另外,在食品加工蛋白质提取过程中会使蛋白质变性,影响抗体对抗原蛋白的特异性安静结合能力,使得该法检测能力下降,甚至是假阴性结果^[12]。蛋白质的非免疫检测技术还包括液相色谱(HPLC)^[13]、毛细管电泳^[14-15]等技术,但由于分离度不佳、无商品化标准品、灵敏度差等问题,极少被应用于过敏原的检测工作中。

由于 DNA 在各种生物样本中的高度稳定性,基于核酸的检测方法更有优势^[16-18]。基于目的基因检测的方法有经典 PCR 法^[19-20]、多重 PCR 法^[21]、环介导等温扩增技术^[22-23]以及基因芯片技术。然而,经典 PCR 技术一

基金项目:苏州市科技局民生科技项目(编号:SS202038);江苏省市场监督管理局科技计划项目(编号:KJ21125075)

作者简介:金萍(1986—),女,苏州市产品质量监督检验院高级工程师,硕士。E-mail:846493521@qq.com

收稿日期:2021-12-16 **改回日期:**2022-05-23

个反应体系只能检测单一基因,检测通量低,后期还需要电泳来区分核酸片段,对于大小相近的片段检测容易产生误差。多重 PCR 技术虽可同时扩增多重靶标,但同样需要进行电泳检测。基因芯片技术是将多个不连续的样品分析过程集成到一个芯片中,实现了高通量和微量化,但检测仪器昂贵,且对检测人员要求较高^[24-26]。研究拟建立一种能实时同步检测食品中大豆、小麦过敏原的 TaqMan 探针双重荧光 PCR 检测方法,以为食品监管部门有效管理过敏原标识提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ABITaqMan Universal PCR master mix;赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

引物以及 TaqMan 荧光探针:生工(上海)生物工程有限公司;

DP304 基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技公司;
植物基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技公司;
无 DNA 酶水:QIAGEN 公司;
无水乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
大豆、小米、红豆、玉米、水稻、大麦:大润发超市。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机: Sorvall ST8R 型, Thermo Fisher Scientific 公司;

微量核酸测定仪: Epoch 型, 美国伯腾公司;
实时荧光 PCR 仪: ABI 7500 型, 美国 ABI 公司;
金属干式恒温仪: MK-10 型, 杭州奥盛公司;
组织研磨器套装: OSE-Y30 型, 天根生化科技有限公司;

恒温水浴锅: WNB45 型, 美墨尔特(上海)贸易有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 模板制备 使用组织研磨器对大豆、

小米、红豆、玉米、水稻、大麦等样品进行均质处理,分别过 80 目筛备用;为避免不同样品间的交叉污染,不同的样品的处理物品不通用。按照植物基因组 DNA 提取试剂盒要求进行核酸提取,利用 Epoch 微量核酸测定仪测定提取 DNA 的纯度,DNA 的纯度 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 比率在 1.7 和 2.0 之间满足要求;利用 Qbit 测定仪测定浓度,根据使用情况,对核酸样本进行分装和保存。

1.3.2 特异性引物、探针的设计与合成 从 Genbank 数据库中搜索获得大豆、小麦成分的特异性核酸序列,通过软件 Megalign 比对分析相近物种基因序列,选取匹配度低、差异大的序列片段,使用 Primer Express 3.0 以及 Primer Blast 等软件工具设计获得针对大豆、小麦成分基因的引物和不同荧光标记的探针序列,并进行特异性理论值的验证。同时,以真核生物 18S rRNA 作为内参照基因确保试验的有效性,内参基因引物探针设计来源于任易婕等^[27]的相关研究。

1.3.3 多重实时荧光 PCR 检测 采用 25 μL 扩增反应体系,反应液中包含 13 μL TaqMan PCR master mix、1 μL 上游引物(10 μmol/L)、1 μL 下游引物(10 μmol/L)、1 μL 荧光标记探针(10 μmol/L)以及 3 μL 模板 DNA(40 ng/mL)。

反应循环参数: 50 ℃, 2 min; 95 ℃, 10 min; 95 ℃, 15 s, 60 ℃, 1 min, 40 个循环反应, 试验于 ABI 7500 型实时荧光 PCR 仪上进行。

1.3.4 特异性检测 按照 DNA 提取试剂盒说明书上的步骤分别提取大豆、小米、红豆、玉米、水稻、大麦以及花生等样品的核酸,核酸质量浓度控制在 50 ng/μL 左右,为确保试验过程的有效性,多重体系中添加了真核生物 18S rRNA 作为内参基因。按照 1.3.3 中体系要求进行扩增反应,扩增完成后根据每个体系中模板 DNA 的扩增曲线和临界循环值(Ct 值)来确定所设计的多重荧光体系的特异性。

表 1 试验引物探针序列[†]
Table 1 Probes and primers of test

物种	引物、探针序列	目标基因
内参	F: 5'-AGCCTGAGAAACGGCTACC-3'	真核生物 18S rRNA
	R: 5'-TGCTGGCACCAGACTTGC-3'	
	P: 5'-CY5-TGCGCGCTGCTGCCTTCCT-3'	
小麦	F: 5'-GCAGCAATGCAAACCTGTGT-3'	醇溶蛋白
	R: 5'-CACTTGGCAATCGCTTTGTG-3'	
	P: 5'-FAM-ACTGGTGTTCATCCCTCTGGTCAATGATCTG-3d	
大豆	F: 5'-CTCTACTCCACCCCATCCA-3'	Lectin
	R: 5'-GAAGGAAGCGGCGAAGCT-3'	
	P: 5'-HEX-TGGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTGC-3'	

[†] F 代表上游引物, R 代表下游引物, P 代表探针。

1.3.5 体系灵敏度检测 按照 1.3.1 方法提取纯大豆及小麦 DNA,用不含 DNA 酶的无菌蒸馏水稀释核酸样本,核酸质量浓度为 10.000~0.001 ng/ μ L。按照 1.3.3 中检测体系和反应参数进行测试,确定该多重体系对于大豆及小麦 DNA 的核酸水平最低检测限。

为了进一步检测 TaqMan 探针多重荧光 PCR 检测系统的抗干扰能力,拟制备不同质量比的混合样进行检测。首先,将均质粉碎后的小米、红豆、玉米、水稻以及花生这几种常见谷物按照质量比 1:1:1:1:1 混合,作为检测的干扰样品。然后,根据表 2 和表 3 所示比例,分别将大豆和小麦与干扰样品进行混合,作为检测用模拟

混合样品。采用 TaqMan 探针的多重实时荧光 PCR 法测定混合样品检测体系的检出限。

1.3.6 市售食品样品中大豆、小麦过敏原检测 进一步测试所建体系对加工样品的检测能力,对 10 种常见市售谷物食品(表 4)进行大豆、小麦过敏原检测。

2 结果与分析

2.1 特异性试验

由图 1 可知,建立的实时荧光 PCR 方法对 18S rRNA 内参基因均有明显的扩增信号。内参照基因的有效扩增,说明所建方法的反应过程运行正常。

表 2 大豆模拟 DNA 混合样品

Table 2 DNA mixture samples of soybean

编号	%	
	大豆	干扰样品
A	10.00	90.00
B	5.00	95.00
C	1.00	99.00
D	0.10	99.90
E	0.01	99.99

表 3 小麦模拟 DNA 混合样品

Table 3 DNA mixture samples of wheat

编号	%	
	小麦	干扰样品
F	10.00	90.00
G	5.00	95.00
H	1.00	99.00
I	0.10	99.90
J	0.01	99.99

表 4 市售加工食品信息表

Table 4 Commercially available processed food information sheet

编号	样品名称	主要成分信息	有无过敏原标识
1	津味锅巴	大米粉、玉米粉、小麦粉、淀粉等	无
2	青稞麦	小麦、植物油、芝麻、青稞、花生等	有(小麦、青稞、花生、芝麻)
3	紫薯味豆浆粉	豆粉、紫薯全粉等	有(大豆及其制品)
4	豆奶	水、大豆等	无
5	牛奶香脆饼干	小麦粉、食用植物油、维生素、食品添加剂等	有(小麦和乳制品)
6	红枣豆奶	水、大豆、红枣浓缩汁等	无
7	蛋白粉	大豆分离蛋白、浓缩乳清蛋白、大豆磷脂	无
8	蒸蛋糕	小麦粉、白砂糖、鲜鸡蛋、乳粉等	无
9	素香肠	大豆分离蛋白、淀粉、水等	无
10	蛋白肉	大豆分离蛋白、低温豆粕、小麦粉、大豆浓缩蛋白	无

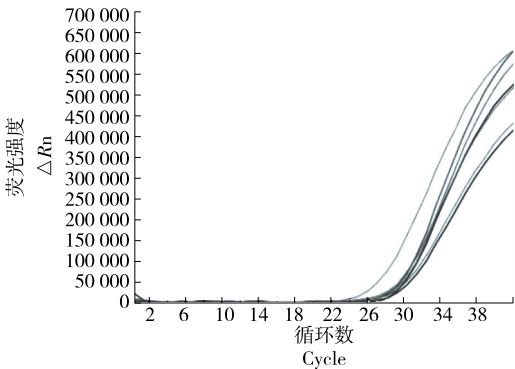


图 1 7 个测试样品 18S rRNA 扩增结果
Figure 1 Amplification of 18S rRNA from 7 test samples

大豆过敏原成分检测体系采用 FAM 荧光标记,小麦过敏原成分采用 HEX 荧光标记,由图 2(a)可知,在 FAM 荧光通道上,建立的方法仅对大豆样本有明显的扩增反应,其他样本如小米、红豆、玉米等均未检测到荧光信号。由图 2(b)可知,在 HEX 荧光通道上,建立的方法仅对小麦样品有明显的扩增信号,其他样品均未检测到荧光信号。

综上,所建立的方法可特异性检测出大豆和小麦过敏原。

2.2 灵敏度试验

大豆和小麦过敏原 DNA 模板质量浓度分别为 10.000,1.000,0.100,0.010,0.005,0.001 ng/ μ L。

由图 3(a)可知,大豆过敏原 DNA 质量浓度为

0.01 ng/ μ L 时,Ct 值为 29.1<35.0,且扩增曲线呈典型“S”型,说明该反应体系检测大豆过敏原的最低限度为 0.01 ng/ μ L DNA 浓度。由图 3(b)可知,在 0.01 ng/ μ L DNA 模板浓度下,小麦过敏原 Ct 值为 29.4<35.0,扩增

曲线呈典型“S”型,说明该反应体系检测小麦过敏原的最低限度为 0.01 ng/ μ L DNA 浓度。因此,在保证特异性的前提下,TaqMan 探针多荧光 PCR 系统对大豆和小麦中过敏原 DNA 的最低核酸水平检测限均为 0.03 ng。

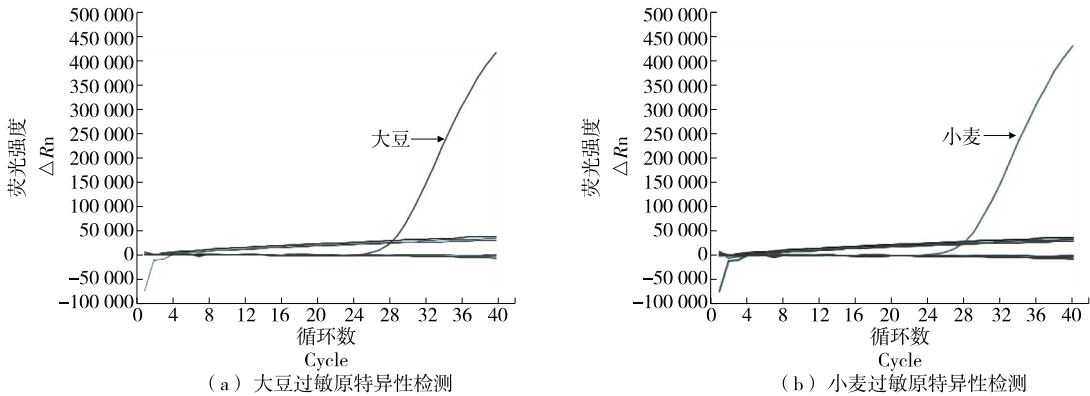


图 2 特异性检测结果
Figure 2 Specific test results

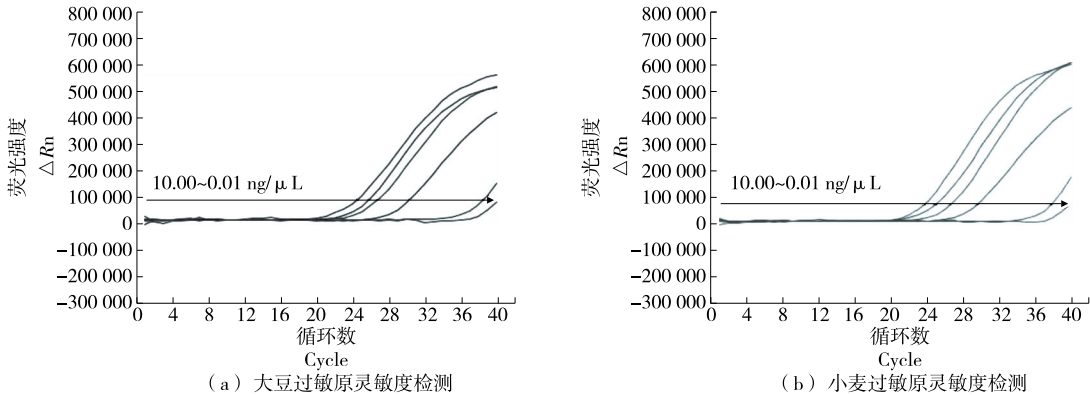


图 3 灵敏度检测
Figure 3 The sensitivity detections

2.3 抗干扰试验

根据 1.3.3 的体系条件对表 2 及表 3 中模拟样本 A~J 进行测定,每个样品做 3 个平行,样品核酸浓度选定在 40 ng/mL 左右,检测结果见表 5。从表 5 可以看出,10.00%~0.01%的大豆和小麦模拟样品均获得成功扩增,Ct 值分别为 33.23,32.58,均<35.0。结果说明,所建立的混合检测检测体系均能对混样给出正确判断,抗干扰性好,对大豆和小麦过敏原成分可达到 0.01%质量水平的检测限。

2.4 市售加工样品检测

采用自建的双重荧光 PCR 方法对市售的 10 批次加工食品进行了大豆、小麦过敏原检测。由表 6 可知,内参基因通道扩增正常,Ct 值均<35.0,说明反应过程正常运行,检测体系对加工食品适应良好。编号 1、2、5、8 以及 10 号样品检出小麦成分,而 3、4、6、7、9 以及 10 号样品检出大豆成分,检测结果与样品的标签成分相符,说明所建方法适用于加工食品。

3 结论

建立了一种基于 TaqMan 探针双重荧光 PCR 的检

表 5 混合样品检测结果[†]

Table 5 The result of DNA mixture samples

检测体系	样品编号	目标质量比/%	平均 Ct 值	结果判定
大豆 过敏原	A	10.00	23.92±0.11	+
	B	5.00	24.76±0.07	+
	C	1.00	26.79±0.07	+
	D	0.10	29.82±0.19	+
	E	0.01	33.23±0.06	+
小麦 过敏原	F	10.00	24.14±0.08	+
	G	5.00	25.37±0.18	+
	H	1.00	26.80±0.03	+
	I	0.10	28.79±0.08	+
	J	0.01	32.58±0.05	+

[†] “+”代表检出,“-”代表未检出。

表 6 市售加工食品检测结果
Table 6 Test results of commercially available processed food

编号	大豆成分 Ct 值	小麦成分 Ct 值	内参基因
1	>35.00	22.56	28.11
2	>35.00	24.18	26.84
3	20.76	>35.00	28.56
4	22.86	>35.00	26.46
5	>35.00	24.25	27.05
6	23.55	>35.00	24.88
7	19.35	>35.00	26.41
8	>35.00	19.75	27.45
9	24.33	>35.00	26.88
10	25.63	24.88	29.11

测方法,通过在同一反应管内设置内参照基因和两种目标基因进行同步扩增,实现食品中大豆和小麦过敏原的同时检测。所建立的方法仅对大豆和小麦过敏原 DNA 有特异性的扩增,最低检测限为 0.03 ng,在混合样品的检测中也表现出很好的抗干扰能力。相较于传统的酶联免疫等抗体检测方法,更适用于大批量样品的多成分同步筛选。相较于基因芯片等技术,操作简便,使用成本低。该法可以为其他过敏原成分的检测提供参考,适用于大批量样品的筛查,具有一定的推广价值,为食品过敏原监管提供有效依据。

参考文献

[1] 黄霆钧, 张欣琪, 刘安游, 等. 我国食品过敏原标准体系构建研究[J]. 中国标准化, 2020(3): 129-132, 164.
HUANG T J, ZHANG X Q, LIU A Y, et al. Research on the construction of food allergen standards system in china [J]. China Standardization, 2020(3): 129-132, 164.

[2] 宁晖, 房方. 食品过敏法规及其检测技术现状[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3 768-3 772.
NING H, FANG F. Regulations and current detection technology of food allergen[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(12): 3 768-3 772.

[3] 王雅清, 倪皓洁, 李华韬, 等. 食物过敏原检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 264-270.
WANG Y Q, NI H J, LI H T, et al. Research advance in detection technology for food allergen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 264-270.

[4] 张晶宇. 基于蛋白质组学的鱼类过敏原检测方法研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019: 7-22.
ZHANG J Y. Proteomics-based detection of fish allergens [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019: 7-22.

[5] 郑义成, 华萍, 杨安树, 等. 食物中过敏原检测技术研究进展[J].

食品科学, 2010, 31(21): 417-420.

ZHENG Y C, HUA P, YANG A S, et al. Research advance in detection technologies for allergen in food[J]. Food Science, 2010, 31(21): 417-420.

[6] 郭颖慧, 霍胜楠, 孟静, 等. 食品过敏原检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 31(21): 417-420.
GUO Y H, HUO S N, MENG J, et al. Research progress of detection technologies for allergen in food[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 31(21): 417-420.

[7] WALCZYK N E, SMITH P M C, TOVEY E R, et al. Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of immunoassays[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 335-344.

[8] LUIS A, GONZALEZ I, GARCIA T, et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Food Control, 2008, 19(1): 1-8.

[9] BENREJEB S, ABBOTT M, DAVIES D, et al. Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate[J]. Food Addit Contam, 2005, 22(8): 709-715.

[10] POLLET J, DELPORT F, JANSSEN K P F, et al. Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor[J]. Talanta, 2011, 83(5): 1 436-1 441.

[11] JOHNSON P E, RIGBY N M, DAINITY J R, et al. A multi-laboratory evaluation of a clinically-validated incurred quality control material for analysis of allergens in food[J]. Food Chem, 2014, 148: 30-36.

[12] CUCU T, DE MEULENAER B, KERKAERT B, et al. MALDI based identification of whey protein derived tryptic marker peptides that resist protein glycation[J]. Food Res Inter, 2012, 47(1): 23-30.

[13] MONACI L, VISCONTI A. immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives[J]. Trends in Food Science and Technology, 2010, 21(6): 272-283.

[14] GARCIA-RUIZ C, TORRE M, MARINA M L. Analysis of bovine whey proteins in soybean dairy-like products by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 2009, 859(1): 77-86.

[15] 徐双双, 王尉, 陈尔凝, 等. 电泳法在食品过敏原检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3 436-3 443.
XU S S, WANG W, CHEN E N, et al. Application of electrophoresis in the detection of food allergens[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(11): 3 436-3 443.

[16] SIVAGURU M, BALUSKA F, VOLKMANN D, et al. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. short-term effects on the distal part of the transition zone[J]. Plant Physiology, 2009, 119: 1 073-1 082.

[17] SAMAC D A, TESFAYE M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils: A review[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2003, 75: 189-207.

(下转第 102 页)

- chinery, 2022, 38(2): 148-152.
- [8] WU X W, SAHOO D, HOI S C H. Recent advances in deep learning for object detection[J]. *Neurocomputing*, 2020, 396: 39-64.
- [9] XU W K, ZHU Z H, GE F L, et al. Analysis of behavior trajectory based on deep learning in ammonia environment for fish [J]. *Sensors*, 2020, 20(16): 1-11.
- [10] 高辉, 马国峰, 刘伟杰. 基于机器视觉的苹果缺陷快速检测方法研究[J]. *食品与机械*, 2020, 36(10): 125-129, 148.
GAO H, MA G F, LIU W J. Research on a rapid detection of apple defects based on mechanical vision[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(10): 125-129, 148.
- [11] 王铁伟, 赵瑶, 孙宇馨, 等. 基于数据平衡深度学习的不同成熟度冬枣识别[J]. *农业机械学报*, 2020, 51(S1): 457-463, 492.
WANG T W, ZHAO Y, SUN Y X, et al. Recognition approach based on data-balanced Faster R-CNN for winter jujube with different levels of maturity[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(S1): 457-463, 492.
- [12] 王立扬, 张瑜, 沈群, 等. 基于改进型 LeNet-5 的苹果自动分级方法[J]. *中国农机化学报*, 2020, 41(7): 105-110.
WANG L Y, ZHANG Y, SHEN Q, et al. Automatic detecting and grading method of apples based on improved LeNet-5[J]. *Journal of Chinese Agricultural Mechanization*, 2020, 41(7): 105-110.
- [13] 邓立苗, 杜宏伟, 徐艳, 等. 基于机器视觉的马铃薯智能分选方法与实现[J]. *中国农机化学报*, 2015, 36(5): 145-150.
DENG L M, DU H W, XU Y, et al. Implementation of intelligent potato grading method based on computer vision[J]. *Journal of Chinese Agricultural Mechanization*, 2015, 36(5): 145-150.
- [14] 田有文, 吴伟, 卢时铅, 等. 深度学习在水果品质检测与分级分类中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 260-270.
- TIAN Y W, WU W, LU S Q, et al. Application of deep learning in fruit quality detection and classification[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 260-270.
- [15] YU J H, MIAO W J, ZHANG G B, et al. Target positioning and sorting strategy of fruit sorting robot based on image processing[J]. *Traitement du Signal*, 2021, 38(3): 797-805.
- [16] CHEN J L, ZHANG M, XU B G, et al. Artificial intelligence assisted technologies for controlling the drying of fruits and vegetables using physical fields: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 15: 251-260.
- [17] 张丽芬. 基于计算机视觉技术的樱桃自动分选系统设计[J]. *农机化研究*, 2017, 39(9): 212-214.
ZHANG L F. Design of cherry sorting system based on computer vision technology[J]. *Journal of Agricultural Mechanization Research*, 2017, 39(9): 212-214.
- [18] 吴捍疆, 张丰收, 张佳琪. 基于 PLC 的蜜柚分拣系统设计[J]. *包装与食品机械*, 2019, 37(4): 28-30.
WU H J, ZHANG F S, ZHANG J Q. Design of honey pomelo sorting system based on PLC[J]. *Packaging and Food Machinery*, 2019, 37(4): 28-30.
- [19] 王宇杰. 基于机器视觉的水果分级系统设计[J]. *包装工程*, 2021, 42(3): 235-239.
WANG Y J. Design of fruit grading packaging system based on machine vision[J]. *Packaging Engineering*, 2021, 42(3): 235-239.
- [20] FAN S X, LI J B, ZHANG Y H, et al. On line detection of defective apples using computer vision system combined with deep learning methods[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 286: 1-10.
-
- (上接第 63 页)
- [18] SAMUELS T D, KUCUKAKYUZ K, RINCON-ZACHARY M. AI partitioning patterns and root growth as related to AI sensitivity and AI tolerance in wheat[J]. *Plant physiology*, 2007, 113: 527-534.
- [19] 陈庆山, 刘春燕, 刘迎雪, 等. 核酸体外扩增技术[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(5): 10-14.
CHEN Q S, LIU C Y, LIU Y X, et al. Progress of nucleic acid amplification technologies[J]. *China Biotechnology*, 2004, 24(5): 10-14.
- [20] 董旭婉. 食品中植物源性成分数字 PCR 定量检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 29-59.
DUNG X W. Study on quantitative detection of plant-derived components in food by digital PCR[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 29-59.
- [21] 兰海鸥. 大豆、核桃、花生过敏原基因三重实时荧光检测方法的建立及应用[D]. 兰州: 西北民族大学, 2020: 22-43.
LAN H O. Establishment and application of triple real-time fluorescence detection method for allergen genes in soybean, walnut and peanut [D]. Lanzhou: Northwest University for nationalities, 2020: 22-43.
- [22] ZAHRADNIK C, MARTZY R, MACH R L, et al. Detection of the food allergen celery via loop-mediated isothermal amplification technique[J]. *Anal Bio Chem*, 2014, 406(27): 6 827-6 833.
- [23] 陈云芳, 詹国辉, 高渊. 核酸恒温扩增技术的原理及其应用[J]. *西南林学院学报*, 2010, 30(S1): 30-32, 40.
CHEN Y F, ZHAN G H, GAO Y. Principle and application of isothermal DNA amplification[J]. *Journal of Southwest Forestry College*, 2010, 30(S1): 30-32, 40.
- [24] KOLLMEIER M, FELLE H H, HORST W J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 945-956.
- [25] BLARNEY F P C, NISHIZAWA N K, YOSHIMURA E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots[J]. *Soil Science & Plant Nutrition*, 2004, 50: 67-76.
- [26] ZHENG S J, YANG J L. Target sites of aluminum phytotoxicity[J]. *Biologia Plantaru*, 2005, 49: 321-331.
- [27] 任易婕, 霍胜楠, 翟清燕, 等. 膜芯片技术对牛、羊、牦牛、驴肉源食品的掺伪鉴别[J]. *肉类研究*, 2019, 33(6): 33-38.
REN Y J, HUO S N, ZHAI Q Y, et al. Identification of adulterated meat from cattle, sheep, yak and donkey by membrane chip technology[J]. *Meat Research*, 2019, 33(6): 33-38.