

基于物种特异性 PCR 技术检测鱼糜中白鲢成分

宋春萍, 林 洪*

(中国海洋大学食品学院, 青岛 266003)

摘要: 目的 建立一种基于物种特异性引物 PCR 测定混合鱼糜中白鲢鱼糜成分的快速检测方法。**方法** 根据 NCBI 数据库中白鲢小清蛋白特异性较强的 DNA 序列位置设计引物进行 PCR 实验, 通过测序得到了白鲢小清蛋白 DNA 的一段内含子序列, 在此基础上设计了白鲢的特异性引物。提取样品 DNA 后进行 PCR 实验, 产物经 2% 琼脂糖电泳分析进行引物特异性验证。**结果** 在白鲢小清蛋白内含子位置设计的白鲢特异性引物, 对巴沙鱼、铜盆鱼等 8 种鱼具有很强的物种特异性, 可以实现对这 9 种鱼的混合鱼糜中白鲢成分的定性检测, 且方法灵敏度为 1%。**结论** 本方法无需测序, 能够快速、准确检测鱼糜中白鲢成分。

关键词: 白鲢; 内含子; 特异性引物; PCR; 分子鉴别

Detection of hypophthalmichthys molitrix in surimi by species-specific PCR

SONG Chun-Ping, LIN Hong*

(College of Food Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid detection of composition of hypophthalmichthys molitrix (silver carp) in the mixed surimi raw materials based on species-specific primer PCR. **Methods** Primers were designed based on the position of the DNA sequence specific to the parvalbumin of silver carp in the NCBI database, and an intron sequence of the DNA was determined by sequencing. On this basis, specific primers for parvalbumin of silver carp were designed. At last, the genomic DNA was extracted and subjected to PCR experiments, and the product was analyzed by 2% agarose electrophoresis. **Results** The silver carp -specific primers designed in the intron of the silver carp parvalbumin had strong species specificity for 8 species of fish such as basha fish and copper pot fish. Qualitative detection of silver carp in 9 kinds of mixed surimi could be achieved and the method sensitivity was 1%. **Conclusion** The method can detect the silver carp components in surimi raw materials quickly and accurately without PCR product sequencing.

KEY WORDS: hypophthalmichthys molitrix; intron; specific primer; polymerase chain reaction; molecular authentication

基金项目: 中央高校基本科研业务项目(201762004)、现代农业产业技术体系国家海水鱼体系项目(CARS-47-G28)

Fund: Supported by Basic Research Business Fees of Central Colleges and Universities (201762004) and the National Marine Fish System of China Agriculture Research System (CARS-47-G28)

*通讯作者: 林洪, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lnhong@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LIN Hong, Professor, School of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China. E-mail: lnhong@ouc.edu.cn

1 引言

白鲢(*hypophthalmichthys molitrix*),属于鲤形目鲤科鲢属,是著名的四大家鱼之一。作为人工饲养的大型淡水鱼,白鲢生长快、疾病少、产量高,因此为我国主要的淡水养殖鱼类之一^[1]。

近几年,我国鱼糜及其制品产业发展迅速,市场规模不断扩大,国内现有的鱼糜制品生产厂家已发展到 400 余家,鱼糜原料生产厂家约 50 余家,行业产值规模超过 200 亿元^[2]。鱼糜制品产业不断发展的同时,海水鱼糜原料质量呈现出了下降的趋势,这使得许多工厂为了提高海水鱼糜的白度和弹性同时降低成本,在海水鱼糜中大量掺杂白鲢等淡水鱼糜。由于原料品种直接影响着鱼糜制品成本的高低,而直接通过外在的形态特征无法判断冷冻鱼糜原料组成,因此这一行为严重影响了鱼糜制品企业的利益和消费者的知情权。

目前仍无成熟统一的行业标准和国家标准来评定鱼糜品种、是否掺假及其优劣^[3],现有的行业标准和国家标准主要是针对陆源性动物类肉制品(如鸡鸭驴猪牛羊等)原料的检测^[4-6],与陆源性动物类肉制品相比,鱼糜中各原料成分之间的亲缘关系更为相近,分辨的难点也更大。基于核酸分子学水平的动物成分定性检测技术大多选择线粒体基因作为靶基因^[7],尤其是 *COI* 基因作为公认的 DNA 条形码^[8],但是选择线粒体基因进行定性检测需结合产物序列比对步骤,因此并不适用于设计特异性引物。

小清蛋白(parvalbumin, PRVBs)是分子量在 11~14 kDa 范围内的维持细胞内钙离子交换的钙结合蛋白,在鱼类、两栖类和脊椎动物的肌肉中广泛分布,在肌肉的舒张运动中起着重要作用。由于小清蛋白一级结构高度可变^[9],具有物种特异性^[10],已有不少研究将小清蛋白用于鱼种类鉴别,比如韩建勋等^[11]以鱼类小清蛋白基因为靶标,设计了多宝鱼在内的 8 种鱼的通用引物以及特异性探针,利用可视芯片技术建立了一种鱼肉品种的高通量快速检测方法;Carrera 等^[12]通过监测小清蛋白特征肽段,对来自 10 种商业鳕鱼产品的蛋白质提取物进行了验证。

因此本研究针对白鲢以及鲛鱼、巴沙鱼、带鱼、卵形鲳鲷(金鲳)、鲤鱼、小黄鱼、狭鳕、真鲷(铜盆鱼)这 9 种常用鱼糜原料鱼种,利用 NCBI 数据库中现有的白鲢的小清蛋白的基因作为靶基因,基于物种特异性 PCR 技术建立直接、有效、准确的 DNA 检测方法,实现对鱼糜原料中的白鲢成分进行快速定性检测,在企业收购鱼糜的过程中,作为质量控制的依据,保障消费者和企业权益;同时也可以监管部门规范行业秩序及标签标注监管方面发挥作用,为原料品种鉴定提供理论依据和技术支持。食品成分的真实性是食品质量安全的重要内涵,本研究也为其他混合食品原料组分检测奠定了理论基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Thermal cycler T960(力康生物医疗科技控股有限公司); BHS-2 数显恒温水浴锅(上海凌托仪器设备有限公司); Model 491 Prep Cell 基础型电泳仪电源、Universal Hood II 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); Sigma1-14k 小型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); Nanodrop One 超微量分光光度计(美国赛默飞公司)。

海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(DP324,北京天根生化科技有限公司); Taq PCR Mix 预混液[2X,含红染料,生工生物工程(上海)股份有限公司]; TAE 缓冲液(50×,北京索来宝科技有限公司); 高纯度低电渗琼脂糖(北京擎科新业生物技术有限公司); 无水乙醇(分析纯,国药集团); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 基因组 DNA 提取

使用海洋动物基因组提取试剂盒提取鱼类基因组 DNA,测定 DNA 浓度后于-20 °C 保存。

2.2.2 DNA 含量的测定

使用 Nanodrop 对提取的基因组 DNA 浓度进行测定,且 A_{260}/A_{280} 应在 1.8~2.0 之间^[13]。

2.2.3 靶基因的选择及特异性引物设计

以 NCBI 中白鲢小清蛋白基因序列(GenBank: FJ216937.1)为靶基因,利用引物设计软件 primer premier 6.0 进行引物设计。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2.4 PCR 扩增体系及条件

PCR 扩增体系为 50 μ L,内含 Taq PCR Master Mix 25 μ L,上游引物(10 μ mol/L) 2 μ L,下游引物(10 μ mol/L) 2 μ L, DNA 模板 100 ng,用灭菌蒸馏水补足体系。反应参数:94 °C 变性 4 min,进行 35 次循环扩增反应(94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s),72 °C 延伸 10 min,PCR 产物于 4 °C 暂存。

2.2.5 引物特异性及模板验证验证

在 NCBI 数据库中,利用 primer blast 工具进行引物的特异性分析。

以白鲢、巴沙鱼、鲛鱼、带鱼、鲤鱼、金鲳、小黄鱼、狭鳕以及铜盆鱼糜组织提取的 DNA,用白鲢特异性引物以及 18s 引物分别进行 PCR 反应,经 2%的琼脂糖电泳进行引物特异性验证以及模板验证。

2.2.6 检测灵敏度

制备白鲢鱼糜质量分数分别为 0.1%、1%、5%、10% 的混合鱼糜样品,进行检测灵敏度实验。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取

从 9 种鱼中提取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0 范围内, 证明所有提取的 DNA 适用于 PCR 检测。

3.2 特异性引物设计

由于除白鲢、狭鳕、铜盆鱼外, 数据库中并无其他鱼小清蛋白序列的记录, 因此无法直接通过序列比对的方式确定白鲢特异性引物。因此本研究以 NCBI 中白鲢小清蛋白基因序列(GenBank: FJ216937.1)为模板, 在特异性较强

的碱基序列的位置上, 利用引物设计软件 primer premier 6.0 设计了引物 0522 HYP1, 序列如表 1。

以白鲢、巴沙鱼等 8 种鱼的 DNA 为模板, 进行 PCR 实验。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳分析, 电泳结果如图 1。

如图 1 结果所示, 引物 0522 HYP1 对巴沙鱼和鲤鱼是非特异的, 且 PCR 产物均大于 200 bp, 与预期产物大小 158 bp 不一致, 这可能是由于 PCR 产物中间包含一段白鲢小清蛋白的内含子, 需进行测序验证。对白鲢的 0522HYP1 的 PCR 产物进行测序, 并将测序结果使用 Nucleotide BLAST 与原模板序列(GenBank: FJ216937.1)进行比对, 结果如图 2。

表 1 引物 0522 HYP1 序列、引物 0823-2 序列、引物 0823-18s 序列
Table 1 Sequence of 0522HYP1, 0823-2 and 0823-18s

| 引物名称 | | 碱基序列(5'to3') | 引物长度/bp | 产物大小/bp |
|-----------|----|------------------------|---------|---------|
| 0522 HYP1 | 正向 | CCAGGACAAGAGCGGCTTCA | 20 | 158 |
| | 反向 | CGGCGAACTCATCAACTCCAAT | 22 | |
| 0823-2 | 正向 | CTCAAGTAAGTCCGGTCTT | 19 | 203 |
| | 反向 | CGAACTCATCAACTCCAATC | 20 | |
| 0823-18s | 正向 | CAGATACCGTCGTAGTTCC | 19 | 205 |
| | 反向 | GTTTCCCGTGTGAGTCA | 18 | |



注: 1~8 分别为白鲢、巴沙鱼、鲮鱼、带鱼、鲤鱼、金鲳、小黄鱼、狭鳕鱼; B 为空白对照。

图 1 引物 0522HYP1 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR product of primer 0522HYP1

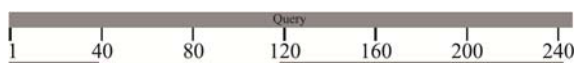


图 2 0522HYP1 产物与原模板序列比对结果

Fig.2 Sequence comparison of 0522HYP1 product with the original template

通过序列比对可知, 40~122 bp 的序列未与模板序列匹配, 分析原因认为这是一段白鲢小清蛋白的内含子序列。Hildebrandt 等^[14]研究表明小清蛋白基因由不同的基因

亚型编码, 即包含相同数量的外显子, 但是内含子的核苷酸长度、碱基组成不同。因此可以认为小清蛋白 DNA 序列中的内含子的物种特异性更强, 于是以之前测序结果为基础, 在含内含子序列的位置设计了白鲢的特异性引物 0823-2, 引物序列见表 1。

同时, 根据金鲳的 18s rRNA 基因(GenBank: KY014076.1)设计了引物 0823-18s, 用于模板验证, 引物序列见表 1。

3.3 引物特异性验证

3.3.1 Primer-BLAST 验证

在 NCBI 中, 通过 Primer-BLAST 工具进行数据库内引物特异性验证, 选择 nr 数据库^[11], Organism 中输入 Teleostei, 结果如图 3, Primer-BLAST 没有检测到与引物 0823-2 完全匹配的其他鱼种, 因此可以认为在数据库的范围内, 引物 0823-2 是特异的。

3.3.2 引物特异性验证及模板验证

在退火温度为 55 °C, 30 个循环的条件下进行 PCR, 产物经 2% 琼脂糖电泳分析, 进行引物特异性验证及模板验证。引物 0823-2 和 0823-18s 核酸电泳结果分别为图 4 和图 5, 0823-2PCR 产物与模板序列比对结果如图 6。

图 5 表明 9 种鱼 DNA 模板没有问题。由图 4 可知, 白鲢特异性引物 0823-2 对巴沙鱼、鲮鱼、带鱼、鲤鱼、金鲳、小黄鱼、狭鳕以及铜盆鱼是特异的, 可以实现对这 8 种混合鱼糜中的白鲢成分的定性检测。

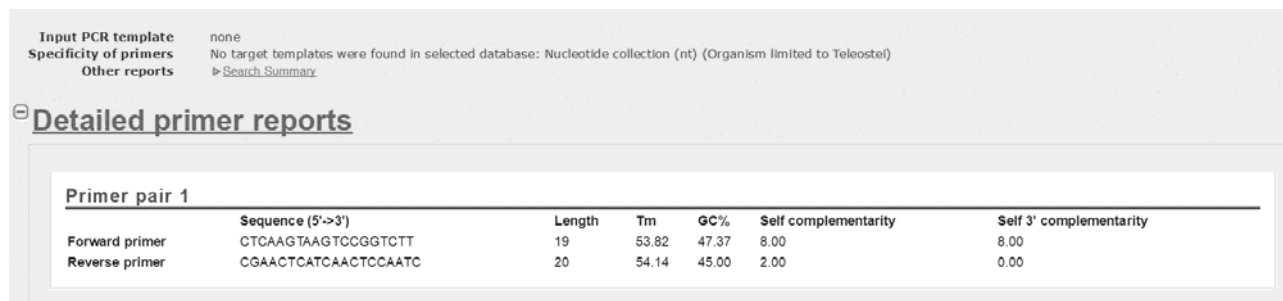
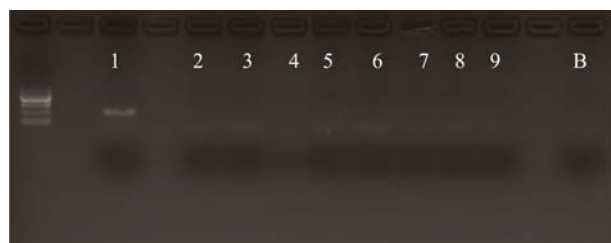


图 3 引物 0823-2 的 Primer-BLAST 结果

Fig.3 Primer-BLAST result of 0823-2



注: 1~9 分别为白鲢、巴沙鱼、鲮鱼、带鱼、鲤鱼、金鲳鱼、小黄鱼、狭鳕鱼、铜盆鱼; B 为空白对照。

图 4 引物 0823-2 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products



注: 1-9 分别为白鲢、巴沙鱼、鲮鱼、带鱼、鲤鱼、金鲳、小黄鱼、狭鳕、铜盆鱼; B 为空白对照。

图 5 引物 0823-18s PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of PCR products

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|---------------|-----------|-----------|
| 375 bits(203) | 5e-109 | 203/203(100%) | 0/203(0%) | Plus/Plus |
| Query 2 | CTCAAGTAAGTCCGGTCTTAAATCACTTTTTACTGGTTCAAACCTGGAACAATTCTTGA | 61 | | |
| Sbjct 190 | CTCAAGTAAGTCCGGTCTTAAATCACTTTTTACTGGTTCAAACCTGGAACAATTCTTGA | 249 | | |
| Query 62 | GGTTGATTGTTTGCTTGTGCTCTTCAGACTGTTCTCTGCTGGTGCCAG | 121 | | |
| Sbjct 250 | GGTTGATTGTTTGCTTGTGCTCTTCAGACTGTTCTCTGCTGGTGCCAG | 309 | | |
| Query 122 | GGCACTCACTGATGCAGAGACAAAGGCCTTCTTGAAAAGCTGGAGACTCTGATGGTGATGG | 181 | | |
| Sbjct 310 | GGCACTCACTGATGCAGAGACAAAGGCCTTCTTGAAAAGCTGGAGACTCTGATGGTGATGG | 369 | | |
| Query 182 | CAAGATTGGAGTTGATGAGTTCG | 204 | | |
| Sbjct 370 | CAAGATTGGAGTTGATGAGTTCG | 392 | | |

图 6 引物 0823-2 PCR 产物与模板序列 BLAST 结果

Fig.6 Result of nucleotide BLAST of PCR products

3.4 PCR 条件优化

对循环数、退火温度以及初始模板量这 3 组 PCR 条件进行优化, 结果如图 7, 最终确定 PCR 条件为退火温度 55 °C、初始模板量为 100 ng、35 个循环。

3.5 检测灵敏度

结合实际情况, 制备白鲢鱼糜质量分数分别为 0.1%、

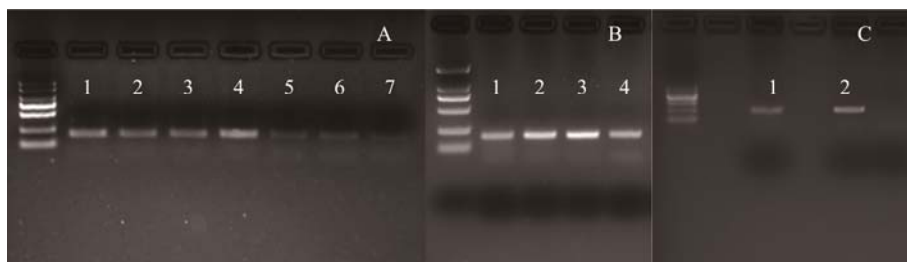
1%、5%、10%的混合鱼糜样品, 从中提取 DNA 后, 进行 PCR 实验, 结果如图 8, 由图 8 可知模拟样品检测灵敏度可达 1%(白鲢鱼糜的质量分数), 满足检测需要。

4 结论

本研究利用 NCBI 数据库中现有的白鲢的小清蛋白的基因(GenBank: FJ216937.1)作为靶基因, 确定了白鲢

特异性引物,并基于物种特异性 PCR 技术建立直接、有效、准确的 DNA 检测方法。作为国内首次采用物种特异性 PCR 技术对混合鱼糜中白鲢成分进行定性检测,相较于需结合产物序列比对步骤的其他核酸水平的定性

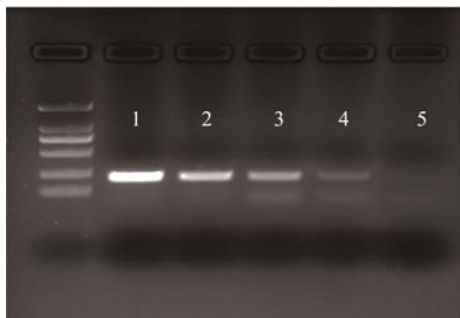
检测方法,本方法具有操作简便,特异性强,检测时间短以及成本低的优点,可根据琼脂糖核酸电泳结果直接进行判断,是最基础的检测方法,可满足日常检测的要求。



注: A: 退火温度(1~7 分别为 52、53、54、55、56、57、58 °C); B: 初始模板量(1~4 分别为 400、200、100、20 ng); C: 循环数(1 为 30 cycles, 2 为 35 cycles)。

图 7 不同 PCR 条件电泳图

Fig.7 Electrophoretogram of different PCR conditions



注: 1~5 分别为 100%、10%、5%、1%、0.1%。

图 8 不同质量分数样品 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.8 Agarose electrophoresis patterns of different samples

基于核酸分子学水平的动物成分定性检测技术大多选择线粒体基因作为靶基因^[15],但是线粒体 DNA 由于丰度高且分布不均,易导致定量结果偏差^[7],如果想要同时定性和定量只能选择单拷贝的基因组 DNA。本研究选择的小清蛋白作为一种单拷贝基因,可用于后续定量检测方法建立,同时本研究也为其他混合食品原料组分检测建立了理论基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国动物志编辑委员会. 中国动物志[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Chinese Animal Science Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences. Fauna of China [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [2] 徐承旭. 我国最大鱼糜专业组织在厦门成立[J]. 水产科技情报, 2014, (4): 219-219.
Xu CX. China's largest professional fishery organization was established in Xiamen [J]. Fish Sci Technol Inform, 2014, (4): 219-219.
- [3] 张先翼. 基于波谱及其成像技术的鱼糜品种鉴定和品质评价[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.

Zhang XY. Identification and quality evaluation of surimi based on spectroscopy and its imaging technology [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.

- [4] SN/T 3731-2017 检验检疫行业标准 食品及饲料中常见禽类品种的鉴定方法[S].
SN/T 3731-2017 Inspection and quarantine industry standards-Identification methods for common poultry species in food and feed [S].
- [5] SN/T 3730-2013 检验检疫行业标准 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法[S].
SN/T 3730-2013 Inspection and quarantine industry standards-Identification methods for common animal species in food and feed [S].
- [6] SN/T 2257-2010 检验检疫行业标准 畜肉食品中牛成分定性检测方法[S].
SN/T 2257-2010 Inspection and quarantine industry standards-Qualitative detection methods for cattle components in livestock meat products [S].
- [7] 王金斌, 李文, 白蓝, 等. 基于核酸分子学方法的肉类成分鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2017, (11): 325-334.
Wang QB, Li W, Bai L, et al. Research progress in identification of meat components based on nucleic acid molecular methods [J]. Food Sci, 2017, (11): 325-334.
- [8] Hebert PDN, Ratnasingham S, De WJR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceed Royal Soc B: Biol Sci, 2003, 270(1): 96-99.
- [9] Rehbein H, Rainer K, Pineiro C, et al. Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing [J]. Electrophoresis, 2000, 21(8): 1458-1463.
- [10] 农小献, 宾石玉, 蒙涛, 等. 小清蛋白研究进展[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(6): 887-891.
Nong XX, Bin SY, Meng T, et al. Progress in research on parvalbumin [J]. Biotechnol Commun, 2011, 22(6): 887-891.
- [11] 韩建勋, 陈颖, 王斌, 等. 应用可视芯片技术高通量鉴别 8 种鱼成分[J]. 分析测试学报, 2018, 37(2): 174-179.

Han JX, Chen Y, Wang B, *et al.* High-throughput identification of eight fish species by using thinfilm biosensor chips [J]. *J Instrum Anal*, 2018, 37(2): 174–179.

[12] Carrera M, Monica B, Pineiro F, *et al.* Fast monitoring of species-specific peptide biomarkers using high-intensity-focused-ultrasound-assisted tryptic digestion and selected MS/MS ion monitoring [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(14): 5688–5695.

[13] 万超, 蒋丹, 吕泉, 等. 太平洋无须鲷鱼及其制品的 PCR 鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(1): 71–75.

Wan C, Jiang D, Lv Q, *et al.* PCR identification of Merluccius products and its products [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(1): 71–75.

[14] Hildebrandt S. Multiplexed identification of different fish species by detection of parvalbumin, a common fish allergen gene: A DNA application of multi-analyte profiling technology [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(5): 1787–1796

[15] 吕冬梅, 黄原, 文慧, 等. DNA 条形码技术在食品鉴定中的应用[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 248–253.

Lv DM, Huang Y, Wen H, *et al.* Application of DNA barcode technology

in food identification [J]. *Food Sci*, 2015, 36(9): 248–253.

(责任编辑: 于梦娇)

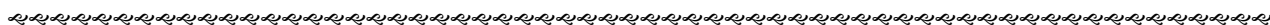
作者简介



宋春萍, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工及贮藏工程。
E-mail: qdkillua@163.com



林洪, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与质量控制。
E-mail: linhong@ouc.edu.cn



“食品安全快速检测技术”专题征稿函

食品安全快速检测技术是食品安全保障的重要支撑。要从根本上解决食品安全问题, 就必须对食品的生产、加工、流通和销售等各环节实施全程管理和监控, 而实验室检测方法和仪器是很难及时、快速而全面地从各环节监控食品安全状况, 这就需要大量能够满足这一要求的快速、方便、准确、灵敏的食品安全分析检测技术。

本刊特别策划了“食品安全快速检测技术”专题, 由军事医学科学院高志贤研究员和暨南大学丁郁教授担任专题主编, 主要围绕比色分析技术、光谱分析技术、免疫分析技术、层析检测技术、无损检测技术、生物检测技术、快速前处理技术、电化学传感器、纳米技术”等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可, 本专题计划在 2020 年 6 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编高志贤研究员和暨南大学丁郁教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

请在 2020 年 4 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“**专题: 食品安全快速检测技术**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注**食品安全快速检测技术**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部