

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250415003

引用格式: 白朵兰, 洪麟, 杨滴, 等. 基于改进的预扩增实时荧光定量聚合酶链式反应法检验虹鳟源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 18–25.

BAI DL, HONG L, YANG D, *et al.* Detection of *Oncorhynchus mykiss* source components based on improved pre-amplification real-time quantitative polymerase chain reaction method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 18–25. (in Chinese with English abstract).

基于改进的预扩增实时荧光定量聚合酶链式反应 法检验虹鳟源性成分

白朵兰¹, 洪麟², 杨滴², 陈文超², 王佳琪², 方蕾¹, 刘彦泓^{2*}, 郑秋月^{1*}

[1. 大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600;

2. 大连市检验检测认证技术服务中心, 国家市场监督管理总局技术创新中心
(食用农产品安全快速检测与追溯), 大连 116630]

摘要: **目的** 建立改进的预扩增实时荧光定量聚合酶链式反应法(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)法检验虹鳟源性成分的方法。**方法** 基于对现行标准中虹鳟 qPCR 方法进行验证和改进提高, 建立改进的预扩增 qPCR 方法, 并对两种 qPCR 方法进行比较。**结果** 经验证, 在采用标准中 qPCR 方法对虹鳟的近种鱼种银鲑、大西洋鲑等鱼种进行特异性验证时有交叉反应, 基于设置预扩增反应步骤的改进 qPCR 方法特异性良好, 对于银鲑、大西洋鲑等近种鱼种未出现交叉扩增。qPCR 和预扩增 qPCR 方法的扩增效率分别为 90.25%、104.91%, 最低检出限分别为 2.99×10^{-3} ng/ μ L (0.83~8.87 pg/ μ L, 95%置信区间)和 1.50×10^{-4} ng/ μ L (0.09~0.27 pg/ μ L, 95%置信区间)。**结论** 所改进的虹鳟源性成分预扩增 qPCR 方法具有高特异性、高灵敏度, 适用于食品样品中虹鳟源性成分的真实性和掺假检验。

关键词: 虹鳟源性成分; 真实性检验; 实时荧光定量聚合酶链式反应法; 预扩增实时荧光定量聚合酶链式反应法

Detection of *Oncorhynchus mykiss* source components based on improved pre-amplification real-time quantitative polymerase chain reaction method

BAI Duo-Lan¹, HONG Lin², YANG Di², CHEN Wen-Chao², WANG Jia-Qi², FANG Lei¹,
LIU Yan-Hong^{2*}, ZHENG Qiu-Yue^{1*}

[1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Dalian Center for Certification and Food and Drug Control, Technology Innovation Center of Food Safety Technique of Inspection for State Market Regulation (Rapid Screening and Traceability for Edible Agricultural Product Safety), Dalian 116630, China]

收稿日期: 2025-04-15

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2023MK130)

第一作者: 白朵兰(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: dl122307@163.com

*通信作者: 刘彦泓(1976—), 女, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 3252168072@qq.com

郑秋月(1972—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 20211484@dlnu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To establish a pre-amplified quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) method for the detection of *Oncorhynchus mykiss* source components. **Methods** The study developed an enhanced pre-amplified qPCR method, which was based on the validation and improvement of the existing standard qPCR method and compared the performance of both methods. **Results** Specificity testing of the standard qPCR method revealed cross-reactivity with closely related species, such as *Coho salmon* and *Atlantic salmon*. The established improved pre-amplified qPCR method, which incorporated a pre-amplification step, exhibited high specificity and no cross amplification was observed for *Coho salmon*, *Atlantic salmon* and other closely related species. The amplification efficiencies of the standard qPCR and the pre-amplified qPCR methods were 90.25% and 104.91%, respectively. The lowest limits of detection of the 2 kinds of methods were 2.99×10^{-3} ng/ μ L (0.83–8.87 pg/ μ L, 95% confidence interval) for the standard qPCR and 1.50×10^{-4} ng/ μ L (0.09–0.27 pg/ μ L, 95% confidence interval) for the pre-amplified qPCR. **Conclusion** The method established in this study has the characteristics of strong specificity, high sensitivity, and is suitable for authenticity and adulteration detection of *Oncorhynchus mykiss* source components in food products.

KEY WORDS: *Oncorhynchus mykiss* source; authenticity identification; quantitative real-time polymerase chain reaction; pre-amplified quantitative real-time polymerase chain reaction

0 引言

三文鱼是鲑科鱼类的统称,包括大西洋鲑、虹鳟、银鲑、王鲑、红鲑、秋鲑、粉鲑等,最早在分类学上是指鲑科鱼鲑属(*Salmo*)的大西洋鲑(*Salmo salar*)^[1]。三文鱼因口感独特、营养丰富,含有大量不饱和脂肪酸和人体必需微量元素^[2],具有高经济价值。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*),俗名淡水三文鱼,属鲑形目,鲑亚科,大麻哈鱼属(*Oncorhynchus*)^[3]。虹鳟鱼虽在肉质、纹理、口感和大西洋鲑极其相似,但在营养价值和经济价值上与大西洋鲑鱼存在较大差异^[4]。据报道,在淡水中养殖的虹鳟鱼存在感染寄生虫^[1]和过量砷积累^[5]的风险,生食但不标识容易产生食品安全隐患。在高额利润的驱动下,一些不法商贩常以低价虹鳟鱼替代大西洋鲑鱼进行售卖,导致三文鱼近种鱼间的掺假现象在生产加工及商品销售环节屡见不鲜。这些欺诈事件损害消费者经济利益,同时加大食品安全风险。丁清龙等^[1]采用实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测广东省内销售的三文鱼产品,从标识含有大西洋鲑的 98 批次样品中检出了虹鳟源性成分。CAWTHORN 等^[6]报道了发生在南非的因鱼类命名错误或标签错误造成的海鲜欺诈案例。HORREO 等^[7]调查西班牙马德里餐馆,发现秋鲑掺假冒充大西洋鲑鱼。美国华盛顿地区 38% 的三文鱼水产品存在商品标识与实际品种不符的问题^[8]。为了保护消费者权益以及确保公众健康,迫切需要一种精准可靠的方法进行三文鱼品种真实性检验。

在水产养殖、原料采购、生产加工环节,虹鳟鱼和大西洋鲑鱼等其他三文鱼的鉴定主要依赖于其形态特征,而

经加工制作成寿司和鱼片等产品后,很难根据残余特征鉴别三文鱼原料真伪^[9]。国家食品安全标准规定预包装产品的标签应符合 GB 7718—2011《食品安全国家标准 预包装食品标签通则》的要求,标注原料鱼产地以及种名,标注三文鱼(大西洋鲑)、三文鱼(虹鳟)等。目前鱼类种类鉴定方法主要有酶联免疫吸附法和蛋白质组学法^[10–11]、分子生物学方法^[12–14]、代谢组学技术^[15]等。CHAI 等^[16]使用 UV-Vis 光谱仪鉴别鱼种类。CHEN 等^[17]建立大西洋鲑鱼拉曼光谱掺假鉴别方法。MA 等^[18]开发了数字 PCR 定量检测虹鳟鱼和大西洋鲑鱼的方法。YANG 等^[19]建立了大西洋鲑鱼和虹鳟鱼重组酶聚合酶扩增结合侧向流试纸条(recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip, RPA-LFS)鉴定方法。基于核酸的分子生物学方法广泛应用于鱼类真实性及掺假检验^[20–22]。其中实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)是物种真实性鉴别的金标准,常被制定为检测标准^[23]。qPCR 应用于物种鉴定更加稳定,方法特异性和灵敏度都比较高^[24]。

基因条形码技术是鱼种鉴定常用方法^[25–29],本研究先采用基因条形码利用一段标准 DNA 序列^[30]进行物种鉴定鉴别实验用鱼类样品的物种真实性和准确性。现行检验虹鳟源性成分的标准方法为 SN/T 5480—2022《虹鳟成分鉴定技术规范实时荧光 PCR 法》,本研究在应用该标准检验食品中虹鳟源性成分时发现,标准中规定的 qPCR 方法存在非特异性扩增。为了提高虹鳟源性成分检测的准确性,本研究改进标准中的 qPCR 反应程序,设置预扩增反应步骤,用以加速样本核酸裂解和富集模板,建立虹鳟源性成分的预扩增 qPCR 方法,消除了现行标准方法中存在的非特异性扩增的问题,并对低浓度样品

的做到了高灵敏特异鉴定,实现食品中虹鳟源性成分的快速可靠检验。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验样品

用于方法建立及特异性实验用的虹鳟、银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑等样品,来源于大连市水产品生产加工企业,样品的物种真实性通过 DNA 条形码进行测序确认。同时收集了 37 份标识含有虹鳟、大西洋鳟、银鲑、粉鲑、红鲑、秋鲑等成分的食品样本,来源于大连市水产品生产加工企业及各大超市出售的产品。

1.1.2 试剂与仪器

基因组 DNA 提取试剂[货号: AS1600, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司]; qPCR 反应试剂[货号: Code No. RR390A, 宝生物工程(大连)有限公司]; QRT-PCR 实时荧光 PCR 试剂(货号: Cat# 6001001101, 卡尤迪生物科技有限公司); 测序试剂盒(BigDye Terminators V3.0, 上海嘉鹏科技有限公司)。

NanoDrop 超微量分光光度计、ABI QuantStudio 7 定量 PCR 仪、LLSC009 高速冷冻离心机、ABI3130X 基因测序分析仪(美国赛默飞世尔科技公司); BWS-10 恒温水槽与水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); PTX-FA210S 分析天平(精度 0.1 mg, 福建华志电子科技有限公司); Synergy H1 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及基因组 DNA 提取

提取虹鳟及其他近种鱼的基因组 DNA 用于 qPCR 分析实验。取 200 mg 组织肉,采用磁珠法 DNA 提取试剂盒提取鱼类基因组 DNA。采用超微量分光光度计根据 A_{260}/A_{280} 比值测定并计算提取的基因组 DNA 的纯度和浓度。

1.2.2 样品真实属性基因条形码测试

根据国际生物条形码协会推荐的鱼类 DNA 条形码基因并参考相关文献资料,基于鱼类 COI 基因序列测序结果

对样品进行物种鉴定,保证实验样品的真实属性。采用鱼类 DNA 条形码通用引物扩增三文鱼线粒体 COI 基因序列^[30]。DNA 条形码通用引物信息如表 1 所示。

按照表 1 中反应条件进行基因条形码 PCR 扩增,PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳回收纯化,使用 ABI 测序仪进行双向测序,使用 SeqMan 11.1 对序列峰图进行校对拼接,分析测序结果。

1.2.3 qPCR 引物与探针

qPCR 扩增的引物和 Taq Man 探针(Fw/Rev/probe)基于已发布实施的 SN/T 5480—2022,使用 primer blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行评估。引物和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成,具体序列见表 2。

1.3 qPCR 方法验证及改进

1.3.1 标准方法 qPCR 扩增

基于标准方法中的 qPCR 反应体积 25 μ L,其中 12.5 μ L 含有酶混合物的 Probe qPCR Mix, 0.4 μ mol/L 正向引物、反向引物、探针各 1 μ L, 7.5 μ L 无 DNA 酶的超纯水, 2 μ L 提取的 DNA 模板。qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 在 60 $^{\circ}$ C 时收集 FAM 荧光信号,反应结束后分析荧光扩增曲线结果。

1.3.2 预扩增 qPCR 扩增

预扩增 qPCR 反应体系为 25 μ L,其中 16 μ L 含有酶混合物的 Probe qPCR Mix, 0.4 μ mol/L 正向引物(Fw)、反向引物(Rev)、探针(Probe)各 1 μ L, 4 μ L 无 DNA 酶的超纯水, 2 μ L 提取的 DNA 模板。改进的预扩增 qPCR 反应程序: 首先进行预扩增步骤, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 10 s, 15 个循环,此步骤不采集 FAM 荧光信号; 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环,在 55 $^{\circ}$ C 时采集 FAM 荧光信号,反应结束后分析荧光扩增曲线结果。

1.3.3 qPCR 和预扩增 qPCR 特异性分析

使用标准中虹鳟源性成分的引物和探针(表 2),针对虹鳟同属或近属的其他鱼种的基因组 DNA 进行交叉反应分析,包括银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑基因组 DNA,用来评估 qPCR 和预扩增 qPCR 的特异性。超纯水作为空白对照。

表 1 基因条形码测序引物序列及 PCR 反应条件
Table 1 Gene barcode sequencing primer sequence and PCR reaction conditions

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	反应条件	条带大小/bp
COI	上游引物 F	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	94 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min	655
	下游引物 R	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA		

表 2 用于 qPCR 方法的引物/探针
Table 2 Primers/probes used in the qPCR method

引物/探针	引物/探针序列(5'→3')	参考文献
Few	AGTAATTATCGGCATACGAAACCAG	[28]
Rev	GTTTCGATAATGATCAGTACTGGGATC	
Probe	FAM-CTACGGCCGCCCTCGGCCATTTAT-TAMRA	

1.3.4 qPCR 和预扩增 qPCR 的扩增效率分析

以提取的虹鳟基因组 DNA(初始质量浓度为 2.99×10^1 ng/ μ L)为模板, 进行 10 倍浓度稀释, 分别制备了 2.99×10^0 、 2.99×10^{-1} 、 2.99×10^{-2} 、 2.99×10^{-3} 、 2.99×10^{-4} ng/ μ L 总计共 6 个质量浓度梯度稀释液, 测试 qPCR 和预扩增 qPCR 方法的扩增效率。每个质量浓度设 3 个平行反应, 分别采用 2 种方法重复测试 3 次。以起始样品 DNA 质量浓度的稀释倍数为横坐标(X, ng/ μ L), 以扩增的 Ct 值为纵坐标(Y), 分别绘制线性曲线, 计算分析得到相应的线性方程及其斜率、线性相关系数(r^2)和 PCR 反应效率(E), 探讨两种 qPCR 扩增方法的扩增效率。用公式 $E=10^{(-1/\text{斜率})}-1$ 计算 qPCR 效率(E), 并以百分比表示。E 是评价 PCR 检验性能最重要的指标之一, 需要满足达到 90%~110%的要求。

1.3.5 qPCR 和预扩增 qPCR 灵敏度分析

为了进一步确定 qPCR 和预扩增 qPCR 的最低检出限(limit of detection, LOD), 将提取的虹鳟基因组 DNA 稀释为 2.99×10^{-2} 、 2.99×10^{-3} 、 1.50×10^{-3} 、 1.50×10^{-4} 、 7.48×10^{-5} 、 5.98×10^{-5} 、 2.99×10^{-5} ng/ μ L 共计 7 个质量浓度梯度, 每个质量浓度梯度平行测试 12 次, 以 12 个子样全部为阳性结果的浓度确定 LOD。

1.3.6 基于预扩增 qPCR 方法检验实际样本

本研究收集了 37 份标识含有虹鳟、大西洋鲑、银鲑、粉鲑、王鲑等成分的食品样本, 评估改进的预扩增 qPCR 方法在实际样品检验中的适用性, 每个样本进行 3 次重复试验。所收集样品涵盖常见的水产品及其加工产品类别, 包括原料、半加工产品、深加工食品等。

1.4 数据处理

为了测定分析虹鳟源性成分的灵敏度, LOD 数据以 Ct 值的平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 使用 GraphPad prism 9.3 进行半对数回归分析评估。使用 MedCalc 20.0 软件对连续稀释 7 个质量浓度梯度的重复测试数据进行概率回归分析, 计算 qPCR 和预扩增 qPCR 在 95%概率水平下的 LOD。LOD 是评价方法有效检验范围和准确定量范围的重要参数, 分析过程中在满足 95%置信区间的条件下所能检验到的目标

样品的最低浓度。

2 结果与分析

2.1 样品真实性基因条形码测试结果

利用基因条形码技术对收集到的三文鱼样品的 COI 基因部分特异区段进行测序, 测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 blast 比对, 得到样品基因条形码的测序结果为: 大西洋鲑(KX145289.1)、银鲑(FJ998805.1)、虹鳟(EU752133.1)、粉鲑(KX145377.1)、红鲑(FJ999169.1)、秋鲑(AP010773.1), 基因序列相似性均高达 99%, 结果表明样品来源真实准确。所收集的虹鳟、银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑等样品基因条形码测试结果如表 3 所示。

2.2 引物和探针序列特异性比对

以虹鳟的线粒体基因片段(genbank: LC050735.1)为靶标基因片段, 对标准中的 qPCR 引物(Fw/Rev)和 Taq Man 探针(probe)在 NCBI 进行同源性比对, 比对结果表明该引物和探针对于虹鳟源性成分的检验具有较好的特异性(图 1)。基于应用标准方法检测三文鱼真实属性时发现存在非特异性扩增, 本研究进一步采用实际样品验证标准方法的特异性。

2.3 qPCR 扩增特异性结果

使用标准中的引物和探针及反应程序(qPCR)进行特异性实验, 发现虹鳟的近属三文鱼源性成分样品, 包括银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑及秋鲑的基因组 DNA 均发生非特异性扩增, 在第 30 个 PCR 循环后均出现阳性荧光扩增曲线(图 2A)。为了消除非特异性扩增, 本研究对标准中的 qPCR 方法进行改进, 增设了一个 15 个循环的预扩增 PCR 反应过程。优化后的 qPCR 热循环条件为先进行预扩增 95 $^{\circ}$ C 10, 50 $^{\circ}$ C 10 s, 15 个循环, 不采集 FAM 荧光信号; 然后再进行实时荧光 PCR 扩增, 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 在 55 $^{\circ}$ C 时采集 FAM 荧光信号(表 4)。

表 3 样品 DNA 基因条形码测序结果
Table 3 Sequencing results of sample DNA gene barcode

编号	样品名称	拉丁文名称	测序结果	测序结果是否与样品名称一致
			(genbank 序列号)	
1	大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	KX145289.1	是
2	银鲑	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	FJ998805.1	是
3	虹鳟	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	EU752133.1	是
4	粉鲑	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	KX145377.1	是
5	红鲑	<i>Oncorhynchus nerka</i>	FJ999169.1	是
6	秋鲑	<i>Oncorhynchus keta</i>	AP010773.1	是

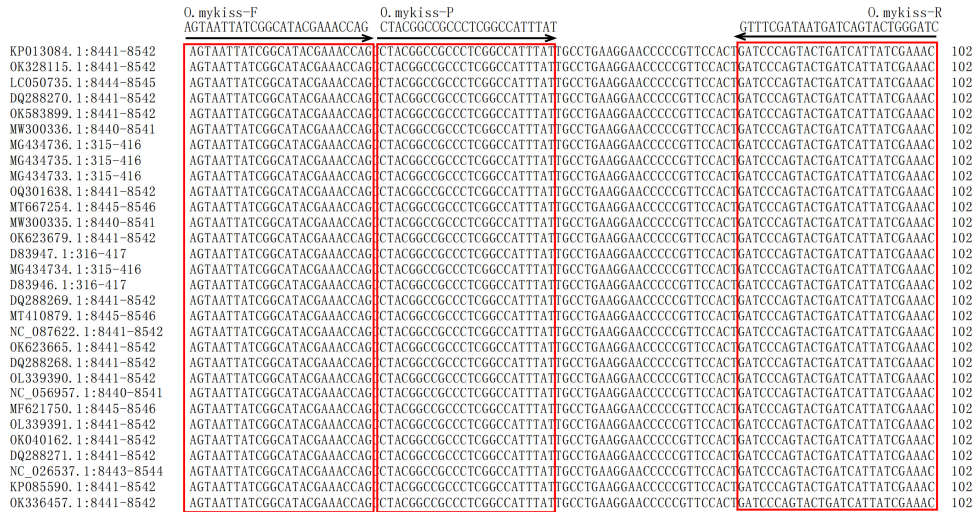
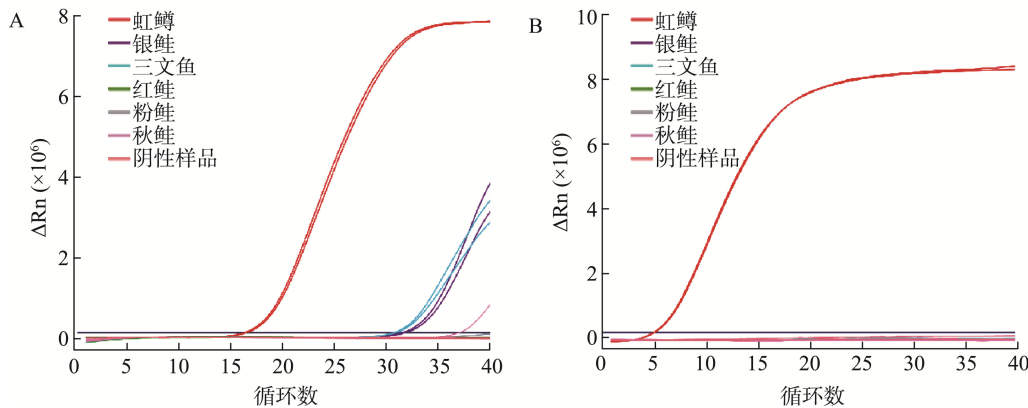


图 1 标准方法中虹鳟源性成分引物和探针序列比对结果

Fig.1 Sequence alignment results of primers and probe for *Oncorhynchus mykiss* source components in standard method



注: A. 标准中的 qPCR 反应程序, 在第 30 个循环开始, 银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑等样品基因组 DNA 均出现非特异性荧光扩增曲线; B. 预扩增 qPCR 反应程序, 仅虹鳟基因组 DNA 出现特异性扩增, 其余样品基因组 DNA 均无非特异性扩增。

图 2 qPCR (A)和预扩增 qPCR (B)检验虹鳟源性成分特异性

Fig.2 Specific detection of *Oncorhynchus mykiss* source components of universal qPCR (A) and pre-amplified qPCR (B)

表 4 qPCR 和预扩增 qPCR 反应程序

Table 4 Reaction program conditions of universal qPCR and pre-amplified qPCR

检验方法	温度/℃	时间	循环数/个
qPCR	95	10 min	1
	95	15 s	40
	60	1 min	
预扩增 qPCR	95	10 s	15
	50	10 s	
	95	1 min	1
	95	10 s	40
	55	30 s	

2.4 预扩增 qPCR 特异性结果

采用标准中的 qPCR 引物探针, 基于本研究改进的预扩增 qPCR 进行虹鳟成分的特异性试验。预扩增 qPCR 结

果如图 2B 所示。结果表明仅虹鳟基因组 DNA 出现特异性荧光扩增曲线, 银鲑、大西洋鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑等鱼种基因组 DNA 均未出现特异性扩增, 没有发生交叉反应。表明改进的预扩增 qPCR 反应程序具有良好的特异性。

2.5 qPCR 和预扩增 qPCR 的扩增效率结果

以梯度稀释的虹鳟基因组 DNA(初始质量浓度为 2.99×10^1 ng/μL)为模板, 评估 qPCR 以及改进的预扩增 qPCR 方法扩增效率。分别以模板 DNA 浓度的稀释度为横坐标(X, ng/μL), 以扩增的 Ct 值为纵坐标(Y), 使用 GraphPad prism 9.3 软件绘制线性曲线。使用 Origin 2021 绘制 qPCR 的线性曲线, 得到 $Y = -3.58X + 24.12$, 相关系数 $r^2 = 0.99$, 由扩增效率公式 $E = 10^{(-1/\text{斜率})} - 1$ 计算得到 $E = 90.25\%$ (图 3A)。绘制预扩增 qPCR 的线性曲线, 得到 $Y = -3.21X + 10.01$, 相关系数 $r^2 = 0.99$, 计算得到 $E = 104.91\%$ (图 3B)。

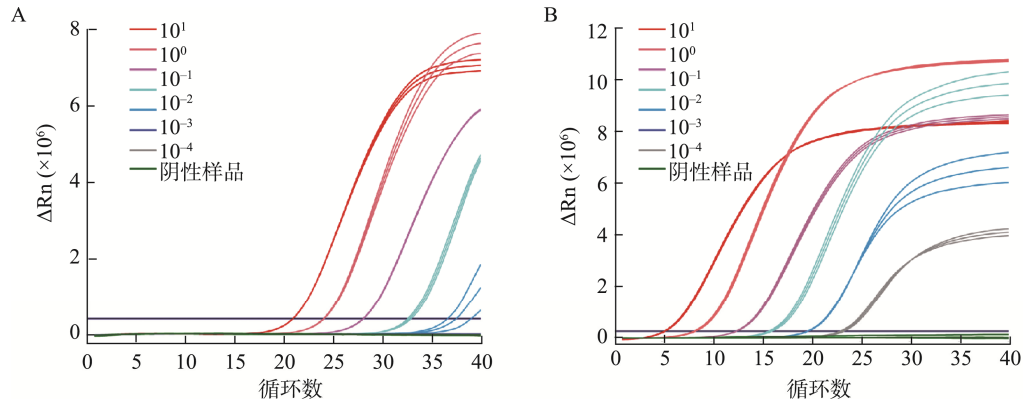


图 3 qPCR (A)和预扩增 qPCR (B)检验虹鳟源性成分扩增效率分析

Fig.3 Sensitivity results of *Oncorhynchus mykiss* source components of universal qPCR (A) and pre-amplified qPCR (B)

2.6 qPCR 和预扩增 qPCR 的灵敏度结果

对提取的虹鳟基因组 DNA 进行灵敏度实验。qPCR 可以检测到虹鳟基因组 DNA 的质量浓度为 2.99×10^{-3} ng/ μ L, 3 个平行样品中仅有 2 个阳性, 预扩增 qPCR 可以检测到虹鳟基因组 DNA 的质量浓度为 1.50×10^{-4} ng/ μ L, 3 个平行样品都为阳性结果(图 4)。

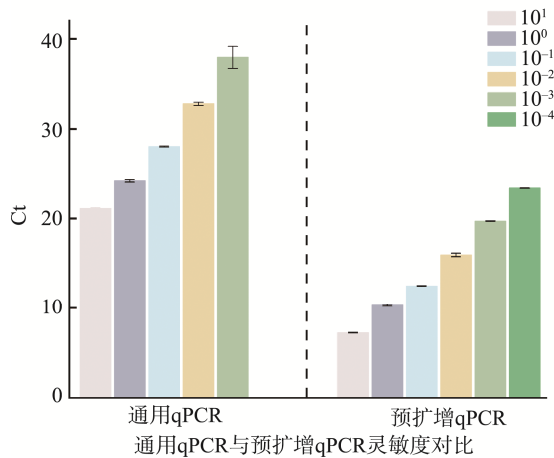


图 4 qPCR 和预扩增 qPCR 检验虹鳟基因组 DNA 的灵敏度
Fig.4 Sensitivity of qPCR and pre-amplification qPCR in detecting genomic DNA of *Oncorhynchus mykiss*

并用 MedCalc 22.0 软件对结果进行概率回归分析, 以计算 qPCR 和预扩增 qPCR 在 95% 概率水平下的检验低限。在 95% 概率水平下, qPCR 检验虹鳟基因组 DNA 的 LOD 为 2.99×10^{-3} ng/ μ L, 95% 的置信区间为 0.83~8.87 pg/ μ L(图 5A)。预扩增 qPCR 检验虹鳟基因组 DNA 的 LOD 为 1.50×10^{-4} ng/ μ L, 95% 的置信区间为 0.09~0.27 pg/ μ L(图 5B)。

2.7 预扩增 qPCR 检验实际样品结果

为了评价本研究改进的预扩增 qPCR 检验实际样品中虹鳟源性成分的有效性, 本研究检验了 37 份标识含有虹鳟、大西洋鲑、银鲑、粉鲑、王鲑等成分的水产类食品样品提取的基因组 DNA。使用预扩增 qPCR 方法, 在标识含有虹鳟源性成分的 19 份样本中均检出阳性扩增, Ct 值为 15.02~25.46, 与样品标识相符; 其中有 2 份鱼丸样品没有标识含有虹鳟源性成分, 仍然检出虹鳟源性成分阳性, 与样品标识不符。所有检出虹鳟源性成分均采用基因条形码进行测序进行阳性检出验证, 测序结果均与预扩增 qPCR 检验结果一致。另外 16 份样本未检出虹鳟源性成分, 没有出现 Ct 数值, 检验结果为阴性, 与样品标识相符。此外, 本实验室留存的已经过形态学鉴别和基因条形码测序验证为含有虹鳟源性成分的 5 份样品, 经预扩增 qPCR 方法检测均出现虹鳟源性成分的特异性扩增阳性结果, 进一步验证了方法的可靠性与适用性。

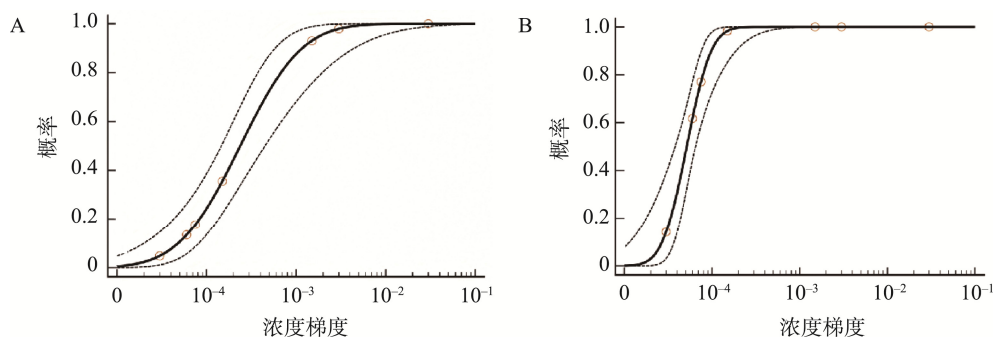


图 5 qPCR (A)和预扩增 qPCR (B)的 LOD 值确定

Fig.5 Determination of LOD values for qPCR (A) and pre-amplified qPCR (B)

3 结论与讨论

本研究开发了一种改进提高的预扩增 qPCR 方法, 通过在实时荧光 PCR 扩增反应之前增加 15 个循环预扩增来加速模板的热裂解, 加速模板 DNA 热变性和复性, 此阶段不收集荧光信号, 使核酸充分释放出来, 富集模板 DNA, 累积了更多的模板用于后续的 qPCR 分析, 有利于低拷贝检测的高阈值判读, 在 qPCR 扩增阶段早期观察到阳性荧光信号, 提高特异性扩增效率。克服了 SN/T 5480—2022 qPCR 方法检测大西洋鲑、银鲑、红鲑、粉鲑、秋鲑等源性成分发生非特异性扩增的问题, 有效解决了由于三文鱼鱼种之间基因组序列极为相似, 易出现 PCR 扩增交叉反应, 影响物种真实属性鉴定准确性的难题。并且改进的预扩增 qPCR 方法最低 LOD 为 1.50×10^{-4} ng/ μ L (0.09~0.27 pg/ μ L, 95%置信区间), 扩增效率为 104.91%; 优于标准方法 qPCR 的 2.99×10^{-3} ng/ μ L 灵敏度 (0.83~8.87 pg/ μ L), 扩增效率 90.25%。同时进行了 37 份水产品样品的预扩增 qPCR 分析, 包括原料、单一含量食品、混合食品、以及深加工食品等不同种类样品。本研究分别采用预扩增 qPCR 方法检测实际样品和已知样品, 对于出现虹鳟源性成分阳性扩增的样品同时进行基因条形码测序, 验证方法的准确性。基于两种形式的验证结果表明本研究建立的基于改进的预扩增 qPCR 方法稳定可靠, 适用于食品样品中虹鳟源性成分的真实性和掺假检验。

参考文献

- [1] 丁清龙, 曾晓琮, 周露, 等. 三文鱼水产品掺假情况调查[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(13): 4080–4085.
DING QL, ZENG XC, ZHOU L, *et al.* Investigation of salmon adulteration [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(13): 4080–4085.
- [2] LANDRY JD, BLANCH EW, TORLEY PJ. Chemical indicators of Atlantic salmon quality [J]. Food Reviews International, 2024, 40(5): 1426–1456.
- [3] 陆冠亚, 谭笑, 周萍, 等. 浅谈几种外来鲑形目物种[J]. 水产养殖, 2023, 44(11): 28–33.
LU GY, TAN X, ZHOU P, *et al.* A brief introduction to some alien salmoniformes [J]. Journal of Aquaculture, 2023, 44(11): 28–33.
- [4] 何晓霞, 许艳丽, 徐颖, 等. 麻哈鱼掺假鉴定及制度防范措施和建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 220–225.
HE XX, XU YL, XU Y, *et al.* Adulteration identification of salmon and institutional preventive measures and suggestions [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(1): 220–225.
- [5] NASCIMENTO DHJM, J FFPD, COELHO MJM, *et al.* Impacts of the residual trace metals of aquaculture in net cages on the quality of sediment [J]. Life, 2023, 13(2): 338.
- [6] CAWTHORN D, DUNCAN J, KASTERN C, *et al.* Fish species substitution and misnaming in South Africa: An economic, safety and sustainability conundrum revisited [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 165–181.
- [7] HORREO LJ, FITZE SP, JIMÉNEZ-VALVERDE A, *et al.* Amplification of 16S rDNA reveals important fish mislabeling in Madrid restaurants [J]. Food Control, 2019, 96: 146–150.
- [8] GARCIA LJ, GASPAR AY, DIEKOUNDADE A, *et al.* Fishy business in seattle: Salmon mislabeling fraud in sushi restaurants vs grocery stores [J]. PloS One, 2024, 19(11): e0311522.
- [9] XIONG X, HUANG MH, XU WJ, *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) identification in processed fish products using loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction assays [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(13): 4696–4704.
- [10] COZZOLINO D, BUREŠ D, HOFFMAN LC, *et al.* Evaluating the use of a similarity index (SI) combined with near infrared (NIR) spectroscopy as method in meat species authenticity [J]. Foods, 2023, 12(1): 182.
- [11] EMILIA F, MAGDALENA M. Species-specific peptide-based liquid chromatography-mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products [J]. Food Chemistry, 2019, 283: 489–498.
- [12] RAHARJO JT, CHUDORI CNY, AGUSTINA WF. TaqMan probe real-time polymerase chain reaction targeting the ATPase 6 gene for the detection of pork adulteration in meat and meatballs [J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(6): e12715.
- [13] ASMAA G, DOAA H, SOBH EHE. Single nucleotide polymorphism-based methodology for authentication of bovine, caprine, ovine, camel, and donkey meat cuts [J]. Journal of Food Science, 2021, 86(10): 4444–4456.
- [14] HU QQ, PAN YQ, XIA HL, *et al.* Species identification of caviar based on multiple DNA barcoding [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2023, 28(13): 5046.
- [15] FAN KJ, SU WH. Applications of fluorescence spectroscopy, RGB- and multiSpectral imaging for quality determinations of white meat: A review [J]. Biosensors, 2022, 12(2): 76.
- [16] CHAI ZL, WANG CY, BI HY. Rapid identification between two fish species using UV-Vis spectroscopy for substitution detection [J]. Molecules, 2021, 26(21): 6529.
- [17] CHEN ZL, WU T, CHENG X, *et al.* Rapid identification of rainbow trout adulteration in atlantic salmon by raman spectroscopy combined with machine learning [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2851.
- [18] MA YX, SHAO ZL, YU XP, *et al.* A droplet digital PCR-based approach for quantitative analysis of the adulteration of atlantic Salmon with rainbow trout [J]. Foods, 2023, 12(23): 4039.
- [19] YANG QK, LIU X, WANG L, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Oncorhynchus mykiss* adulteration in *Salmo salar* by recombinase

- polymerase amplification combined with lateral flow strip [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2022, 54(7): 1–4.
- [20] 韦涛, 黄继锦, 黄惠琳, 等. 环介导等温扩增与 qPCR 用于检验肉制品中狗源性成分的比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3060–3070.
- WEI T, HUANG JT, HUANG HL, *et al.* Comparison of loop-mediated isothermal amplification and qPCR used for the detection of the dog-derived ingredients in meat products [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(8): 3060–3070.
- [21] 汪艺, 冯俊丽, 戴志远, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应快速鉴定三种鳕鱼[J]. *核农学报*, 2020, 34(10): 2190–2198.
- WANG Y, FENG JL, DAI ZY, *et al.* Rapid identification of three cod species by quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(10): 2190–2198.
- [22] SHEHATA HR, RAGUPATHY S, SHANMUGHANANDHAN D, *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods for molecular diagnostic identification of probiotics. [J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 102(6): 1774–1778.
- [23] LIU L, MU BR, ZHOU Y, *et al.* Research trends and development dynamics of qPCR-based biomarkers: A comprehensive bibliometric analysis [J]. *Molecular Biotechnology*, 2025. DOI: 10.1007/s12033-024-01356-7
- [24] AUGUSTO GLOD, RABELLO LF, GILIANE TSD, *et al.* qPCR assay for the detection of pseudocowpox virus [J]. *Archives of Virology*, 2020, 166(1): 1–5.
- [25] LI QP, XUE HY, FEI YJ, *et al.* Visual detection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) simultaneously by duplex loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 2022, 4: 100107.
- [26] TOMMASO G, VALERIO M, MARTA D, *et al.* Check your shopping cart: DNA barcoding and mini-barcoding for food authentication [J]. *Foods* (Basel, Switzerland), 2023, 12(12): 2392.
- [27] CHEN CT, DING YF, WANG Y, *et al.* High-resolution melting analysis of *COI* sequences distinguishes pufferfish species (*Takifugu* spp.) in China [J]. *Food Chemistry*, 2021, 69(2): 794–804.
- [28] LI YM, LI SY, HAE YK. A multiplex PCR assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous identification of atlantic cod, pacific cod, blue whiting, haddock, and alaska pollock [J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2631–2631.
- [29] YAO L, XIN HM, QU M, *et al.* Development of duplex Real-time Polymerase chain reaction for simultaneous detection of oilfish and escolar derived components [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 101(5): 1792–1799.
- [30] IVANOVA VN, ZEMLAK ST, HANNER H, *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 544–548.
- (责任编辑: 安香玉 韩晓红)