

菲律宾蛤仔及其制品的 Taqman 荧光 PCR 鉴定方法

刘淑艳¹, 万超¹, 尹祺², 杨宇¹, 蒋丹^{3*}

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 大连机场出入境检验检疫局, 大连 116000;
3. 大连海洋大学, 大连 116023)

摘要: **目的** 建立菲律宾蛤仔成分 Taqman 荧光 PCR 定性检测方法。**方法** 根据菲律宾蛤仔线粒体细胞色素氧化酶 CoxI 基因中的保守基因序列设计一对菲律宾蛤仔特异性引物, 通过 Taqman 荧光 PCR 法进行 PCR 扩增反应, 对菲律宾蛤仔成分进行特异性检测。**结果** 该方法的引物对于菲律宾蛤仔成分的特异性良好; 菲律宾蛤仔 DNA 检出限为 0.04 ng/μL, 可达菲律宾蛤仔肉粉质量分数的 0.001%。通过对市售菲律宾蛤仔制品的检测, 该方法可检测出制品中的菲律宾蛤仔成分。**结论** 该检测方法特异性强, 灵敏度高, 能够用于食品中菲律宾蛤仔成分的真实性鉴别。

关键词: 菲律宾蛤仔成分; Taqman 荧光 PCR; Cox I

Taqman fluorescent PCR method for rapid identification of *Ruditapes philippinarum* and its products

LIU Shu-Yan¹, WAN Chao¹, YIN Qi², YANG Yu¹, JIANG Dan^{3*}

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 2. Dalian Airport Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116000, China; 3. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of qualitative detection of *Ruditapes philippinarum* by Taqman fluorescence PCR. **Methods** A pair of *Ruditapes philippinarum* specific primers were designed according to conservative gene sequence in the CoxI gene of the mitochondrial cytochrome oxidase of *Ruditapes philippinarum*. The PCR amplification reaction was carried out by Taqman fluorescence PCR method, and the specificity of the *Ruditapes philippinarum* was tested. **Results** The specificity was good between primers and *Ruditapes philippinarum* DNA. *Ruditapes philippinarum* DNA detection limit was 0.04 ng/μL, which could reach 0.001% of the mass fraction of *Ruditapes philippinarum* meat powder. **Conclusion** This method is highly specific and sensitive, which can be used for the identification of the authenticity of *Ruditapes philippinarum* in the food.

KEY WORDS: *Ruditapes philippinarum* ingredients; Taqman fluorescence PCR; CoxI

1 引言

菲律宾蛤仔是贝壳类海产品, 隶属蛤仔属、帘蛤科,

学名菲律宾蛤仔, 南方俗称花蛤, 辽宁称蚬子, 山东称蛤蜊。菲律宾蛤仔适应性强(广温、广盐)、分布广、离水存活时间长, 是一种适合人工高密度养殖的优良贝类, 是我

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK037)、辽宁出入境检验检疫局科技计划项目(LK04-2016)、国家质检总局质检公益性行业科研项目(201410059)

Fund: Supported by Science and Technology Project of General Administration of Quality Supervision (2013IK037), Science and Technology Project of Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (LK04-2016) and Public Welfare Program of General Administration of Quality Supervision (201410059)

*通讯作者: 蒋丹, 研究员, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: jiangdan66@163.com

*Corresponding author: JIANG Dan, Researcher, Dalian Ocean University, Dalian 110623, China. E-mail: jiangdan66@163.com

国主要海产经济贝类之一^[1-3]。蛤仔属在中国有 2 种, 即菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和杂色蛤仔(*Ruditapes variegata*)^[4]。与菲律宾蛤仔相比, 杂色蛤仔是一种野生种类, 在我国只分布在福建平潭以南地区, 且成熟个体小、售价低^[5]。传统方法可以通过形态学特征对菲律宾蛤仔进行判断, 但是作为近缘物种的 2 种蛤仔在地理分布上有重叠而外表又非常相似, 加工后的冻煮蛤肉和干蛤形态差异更加细微, 传统的形态学特征识别方法存在识别困难与识别错误等问题, 给菲律宾蛤仔育苗养殖、出口创汇带来一定困扰。基因信息快速进化并呈母系遗传的线粒体 DNA 是种群遗传学和进化遗传学的理想研究对象。菲律宾蛤仔与其他近缘物种的序列相似度在 85%~94%之间, 而 *CoxI* 基因序列有较大差异, 目前, 贝类动物的分子检测主要集中于这一序列^[6]。目前, 仅有刘相全等^[7]建立的 2 种蛤仔扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)检测方法, 但是该方法操作繁琐、耗时长, 针对日益增长的杂色蛤出口现状, 尤其进出口检验领域, 亟需一种简捷、灵敏、特异性好的快速检测方法。因此, 建立实时荧光 PCR 法对菲律宾蛤仔进行物种识别、菲律宾蛤仔的物种保护、系统发育研究、菲律宾蛤仔产品出口等领域均具有现实意义。

2 材料与方法

2.1 材料

DP324 海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物公司); DP305 植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物公司); Premix Ex Taq(TaKaRa 中国公司); 琼脂糖(北京沃比森科技有限公司); 引物(上海生工生物公司)。菲律宾蛤仔、杂

色蛤仔、乌蛸蛤、飞蛤、青蛤、紫石房蛤、日本镜蛤、四角蛤、白蛤、车蛤、丽文蛤、波纹巴非蛤、蛭蛸、大竹蛸、长竹蛸、泥蚶、魁蚶、虹光亮樱蛤、凸壳肌蛤、条纹短齿蛤、日本肌蛤、脆壳肌蛤、织纹螺、虾夷扇贝、栉孔扇贝、海湾扇贝、栉江珧、近江牡、长牡蛎、真牡蛎、褶牡蛎、密鳞牡蛎、欧洲牡蛎、澳洲牡蛎、希腊牡蛎、鲫鱼、草鱼、鲤鱼、鳙鱼、玉米、小麦、菲律宾蛤仔制品购于大连各水产市场和超市。

2.2 仪器与设备

7500 Fast PCR 仪(美国 ABI 公司); GelDoc 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

2.3 方法

2.3.1 引物和探针

通过 *Ruditapes philippinarum* *CoxI* 序列的比对分析, 在序列的差异处设计特异性引物。上游引物序列为: 5'-ggttgaacagctctaccctcc-3'; 下游引物序列为: 5'-gctaacatactactacgcaaaa-3'; 探针序列为: 5'-tctcttcacgtaggtggtgtctctcaatt-3'。将设计好的引物在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中, 利用 primer blast 程序选择 nr 数据库, 进行引物的特异性分析, 如图 1 结果所示: 在返回的结果中, 只有 *Ruditapes philippinarum* 的物种能和所设计的引物完全互补结合, 菲律宾蛤仔 *CoxI* 目的片段上游引物、下游引物、探针序列与杂色蛤仔、文蛤、血蚶、青蛤、栉孔扇贝均有较大的差异性, 通过和其他帘蛤科序列比对也无相似性位点, PCR 检测没有检测到完全匹配的其他物种, 证明引物的特异性较好。

菲律宾蛤仔	GGTTGAACAGCTCTACCCTCC GTTCGTCGTCGAATTGGGTTTCATTCAGGTTGTGCTGTGGATTATGTAA
杂色蛤仔TA.T..T..G..T..A..TAGTGC.ATT.CA.....T..G.....A....C.....C.
文蛤TA.T..T.....T..A..TAGTTGAAAA.A.....T...GTAAG...A.....T...
血蚶	..A.....CC.A.....G..T..A..TA.TTGAATC.....C...AC.CCG...A.A...ATA...
青蛤	..G.....TA.T..T..A..T..A..TAAT.GGACT.AC..G.T..GGTA.....A.....T...
栉孔扇贝	..A..G.....T.....TC.TG.TAGTGCAATCGCG..CG.....AGC.T.A..A...ATG.G..
菲律宾蛤仔	TCTCTTCACGTTAGGTGTTGTTCTCTCAATT TTAGCTTCTATTAATTTTGTAACTACTACATCATTG
杂色蛤仔	...T.A..T..T..G..AA.A..A..T..A.....A.....C..T.....GTTT.C
文蛤A..T.....CT.....T...A.GT..GG.....C...ACT.C...AG.TATT.GT
血蚶	G..T.G..TA.T.C...AT.TGG...T..AA..AGG..AT.A.....A.GTG...TTATTAG.
青蛤	...T.A..T..T.....T.....T...CA.GT..GG.....CT.C...GGTCTT.GT
栉孔扇贝	..C.....C...C.....T..C..C...C...GAG..G.A.....A...CA..AGTTATTAAT
菲律宾蛤仔	ATTACTACATCATTGATGCGAACAGGTGTCATGTTAA TTTTGCGTAGTAGTATGTTAGCTTGGT
杂色蛤仔GTTT.C..T..A..G.GG..G..G..AG..T.A..C..GGC...A.....TG....
文蛤	..C...AG.TATT.GT..A..TC...A..T..AGCTT.AG.T..A.CGCCA...T.T.....
血蚶	TG.....TTATTAG.GCA..GTTTTT..GTT.AA.TGC.GA...TTGCCA..T..TAT...G
青蛤	..C...GGTCTT.GT..A..TC.G.A.AGA..TAG...G..A...GT.TCA...C.T.....
栉孔扇贝	..CA..AGTTATTAAT..A...T.CCC..GG..AAC...AGAC.AA.TACC.T.A..C.TC..AG

图 1 菲律宾蛤仔引物、探针特异性

Fig. 1 Specific primers and probe of *Ruditapes philippinarum*.

2.3.2 DNA 模板制备

使用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒, 提取 100 mg 上述样品的总 DNA; 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒, 提取 100 mg 上述植物类样品的总 DNA。

2.4 方法评价

2.4.1 引物的特异性

利用上述引物对菲律宾蛤仔及其他 41 份非菲律宾蛤仔动植物样品 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增。荧光 PCR 反应体系为 20 μ L, 包含 Premix 反应液 10 μ L、模板 DNA 1 μ L、引物探针各 1 μ L、灭菌双蒸水 6 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火延伸 33 s, 40 个循环。

2.4.2 检测灵敏度

将菲律宾蛤仔 DNA 梯度稀释, 进行 DNA 浓度灵敏度实验, 制备成 50、10、1、0.2、0.04、0.008 ng/ μ L 6 个浓度梯度样品; 将鲫鱼肉粉与菲律宾蛤仔肉粉混合配制含菲律宾蛤仔成分质量分数 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 的梯度混合样品, 进行模拟样品灵敏度实验。

2.4.3 方法应用

市售菲律宾蛤仔制品主要为冻煮菲律宾蛤仔肉和干菲律宾蛤仔肉, 收集冻煮菲律宾蛤仔肉 15 份、干菲律宾蛤仔肉 15 份, 利用所建立的 Taqman 荧光 PCR 检测方法测定其菲律宾蛤仔成分。

3 结果与分析

3.1 DNA 质量分析

Nanodrop2000 在 260 nm 和 280 nm 测定样品提取 DNA OD 值, 所有提取 DNA_{260/280} 值均为 1.8~2.0, 表明所有抽提的 DNA 适用于 PCR 检测。

3.2 引物的特异性结果

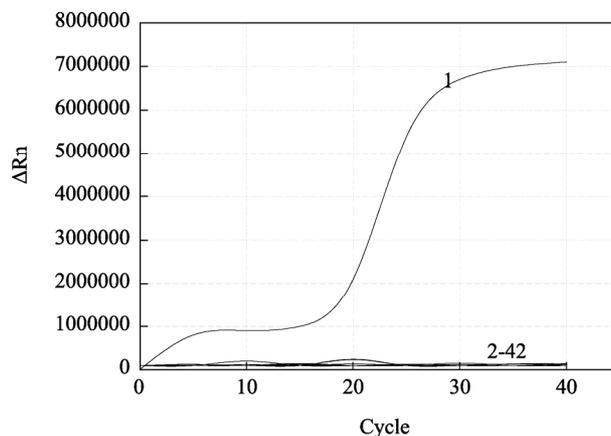
提取菲律宾蛤仔样品和 41 份其他动植物样品 DNA, 以 100 ng DNA 作为模板进行 6 次重复实验, 只有菲律宾蛤仔样本出现显著扩增, 5 次平行反应的 Ct 值为 11.278 \pm 0.52, 同属杂色蛤仔样品、41 种常见其他动植物样品均无明显扩增曲线(图 2)。

3.3 灵敏度检测结果

使用 5 倍梯度稀释的菲律宾蛤仔总 DNA 作为模板进行荧光 PCR 检测, 当 DNA 浓度 \geq 0.04 ng/ μ L 时均可特异扩增, 见图 3, 结果表明菲律宾蛤仔基因组 DNA 检测灵敏度可达 0.04 ng/ μ L。将鲫鱼肉粉与菲律宾蛤仔肉粉配制成质量分数的梯度混合样品进行荧光 PCR 扩增, 浓度 0.001%~10% 样品出现稳定扩增曲线, 结果显示模拟样品检出限可达 0.001% 菲律宾蛤仔肉粉(质量分数), 见图 4。

3.4 市售菲律宾蛤仔制品检测结果

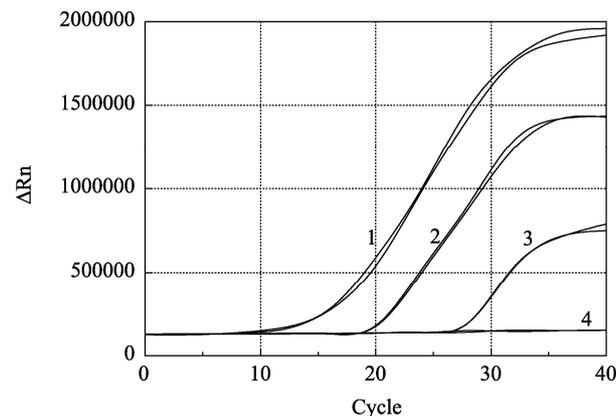
所购冻煮蛤肉和蛤肉干品检测结果见表 1。其中冻煮蛤肉均出现阳性结果, 蛤肉干品有 3 个样品为阴性结果。



1: 菲律宾蛤仔; 2~42: 41 种非菲律宾蛤仔动植物样品

图 2 菲律宾蛤仔引物特异性检测

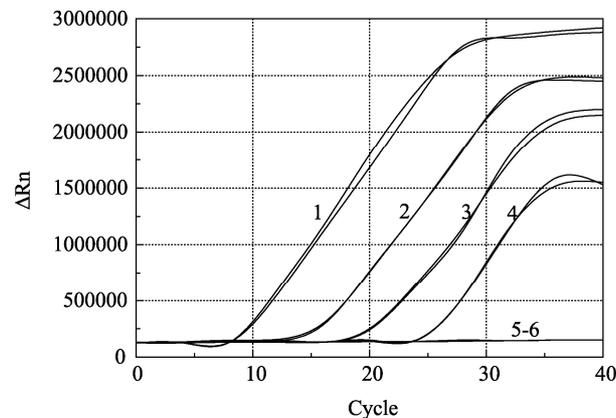
Fig. 2 Specific detection of primers in *Ruditapes philippinarum*



1: 1.0 ng/ μ L 扩增结果; 2: 0.2 ng/ μ L 扩增结果; 3: 0.04 ng/ μ L 扩增结果; 4: 空白对照。

图 3 菲律宾蛤仔 DNA 浓度灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity detection of *Ruditapes philippinarum* DNA



1~5: 质量分别为 1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001% 的扩增结果; 6: 空白对照。

图 4 菲律宾蛤仔模拟样品灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivity detection of *Ruditapes philippinarum* simulated samples

表 1 市售菲律宾蛤仔制品检测
Table 1 Detection of *Ruditapes philippinarum* products

样品品种	样品数量	菲律宾蛤仔源性阳性数量	菲律宾蛤仔源性阳性数量比例(%)
冻煮蛤肉	15	15	100
蛤肉干品	15	12	80

4 结 论

因为以传统学方法较难区分和习惯原因, 出口贸易中通常菲律宾蛤仔也被称为杂色蛤, 给菲律宾蛤仔成品出口带来一定的混淆性, 也给以杂色蛤仔掺假或以次充好提供了一定的条件。本文用 DNA 技术检测菲律宾蛤仔及其他 34 种帘蛤科同科蛤蚶物种, 建立的荧光 PCR 检测方法针对菲律宾蛤仔具有良好的特异性, 可以完全区分菲律宾蛤仔和其他 34 种帘蛤物种, 对近缘的同属的杂色蛤仔也可以甄别检测。

采用 DNA 技术鉴定动物物种是物种识别方法中最为热门也是发展最快的分子技术。实时荧光 PCR 是 DNA 技术鉴定中快捷高效的技术之一, 指在 DNA 扩增反应中, 以荧光化学物质测每次聚合酶链式反应(PCR)循环后 Taqman 探针报告基团荧光强度的方法^[8-12]。而国内目前仍未有使用荧光 PCR 技术进行菲律宾蛤仔成分定性检测的报道, 本研究是国内首次采用荧光 PCR 技术对菲律宾蛤仔成分进行定性检测。

Taqman 荧光 PCR 检测方法相对于染料法灵敏度更高, 兼顾简单方便、特异性好等特点^[13-16]。本研究所建立的菲律宾蛤仔成分 Taqman 荧光 PCR 检测方法具有良好的特异性; 菲律宾蛤仔基因组 DNA 检测灵敏度可达 0.04 ng/μL, 模拟样品灵敏度检测可达 0.001% 菲律宾蛤仔肉粉(质量分数), 满足日常检测的要求。市售实际样品的检测结果表明该方法具有很强的实用性。所选样品菲律宾蛤仔冻煮蛤肉和蛤肉干品, 由于在生产过程中需要经过一系列的复杂精细加工, DNA 受到很大程度的破坏, 相对于传统形态学方法很难鉴别溯源加工后的蛤肉, 荧光 PCR 检测方法可以检测出菲律宾蛤仔成分, 可应用于冻煮蛤肉和蛤肉干品中菲律宾蛤仔成分的鉴定。因此, 本文建立的菲律宾蛤仔 Taqman 荧光 PCR 检测方法可对进出口菲律宾蛤仔制品提供有效的监管手段和技术支撑。

参考文献

- [1] 刘青, 张越, 付鑫, 等. 菲律宾蛤仔的研究进展[J]. 河北渔业, 2011(1): 56-59.
- [2] Wang Q, Zhang L, Yang D, et al. Molecular diversity and evolution of defensins in the manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 47(1): 302-312.
- [3] Nie H, Yan X, Huo Z, et al. Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 229-229.
- [4] 闫喜武, 霍忠明, 张跃环, 等. 菲律宾蛤仔家系的建立及早期生长发育[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 32-40.
- [5] Yan XW, Huo ZM, Zhang YH, et al. Family-establishment and early growth of *Ruditapes philippinarum* [J]. Aquac Fish, 2010, 34(1):32-40.
- [6] 庄启谦. 中国动物志: 软体动物门、双壳纲、帘蛤科[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Zhuang QQ. Fauna sinica: Mollusca, Bivalvia, Veneridae [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] Chen J, Li Q, Kong LF, et al. COI-based DNA barcoding in Tapetinae species (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) along the coast of China [J]. Zool Res, 2010, 31(4): 345-352.
- [9] 刘相全, 包振民, 胡景杰, 等. 两种蛤仔群体遗传多样性的形态参数及 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 359-364.
- [10] Liu XQ, Bao ZM, Hu JJ, et al. Morphological parameters and AFLP analysis of genetic diversity in two species of clam [J]. Chin J Ocean Limn, 2010, 41(3): 359-364.
- [11] Stewart D, Reza Z, Abdelmajid D, et al. A multi-species TaqMan PCR assay for the identification of Asian Gypsy Moths (*Lymantria* spp.) and other invasive *Lymantriines* of biosecurity concern to North America [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160878.
- [12] Guimaraes AM, Vieira RF, Poletto R, et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis* [J]. J Appl Microbiol, 2011, 111(2): 417-425.
- [13] An JH, Noh YH, Kim IE, et al. Development of PCR and TaqMan PCR assays to detect *Pseudomonas coronafaciens*, a causal agent of halo blight of oats [J]. Plant Pathol J, 2015, 31(1): 25-32.
- [14] Swayne RL, Ludiam HA, Shet VG, et al. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo-(class A and D) carbapenemases in *Enterobacteriaceae* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(1): 35-38.
- [15] Wang JZ, Duan R, Liang JR, et al. Real-time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the ail and foxagenes [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(12): 4443-4444.
- [16] Oldal M, Nemeth V, Madai M, et al. Identification of hantavirus infection by western blot assay and TaqMan PCR in patients hospitalized with acute kidney injury [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 79(2): 166-170.
- [17] Mani RS, Madhusudana SN, Mahadevan A, et al. Utility of real-time Taqman PCR for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies

[J]. J Med Virol, 2014,86(10): 1804–1812.

- [15] Marques LM, Amorim AT, Martins HB, *et al.* A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum* [J]. Vet Microbiol, 2013, 167(3–4): 670–674.
- [16] Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, *et al.* Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(4): 352–356.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘淑艳, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为分子生物学、毒理学。
E-mail: liushuyan05@163.com



蒋丹, 博士, 研究员, 主要研究方向为分子生物学。
E-mail: jiangdan66@163.com