

# 食品和饲料中火鸡源性成分的实时荧光 PCR 检测方法

张舒亚<sup>1</sup>, 谌鸿超<sup>1</sup>, 宋青<sup>1</sup>, 高琴<sup>1</sup>,  
吕蓉<sup>1</sup>, 李想<sup>1</sup>, 刘月明<sup>1</sup>, 李富威<sup>2</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)

**摘要:** 为对产品真实性提供技术支持, 作者建立了食品和饲料中火鸡源性成分的检测方法。采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法, 对火鸡源性成分特异性、灵敏度进行检测并进行实际应用。实验表明, 建立的检测方法具有特异性和高灵敏度, 检测限为 0.001%。通过对市售食品和饲料样品的检测, 建立的方法适用于食品和饲料中火鸡源性成分的检测。

**关键词:** 食品; 饲料; 火鸡; 实时荧光 PCR 方法; 检测

**中图分类号:** TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0207—05

## Identification of Turkey Derived Material in Food and Feed Using Real-Time PCR

ZHANG Shu-ya<sup>1</sup>, CHEN Hong-chao<sup>1</sup>, SONG Qing<sup>1</sup>, GAO Qin<sup>1</sup>,  
LU Rong<sup>1</sup>, LI Xiang<sup>1</sup>, LIU Yue-ming<sup>1</sup>, LI Fu-wei<sup>2</sup>

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

**Abstract:** This work describes the development of a PCR system for the authentication of turkey derived material in food and feed. A real-time PCR method was established for detection of turkey derived material. The method was specific for turkey derived material, and the limit of detection was determined as 0.001%. The PCR procedure is suitable for the detection of turkey derived material in food and feed.

**Keywords:** food, feed, turkey derived material, real-time PCR, detection

在动物产品原料和加工产品中, 经常出现成分的掺假造假和无意污染现象。人为掺假主要是不法商要降低成本或增加品质, 以谋取巨额经济利益,

如三聚氰胺奶粉、地沟油、染色馒头事件等, 这是欺诈违法行为。这种掺假造假、以次充好的行为除了严重扰乱我国经济秩序, 另一个最主要影响是危害

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 上海科委技术标准专项项目(06DZ05033); 上海出入境检验检疫局科研项目(HK002-2012, 沪科 06-08)。

作者简介: 张舒亚(1978—), 女, 河南商丘人, 高级工程师, 农学硕士, 主要从事动植物与食品分子生物学检测技术方面的研究。

E-mail: zhangshuya@shciq.gov.cn

人体健康和畜禽安全。在加工产品的造假掺假过程中,经常会使用有毒有害物质(如染色馒头等),危害人民身体健康。疯牛病和禽流感的世界性爆发和流行,人们越来越关注食品安全和饲料安全。部分人群因为健康缘故也只食用素食部分。疯牛病的发生是由于反刍动物食用了含有动物成分的饲料,所以各国禁止含有动物成分的饲料喂养动物。由于含有禽成分的饲料可能具有传播禽流感的风险,用这些掺假的饲料喂养动物,会影响畜禽的健康生长及我们的畜牧业安全。《中华人民共和国产品质量法》、《中华人民共和国食品卫生法》和《食品标识管理规定》(国家质量监督检验检疫总局令第102号)等法律法规禁止产品的造假掺假行为和正确标识食品标签。

为保持产品的真实性,国内外研究学者建立了食品和饲料中牛、羊、猪等多种物种成分以及鱼翅等高附加值产品的检测方法<sup>[1-9]</sup>。目前对火鸡源性成分检测研究报道还不多,国内还未见火鸡源性成分检测的研究报道。作者采用实时荧光PCR检测方法对火鸡成分进行鉴定,确保火鸡及相关产品的真实性,该方法的推广应用对保障产品质量安全,保护消费者知情权和选择权,打击掺假造假违法行为和保护畜牧业健康发展等提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

火鸡、鸡肉、鸭肉、鹅肉、鸽子、鹌鹑、牛肉、猪肉、山羊肉、绵羊肉、梅花鹿肉、骆驼肉、马肉、驴肉、兔肉、野兔肉、野猪肉、貉肉、蛇肉、牛蛙、蛤蟆肉、草虾、螃蟹、甲鱼、牡蛎、贻贝、蜗牛等27种动物材料;购自上海市农贸市场或超市;大豆、玉米、大麦、小麦、大米、马铃薯、番茄、豌豆、苹果、胡萝卜等10种常见植物材料;购自上海市农贸市场或超市;15批进口冻火鸡腿肉、火鸡脯肉和火鸡颈肉,10个进口未标识火鸡成分的食品(包括面包、香肠、饼干等),20批鸡肉骨粉饲料,20批其他成分饲料(包括猪肠膜蛋白粉、多福蛋白、乳清粉、宠物饲料等);由作者所在实验室保存。2个国内市场火鸡产品,各6种鸡、鸭、鹅、鸽子、鹌鹑等30种禽肉和蛋产品,20批其他成分食品(肉干、肉酱、饼干、罐头等);购自上海市农贸市场或超市。

### 1.2 试剂

CTAB提取缓冲液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na<sub>2</sub>EDTA,pH 8.0。蛋白酶K:20 mg/mL。CTAB沉淀溶液:5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl。氯仿(三氯甲烷)。70%乙醇。TE缓冲液(Tris-Cl,EDTA缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。实时荧光PCR混合液:Taqman Gene Expression Master Mix(AB公司,Part No. 4369016)。PCR预混合液:Premix Ex Taq Version 2.0(TaKaRa公司,Code: D332A)。超纯水(ddH<sub>2</sub>O)。

火鸡源性检测正向引物:5'-GCC CTA ACC CCT TAA GAA AAG AAT -3',反向引物:5'-AGT TGC TAT GGC TAA GTC AAG TTT ACA C -3',探针:5'-FAM-CTT GCT TGA GCC ACA CC-MGB-3'。

18S rRNA检测引物:5'-TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A -3'和5'-AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T -3'。

### 1.3 仪器设备

ABI 7300实时荧光PCR仪,天平,移液枪,离心机,恒温孵育器,冷冻碾磨机,DNA冷冻干燥离心机,核酸蛋白浓度分析仪,Eppendorf离心管,PCR反应管。

### 1.4 样品的制备

用冷冻碾磨机将上述植物材料和动物材料样品研磨成粉状。使用冷冻碾磨机将鸡肉和火鸡肉磨成粉末状,并于60℃烘干3h。用鸡肉粉与火鸡肉粉混合,配制成分别含有质量分数10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%和0.0001%火鸡肉粉的混合样品。

### 1.5 DNA的提取

将样品研磨后,称取100 mg样品于2 mL离心管中,加入1.5 mL CTAB提取缓冲液和10 μL蛋白酶K(20 mg/mL)溶液。60℃振荡过夜后13 000 g离心10 min,转移上清液到新的离心管中。加入750 μL氯仿后用力振荡,13 000 g离心5 min,将上清转移到新的离心管中。加入2倍体积的CTAB沉淀溶液,室温静置60 min,13 000 g离心15 min,弃去上清。加入350 μL NaCl溶液将沉淀进行悬浮。再加入350 μL氯仿,涡旋振荡进行混匀,13 000 g离心10 min。转移上清液后加入0.6倍体积的异丙醇用来沉淀核酸,室温放置20 min,13 000 g离心10 min,弃去上清液。加入500 μL 70%乙醇溶液洗涤沉淀,溶

解于200  $\mu\text{L}$  TE 溶液中, 用核酸蛋白含量测定仪测定 DNA 浓度, 也可用等效的商业化 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

### 1.6 DNA 浓度测定及配制

用德国 Eppendorf Biophotometer 型核酸蛋白浓度分析仪测定抽提样品 DNA 的质量浓度。

用鸡肉 DNA 溶液(质量浓度 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )将抽提的火鸡肉 DNA 溶液(浓度 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )稀释成 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01  $\text{ng}/\mu\text{L}$  DNA 混合液, 用于灵敏度测试。

### 1.7 PCR 测试

过敏原大豆成分实时荧光 PCR 检测的反应体系: 实时荧光 PCR 混合液 12.5  $\mu\text{L}$ , 正反向引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 探针(5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 100  $\text{ng}$ , 水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。实时荧光 PCR 反应循环参数: 50  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 40 个循环。

18S rRNA 基因引物 PCR 反应体系: PCR 预混合液 12.5  $\mu\text{L}$ , 引物(5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 100  $\text{ng}$ , 反应体积为 25  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 20 s, 54  $^{\circ}\text{C}$ , 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 40 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 加 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ 上样缓冲液点样进行琼脂糖凝胶电泳。PCR 产物电泳检测所用的凝胶质量浓度为 1.5~2.0  $\text{g}/\text{dL}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 真核生物特异引物 18S rRNA 引物的检测结果

18S rRNA 基因在真核生物中高度保守, 18S rRNA 基因特异引物在真核生物 DNA 中均能有效扩增, 常用于真核生物的内参照基因。用真核生物 18S rRNA 特异引物扩增本实验提取的所有 DNA 溶液(包括各种动物或植物材料的 DNA 溶液), 所有 DNA 溶液均能出现 137 bp 的特异扩增条带。结果表明, 所有抽提的 DNA 溶液适合于 PCR 测试。

### 2.2 火鸡成分的实时荧光 PCR 特异性检测

以火鸡 12S rRNA 基因为靶标, 设计火鸡检测引物和探针序列。用火鸡源性检测引物对火鸡和供试的其他动物和植物进行检测, 在火鸡 DNA 中出现扩增, 而在鸡肉、鸭肉、鹅肉、鸽子、鹌鹑、牛肉、猪肉、山羊肉、绵羊肉、梅花鹿肉、骆驼肉、马肉、驴肉、

兔肉、野兔肉、野猪肉、猪肉、蛇肉、牛蛙、蛤蟆肉、草虾、螃蟹、甲鱼、牡蛎、贻贝、蜗牛、大豆、玉米、大麦、小麦、大米、马铃薯、番茄、豌豆、苹果、胡萝卜等 36 种常见动植物材料 DNA 样品中均无扩增, 见图 1。这说明该检测方法具有物种特异性。

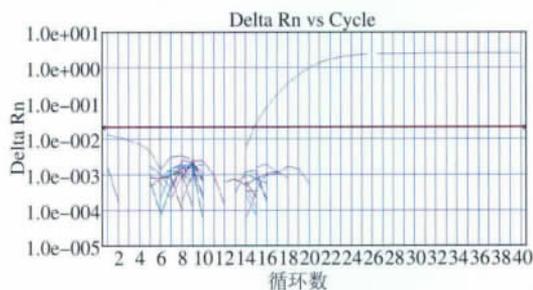
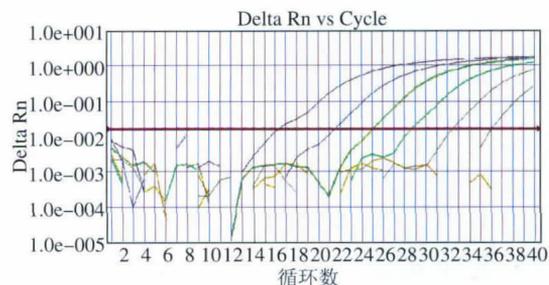


图 1 火鸡源性引物探针特异性实时荧光 PCR 检测图谱

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

### 2.3 火鸡成分的实时荧光 PCR 检测灵敏度

对 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA 进行检测, 在 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA 中出现扩增, 在 0.000 01  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA 中未出现扩增, 见图 2。实验表明, 火鸡源性检测引物检测灵敏度为 0.000 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA。



扩增曲线由左至右分别为: 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA, 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA, 0.1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA, 0.01  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA, 0.001  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA, 0.000 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  火鸡 DNA

图 2 火鸡 DNA 实时荧光 PCR 检测灵敏度图谱

Fig. 2 Amplification curve generated by serial dilution of turkey DNA

用鸡肉粉 10 倍系列混合配制不同含量的火鸡肉粉样品。使用火鸡成分引物和探针对质量分数 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 和 0.0001% 火鸡肉粉的样品 DNA 进行检测。10%、1%、0.1%、0.01% 和 0.001% 火鸡肉粉均出现扩增曲线, 而 0.000 1% 火鸡肉粉未出现扩增曲线, 见图 3。实验表明, 该方法的检测灵敏度为 0.001% (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) 火鸡肉粉。

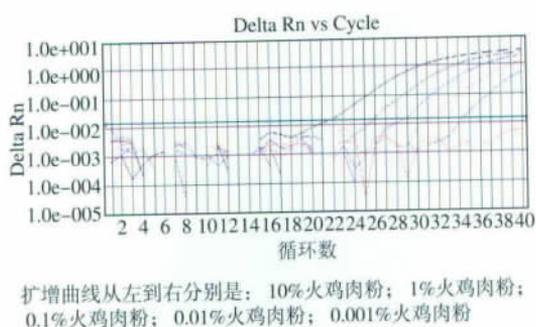


图3 火鸡肉粉质量比的实时荧光 PCR 检测灵敏度图  
Fig. 3 Amplification curve generated by different turkey percentage

### 2.4 食品中火鸡成分检测的应用

使用建立的检测方法对 15 个进口火鸡产品、

10 个、52 个国内市场流通的市售食品以及进口 40 批饲料进行检测，以验证检测方法的实际应用性。经对 117 个食品和饲料样品进行检测，在 15 批进口样品和 2 个国内火鸡产品中检测出火鸡成分，检测结果与食品成分相符；在 10 个进口未标识火鸡成分的食品，国内市场的 30 个禽肉蛋制品和 20 批其他成分食品中未检出火鸡成分，检测结果与食品成分相符；在 1 批美国进口的鸡肉骨粉饲料检出火鸡成分，在其他的 19 批鸡肉骨粉饲料和 20 批其他成分饲料未检出火鸡成分，见表 1。结果表明，研究建立检测方法能够适用于食品和饲料的火鸡源性成分检测。

表 1 食品和饲料中火鸡源性成分检测结果

Table 1 Test results of commercial food and feed samples

名称	标识含有火鸡成分样品数	未标识含有火鸡成分样品数	检测结果	成分不符样品数
进口火鸡产品	15		检出火鸡源性成分	0
进口食品		10	未检出火鸡源性成分	0
国内市场火鸡产品	2		检出火鸡源性成分	0
国内市场禽肉蛋		30	未检出火鸡源性成分	0
国内市场食品		20	未检出火鸡源性成分	0
美国进口鸡肉骨粉饲料		20	在 1 个样品中检出火鸡源性成分	1
进口饲料		20	未检出火鸡源性成分	
总计	17	100	/	1

## 3 结语

目前对物种成分的鉴定，基本上是采用生物技术手段，以蛋白质为基础的检测技术（如 ELISA）和核苷酸为基础的检测技术（如 PCR）。PCR 检测方法由于其高特异性和高灵敏度广泛应用于加工产品（尤其是深加工产品）的检测<sup>[1-13]</sup>。12S rRNA 基因序列由于保守特异而常被选用于动物源性成分鉴别，I Martín 和 Miguel A Rodríguez 报道了以 12S rRNA

为检测靶标的火鸡普通 PCR 检测方法<sup>[11-12]</sup>，其检测限为 0.1%~1%。2012 年 Zulal Kesmen 报道了基于火鸡 NADH 脱氢酶检测靶标的检测方法，其检测限为 0.001%<sup>[13]</sup>。作者以火鸡 12S rRNA 基因为靶标，研究建立了食品和饲料中火鸡成分实时荧光 PCR 检测方法，特异性强，灵敏度高，检测限为 0.001%（10 mg/kg），能准确检测出食品和饲料中的火鸡成分，为食品和饲料中火鸡成分检测方法标准化提供了依据。

### 参考文献：

[1] Miguel A Rodríguez, Teresa García, Isabel González, et al. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures[J]. *J Food Prot*, 2004, 67(1):172-177.  
[2] Miguel A Rodríguez, Teresa García, Isabel González. Quantitation of mule duck in goose foie gras using taqman real-time polymerase chain reaction[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6):1478-1483.

- [ 3 ] 张舒亚,金丽琴,蒋剑琼,等. 食品中鱼源性成分 PCR 检测方法研究[J]. 食品与发酵工业,2010,1:142-145.  
ZHANG Shu-ya,JIN Li-qin,JIANG Jian-xiong,et al. Identification of fish derived material in food[J]. **Food and Fermentation Industries**,2010,1:142-145.(in Chinese)
- [ 4 ] 张舒亚,吕蓉,刘月明,等. 硫酸软骨素中掺假动物成分检测方法研究[J]. 食品工业科技,2009,1:309-318.  
ZHANG Shu-ya,LY Rong,LIU Yue-ming,et al. Identification of animal derived material in chondroitin sulfate [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2009,1:309-318.(in Chinese)
- [ 5 ] 张舒亚,管薇薇,刘月明,等. 饲料中鱼源性成分真实性鉴别研究[J]. 饲料研究,2009,6:45-48.  
ZHANG Shu-ya,GUAN Wei-wei,LIU Yue-ming,et al. Identification of fish derived material in feed [J]. **Feed Research**,2009,6:45-48.(in Chinese)
- [ 6 ] 张舒亚,李艳,潘良文. 鸡精调味料中鸡源性成分真实性鉴别研究[J]. 中国调味品,2007,12:60-62.  
ZHANG Shu-ya,LI Yan,PAN Liang-wen. Identification of chicken derived material in chicken essence seasoning [J]. **China Condiment**,2007,12:60-62.(in Chinese)
- [ 7 ] 郭云霞,冒海琳,张舒亚,等. 鱼翅的分类及鉴别方法[J]. 食品工业,2011,6:96-99.  
GUO Yun-xia,MAO Hai-lin,ZHANG Shu-ya,et al. Classification and identification of shark fin [J]. **The Food Industry**,2011,6:96-99.(in Chinese)
- [ 8 ] 郭云霞,包建强,张舒亚,等. 食品中鲨鱼源性成分真实性 PCR 鉴别研究[J]. 食品工业科技,2011,32(10):421-42.  
GUO Yun-xia,BAO Jian-qiang,ZHANG Shu-ya,et al. Authentication of shark derived material in food using PCR [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2011,32(10):421-42.(in Chinese)
- [ 9 ] 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):289-294.  
ZHAO Wen-jing,LI Yan,GAO Peng-fei,et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of laatic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(4):289-294.(in Chinese)
- [10] 刘光明,苏文金,梁基选,等. 多重 PCR 方法检测食品中转基因成分[J]. 食品与生物技术学报,2002,21(4):379-383.  
LIU Guang-ming,SU Wen-jin,LIANG Ji-xuan,et al. Multiplex PCR for detecting transgenic component in foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2002,21(4):379-383.(in Chinese)
- [11] I Martín,T García,V Fajardo,et al. Technical note:detection of chicken,turkey,duck,and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction[J]. **Journal of Food Science**,2007,85(2):452-458.
- [12] Miguel A Rodríguez,Teresa García,Isabel González,et al. Identification of goose,mule duck,chicken,turkey,and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction[J]. **J Agric Food Chem**,2003,51(6):1524-1529.
- [13] Zulal Kesmen,Ahmet E. Yetiman,Fikrettin Sahin,et al. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays[J]. **Journal of Food Science**,2012,77(2):167-173.