

实时荧光定量 PCR 法鉴别俄罗斯鲟鱼子酱分子

万超, 代弟, 屈菲, 徐君怡, 贾赞*

(大连海关, 大连 116001)

摘要: **目的** 建立鉴别荧光定量 PCR 法鉴别俄罗斯鲟鱼子酱的方法。**方法** 以鲟形目 16 种鱼类 *D-LOOP* 基因序列作为目的基因进行比对, 选择差异序列设计俄罗斯鲟特异性引物, 构建俄罗斯鲟源性成分实时荧光 PCR 检测方法。**结果** 通过特异性检测同目 7 种近源物种、46 种非近源物种, 表明该方法对于俄罗斯鲟源性成分具有较好的特异性; 进行梯度稀释灵敏度检测, 可检出 0.1 ng/ μ L 俄罗斯鲟 DNA。通过对市售 6 种鱼子酱共 35 个样本进行检测, 可检测出鱼子酱中的俄罗斯鲟成分。**结论** 该荧光检测方法特异性强、灵敏度较高, 适用于鱼子酱中俄罗斯鲟源性成分的鉴定检测。

关键词: 俄罗斯鲟; 鱼子酱; 实时荧光定量 PCR; 源性成分

Identification of *Acipenser gueldenstaedtii* caviar molecules by real-time fluorescence quantitative PCR

WAN Chao, DAI Di, QU Fei, XU Jun-Yi, JIA Yun*

(Dalian Customs, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the identification of *Acipenser gueldenstaedtii* by fluorescence quantitative PCR. **Methods** The *D-Loop* gene sequences of 16 species of *Acipenser* were compared as the target genes. The specific primers were designed to construct a real-time fluorescent PCR method for the detection of *Acipenser gueldenstaedtii* derived components. **Results** Through the specific detection of seven species of proximal origin and 46 species of non-proximal origin in the same order, it showed that this method had good specificity for the composition of *Acipenser gueldenstaedtii*. Gradient dilution sensitivity detection was performed to detect 0.1 ng/L DNA of *Acipenser gueldenstaedtii*. Through the detection of six kinds of caviar sold in the market (35 samples), the fluorescence method could detect the *Acipenser gueldenstaedtii* in caviar. **Conclusion** The fluorescence detection method is specific and sensitive, and it is suitable for the identification and detection of *Acipenser gueldenstaedtii*.

KEY WORDS: *Acipenser gueldenstaedtii*; real-time fluorescent quantitative PCR; caviar; source compounds

0 引言

根据联合国粮农组织的定义, 仅鲟形目鱼类的鱼卵产品才能被称为鱼子酱, 其他的鱼类来源的鱼卵制品则归

类为“鱼子酱代用品”^[1-2]。同时, 全世界共有 26 种鲟鱼, 仅欧鳇、俄罗斯鲟、史氏鲟、闪光鲟、西伯利亚鲟、美洲匙吻鲟等 6 种鲟类的卵可制成鱼子酱。又以欧鳇、俄罗斯鲟、闪光鲟鱼子酱价格口感最好, 深受消费者喜欢^[3-5]。同时,

基金项目: 海关总署科研项目(2019HK094)

Fund: Supported by Scientific Research Projects of the General Administration of Customs Fund (2019HK094)

*通信作者: 贾赞, 博士, 研究员, 主要研究方向为珍稀动物物种鉴定、动物疫病诊断与防治。E-mail: jxy750921@163.com

*Corresponding author: JIA Yun, Ph.D, Professor, Technical Center of Dalian Customs, No.60, Changjiangdong Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: jxy750921@163.com

不同鱼子酱的营养价值也有差异。以俄罗斯鲟和西伯利亚鲟鱼子酱为例,俄罗斯鲟鱼卵中粗蛋白水分和粗灰分含量、各种氨基酸含量均高于西伯利亚鲟鱼卵,俄罗斯鲟鱼卵中必需氨基酸,俄罗斯鲟鱼卵的营养价值优于西伯利亚鲟鱼卵^[6]。

但是,由于鲟形目鱼类广泛存在种间杂交现象和养殖场长期配种传代忽视了亲鱼的遗传背景问题,导致亲本不纯、种质混乱、遗传背景不清等情况。由俄罗斯鲟鱼卵制成的鱼子酱虽然是市场上最昂贵的鱼子酱之一,但鱼子酱售价差别巨大(国际市场价格俄罗斯鲟鱼子酱约1000~2000€/kg,西伯利亚鲟约为300€/kg),混乱销售,以次充好的情况屡有发生。鱼子酱仅以外观分辨,很难判断其物种来源,因此,建立一种特异、灵敏的俄罗斯鲟及其制品鉴定方法对于俄罗斯鲟种质鉴定、育种筛选、分子铭牌溯源具有重要的经济和现实意义。同时,该方法也可以对俄罗斯鲟相关制品进行分子鉴定和溯源^[1-2]。本研究所采用的实时荧光定量PCR法(SYBR Green 荧光PCR),是在PCR反应体系中加入荧光染料SYBR Green,其可特异性地掺入DNA双链并发射荧光信号,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程的分析方法,该方法具有准确、快速、简便的特点,在物种鉴定领域有着广泛应用。鲟类物种鉴定多采用普通PCR、微卫星DNA、DNA条码等方法,SYBR Green 荧光染料法检测俄罗斯鲟物种尚未见相关研究^[7-12]。本研究采用实时荧光定量PCR法鉴别俄罗斯鲟鱼子酱分子,以期相关检测机构提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Premix Ex Taq(SYBR Premix Ex Taq)缓冲体系、植物基因组DNA提取试剂盒(DP254)、海洋动物基因组DNA提取试剂盒(DP332)[天根生化科技(北京)有限公司];琼脂糖(上海吉至生化科技有限公司);引物(上海生工生物公司合成)。

俄罗斯鲟、匙吻鲟、西伯利亚鲟、欧鲤、闪光鲟、史氏鲟、小体鲟(北京市水产科学研究所鲟鱼繁育基地);俄罗斯鲟、匙吻鲟、西伯利亚鲟、欧鲤、闪光鲟、史氏鲟鱼子酱购于北京、大连、广州等地市场和超市;南蓝鳕、黑线鳕、黑鳕、阿拉斯加鳕鱼、细鳞壮鳕、拟庸鲽、大西洋鳕、太平洋鳕、绿青鳕、北太平洋无须鳕、牙鲆、多宝鱼、大菱鲆、大西洋鲑、红鱼、大马哈鱼、大泷六线鱼、中国花鲈、大西洋蓝枪鱼、大黄鱼、银枪鱼、条纹四鳍旗鱼、舌头鱼、黄盖鲽、太平洋鲱、蓝鳍金枪鱼、大目金枪鱼、黄鳍金枪鱼、黑点褐胸鳕、日本鳗、双髻鲨、高鳍真鲨、鲫鱼、鲤鱼、草鱼、鳙鱼、鸭、鸡、鹅、

牛、猪、大米、绿豆、大豆、玉米、小麦等购于大连各水产市场和超市。

1.2 仪器与设备

Nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); V7 实时荧光定量PCR仪(美国 ABI 公司); Gel Doc 凝胶成像检测系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取DNA

取上述组织样品各100 mg,分别使用海洋动物基因组DNA提取试剂盒和植物基因组DNA提取试剂盒提取总DNA。

1.3.2 引物设计

通过 *Acipenser gueldenstaedtii* CoxI 序列的比对分析,根据序列差异设计俄罗斯鲟特异性引物。上游引物序列为:5'-TATACACCATTATCTCTATGT-3';下游引物序列为:5'-GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA-3'。

1.3.3 引物的特异性检测

利用上述引物对俄罗斯鲟及其他6种鲟形目鱼类、46份非鲟形目动植物样品DNA进行实时荧光PCR扩增。荧光PCR反应体系为25 μL,包含SYBR Premix 反应液12.5 μL、模板DNA 1 μL、引物各1 μL、灭菌双蒸水10.5 μL。反应条件为:预变性95 °C 30 s;变性95 °C 5 s、60 °C 退火延伸30 s,42个循环。

1.3.4 灵敏度的检测

俄罗斯鲟DNA梯度稀释,制备成100、10、1、0.1、0.01 ng/μL、5个浓度梯度样品,进行DNA浓度灵敏度实验。

1.3.5 市售俄罗斯鲟制品的检测

市售俄罗斯鲟、匙吻鲟、西伯利亚鲟、欧鲤、闪光鲟、史氏鲟各5~10份,利用所建立的SYBR Green 荧光PCR检测方法测定其俄罗斯鲟成分。

2 结果与分析

2.1 DNA质量分析

以Nanodrop2000测定样品提取样品DNA OD值,样品提取的DNA OD_{260/280}值在1.8~2.0之间(见表1,其中小体鲟值为1.61、史氏鲟为1.79)。结果表明,抽提的DNA均适用于PCR检测。

2.2 引物的特异性结果

以俄罗斯鲟样品DNA和其他6种鲟形目鱼类、46份非鲟形目动植物样品DNA,各100 ng DNA作为模板进行3次重复PCR特异性实验,俄罗斯鲟样本有显著扩增,3次平行反应的Ct值为18.7±0.15,其余6种鲟形目鱼类、46份非鲟形目动植物样品均无明显扩增曲线,表明本方法对俄罗斯鲟成分的具有良好特异性(图1)。

表1 部分样品提取 DNA Nano Drop 2000 的检测结果
Table 1 Detection results of DNA Nano Drop 2000 extracted from some samples

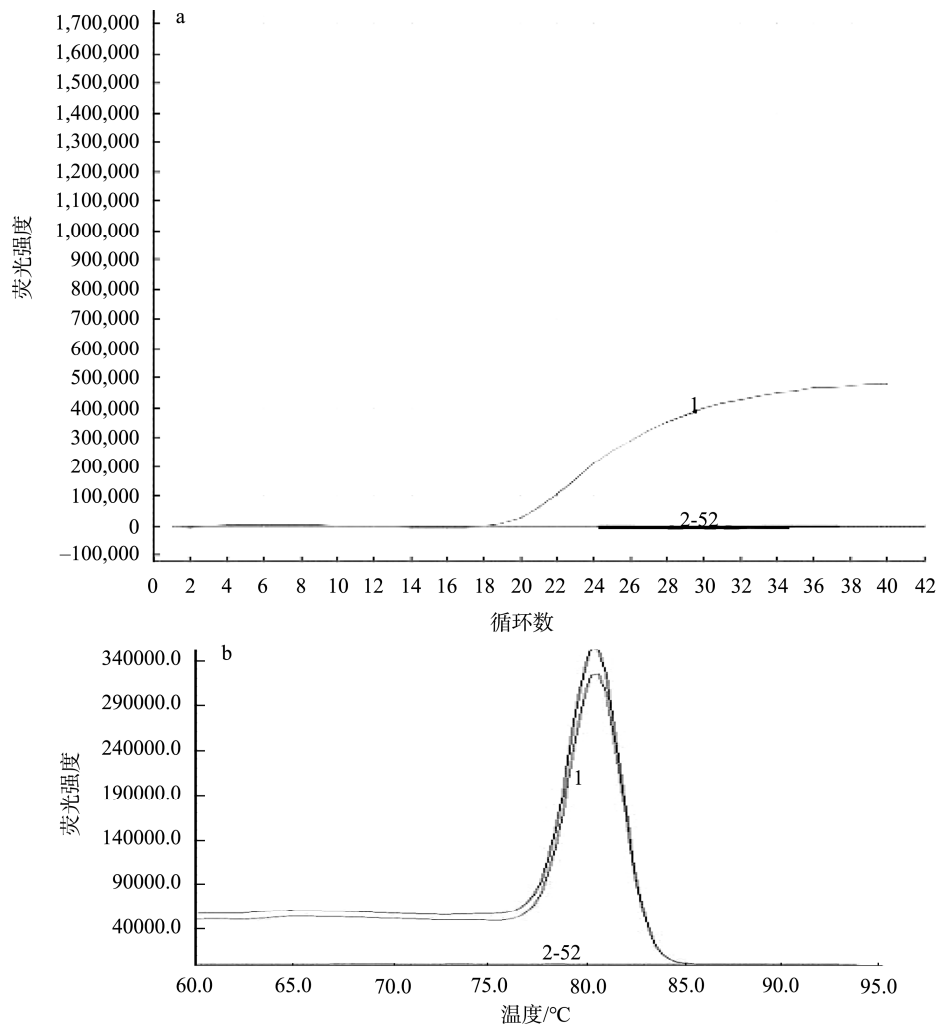
| 样品 | 核酸浓度/(ng/ μ L) | $OD_{260/280}$ |
|----------|--------------------|-----------------|
| 欧鳊(肉) | 120 \pm 2.31 | 1.99 \pm 0.03 |
| 小体鲟(肉) | 412 \pm 1.56 | 1.61 \pm 0.11 |
| 史氏鲟(肉) | 180.6 \pm 2.15 | 1.79 \pm 0.04 |
| 俄罗斯鲟(肉) | 135.1 \pm 1.37 | 1.85 \pm 0.06 |
| 西伯利亚鲟(肉) | 201.2 \pm 2.44 | 1.83 \pm 0.07 |
| 达氏鲟(肉) | 354 \pm 0.47 | 1.98 \pm 0.12 |
| 太平洋无须鲂 | 162.5 \pm 1.55 | 1.83 \pm 0.14 |
| 大西洋鳕鱼 | 418.3 \pm 0.43 | 1.96 \pm 0.05 |
| 绿青鳕 | 456.8 \pm 1.25 | 1.87 \pm 0.12 |
| 太平洋鳕 | 143.7 \pm 2.43 | 1.94 \pm 0.04 |
| 黑线鳕 | 198.7 \pm 0.14 | 1.83 \pm 0.04 |

2.3 灵敏度检测结果

以 10 倍梯度稀释的俄罗斯鲟 DNA 进行俄罗斯鲟成分的荧光 PCR 梯度检测, 检测方法的灵敏度, 当 DNA 浓度 ≥ 0.1 ng/ μ L 时样品均可扩增(见图 2), 结果显示该检测方法对俄罗斯鲟基因组 DNA 检测灵敏度可达 0.1 ng/ μ L。

2.4 市售俄罗斯鲟制品检测结果

所购鱼子酱 SYBR Green 荧光 PCR 检测结果见表 2。其中 10 份俄罗斯鲟鱼子酱均出现阳性扩增曲线, 5 份匙吻鲟、5 份西伯利亚鲟、5 份欧鳊、5 份闪光鲟、5 份史氏鲟鱼子酱均为阴性结果, 但 1 份欧鳊样本也呈阳性。考虑俄罗斯鱼子酱与欧鳊鱼子酱价格差别较大的原因, 欧鳊鱼子酱检出俄罗斯源性成分可能有以次充好、掺假的可能。该检测结果表明该方法可以对市售俄罗斯鲟鱼子酱进行鉴定, 实用效果好。

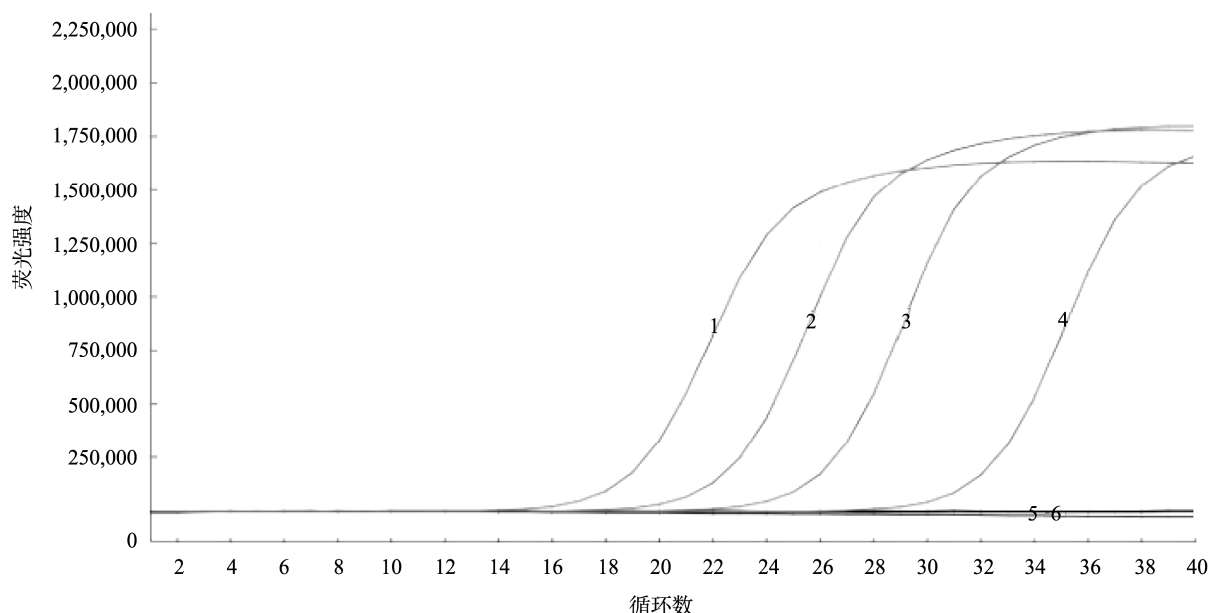


注: 1. 俄罗斯鲟; 2. 达氏鲟; 3. 史氏鲟; 4. 西伯利亚鲟; 5. 小体鲟; 6. 闪光鲟; 7. 欧鳊; 8. 空白对照; 9~52. 非鲟形目动植物样品。

b. 熔解曲线

图1 俄罗斯鲟引物特异性检测

Fig.1 Detection of specificity of primers for *Acipenser gueldenstaedtii*



注: 1. 100 ng/μL 扩增结果; 2. 10 ng/μL 扩增结果; 3. 1 ng/μL 扩增结果; 4. 0.1 ng/μL 扩增结果; 5. 0.01 ng/μL 扩增结果; 6 空白对照。

图 2 俄罗斯鲟 DNA 浓度灵敏度检测。

Fig.2 Sensitivity detection of *Acipenser gueldenstaedtii* DNA

表 2 市售俄罗斯鲟制品的俄罗斯鲟源性检测

Table 2 Detection of *Acipenser gueldenstaedtii* sources in *Acipenser gueldenstaedtii* products.

| 鱼子酱品种 | 数量 | 俄罗斯鲟阳性数量 | 阳性比例/% |
|-------|----|----------|--------|
| 俄罗斯鲟 | 10 | 10 | 100 |
| 匙吻鲟 | 5 | 5 | 0 |
| 西伯利亚鲟 | 5 | 5 | 0 |
| 欧鲤 | 5 | 4 | 20 |
| 闪光鲟 | 5 | 5 | 0 |
| 史氏鲟 | 5 | 5 | 0 |

3 结束语

中国海关数据显示, 2013 年至 2018 年间, 中国鱼子酱出口数量增长 5 倍。我国成为全球第一大鱼子酱生产国, 为全球提供 70% 的鱼子酱, 由鲟鱼卵加工而成的鱼子酱走向国门, 成为驰名中外的高档营养食品。因此鱼子酱销售中以次充好, 以假充真的事件屡屡发生, 严重危害了消费者切身利益。有报道商家用破碎鱼子和鱼脂合成人工鱼子酱冒充俄罗斯鲟鱼子酱销售的案例, 而我国也常有贩卖假俄罗斯鲟鱼子酱的案例出现。作为鲟鱼制品鉴定方法, 荧光 PCR 检测技术日益成熟, 相比其他方法, 流程简单、具有快速检测的优势。

本研究的难点在于鲟鱼可能因为生活环境类似, 进化差异较小, 导致近源物种繁多, 基因序列相对保守, 难以筛选中合适的差异性位点作为待选引物序列。本文通过基因大量比对, 对鲟鱼物种 *PanI*、*Its*、*cytb* 等基因进行序列比对, 发现 *D-loop* 为合适的靶基因位点, 该结论与 DNA 条形码目的基因结论多有差异^[13-16]。这也为分析鲟鱼物种、建立相关核酸检测方法, 提供了一定技术基础。本研究建立的俄罗斯鲟鱼子酱荧光 PCR 检测方法具有很好的特异性, 俄罗斯鲟基因组检测 DNA 灵敏度可达 0.1 ng/μL, 可用于俄罗斯鲟鱼子酱物种鉴定和相关制品的成分溯源。市售实际样品的检测结果表明该方法具有很强的实用性, 欧鲤鱼子酱样品可能存在物种混杂的现象, 该检测方法满足日常检测的要求。

参考文献

- [1] 周晓华. 鲟鱼子酱产业现状分析[J]. 水产学杂志, 2015, 28(4): 48-52.
ZHOU XH. Analysis on the current situation of sturgeon caviar industry [J]. Chin J Fisheries, 2015, 28(4): 48-52.
- [2] 孙大江, 马国军, 吴文化. 我国鲟鱼子酱产业现状和发展趋势[J]. 中国水产, 2011, (7): 25-27.
SUN DJ, MA GJ, WU WH. Current situation and development trend of sturgeon caviar industry in China [J]. China Fish, 2011, (7): 25-27.
- [3] ADELI, AFSHIN, NAMDAR, *et al.* The Iranian caviar and its substitutes in the world market [J]. Chem Commun, 2015, 29(3): 145-151.
- [4] BRONZI P, CHEBANOV M, MICHAELS JT, *et al.* Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 [J]. J Appl Ichthyol, 2019, 35(1): 257-266.

- [5] CHRISTIAN, FUNKE. 检测台上的奢侈食品 准确对鱼子酱进行盐度滴定检测[J]. 实验与分析, 2017, 72(1): 29–31.
CHRISTIAN, FUNKE. The luxury food on the test table accurately carries on the salinity titration detection to the caviar [J]. *Exp Anal*, 2017, 72(1): 29–31.
- [6] 高露姣, 夏永涛, 黄艳青. 俄罗斯鲟鱼卵与西伯利亚鲟鱼卵的营养成分比较[J]. 海洋渔业, 2012, (1): 57–63.
GAO LJ, XIA YT, HUANG YQ. Comparison of nutritional components between Russian sturgeon eggs and Siberian sturgeon eggs [J]. *Mar Fish*, 2012, (1): 57–63.
- [7] 吴文化. 几种鲟鱼及杂交种 DNA 条形码研究及分子鉴别[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
WU WH. DNA barcoding and molecular identification of several sturgeons and their hybrids [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [8] 郭向贺. 五种鲟鱼种质鉴定及遗传多样性分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
GUO XH. Germplasm identification and genetic diversity analysis of five sturgeon species [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014.
- [9] 董颖, 胡红霞. 鲟鱼种质鉴定技术的发展及应用[J]. 中国水产, 2014, (10): 70–72.
DONG Y, HU HX. Development and application of sturgeon germplasm identification technology [J]. *Chin J Fish*, 2014, (10): 70–72.
- [10] 刘伟, 孔杰, 王霞. 微卫星标记在鲟鱼分子遗传学研究中的应用[J]. 农技服务, 2017, 34(12): 12–14.
LIU W, KONG J, WANG X. Development and application of identification techniques for sturgeon germplasm [J]. *Agr Technol Serv*, 2017, 34(12): 12–14.
- [11] 辛苗苗. 基于 SSR 的中华鲟亲缘鉴定和遗传特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
XIN MM. Genetic identification of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) based on SSR Markers [D]. Chongqing: Southwest University, 2015.
- [12] 张四明, 邓怀, 汪登强. 7 种鲟形目鱼类亲缘关系的随机扩增多态性 DNA 研究[J]. 自然科学进展, 1999, 9(9): 818–823.
ZHANG SM, DENG H, WANG DQ. Study on genetic relationship of seven sturgeons by random amplified polymorphic DNA [J]. *Prog Nat Sci*, 1999, 9(9): 818–823.
- [13] BIRSTEIN VJ, DESALLE R, DOUKAKIS P, *et al.* Testing taxonomic boundaries and the limit of DNA barcoding in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* [J]. *Dna Seq*, 2018, 12(1): 152–158.
- [14] KUDLAI O, OROS M, KOSTADINOVA A, *et al.* Exploring the diversity of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) in fishes from the River Danube using mitochondrial DNA barcodes [J]. *Parasites Vectors*, 2017, 10(1): 592.
- [15] NATALIIV I, TYLERS Z, ROBERTH H, *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 7(4): 544–548.
- [16] KESKIN E, ATAR HH. DNA barcoding commercially important fish species of Turkey [J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, 13(5): 788–797.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



万 超, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为分子生物学、毒理学、微生物学。
E-mail: 656596961@qq.com



贾 贇, 博士, 研究员, 主要研究方向为珍稀动物物种鉴定、动物疫病诊断与防治。
E-mail: jxy750921@163.com