

团体标准

《肉及肉制品中鸡鸭源性成分的鉴定 定梯型熔解温度等温扩增检测方法》

标准编制说明

标准起草工作组

2024 年 09 月

一、制定标准的意义

民以食为天，食以安为先，随着人们生活水平的日渐提高，消费者对食品的质量安全问题越来越关注。我国肉品产量约占世界总产量的三分之一，充足的肉品资源供给为我国肉制品产业提供了有利的发展条件。目前，我国居民肉及肉制品消费需求升级，由数量向质量，由温饱向营养健康迅速转变。肉及肉制品作为人体营养优质蛋白质的来源，其安全与人们的身体健康息息相关，但肉制品中掺假问题仍时有发生，例如存在牛肉、羊肉中掺入价格低廉的鸡肉、鸭肉的现象，掺假鉴别及溯源分析也成了监测的热点问题。肉类掺假和质量安全问题不仅会带来人类健康风险，扰乱销售市场秩序，侵犯消费者权益，阻碍经济发展，引起宗教矛盾，也为潜在的动物疫病的传播埋下隐患。因此，加强对肉及肉制品的鉴别检验极为重要，准确判定肉品掺假，确保食品标签制度的有效实施，需要灵敏、可靠的检测方法鉴定肉及肉制品的物种来源。

目前已经建立的肉及肉制品相关国家标准和行业标准包括：GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性检测实时荧光 PCR 法》、由海关总署颁发的进出口行业标准 SN/T 5199-2020《家畜家禽成分 DNA 条形码检测技术规范》文件适用于家畜、家禽单一物种样品的检测，不适用于多物种混合样品中动物成分的检测。由国家质量监督检验检疫总局颁发的进出口行业标准 SN/T 3731.5-2013《食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法 第 5 部分：鸭成分检测 PCR 法》、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》、SN/T 2727-2010《饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法》等标准。

以上标准对鸡肉、鸭肉源性成分的掺杂要求模糊，检测周期长，成本高，无法满足市场的快速检测。某些标准适用于家畜、家禽单一物种样品的检测，不适用于多物种混合样品中动物成分的检测。企业标准也参差不齐，没有统一的规范性文件，这都制约了肉制品产业的健康、稳定、快速发展。

标准化是为了建立最佳秩序、促进共同效益而开展的制定并应用标准的活动。为了保证标准化活动有序开展，促进标准化目标和效益的实现，就需要建立完善的技术规则，起草高质量的标准化文件。通过确定文件的规范性要素，编制标准

化文件，从而对各类标准化对象进行标准化。一个完善的标准能够起到规范整个行业生产行为，提升行业产品质量，发挥促进技术提升的重要作用。团体标准作为国标、行标、地标的有效补充，以坚持市场主导和服务行业为原则，为促进行业的持续高效发展发挥着积极和引导作用。

因此，因此，建立快速、准确、简单的检验和判定肉制品中鸡肉、鸭肉源性成分掺假的方法，对于打击食品加工领域的违法犯罪、保证肉类产业的健康发展和保障消费者的权益具有重要意义。

二、任务来源及编制原则和依据

（一）任务来源

目前市场上肉及肉制品中存在“标签混乱、以次充好，以假乱真”等行业乱象。牛肉食品掺假类型包括：牛肉地理原产地标签不符、出售早期经过冷冻的牛肉；牛肉及其制品中掺入价格低廉的鸡肉、鸭肉、猪肉和老鼠肉；发现销售的牛肉制品与产品标签不符并使用未进行申报的肉类代替牛肉；发现使用粘合肉糜或切片肉制品的粘合剂，“挂羊头卖鸭肉”的事件频发，严重影响了消费者的健康、破坏了市场秩序、影响社会和谐与安定。2013 年爱尔兰、英国、法国等欧洲多个国家陆续发现本国部分市售牛肉产品中掺入马肉，少部分产品还掺有猪肉，且掺入的马肉还可能残留有止痛类药物“保泰松”，随着事件的发酵，马肉风波也蔓延至亚洲的多个国家和地区。2013 年的欧洲马肉丑闻引起全球对食品欺诈的广泛关注，更是引发了巨大的公众信任危机。在世界范围内产生了严重的负面影响，是自疯牛病以来欧洲范围内爆发的最严重的食品安全危机。因此，加强对肉及肉制品的鉴别检验极为重要，准确判定肉品掺假，确保食品标签制度的有效实施，需要灵敏、可靠的检测方法鉴定肉及肉制品的物种来源。

根据肉及肉制品市场的需求，有必要制定肉及肉制品有关鸡鸭成分鉴定的团体标准，为肉及肉制品提供标准保护和标准依据。为此，许昌市胖东来超市有限公司及相关生产企业、高校和政府机构于 2024 年 9 月 3 日向河南省食品科学技术学会提出立项《肉及肉制品中鸡鸭源性成分的梯型溶解温度等温扩增检测方法》团体标准项目建议书，根据《河南省食品科学技术学会团体标准管理办法》《河南省食品科学技术学会团体标准制定程序》的规定，同意许昌市胖东来超市有限公司就肉及肉制品中鸡鸭源性成分的检测向河南省食品科学技术学会提出申请，

由河南省食品科学技术学会负责《肉及肉制品中鸡鸭源性成分的梯型溶解温度等温扩增检测方法》团体标准的审定工作。

（二）编制原则和依据

1. 编制原则

本标准的制定主要遵循以下原则：一是科学实用原则。在尊重科学、紧密结合实践、广泛征求意见及调查研究的基础上，紧贴畜禽肉及肉制品中鸡鸭源性成分鉴定的快速检测方法，具有可操作性和实用性。二是协调性原则。以质量和安全为核心，符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。三是因地制宜原则。标准的制定坚持从我省食品行业的实际出发，充分考虑相关食品企业的现状和技术条件，确保畜禽肉及肉制品中的真实性和技术条件的可行性。

2. 编制依据

本标准的制定参考了 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》及其他国家相关法律、法规，严格按照 GB-T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分 标准化文件的结构和起草规则》的要求组织实施编写，规定了范围、规范性引用文件、术语和定义、方法提要、原理、试剂或材料、仪器设备、检测步骤、结果判定、检测过程中防止交叉污染的措施等。本标准依据相关最新的标准和法规进行编写，以适应食品企业健康发展的需要。

三、编制过程

（一）编制大纲和标准文本初稿

时间：2024年07月8日-2024年9月2日

根据河南省食品科学技术学会提出的团体标准规定要求，报请河南省食品科学技术学会同意立项，确定了总体工作方案，成立了项目起草小组。期间以许昌市胖东来超市有限公司，许昌学院、、、、等十余家企业、高校和政府机构共同收集和查阅相关技术标准和文献资料，采集样品进行检测，并经多次讨论，试验验证，形成了团体标准及编制说明初稿。

四、主要技术内容的说明

1 范围

本文件规定了肉及肉制品中鸡鸭源性成分的梯型熔解温度等温扩增检测方法。

本文件适用于肉及肉制品中鸡鸭源性成分的定性检测。

本文件所规定方法的检出限（LOD）为0.1 %（质量比）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法提要

提取样品DNA，用已知含鸡肉、鸭肉成分的样品DNA为阳性对照，已知不含鸡肉、鸭肉成分的样品DNA为阴性对照，灭菌双蒸水作为空白对照，使用特异性引物和探针，采用梯型熔解温度等温扩增技术，根据荧光信号和扩增现象，判定是否存在鸡肉、鸭肉成分。

5 原理

选择 T_m 值曲线为梯型（包括人字梯型、半人字梯型和直梯型）的特异性核酸片段为靶序列设计巢式引物，将巢式引物的外引物与内引物分别连接成一对引物作为等温扩增用引物，借助外引物与核酸靶序列上对应片段的熔解温度差异提供单链模板，在DNA聚合酶（大片段）催化下通过合成反应与链替代反应对梯型 T_m 值曲线的靶标核酸片段进行等温扩增，进行不同肉类成分的定性分析。

6 试剂或材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB/T 6682中一级水的规格。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

- 6.1 动物组织DNA提取试剂盒。
- 6.2 梯型熔解温度等温扩增检测LMTIA试剂盒。Proofman探针法
- 6.3 梯型熔解温度等温扩增检测LMTIA的引物和探针。鸡肉、鸭肉引物和探针详见表1。鸡肉和鸭肉引物扩增的靶标序列参见附录A。
- 6.4 梯型熔解温度等温扩增检测反应混合液（5 μL（2X）通用型LMTIA预混液，0.4 μL（100 U/μL）（U, Unit，酶学单位）Bst酶）。

表1 鸡肉、鸭肉成分鉴定用引物和探针序列

名称	序列(5'→3')	靶基因
鸡肉	正向引物F: GACGCCCCGGCCTCGTTTTAGTCGTAACAAGGTTTCCGT	ITS
	反向引物B: GCGTCCGGCCGAGCTTTTGGAAGGGAAGGGAAGGCTG	
	环引物LF: TCCTTCCGCAGGTTCAC	
	环引物LB: ACGAGCGCGCGCGGG	
	探针: BHQ2-TCCTTCCGCAGGTTA-6-FAM	
鸭肉	正向引物F: CAGCCCCGGTAATGATTTTAGTCGTAACAAGGTTTCCGT	ITS
	反向引物B: ACCGGGGCTGGGCCTTTTGGGCTCCGTCGCTCAC	
	环引物LF: CTTCCGCAGGTTCACCT	
	环引物LB: GGCTTGGGCGTCGCA	
	探针: BHQ2-GGCTTGGGCGTCT-JOE	

7 仪器设备

- 7.1 等温荧光扩增仪。
- 7.2 恒温水浴锅。
- 7.3 离心机：离心力≥12 000 g。
- 7.4 微量移液器：0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 200 μL~1 000 μL。
- 7.5 恒温混匀仪。
- 7.6 涡旋震荡器。
- 7.7 pH计，精度为0.01。

7.8 天平：感量0.01 g。

7.9 微量紫外-可见分光光度计。

8 检测步骤

8.1 DNA提取

应采用市售的动物组织DNA提取试剂盒提取。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于50 μL，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用双蒸水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

8.2 DNA浓度与纯度的检测

使用核酸蛋白仪或微量紫外-可见分光光度计检测提取DNA的浓度与纯度。分别检测260 nm和280 nm处的吸光值，每个样品重复测三次，取平均值。当A260/A280比值在1.6~2.0时，可用于LMTIA扩增。

8.3 梯型熔解温度等温扩增

8.3.1 梯型熔解温度等温扩增反应体系

梯型熔解温度等温扩增反应体系见表2。PCR八联管中按表1依次加入反应试剂，混匀。放入等温荧光扩增仪。

表2 梯型熔解温度等温扩增反应体系（10μL）

试剂	体积（μL）
梯型熔解温度等温扩增反应混合液	5.4
正向引物 F（100 μmol/L）	0.16
反向引物 B（100 μmol/L）	0.16
环引物 LF（100 μmol/L）	0.04
环引物 LB（100 μmol/L）	0.04
探针（10 μmol/L）	0.2
灭菌双蒸水	2.0
DNA 模板	2.0

8.3.2 梯型熔解温度等温扩增反应程序

按照表2配制鸡肉、鸭肉基因的反应体系。反应程序为：等温荧光扩增仪，鸡肉、鸭肉的检测温度分别设置为62℃和66℃，设置40个循环，每个循环30 s。在样品等温扩增的同时，检测过程中应分别设立阳性对照和阴性对照。

用已知含鸡肉、鸭肉成分的样品DNA作阳性对照，用已知不含鸡肉、鸭肉成分的样品DNA作阴性对照，和空白对照（灭菌双蒸水），实验重复三次。

9 结果判定

若有 FAM 荧光检出，等温荧光扩增仪中出现 S 型或 S 型趋势的曲线，则判定样品含有鸡源性成分，表述为“检出鸡肉成分”；S 曲线参考附录 B；

若有 JOE 荧光检出，等温荧光扩增仪中出现 S 型或 S 型趋势的曲线，则判定样品含有鸭源性成分，表述为“检出鸭肉成分”；S 曲线参考附录 B；

如无 FAM 荧光检出，无 S 典型扩增曲线，则判定为不含鸡源性成分，表述为“未检出鸡肉成分”；

如无 JOE 荧光检出，无 S 典型扩增曲线，则判定为不含鸭源性成分，表述为“未检出鸭肉成分”；

在样品梯型熔解温度等温扩增的同时，应设置梯型熔解温度等温扩增阴性对照、梯型熔解温度等温扩增阳性对照和梯型熔解温度等温扩增空白对照，实验重复三次。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施应按照 GB/T 27403-2008 中附录 D 的规定执行。

五、标准与其他标准的对比分析及采用情况

目前已经建立的畜禽肉及肉制品相关国家标准和行业标准等包括：

由国家标准化管理委员会，国家质量监督检验检疫总局发布的国家标准 GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性检测实时荧光 PCR 法》、GB/T 35918-2018《动物制品中动物源性检测基因条码技术 Sanger 测序法》、GB/T 35917-2018《常见动物源性成分快速测定 膜芯片法》，由海关总署颁发的进出口行业标准

SN/T 5199-2020《家畜家禽成分 DNA 条形码检测技术规范》文件、进出口行业标准 SN/T 5145.11-2019《出口食品及饲料中动物源成分快速检测方法 第 11 部分：鸭成分检测 PCR-试纸条法》和 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》。由国家质量监督检验检疫总局发布的进出口行业标准 SN/T 2978-2011《动物源性产品中鸡源性成分 PCR 检测方法》、进出口行业标准 SN/T 3731.5-2013《食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法 第 5 部分：鸭成分检测 PCR 法》、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》和 SN/T 2727-2010《饲料中禽源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法》。湖北省市场监督管理局颁发的地方标准 DB42/T 1591-2020《畜禽肉及肉制品中牛羊猪鸡鸭源性成分 定性 PCR 检测方法》。吉林省质量技术监督局发布的地方标准 DB22/T 2049-2014《动物源性饲料中鸭源性成分测定 PCR 方法》。上海海关动植物与食品检验检疫技术中心主导制定，国际标准化组织（ISO）正式发布的食品饲料中动物源性成分实时荧光 PCR 检测国际标准《火鸡 DNA 检测方法》（ISO/TS 20224-8）和《ISO/TS 20224-10：2024 分子生物标记分析-食品和饲料中动物源性成分实时荧光 PCR 检测-第 10 部分 鸭 DNA 检测方法》。

以上标准对鸡肉、鸭肉源性成分采用的 PCR、测序、膜芯片法和 PCR-试纸条法等检测方法，存在操作复杂、周期长、成本高等缺点，无法满足市场的快速检测。

海关总署发布的 SN/T 5227.1-2019《出口食品中鸡源性成分快速检测 重组酶介导链替换核酸扩增法（RAA 法）》和 SN/T 5227.4-2019《出口食品中鸭源性成分快速检测 重组酶介导链替换核酸扩增法（RAA 法）》适用于出口食品中鸡鸭源性成分的快速定性检测，然而，RAA 检测方法需要除 DNA 聚合酶之外的蛋白酶参与反应。

国家市场监督管理总局发布的 BJS 201904《食品中多种动物源性成分检测 实时荧光 PCR 法》，不涉及鸡鸭源性成分的鉴定。农业部颁发的农业标准 NY/T 3002-2016《饲料中动物源性成分检测 显微镜法》适用于饲料原料以及畜禽饲料中陆生动物肉骨粉和鱼粉的显微镜定性检测，不涉及鸡鸭源性成分的鉴定。

由国家标准化管理委员会，国家质量监督检验检疫总局发布的国家标准

GB/T 21103-2007 《动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法 实时荧光PCR 方法》适用于动物源性饲料中哺乳动物源性成分的定性检测，不能准确特异的区分肉及肉制品种的鸡鸭源性成分。

本标准编写参考了上述标准的部分内容，并进行了补充后完成。

六、标准中涉及到任何专利情况

无

七、预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议

本标准的制定，将会进一步规范市场，维护食品行业、消费者的利益，保证肉制品的质量安全，为监管部门提供参考依据，同时也能提高畜禽肉及肉制品抽检合格率，保障广大消费者的身体健康。

本标准经批准、发布实施后，拟请标准牵头管理部门进行宣贯，参与本标准的企业应按照要求实施，食品经营服务企业应按照本标准进行畜禽肉及肉制品中鸡鸭源性成分的鉴定。政府监管部门参照该标准对畜禽肉及肉制品中鸡鸭源性成分的检测等操作过程进行监管。

八、其他应说明的事项

无