

TaqMan 荧光 PCR 法快速检测太平洋鳕鱼源性成分

万超*, 王雷, 王贵滨, 杨宇
(大连海关技术中心, 大连 116001)

摘要: **目的** 建立 TaqMan 荧光 PCR 法检测太平洋鳕鱼源性成分的方法。**方法** 以太平洋鳕鱼线粒体细胞色素氧化酶 CoxI 检测靶标, 设计特异性引物和探针, 进行特异性和灵敏度试验, 并对市售样品进行检测。**结果** 该方法引物探针特异性和灵敏度较好, 可以良好区分近属鳕鱼和其他科鱼类, 灵敏度达到 0.04 ng/μL。市售样品中, 90.9% 太平洋鳕鱼切片及 71.4% 太平洋鳕鱼罐头中检出太平洋鳕鱼成分。**结论** 该方法的特异性和灵敏度较好, 适合用于大多数制品中太平洋鳕鱼成分的真实性甄别。

关键词: CoxI; 荧光 PCR; 太平洋鳕鱼

Rapid identification of *Gadus macrocephalus* source components by TaqMan fluorescent PCR

WAN Chao*, WANG Lei, WANG Gui-Bin, YANG Yu
(Technology Centers of Dalian Customs, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of rapid identification of the authenticity of *Gadus macrocephalus* source components by TaqMan fluorescent PCR. **Methods** Targets were detected by *Gadus macrocephalus* mitochondrial cytochrome oxidase CoxI, specific primers and probes were designed, specificity and sensitivity tests were performed, and commercially available samples were tested. **Result** The primers of this method had good specificity and sensitivity, and could well distinguish between *Gadus macrocephalus* and other species of fish, with a sensitivity of 0.04 ng/μL. Among the commercially available samples, *Gadus macrocephalus* were found in 90.9% of *Gadus macrocephalus* slices and 71.4% of *Gadus macrocephalus* canned food. **Conclusion** The method has good specificity and sensitivity, which is suitable for the authenticity screening of *Gadus macrocephalus* components in most products.

KEY WORDS: CoxI; TaqMan real-time fluorescence PCR; *Gadus macrocephalus*

1 引言

太平洋鳕鱼(*Gadus macrocephalus*), 俗称大头鳕, 隶属于鳕形目(Gadiformes)、鳕科(Gadidae)、真鳕属

(*Gadus*)^[1-3]。太平洋鳕鱼, 是冷水性底层鱼类, 主要分布于太平洋北部沿岸海域。在我国, 太平洋鳕主要产于黄海, 是我国重要的海洋经济鱼类, 具有极高的经济价值, 长期出口加拿大、冰岛、挪威等国家^[4,5]。鳕形目形态学差异较

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金(20170520126)

Fund: Supported by Liaoning Doctoral Research Initiation Fund (20170520126)

*通讯作者: 万超, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物学、物种鉴定。E-mail: 656596961@qq.com

*Corresponding author: WAN Chao, Ph.D, Senior Engineer, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.60, Changjiangdong Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: 656596961@qq.com

小, 很多同属鱼类十分相似, 以传统方法很难准确区分鉴别。太平洋鲑鱼作为 3 种“真鲑”之一, 因为价格远高于其他属鲑鱼, 经常被其他鱼类假冒销售^[6,7]。同时, 太平洋鲑鱼作为产量第二大的真鲑, 因其营养丰富, 食用价值高, 常被加工成鲑鱼罐头、冷冻切片、鱼肝油等制品, 以致其真伪更加难以甄别^[8-12]。因此需要一种灵敏、特异性高的太平洋鲑鱼成分鉴定方法。

目前, 鲑鱼的鉴别方法, 主要有 DNA 条码法、限制性片段长度多态性聚合酶链式反应、形态学法、PCR 检测和实时荧光 PCR 检测、环介导等温扩增法等方法^[13-15]。高天翔等^[15]以传统的形态学法对 4 种经济鲑鱼进行比较区分, 大西洋鲑和太平洋鲑在第 1 臀鳍鳍条数、鳃耙数等性状上的差异不明显, 导致鉴定结果易混淆; 李丞等^[14]利用微卫星引物, 对太平洋鲑基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 其中 Gmo37 在大西洋鲑和太平洋鲑中扩增出的条带的长度差异明显, 但 PCR 方法灵敏度较低; 王敏等^[13]以 DNA 条码法鉴定超市所售大西洋真鲑鱼片, 其成分实为马舌鲈, 但 DNA 需获得大量物种样本, 并对其进行测序分析比对, 工作量较大、耗时较长。TaqMan 荧光 PCR 法, 区别于普通 PCR 和荧光染料检测方法, 主要通过荧光标记的特异性探针, 对 PCR 扩增过程进行实时监控, 结合相应的软件可以对产物进行分析, 计算待测样品模板的初始浓度。该方法相比 DNA 条码、常规形态学检测方法, 具有耗时短、准确度高、特异性好等特点, 在物种鉴定领域有着广泛应用^[16,17]。

本研究建立了 TaqMan 荧光 PCR 法快速鉴别太平洋鲑鱼真伪的方法, 以期对太平洋鲑鱼制品的监管提供更灵敏便捷的方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

太平洋鲑、黄线狭鲑、黑线鲑、绿青鲑、大西洋鲑、北太平洋无须鲑、南蓝鲑、细鳞壮鲑、大黄鱼、红鱼、大泷六线鱼、大西洋蓝枪鱼、银枪鱼、蓝鳍金枪鱼、中国花鲈、条纹四鳍旗鱼、蓝鳍红娘鱼拟庸鲈、大菱鲆、舌头鱼、

多宝鱼、黄盖鲽、牙鲆、太平洋鲱、大西洋鲑、大马哈鱼、黑点褐胸鲱、日本鳗、双髻鲨、高鳍真鲨、鲫鱼、草鱼、鲤鱼、鳙鱼, 非鱼类样品绿豆、大豆、玉米、小麦、大米等购于大连各超市和水产市场; 小体鲟、史氏鲟、达氏鲟、欧鳇、俄罗斯鲟、西伯利亚鲟采集于北京市水产科学研究所鲟鱼繁育基地。

引物由上海生工生物公司合成; D0065S 动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(PCR 分析用)(生工生物工程(上海)股份有限公司); DP3111 新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物有限公司); Premix Ex Taq(宝生物工程(大连)有限公司)。

2.2 仪器与设备

LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪(瑞士豪夫迈·罗氏公司); Viscotek 全自动凝胶成像分析系统(英国马尔文仪器有限公司); Quick Drop 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 DNA 提取

取 100mg 鱼、肉类样品, 用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒进行 DNA 提取; 取 100mg 植物类样品, 以新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

2.3.2 引物设计

GenBank 获得太平洋鲑及其他物种 CoxI 序列, 通过 Mega4 比对分析, 根据引物、探针差异性原则设计特异性引物(图 1)。序列如下: 上游引物: 5'-CGGCTCTCTAATTC TCTAATGGC-3'; 下游引物: 5'-CACCCGTGGAGTCA CT CAAC-3'; 探针: FAM-5'- TGAGAAGCCTTCGCTGCCAA ACGG-3'-TAMRA

2.3.3 特异性实验

以上述引物、探针对提取的样品 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 10 s、60 °C 延伸 20 s, 40 个循环。反应体系总体积 20 μL, 具体为模板 DNA 1 μL、Premix 反应液 10 μL、探针 1 μL、上下游引物各 1 μL、灭菌双蒸水 6 μL。

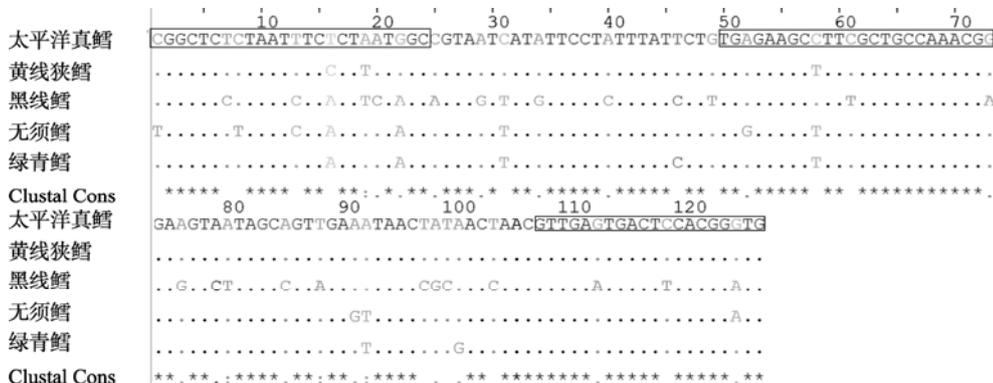


图 1 太平洋鲑鱼特异性引物设计。

Fig.1 Specific primers for *Gadus macrocephalus*

2.3.4 灵敏度实验

以无菌双蒸水稀释太平洋鲑鱼 DNA(浓度为 100 ng/ μ L)梯度稀释至浓度 25、5、1、0.2、0.04、0.008 ng/ μ L, 进行灵敏度检测实验。

2.3.5 市售样品的检测实验

购置太平洋鲑鱼市售太平洋鲑鱼制品冻切片 22 份, 明太鱼样品(黄线狭鳕)15 份, 太平洋鲑鱼肝油 6 份, 太平洋鲑鱼罐头 14 份, 检测其是否含有太平洋鲑鱼成分。

3 结果与分析

3.1 DNA 质量分析

用 QuickDrop 超微量分光光度计测定样品中提取 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 其值为 1.8~2.0, 表明样品提取的 DNA 质量满足 PCR 检测要求。

3.2 引物的特异性结果

以 10 ng 太平洋鲑鱼、鲑鱼科其他鱼类、其他常见动植物 DNA 作为模板进行 6 次荧光 PCR 重复实验, 扩增曲线如图 2 所示。太平洋鲑鱼样本出现明显扩增曲线, 平行反应的 Ct 值为 14.327 \pm 0.104, 5 份黄线狭鳕、北太平洋无须鳕、黑线鳕等同属鲑鱼样品和 44 种常见其他动植物样品均无明显扩增曲线, 证明本文所建立的太平洋鲑鱼荧光 PCR 法引物针对太平洋鲑鱼成分具有良好的特异性。

3.3 灵敏度检测结果

对太平洋鲑鱼总 DNA 进行 5 倍梯度稀释, 选取 25、5、1、0.2、0.04、0.008 ng/ μ L 浓度作为模板进行荧光 PCR 检测, 扩增曲线如图 3 所示, 当 DNA 浓度 \geq 0.04 ng/ μ L 时均可特异扩增, 说明太平洋鲑鱼基因组 DNA 检测灵敏度可达 0.04 ng/ μ L。

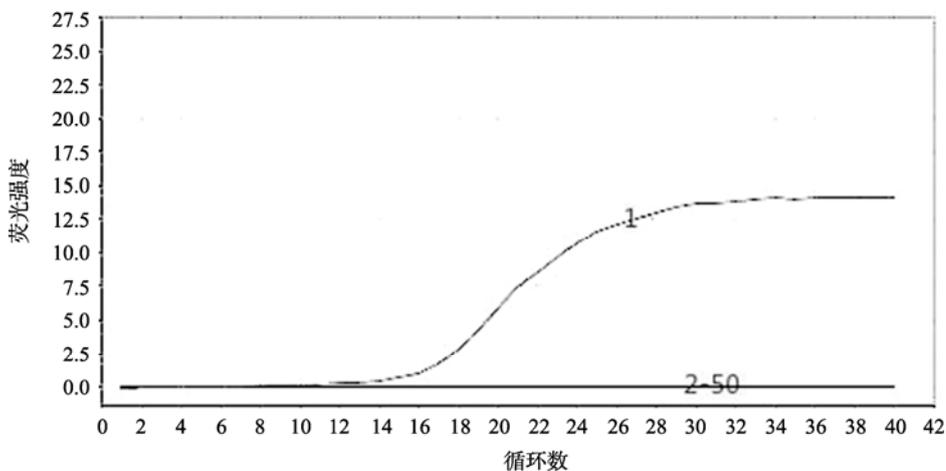


图2 太平洋鲑鱼引物特异性检测

Fig.2 Detection of specificity of primers for *Gadus Macrocephalus* amplification curve.

注: 1.太平洋鲑鱼; 2. 黄线狭鳕; 3、北太平洋无须鳕; 4、绿青鳕; 5、黑线鳕; 6、南蓝鳕; 7、细鳞壮鳕; 8、太平洋鲑鱼; 9、黑鳕; 10 空白对照; 11-50.非鳕形目动植物样品。

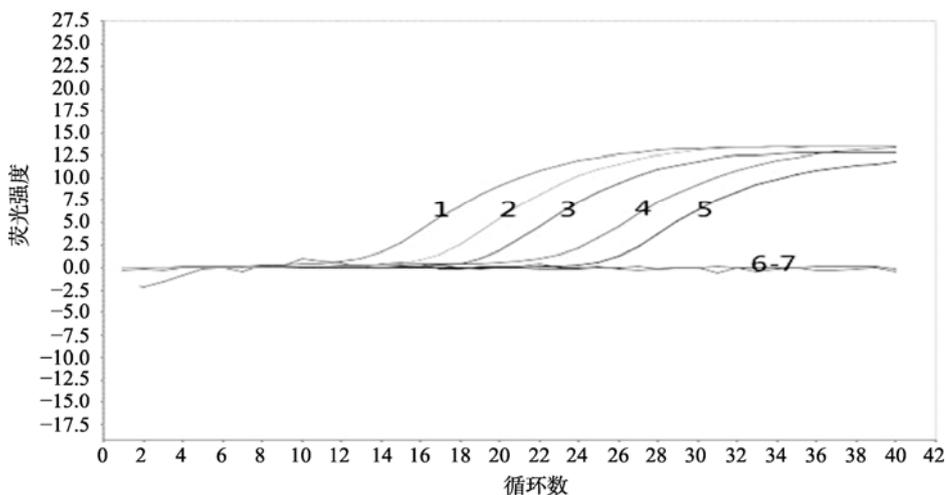


图3 太平洋鲑鱼 DNA 浓度灵敏度检测

Fig.3 Sensitivity detection of *Gadus Macrocephalus* DNA

注: 1. 25 ng/ μ L 扩增曲线; 2. 5 ng/ μ L 扩增曲线 3. 1 ng/ μ L 扩增曲线; 4. 0.2 ng/ μ L 扩增曲线; 5. 0.04 ng/ μ L 扩增曲线; 6. 0.008 ng/ μ L 扩增曲线; 7.空白对照。

3.4 市售太平洋鲑鱼制品检测结果

所购市售鲑鱼制品的检测结果显示如表 1 所示。90.9% 的太平洋鲑鱼切片样品及 71.4% 的太平洋鲑鱼罐头样品中检测出了太平洋鲑鱼成分, 太平洋鲑鱼鱼肝油和黄线狭鳕样品没有扩增曲线出现。说明市售太平洋鲑鱼切片样品绝大多数含有太平洋鲑鱼成分, 部分切片和罐头样品不含太平洋鲑鱼成分, 存在掺假可能。

表 1 市售鲑鱼制品的太平洋鲑鱼源性检测
Table 1 *Gadus Macrocephalus* source detection of commercially available *Gadus Macrocephalus* products

样品品种	数量/个	太平洋鲑鱼阳性 样品数量/个	太平洋鲑鱼阳性 样品比例/%
太平洋鲑鱼冻切片	22	20	90.9
黄线狭鳕	15	0	0
太平洋鲑鱼肝油	6	0	0
太平洋鲑鱼罐头	14	10	71.4

4 结 论

太平洋鲑鱼肉质鲜嫩、蛋白质含量非常丰富, 是消费者钟爱的优质鱼类。因其刺少、富含 DHA, 也是儿童辅食的黄金选择, 但是因其价格昂贵, 掺假销售时有发生。

本研究建立的太平洋鲑鱼实时荧光 PCR 法能特异性区分太平洋鲑鱼和其他近源物种, 为解决长期以来太平洋鲑鱼被以次充好、混杂销售等难题提供有效的监管支撑。该方法特异性好、检测灵敏度高, 检出限达到 0.04 ng/ μ L, 且该方法具有良好的实用性。

本研究中鱼肝油样品没有扩增曲线出现, 并不能说明所有样品均为掺假商品, 也可能由于鲑鱼肝油需要经过的复杂提取加工工艺, 影响了 DNA 靶标质量等原因, 因此未来需要建立适合鲑鱼肝油中太平洋鲑鱼成分测定的方法。

参考文献

- [1] 薛长湖, 宋雨, 徐杰, 等. 太平洋鲑鱼脑中硫苷脂的分离纯化和分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(10): 51-56.
Xue CH, Song Y, Xu J, et al. Isolation, purification and analysis of thioglycosides from Pacific cod brain [J]. J China Ocean Univ (Nat Sci Ed), 2014, 44(10): 51-56.
- [2] 尚可. 鲑鱼的真相[J]. 海洋世界, 2014, (1): 38-43.
Shang K. The truth of squid [J]. Ocean World, 2014, (1): 38-43.
- [3] 郝涤非. 鲑鱼加工工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, (4): 129-132.
Hao DF. Processing technology of cod [J]. Food Res Dev, 2008, (4): 129-132.
- [4] 林景祺. 狭鳕等三种鲑鱼生态和资源[J]. 海洋科学, 1994, (2): 25-29.
Lin JQ. Ecology and resources of three species of squid [J]. Marin Sci, 1994, (2): 25-29.
- [5] 杜君立. 鲑鱼秘史[J]. 企业观察家, 2018, (8): 112-113.

- [6] Du JL. Secret history of squid [J]. Bus Observ, 2018, (8): 112-113.
- [6] 佚名. 鲑鱼名不符实, 当心买到冒充油鱼[J]. 中国食品, 2018, (14): 164-165.
Anonymous. Cod is not named properly, be careful to buy fake oil fish [J]. Chin Food, 2018, (14): 164-165.
- [7] 李栋. 鲑鱼市场乱象全景揭秘[J]. 农村.农业.农民(B 版), 2016, (7): 27-28.
Li D. The squid market chaos panorama reveals [J]. Rur Agric Farm (B Ed), 2016, (7): 27-28.
- [8] Taboada L, SánchezA, Pérez-MartínRI, et al. A new method for the rapid detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*Gadus macrocephalus*), Alaska pollock (*Gadus chalcogrammus*) and ling (*Molva molva*) using a lateral flow dipstick assay [J]. Food Chem, 2017, (233): 182-189.
- [9] Nakamura T, Tanaka T, Kimura O, et al. Comparison of radiocesium and stable isotope ratios of carbon and nitrogen among three stocks of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) around Hokkaido, Japan [J]. Marin Pollut Bull, 2018, (127): 39-44.
- [10] Peng Z, Hou H, Zhang K, et al. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats [J]. Food Chem, 2017, (221): 373-378.
- [11] Biyang H, Bing C, Mingguang M, et al. Molecular characterization and expression analysis of the interleukin 1b gene in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) [J]. Dev Comp Immunol, 2018, (88): 213-218.
- [12] Cunningham KM, Canino MF, Spies IB, et al. Genetic isolation by distance and localized fjord population structure in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*): Limited effective dispersal in the northeastern Pacific Ocean [J]. Canadian J Fish Aquat Sci, 2009, 66(1): 153-166.
- [13] 王敏, 刘莹, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 247-251.
Wang M, Liu Z, Huang H, et al. Application of DNA barcode technology in identification of fish and meat products in Shenzhen [J]. Food Sci, 2015, 36(20): 247-251.
- [14] 李丞, 刘芳, 张柏桥, 等. 大西洋鳕卫星引物对太平洋鳕的适用性[J]. 水产科学, 2010, 29(4): 217-220.
Li C, Liu F, Zhang BQ, et al. Applicability of Atlantic cod microsatellite primers to Pacific cod [J]. Aquat Sci, 2010, 29(4): 217-220.
- [15] 高天翔, 武云飞, 张秀梅, 等. 四种鲑鱼的形态学研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2002, (6): 884-890.
Gao TX, Wu YF, Zhang XM, et al. Morphological studies of four species of cod [J]. J Qingdao Ocean Univ (Nat Sci Ed), 2002, (6): 884-890.
- [16] Worlock A, Blair D, Hunsicker M, et al. Analytical characteristics and comparative evaluation of Aptima HCV quant Dx assay with the Abbott RealTime HCV assay and Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV quantitative test v2.0 [J]. Virol J, 2017, 14(1): 66.
- [17] Ogawa E, Furusyo N, Murata M, et al. Comparison of the Abbott RealTime HCV and Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV assays for the monitoring of sofosbuvir-based therapy [J]. Antivir Ther, 2016, 22(1): 46-50.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



万 超, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物学、物种鉴定。
E-mail: 656596961@qq.com