

火鸡源性成分实时聚合酶链式反应检测方法ISO标准研制

潘良文, 宁雪, 王强, 蔡一村, 许镇坚, 张晨
(上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

摘要: 选择火鸡染色体Z DNA序列的特异片段作为检测靶序列, 建立了实时聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测方法, 该方法种间特异性和种内一致性良好。将靶序列克隆到pUC57质粒中, 通过对不同稀释浓度的质粒样品进行real-time PCR测试, 该方法绝对检测限为5 拷贝/PCR反应。组织国际协同实验对方法进行验证, 方法的假阳性率、假阴性率均为0%, 绝对检测限为5 拷贝/PCR反应。根据对各实验室不同稀释浓度的质粒样品的定性测试结果对方法进行分析, 结果表明, 实验室间标准偏差为0.30, 低于最大允许值1; 在检出概率为95%的情况下, 方法的绝对检测限为3.2 拷贝/PCR反应, 低于最大允许值20 拷贝/PCR反应。将该方法提交国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO), 经过标准不同的制订阶段投票、征求意见, 正式上升为ISO标准 (ISO/TS 20224-8:2022)。

关键词: 火鸡; 实时聚合酶链式反应; 检测; 国际标准化组织

Development of ISO Standard for Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Turkey-Derived Material

PAN Liangwen, NING Xue, WANG Qiang, CAI Yicun, XU Zhenjian, ZHANG Chen

(Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine Technology Center, Shanghai Customs, Shanghai 200135, China)

Abstract: In this study, the specific fragment of turkey chromosome Z-DNA sequence was selected as the target sequence for turkey-derived material detection. A real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method was established, which had good interspecies specificity and interspecies consistency. The target sequence was cloned into the plasmid pUC57, and after being diluted to different concentrations, the plasmid was tested by real-time PCR. The absolute detection limit of this method was 5 copies/PCR reaction. An international collaborative validation trial was conducted to validate this method. The results showed that the false positive and negative rates of the proposed method were both 0%, and the absolute detection limit was 5 copies/PCR reaction. The results of qualitative analysis of the diluted plasmid showed that the inter-laboratory standard deviation was 0.30, less than the maximum permitted value of 1; at a detection probability of 95%, the absolute detection limit was 3.2 copies/PCR reaction, less than the maximum allowable value of 20 copies/PCR reaction. Based on voting results and reviewers' comments, this method was approved by the International Organization for Standardization (ISO) as an international standard method (ISO/TS 20224-8:2022).

Keywords: turkey; real-time polymerase chain reaction; detection; International Organization for Standardization

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230407-067

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0217-08

引文格式:

潘良文, 宁雪, 王强, 等. 火鸡源性成分实时聚合酶链式反应检测方法ISO标准研制[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 217-224.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230407-067. <http://www.spkx.net.cn>

PAN Liangwen, NING Xue, WANG Qiang, et al. Development of ISO standard for real-time polymerase chain reaction detection of turkey-derived material[J]. Food Science, 2024, 45(1): 217-224. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230407-067. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-07

基金项目: 上海市科技创新行动计划技术标准项目 (21DZ2207900);

上海市出入境食品和饲料检测专业技术服务平台项目 (20DZ2291900)

第一作者简介: 潘良文 (1966—) (ORCID: 0000-0001-7899-1797), 男, 研究员, 博士, 研究方向为动物源性食品物种鉴别。

E-mail: panlw888@126.com

肉类掺假是影响食品安全的一个重要方面。一些不法企业和商人经常将低价肉类原料掺入到高价肉制品中以牟取暴利,侵害消费者权益,扰乱市场秩序。肉及肉制品真伪鉴别主要是基于DNA序列的分子生物学检测技术,如普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时PCR(real-time PCR)、数字PCR和DNA条形码等。我国现行的动物源性成分鉴定标准繁多(国家标准、行业标准、地方标准、企业标准等),各种鉴定方法和标准不能有效统一。表1是我国现行有效的主要动物成分检测标准,这些标准还不包括一些地方标准。

表1 我国现行有效的部分主要动物成分检测标准

Table 1 China's current standards for detection of main animal-derived materials

物种成分	标准编号及名称
牛成分	GB/T 38164—2019《常见畜动物源性成分检测方法 实时荧光PCR法》 ^[1] 、GB/T 20190—2006《饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法》 ^[2] 、GB/T 25165—2010《明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法 实时荧光PCR法》 ^[3] 、GB/T 21104—2007《动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法 PCR方法》 ^[4] 、SN/T 2051—2008《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时PCR法》 ^[5] 、SN/T 2980—2011《动物产品中牛、山羊和绵羊源性成分三重实时荧光PCR检测方法》 ^[6] 、SN/T 5145.6—2019《出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第6部分:牛成分检测 PCR-试纸条法》 ^[7] 、HS/T 13—2006《牛、羊、鹿源性成分鉴定方法 实时荧光PCR法》 ^[8] 、农业部2031号公告14—2013《转基因动物及其产品成分检测 普通牛(<i>Bos taurus</i>)内标准基因定性PCR方法》 ^[9] 、QB/T 5505—2020《肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法 PCR法》 ^[10]
绵羊、山羊成分	GB/T 38164—2019 ^[1] 、GB/T 20190—2006 ^[2] 、GB/T 25165—2010 ^[3] 、GB/T 21104—2007 ^[4] 、SN/T 2051—2008 ^[5] 、SN/T 2980—2011 ^[6] 、HS/T 13—2006 ^[8] 、QB/T 5505—2020 ^[10] 、农业部2122号公告—2—2014《转基因动物及其产品成分检测 羊内标准基因定性PCR方法》 ^[11] 、SN/T 5145.7—2019《出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第7部分:绵羊成分检测 PCR-试纸条法》 ^[12]
猪成分	GB/T 21101—2007《动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR方法》 ^[13] 、GB/T 25165—2010 ^[3] 、SN/T 2051—2008 ^[5] 、SN/T 3730.8—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第8部分 猪成分检测 实时荧光PCR法》 ^[14] 、农业部2122号公告—1—2014《转基因动物及其产品成分检测 猪内标准基因定性PCR方法》 ^[15] 、QB/T 5505—2020 ^[10]
鸡成分	SN/T 2978—2011《动物源性产品中鸡源性成分PCR检测方法》 ^[16] 、QB/T 5505—2020 ^[10]
马、驴成分	GB/T 21107—2007《动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR方法》 ^[17] 、SN/T 3730.5—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第5部分:马成分检测 实时荧光PCR法》 ^[18] 、SN/T 3730.4—2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第4部分:驴成分检测 实时荧光PCR法》 ^[19] 、SN/T 5145.8—2019《出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第8部分:驴成分检测 PCR-试纸条法》 ^[20]
火鸡成分	GB/T 38164—2019 ^[1] 、SN/T 5145.12—2019《出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第12部分:火鸡成分检测 PCR-试纸条法》 ^[21] 、SN/T 3731.4—2017《食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法 第4部分:火鸡成分检测实时荧光PCR法》 ^[22]

国内的动物成分检测标准不统一,国际上此前也没有统一的检测标准。为保证动物源性制品国际国内贸易的顺利进行,需要建立统一的国际标准。为此,上海海关向国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)申请立项建立动物成分检测的ISO标准,ISO组织专门设立了一个工作组(食品技术委员会/分子生物标记/肉类物种鉴别工作组(ISO/TC34/SC16/WG8))。通过研究,ISO组织于2020年7月发布了由上海海关主持制定的食品和饲料中牛、绵羊、猪、鸡、山羊、马、驴等动物成分检测的ISO标准:ISO/TS 20224-1:2020^[23]、ISO/TS 20224-2:2020^[24]、ISO/TS 20224-3:2020^[25]、ISO/TS 20224-4:2020^[26]、

ISO/TS 20224-5:2020^[27]、ISO/TS 20224-6:2020^[28]、ISO/TS 20224-7:2020^[29]。

火鸡是一种用作食品原料的重要禽类,与其他肉类相比蛋白质含量较高,脂肪含量和胆固醇的含量较低。火鸡肉价格较高,在加工食品中,容易被鸡、鸭等价格较低的肉类混杂假冒,也容易被混杂假冒其他价格较高的肉类,如牛、羊肉,因此有必要建立火鸡成分的检测方法。

在国外, Martín等^[30]利用12S rRNA线粒体基因、Kesmen等^[31]利用线粒体NADH脱氢酶亚基2基因、Pegels等^[32]利用线粒体DNA控制区和12S rRNA基因区域的特异性序列建立了火鸡成分的real-time PCR检测方法, Shehata等^[33]基于线粒体DNA序列建立了微粒式数字PCR定量检测方法;在国内,张舒亚等^[34]利用线粒体12S rRNA基因建立了火鸡成分的real-time PCR检测方法,李伟琦等^[35]利用TGF-β3基因序列建立了适用于微滴式数字PCR和芯片式数字PCR平台的火鸡成分的定量检测方法。

real-time PCR法具有特异性强、灵敏度高、成本低、操作简便等优点,到目前为止,该方法在日常检测中一直是检测动物成分的最常用的方法。在本研究完成之前,国际上没有一个统一的火鸡成分检测的国际标准。本研究选择火鸡染色体Z DNA序列的单拷贝的保守性的特异片段作为检测靶序列,建立了real-time PCR检测方法,完成国际协同实验,验证了方法的假阳性率、假阴性率、绝对检测限和检出概率(probability of detection, POD),制订出火鸡成分检测的ISO标准(ISO/TS 20224-8:2022)^[36]。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

家火鸡(*Meleagris gallopavo domesticus*)品种尼古拉、青铜、贝蒂娜,由山东嘉祥征博特种动物养殖场提供;家火鸡品种荷兰白、黑火鸡、石板青、波朋、眼斑火鸡(*Meleagris ocellata*)肉,由美国佛罗里达爱立生家庭农场提供;欧洲家鹅(*Anser anser domesticus*)、中国家鹅(*Anser cygnoides domesticus*)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*) DNA,由扬州大学提供;印度瘤牛(*Bos indicus*)、牦牛(*Bos mutus*)、普通牛(*Bos taurus*)、水牛(*Bubalus bubalis*)血液,由云南省草地动物科学研究院提供;美洲野牛DNA,由美国国家野生动物研究中心提供;金鱼(*Carassius auratus*)、番鸭(*Cairina moschata*)、骆驼(*Camelus bactrianus*)、狗(*Canis familiaris*)、山羊(*Capra hircus*)、麋鹿(*Cervus canadensis*)、鸽(*Columba livia*)、鹌鹑(*Coturnix coturnix*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、驴

(*Equus asinus*)、马(*Equus caballus*)、驴(*Equus caballus* × *asinus*)、猫(*Felis catus*)、鸡(*Gallus gallus*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)、小鼠(*Mus musculus*)、鱧鱼(*Onchorhynchus mmaykiss*)、兔子(*Oryctolagus cuniculus*)、绵羊(*Ovis aries*)、野鸡(*Phasianus colchicus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、鸵鸟(*Struthio camelus*)、猪(*Sus scrofa domesticus*)；油菜籽(*Brassica rapa*)、大豆(*Glycine max*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、水稻(*Oryza sativa*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)，来自本单位收集的样本。

通过NCBI中BLAST功能进行序列对比分析，选择火鸡染色体Z DNA序列的物种特异性单拷贝片段作为检测靶序列，其位置信息见表2。利用Primer Express 3.0软件设计出real-time PCR检测的引物和探针，序列信息见表3，引物和探针由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表2 检测靶序列位置信息

Table 2 Location information of detection target sequence

物种名称	基因组序列名称	基因组序列编号	靶序列位置/bp
家火鸡	火鸡染色体Z DNA序列	NC_015041.2 ^[37]	57 643 369~57 643 486

表3 本实验所用的引物和探针序列

Table 3 Sequences of primers and probes used in this study

物种名称	引物/探针名称	序列/荧光标记	基因组序列号
	Turkey-118 bp-F	5'-TGAACAAATCCACTTCCCTTAACC-3'	
家火鸡	Turkey-118 bp-R	5'-TCATTTCTGCTGCACAAAGTGAG-3'	NC_015041.2 ^[37]
	Turkey-118 bp-P	5'-[FAM]-TGATGACGAGCCGACCCACACC-[TAMRA]-3'	

real-time PCR试剂2×PCR Master Mix预混液（货号：4369016）美国Thermo Fisher Scientific公司；普通PCR试剂2×PCR Master Mix预混液（货号：B639295）生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA分子质量标记DL2000（货号：3427A）宝生物工程（大连）有限公司。

1.2 仪器与设备

SPEX 6850型冷冻碾磨机 美国SPEX SamplePrep公司；QX100微粒式数字PCR仪 美国Bio-Rad公司；ABI ViiA7 real-time PCR仪、NanoDrop 2000微量核酸蛋白测定仪 美国赛默飞世尔科技公司；5425小型台式高速离心机 德国Eppendorf公司；UFE500AO型烘箱 德国Memeert公司；DYY-6C电泳仪 北京六一生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理和核酸提取

样品碾磨：对于肉类产品，先切碎，然后在烘箱80℃干燥72 h，再使用冷冻碾磨机粉碎成超细粉末。

核酸提取：使用天根生化科技（北京）有限公司生产的基因组DNA提取试剂盒（DP305）对各类动植物样品提取，按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.2 质粒构建

将火鸡的特异性扩增片段（基因序列号NC_015041.2中57 643 369~57 643 486 bp之间118 bp的片段）与pUC57载体进行连接，得到质粒pUC57-t，转化培养。质粒由生工生物工程（上海）股份有限公司合成并提取质粒DNA，用于验证所建立real-time PCR方法的绝对检测限。

1.3.3 real-time PCR反应体系和循环程序

反应体系：25 μL反应体系，每条引物（10 μmol/L）1 μL，探针（10 μmol/L）0.5 μL，实时荧光2×PCR Master Mix（Thermo Fisher）12.5 μL，无核酸酶和蛋白酶的重蒸水5 μL，样品或质粒DNA 5 μL（基因组DNA质量浓度为20~200 ng/μL，质粒浓度分别为：4、2、1、0.4、0.2、0.1、0.02 拷贝/μL）。循环程序：95℃预变性10 min；95℃变性15 s，60℃退火60 s，45个循环。

1.3.4 普通PCR反应体系、循环程序和电泳条件

反应体系：25 μL反应体系，每条引物（10 μmol/L）1 μL，2×PCR Master Mix（生工生物工程（上海）股份有限公司）12.5 μL，无核酸酶和蛋白酶的重蒸水5 μL，样品DNA 5 μL（基因组DNA质量浓度为20~200 ng/μL）。循环程序：预变性94℃预变性4 min；94℃变性30 s，60℃退火60 s，45个循环；72℃延伸10 min。电泳条件：220 V、20 min。

1.3.5 特异性测试

利用各种动植物的DNA样本，按照1.3.3节real-time PCR反应体系和循环程序进行检测。按照1.3.4节普通PCR反应体系、循环程序和电泳条件，反应体系只加引物不加探针，进行定性PCR测试，并对PCR产物进行测序确证。

1.3.6 测试

利用数字PCR技术对含有火鸡特异扩增片段的质粒pUC57-t拷贝数进行精确定量检测，准确稀释到1 000 拷贝/μL。将定量后的样品DNA稀释至7个浓度，分别为4、2、1、0.4、0.2、0.1、0.02 拷贝/μL，每个PCR反应加入5 μL模板，含有靶序列的质粒拷贝数分别为20、10、5、2、1、0.5、0.1 拷贝。

1.3.7 real-time PCR结果判定

当阳性对照出现扩增、阴性对照和空白对照未出现扩增时，若待测样品出现S型的扩增曲线，并且产生Ct值时，则样品被判定为阳性；若待测样品未出现S型的扩增曲线时，则被判定为阴性。

1.3.8 国际协同实验

检测方法要上升为ISO标准，需要组织国际协同实验完成对所建立的检测方法进行验证。根据

ISO 20813:2019^[38]的要求,对实验室的数量要求是不少于8家,其中国外实验室不少于4家。本研究邀请了12家实验室参加了协同实验,其中,国外4家分别来自德国、法国、马来西亚、美国,国内8家分别来自海关、市场监管、中国科学院、中国农业科学研究院等系统。使用仪器涉及Roche LightCycler480 II、ABI 7500、Agilent Mx3005P、ABI 7500 Fast、ABI QuanStudio 12K Flex、Bio-Rad CFX96 6种品牌和型号的PCR仪。

假阳性率和假阴性率测试:提取火鸡DNA,通过数字PCR将基因组DNA稀释至10拷贝/ μL ,作为阳性样品。选取牛肉DNA,通过数字PCR定量至20拷贝/ μL ,作为阴性样品。每个实验室测试6个阳性样品和6个阴性样品(均为盲样),利用所建立的检测方法进行检测。收集检测结果后,计算检测方法的假阳性率和假阴性率。

绝对检测限测试和POD分析:将载有火鸡的特异性扩增片段的质粒pUC57-t利用数字PCR将质粒浓度稀释至1 000拷贝/ μL 。再将质粒人工稀释至4、2、1、0.4、0.2、0.1、0.02拷贝/ μL 7个浓度梯度,稀释液为含有20 ng/ μL 的超声粉碎鲑鱼精DNA的三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液。对每个浓度点的样品设置6个重复,进行real-time PCR检测,计算各浓度点的阳性结果占总样品数的百分比。POD是指单个实验室使用定性方法在指定浓度下对给定基质进行测试分析得到阳性分析结果的概率,按照ISO/TS 16393:2019^[39]和Uhlig等^[40]发表的分析方法以及Quo Data在线数据分析程序(<https://www.quodata.de/en/interlaboratory-studies.html#0>)对绝对检测限测试的结果进行POD分析。

2 结果与分析

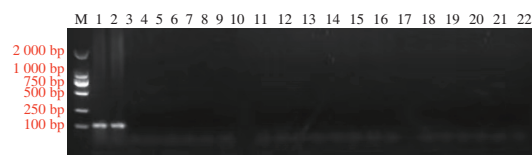
2.1 特异性检测分析

使用火鸡检测方法对收集到的各类动植物样品进行特异性检测。结果显示,只有家火鸡和眼斑火鸡检测结果为阳性,其他物种均为阴性,特别是与火鸡亲缘关系较近的鹌鹑、野鸡也未出现扩增(表4)。为了对建立的real-time PCR方法进行确证,利用上游引物Turkey-118 bp-F和下游引物Turkey-118 bp-R,不添加探针,对以上样品进行定性PCR结合电泳测试,结果显示,也只有家火鸡和眼斑火鸡出现阳性扩增结果,部分禽类和主要肉类动物样品的定性PCR产物电泳图谱见图1。对家火鸡和眼斑火鸡定性PCR的扩增产物分别进行克隆测序,其序列均与火鸡染色体Z DNA序列(GenBank序列号:NC_015041.2)的57 643 369~57 643 486 bp的序列一致,长度为118 bp。使用NCBI BLAST功能对该118 bp的序列进行搜索比对,在整个GenBank库中只有NC_015041.2与之完全配对(图2)。说明利用该引物和探针建立的real-time PCR方法高度特异。

表4 物种特异性测试

测试的物种类别	测试的物种	实验结果
动物	家火鸡	+
	眼斑火鸡	+
	欧洲家鹅	-
	中国家鹅	-
	绿头鸭	-
	野牛	-
	普通牛	-
	印度瘤牛	-
	牦牛	-
	水牛	-
	金鱼	-
	番鸭	-
	骆驼	-
	狗	-
	山羊	-
	麋鹿	-
	鸽	-
	鹌鹑	-
	黑天鹅	-
	鲤鱼	-
	驴	-
	马	-
骡	-	
猫	-	
鸡	-	
恒河猴	-	
鼠	-	
虹鳟鱼	-	
兔子	-	
绵羊	-	
野鸡	-	
大鼠	-	
珠颈斑鸠	-	
鸵鸟	-	
猪	-	
人	人	-
植物	油菜籽	-
	大豆	-
	紫花苜蓿	-
	水稻	-
	高粱	-
	小麦	-
小麦	-	
玉米	-	

注: +.阳性; -.阴性。下同。



M. DL2000 DNA分子质量标记; 1.家火鸡; 2.眼斑火鸡; 3.欧洲家鹅; 4.中国家鹅; 5.绿头鸭; 6.番鸭; 7.鸽; 8.鹌鹑; 9.黑天鹅; 10.鸡; 11.野鸡; 12.珠颈斑鸠; 13.鸵鸟; 14.普通牛; 15.绵羊; 16.猪; 17.驴; 18.马; 19.山羊; 20.骆驼; 21.大西洋鲑鱼; 22.空白对照。

图1 部分禽类和肉类动物样品PCR检测电泳图谱

Fig. 1 PCR detection electrophoresis of partial poultry and meat animal samples

```

Query 1      TGAACAAATCCACTCCCTTAACTCAGGAACATCCAGCATATTGGTAAACAGAGGGAT 60
|||||
Sbjct 57 643 369 TGAACAAATCCACTCCCTTAACTCAGGAACATCCAGCATATTGGTAAACAGAGGGAT 57 643 428

Query 61      GTGGGGGTGTGGCTGCGGCTGTCATCACTGCAGCTCAGCTTTGTGCAGCAGAAATGA 118
|||||
Sbjct 57 643 429 GTGGGGGTGTGGCTGCGGCTGTCATCACTGCAGCTCAGCTTTGTGCAGCAGAAATGA 57 643 486
    
```

Query.PCR产物测序序列; Sbjct.火鸡染色体ZDNA序列 (ID:NC_015041.2)。

图2 火鸡PCR扩增产物测序序列BLAST结果

Fig. 2 BLAST results of the sequence of PCR amplicon from turkey

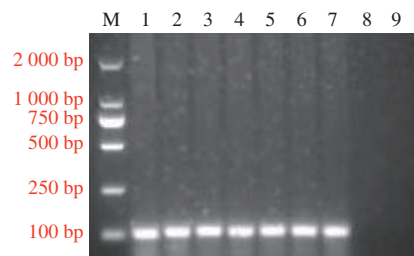
特别值得一提的是, 眼斑火鸡与一种野火鸡, 主要分布于美国、墨西哥、洪都拉斯、危地马拉等很小一部分地区的山林。眼斑火鸡与家火鸡同属于火鸡科火鸡属, 一些国家将眼斑火鸡与家火鸡杂交培育出新的家火鸡品种。NCBI GenBank库中有家火鸡的基因组序列, 但到目前为止未见眼斑火鸡的基因组全序列。本实验通过对眼斑火鸡具有和家火鸡的PCR产物进行测序, 证明两者具有相同的靶序列。本检测方法能同时检测出家火鸡和眼斑火鸡。

2.2 种内一致性测试

使用real-time PCR方法对尼古拉、青铜、贝蒂娜、荷兰白火鸡、黑火鸡、石板青、波朋火鸡等常见火鸡品种进行检测, 所有品种均检测出阳性结果 (表5), 品种鉴定方法准确率为100%。利用上游引物Turkey-118 bp-F和下游引物Turkey-118 bp-R, 不添加探针, 对以上样品进行定性PCR检测和电泳测试。结果显示, 所有火鸡品种出现阳性扩增结果 (图3)。对这些PCR产物进行克隆测序, 序列均与GenBank序列号NC_015041.2的57 643 369~57 643 486 bp的序列一致。结果表明: 本检测方法的测试结果具有良好的种内一致性, 适合于各种品种火鸡的检测。

表5 种内一致性检测结果
Table 5 Results of intraspecies specificity tests

物种名称	品种	PCR检测结果
家火鸡	青铜	+
	荷兰白	+
	黑火鸡	+
	尼古拉	+
	石板青	+
家火鸡	贝尔茨维尔小型白火鸡	+
	波朋	+



1.青铜; 2.荷兰白; 3.黑火鸡; 4.尼古拉; 5.石板青; 6.贝尔茨维尔小型白火鸡; 7.波朋; 8.阴性对照 (鸡); 9.空白对照。

图3 不同火鸡品种样品的定性PCR检测电泳图谱

Fig. 3 Electropherograms of PCR products from various turkey breeds

2.3 绝对检测限测试

利用数字PCR技术对含有火鸡特异基因片段的pUC57质粒样品进行定量检测稀释至1 000 拷贝/μL。将定量后的质粒样品DNA稀释4、2、1、0.4、0.2、0.1 拷贝/μL和0.02 拷贝/μL 7 个浓度梯度。每个物种样品每个浓度做6 次重复。结果显示所建立的检测方法在DNA浓度为1 拷贝/μL (5 拷贝/PCR反应) 时都能清楚检测到特异性DNA (表6), 说明所设计的引物探针绝对检测限可达5 拷贝/PCR反应。

表6 绝对检测限测试

Table 6 Results of absolute detection limit tests

质粒样品DNA浓度/ (拷贝/μL)	质粒样品靶序列拷贝数/ (拷贝/PCR反应)	检测结果
4	20	+
2	10	+
1	5	+
0.4	2	-
0.2	1	-
0.1	0.5	-
0.02	0.1	-

2.4 国际协同实验验证

2.4.1 假阳性率、假阴性率验证

每个参加协同实验的实验室均收到12 个盲样, 包括6 个阳性样品和6 个阴性样品。共计12 个实验室参加了协同实验, 测试样品总数量为144 个, 假阳性率和假阴性率测试结果统计见表7。协同实验统计结果表明, 应用火鸡成分检测方法对阳性样品全部检出, 阴性样品全未检出 (表7), 方法的假阳性率和假阴性率均为0%, 达到ISO 20813:2019标准中规定假阳性率和假阴性率小于5%的要求。说明该方法产生的假阳性和假阴性结果的可能性很低, 能保证检测结果的准确性。

表7 假阳性率和假阴性率协同实验测试结果统计

Table 7 Statistics of false positive and false negative rates in collaborative trials

测试统计指标	结果
参加协同实验的实验室数量	12
提交结果的实验室数量	12
每个实验室收到的样品数量	12
总样品数量	144
收到的实验结果数量	144
含有检测靶序列的样品数量	72
不含检测靶序列的样品数量	72
阳性样品的阳性结果数量	72
阴性样品的阴性结果数量	72
假阴性结果数量	0
假阳性结果数量	0
假阴性率/%	0
假阳性率/%	0

2.4.2 绝对检测限测试验证和POD分析

每个参加协同实验的实验室均收到4、2、1、0.4、0.2、0.1、0.02 拷贝/μL 7 个浓度的质粒DNA样品各6 个,

共计12个实验室参加了协同实验,每一浓度点的测试样品数为72个,这些实验室的测试结果见表8。计算各浓度点的阳性结果占该浓度点总样品数的百分比,结果见表9。协同实验结果表明:当PCR反应体系中靶序列模板数分别为20、10、5、2、1、0.5、0.1拷贝时,检测结果的阳性百分比分别为100%、100%、100%、91.7%、70.1%、54.2%、16.7%。也就是说,当靶序列高于5拷贝/PCR反应时,样品阳性检出率均达到100%,说明该方法的绝对检测限为5拷贝/PCR反应。

表8 绝对检测限协同实验测试结果

靶序列拷贝数	参加协同实验的实验室编号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
0.5	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
0.1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

注: +.阳性; -.阴性。

表9 绝对检测限的协同实验结果分析

靶序列拷贝数	阳性结果数量/总样品数量	阳性率/%
20	72/72	100
10	72/72	100
5	72/72	100
2	66/72	91.7
1	51/72	70.1
0.5	39/72	54.2
0.1	12/72	16.7

按照ISO/TS 16393:2019和Uhlig发表的分析方法及Quo Data在线数据分析 (<https://www.quodata.de/en/interlaboratory-studies.html#0>)对方法的绝对检测限和POD进行分析。所有参加协同实验室在不同浓度稀释点所测试的定性数据都被用来判断检测方法POD等于95%的分析(表10),实验室间标准偏差为0.30,低于最大允许值1;在95%的POD的情况下,方法的绝对检测限为3.2拷贝/PCR反应,低于最大允许值20拷贝/PCR反应^[39]。表明所建立起来的火鸡成分real-time PCR检测方法具有较低的绝对检测限,并且结果之间偏差较小。

表10 POD的协同实验结果

参数	结果值
实验室数量	12
每个稀释水平的PCR重复数量	6
实验室间平均POD	0.80
实验室间平均POD的95%置信区间	0.76~0.84
POD曲线 相对于理想POD曲线 (b=1) 的斜率b	1.15
实验室间标准偏差	0.30
理论中位数实验室的绝对检测限/(拷贝/PCR反应)	3.2

2.4.3 不同品牌和型号的PCR仪器对检测结果的影响

参加协同实验的实验室所使用的PCR仪有Roche LightCycler 480 II、ABI 7500、Agilent Mx3005P、ABI 7500 Fast、ABI QuanStudio 12K Flex、Bio-Rad CFX96 6种不同品牌和型号(表11)。从表8和表11可以看出,各参加实验室的假阳性、假阴性测试结果一致,在绝对检测限(5拷贝靶序列/PCR)反应以上检测结果呈现出100%的阳性率,在绝对检测限以下的2拷贝靶序列/PCR时,各实验室检测结果也表现出较好的准确性和一致性,因此不同品牌和型号仪器对PCR检测结果无明显差异。

表11 各实验室使用的PCR仪的品牌和型号

实验室编号	实验室国家	使用的仪器型号
1	德国	Roche LightCycler 480 II
2	法国	ABI 7500
3	马来西亚	ABI 7500
4	美国	Agilent Mx3005P
5	中国	ABI 7500 Fast
6	中国	Agilent Mx3005P
7	中国	ABI 7500
8	中国	ABI QuanStudio 12K Flex
9	中国	ABI 7500 Fast
10	中国	Bio-Rad CFX96
11	中国	ABI 7500
12	中国	ABI 7500 Fast

2.5 ISO标准制订

课题组向ISO组织提出火鸡检测方法的新工作项目提案,经ISO各成员国投票,ISO同意决定立项。立项编号为:ISO/NP 20224-8。经过工作组草案、委员会草案、技术规范草案(Draft of Technical Specification, DTS)等不同阶段投票,并根据各国专家意见进行修改,多次召开ISO/TC34/SC16/WG8工作组会议讨论修改,形成最终的DTS标准草案。2022年7月,火鸡real-time PCR检测方法在DTS阶段以ISO各成员国100%的赞成率获得通过。2022年10月,ISO组织正式发布了火鸡成分检测ISO标准ISO/TS 20224-8:2022^[36]。

3 结论

本研究以火鸡染色体Z DNA序列的特异片段为检测靶序列建立了火鸡源性成分real-time PCR检测方法,并对方法的特异性、灵敏度进行测试。在此基础上,组织国际协同实验对建立的方法进行了验证。协同实验表明,所建立的检测方法阳性率、假阴性率、绝对检测限、POD等指标均达到ISO 20813:2019所要求的标准制定指标。通过本研究建立了火鸡源性成分real-time PCR检测的ISO标准。

参考文献:

- [1] 国家市场监督管理总局. 常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光PCR法: GB/T 38164—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 10.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局. 饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法: GB/T 20190—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 5.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. 明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法 实时荧光 PCR法: GB/T 25165—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 9.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法PCR方法: GB/T 21104—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 10.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时PCR法: SN/T 2051—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 7.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. 动物产品中牛、山羊和绵羊源性成分三重实时荧光PCR检测方法: SN/T 2980—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 9.
- [7] 海关总署. 出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第6部分: 牛成分检测 PCR-试纸条法: SN/T 5145.6—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 10.
- [8] 海关总署. 牛、羊、鹿源性成分鉴定方法 实时荧光PCR方法: HS/T 13—2006[S]. 北京: 中国海关出版社, 2007: 3.
- [9] 农业农村部. 转基因动物及其产品成分检测 普通牛(*Bos taurus*)内标准基因定性PCR方法: 农业部2031号公告—14—2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 12.
- [10] 工业和信息化部. 肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法 PCR法: QB/T 5505—2020[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2020: 8.
- [11] 农业农村部. 转基因动物及其产品成分检测 羊内标准基因定性PCR方法: 农业部2122号公告—2—2014[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 7.
- [12] 海关总署. 出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第7部分: 绵羊成分检测 PCR-试纸条法: SN/T 5145.7—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 10.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR方法: GB/T 21101—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 10.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局. 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第8部分 猪成分检测 实时荧光PCR法: SN/T 3730.8—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 11.
- [15] 农业农村部. 转基因动物及其产品成分检测 猪内标准基因定性PCR方法: 农业部2122号公告—1—2014[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 7.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源性产品中鸡源性成分PCR检测方法: SN/T 2978—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 9.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR方法: GB/T 21107—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 10.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局. 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第5部分: 马成分检测 实时荧光PCR法: SN/T 3730.5—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 11.
- [19] 国家质量监督检验检疫总局. 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第4部分: 驴成分检测 实时荧光PCR法: SN/T 3730.4—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 11.
- [20] 海关总署. 出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第8部分: 驴成分检测 PCR-试纸条法: SN/T 5145.8—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 10.
- [21] 海关总署. 出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第12部分: 火鸡成分检测 PCR-试纸条法: SN/T 5145.12—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 10.
- [22] 国家质量监督检验检疫总局. 食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法 第4部分: 火鸡成分检测实时荧光PCR法: SN/T 3731.4—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 6.
- [23] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 1: Bovine DNA detection method: ISO/TS 20224-1:2020[S].
- [24] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 2: Ovine DNA detection method: ISO/TS 20224-2:2020[S].
- [25] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 3: Porcine DNA detection method: ISO/TS 20224-3:2020[S].
- [26] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 4: Chicken DNA detection method: ISO/TS 20224-4:2020[S].
- [27] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 5: Goat DNA detection method: ISO/TS 20224-5: 2020[S].
- [28] ISO. Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 6: Horse DNA detection method: ISO/TS 20224-6:2020[S].

- [29] ISO. Molecular biomarker analysis–Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR–Part 7: Donkey DNA detection method: ISO/TS 20224-7:2020[S].
- [30] MARTÍN I, GARCÍA T, FAJARDO V, et al. Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction[J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85(2): 452-458. DOI:10.2527/jas.2006-350.
- [31] KESMEN Z, YETIMAN A E, SAHIN F, 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): C167-C173. DOI:10.1111/j.1750-3841.2011.02536.x.
- [32] PEGELS N, GONZÁLEZ I, LÓPEZ-CALLEJA I, et al. Evaluation of a *TaqMan* real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(7): 1709-1719. DOI:10.3382/ps.2011-01954.
- [33] SHEHATA H R, LI J, CHEN S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(8): e0182872. DOI:10.1371/journal.pone.0182872.
- [34] 张舒亚, 谌鸿超, 宋青, 等. 食品和饲料中火鸡源性成分的实时荧光PCR检测方法[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(2): 207-211.
- [35] 李伟琦, 刘津, 李志勇, 等. 火鸡源性成分数字PCR通用定量检测方法的研究[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2018, 35(3): 309-316. DOI:10.13482/j.issn1001-7011.2018.04.106.
- [36] ISO. Molecular biomarker analysis–Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR–Part 8: turkey DNA detection method: ISO/TS 20224-8:2022[S].
- [37] DALLOUL R A, LONG J A, ZIMIN A V, et al. Multi-platform next-generation sequencing of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*): genome assembly and analysis[J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(9): e1000475. DOI:10.1371/journal.Pbio.1000475.
- [38] ISO. Molecular biomarker analysis–determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods: ISO/TS 16393:2019[S].
- [39] ISO. Molecular biomarker analysis–methods of analysis for the identification and the detection of animal species from foods and food products (nucleic acid-based methods)–General requirements and definitions: ISO 20813:2019[S].
- [40] UHLIG S, FROST K, COLSON B, et al. Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical-statistical modelling of the probability of detection[J]. *Accreditation and Quality Assurance*, 2015, 20(2): 75-83. DOI:10.1007/s00769-015-1112-9.