

文章编号:1000-8551(2020)10-2190-09

实时荧光定量聚合酶链式反应快速鉴定三种鳕鱼

汪 艺¹ 冯俊丽^{1,2,*} 戴志远^{1,2} 田小兰¹(¹浙江工商大学海洋食品研究院,浙江 杭州 310012; ²浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室,浙江 杭州 310012)

摘要:为鉴定常见的3种鳕科鳕鱼(大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼和黑线鳕),选用16S rDNA基因设计区分鳕科和非鳕科鱼类的引物,选用线粒体 *Cytb* 基因设计区分3种鳕鱼的物种特异性引物,建立实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)体系,对其进行物种分析。结果表明,16S rDNA qPCR体系及3种鳕鱼品种特异性 qPCR体系均具有良好的性能,结合标准曲线,可以对单一或混合样品中的目标鳕鱼进行定量检测。在模拟混合样品中目标鳕鱼的相对检测灵敏度可达0.01%。通过对13种市售样品的检测,本研究设计的 qPCR体系可检测出原料及深加工产品中的鳕鱼成分。综上,所建立的 qPCR体系具有很强的实用性,能满足日常检测的要求,并有望作为未来鳕鱼市场管理的检测方法。

关键词:鳕鱼;实时荧光定量PCR;物种鉴定

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.10.2190

鳕鱼属脊椎动物门(Vertebrata)硬骨鱼纲(Osteichthyes)鳕形目(Gadiformes)。鳕鱼营养丰富、肉味鲜美,是全世界年捕捞量最大的鱼类之一,具有重要的经济价值^[1-2]。目前,我国市售鳕鱼主要分为三类:第一类为鳕科鳕鱼类,包括大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、太平洋鳕鱼(*G. macrocephalus*)、狭鳕(*Theragra chalcogramma*)、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)、青鳕(*Theragra chalcogramma*)等;第二类被称为“银鳕鱼”的裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)和南极犬牙鱼(*Dissostichus eleginoides*),其分别属鲉形目和鲈形目,但营养价值高于鳕科鳕鱼类^[3];第三类为鱼目混珠的假鳕鱼类,俗称油鱼,主要为棘鳞蛇鲭(*Ruvettus pretiosus*)和异鳞蛇鲭(*Lepidocybium flavobrunneum*),均属于鲈形目。异鳞蛇鲭含有40%以上的蜡脂(蛇鲭毒素),主要用于提炼工业润滑剂,不可食用^[4]。

为规范鳕鱼类商品的标示,香港食品安全中心于2007年推出了《有关识别及标签:油鱼/鳕鱼的指引》^[5],指出鳕鱼只代表鳕形目鱼类,南极犬牙鱼和裸盖鱼仍可使用俗名“银鳕鱼”。然而,鳕形目鱼类品种繁多,形态学差异较小,不同的鳕鱼品种市场价

格差异悬殊,常出现以次充好、伪造掺假的现象^[6-8]。近年,多个城市出现不法商贩将异鳞蛇鲭冒充鳕鱼卖,引起消费者腹泻、肠胃痉挛等不适^[8]。此外,约六成市售鳕鱼是去头去内脏的冷冻形式,其余四成是去皮去骨的鱼切片,消费者难以通过形态特征判断鱼的种类。因此,为了更加有效地确保鳕鱼产品质量,防止以次充好,需要一种快速有效的鳕鱼物种鉴定方法。

与传统的形态特征鉴别相比,基于DNA技术的分子生物学检测法^[9-13]更适合各种鳕鱼产品(冷冻切片及深加工制品)的鉴别。DNA遗传序列能精确的鉴定物种,尤其线粒体DNA具有较高的变异和进化速率,常被用于鉴定近缘物种。常用的线粒体片段有 *Cytb*^[14]基因、*COI*^[15]基因和D-loop区域(也称control region, CR)^[16]等。

目前,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是应用最为广泛的物种鉴定分子生物学方法。在普通PCR技术的基础上,实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)的应用越来越广泛。qPCR是在PCR体系中引入荧光信号,利用荧光信号的变化实时监测PCR扩增反应每一个循环PCR

收稿日期:2019-03-26 接受日期:2019-05-04

基金项目:浙江省科技计划项目(2017C32072)

作者简介:汪艺,女,主要从事水产品综合利用及功能性食品研究。E-mail:1332074596@qq.com

* 通讯作者:冯俊丽,女,副研究员,主要从事水产品综合利用及功能性食品研究。E-mail:fengjunli@zjgsu.edu.cn

产物量的变化^[17]。其中,SYBR Green I 法适用性较广,不需要合成特异性探针,具有低成本、高特异性、高检测效率等特点,常用于食品真伪鉴定。相比于传统 PCR 技术,qPCR 的优点是不需要在反应结束后再开盖进行电泳检测,既降低了污染的可能性,也减少了操作时间。此外,有研究表明,水产品经过热加工,基因已经大量降解为 200 bp 以下的小片段^[18-20]。qPCR 所扩增的片段较短(一般小于 250 bp),因此对冰冻和新鲜水产品,以及熟制或罐装等鳕鱼类产品均可进行物种鉴定。

本研究以鳕科大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼及黑线鳕为研究对象,阴性对照选择俗称“银鳕鱼”的南极犬牙鱼和假鳕鱼异鳞蛇鲭,利用线粒体 16S rDNA 和 *Cytb* 基因片段,建立 qPCR 体系,对其进行物种分析及鉴定,旨在探索建立鳕鱼市场监管的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、黑线鳕和南极犬牙鱼及异鳞蛇鲭均由浙江工商大学海洋食品研究院提供,-20℃冰箱冷冻保存。13 种检测样品(其中包括 6 种深加工样品)均购自杭州当地多处市场并低温(4℃)保存。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),自制;液氮,杭州今工气体有限公司;Axygen 基因组 DNA 小量提取试剂盒,吴江康宁生命科学有限公司;TB Green™ Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)(2×)试剂盒、PrimeSTAR Max Premix(2×)试剂盒,大连 TaKaRa 生物公司。

1.2 主要仪器与设备

HB-100 型恒温金属浴,杭州博日科技有限公司;MRIEX-5 型漩涡振荡器,海门其林贝儿仪器制造有限公司;ChemDoc XRS 型凝胶成像系统,T100 型 PCR 仪、PTC-0148 型 Mini Opticon Monitor 3 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;BSA124S-CW 型电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;EVOLUTION 60S 型紫外可见分光光度计、Fresco 21 型高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 待测样品 DNA 提取 分别称取 300 mg 待测样品,使用 Axygen 基因组 DNA 小量提取试剂盒提取基因组 DNA。获得的 DNA 经 1.5%凝胶电泳检测后,通过紫外可见分光光度计在 260 nm 波长下测定其浓度。将大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、黑线鳕、南极犬牙鱼及异鳞蛇鲭 DNA 用无菌双蒸水进行 10 倍连续梯度稀释进行绝对灵敏度试验。所有 DNA 置于-20℃保存备用。

混合 DNA 制备:将切碎的异鳞蛇鲭肉分别与 3 种鳕鱼肉(大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼及黑线鳕)混合制得含 10%、1%、0.1%、0.01%及 0.001%(w/w)目标鳕鱼肉的混合物,分别称取 300 mg,使用 Axygen 基因组 DNA 小量提取试剂盒提取基因组 DNA。所有 DNA 置于-20℃保存备用。

1.3.2 qPCR 引物设计 通过 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载鳕科中常见鳕鱼、南极犬牙鱼及异鳞蛇鲭的线粒体基因序列,如表 1 所示。经 DNASTar 软件里的 MegAlign 工具比对,找出各序列中的保守和变异区域。

表 1 引物设计的 GenBank 序列号

Table 1 GenBank accession numbers for sequences used to design primers

标记基因 Genetic marker	目标品种 Target species	GenBank 序列号 GenBank accession numbers
<i>Cytb</i>	大西洋鳕鱼	EU492140、EU492303、EU492304、EU492141、 KP293271-KP293276
<i>Cytb</i>	太平洋鳕鱼	AB078152、EU729394-EU729400
<i>Cytb</i>	黑线鳕	EU492313、EU492142、EU492143、EU492314、EF456008、EF427577、EU224013、EU224014
<i>Cytb</i>	南极犬牙鱼	EF589654、NC_018135、AB723627
<i>Cytb</i>	异鳞蛇鲭	DQ197960、DQ497841、EF988663、AM265576、MG847604、AP012519
16S rDNA	鳕科常见鳕鱼	KJ010598、KJ010704、GU931786、KJ128773、GU018078、GU018079、KJ128823、 EF458335、KR779486、FJ215140、FJ215192、AY850362、EU099474

使用 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) 软件设计候选引物,并根据各引物的二聚体和错配发生率进行筛选。所有特异性引物都经过 GenBank 数据库中的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具测试以保证其特

异性。最终选择线粒体 *Cytb* 基因作为检测 3 种目标鳕鱼、南极犬牙鱼及异鳞蛇鲭的标记基因;选择 16S rDNA 基因设计区分鳕科和非鳕科鱼类的引物。所设计的 qPCR 引物如表 2 所示。所有引物序列均由上海生工生物有限公司合成。

表 2 qPCR 的引物

Table 2 The primer sequences for quantitative real-time PCR

名称 Name	目标品种 Target species	目标基因 Target gene	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	产物大小 Amplicon/bp
GMO	大西洋鳕鱼	<i>Cytb</i>	FP	ACTTGGCTTTGCTGTGATGCTTCTG	171
			RP	TTTGAATAGAGCGTAAGATGGCA	
GMA	太平洋鳕鱼	<i>Cytb</i>	FP	AGACCTGCTCGGCTTTGCTGTAATG	249
			RP	GAAGTGTGGAGGAAGGGCACAACT	
MA	黑线鳕	<i>Cytb</i>	FP	CTGCTTGGTTTTTCCCGTAATACITTT	165
			RP	AGAACGGAGGATAGCATAAGCAAAT	
DE	南极犬牙鱼	<i>Cytb</i>	FP	TGTCATTACCAACCTTCTCTCAGCG	168
			RP	AGGAACAGCAGGTACTACTATGGTGG	
FL	异鳞蛇鲭	<i>Cytb</i>	FP	AATAGTTACCCACCCCATATCAAA	179
			RP	AGGCGGCTCGGAATGTCAAT	
16S rDNA	鳕科	16S rDNA	FP	GCTTAGCTGTCTCCCATCTCC	173
			RP	CCCAACCAAAAGACACTTCAGTA	

注:每组 qPCR 体系的名称都是目标品种或基因标记的简写名称。FP:正向引物;RP:反向引物。

Note: Each quantitative real-time PCR system was named according to the abbreviation of target species or genetic marker. FP: Forward primer. RP: Reverse primer.

1.3.3 引物特异性检测 在对 3 种鳕科鳕鱼(大西洋鳕、太平洋鳕和黑线鳕)及 2 种非鳕科鱼类(南极犬牙鱼和异鳞蛇鲭)的引物特异性试验中,目标鳕鱼为试验组,其他四种为阴性对照,以无菌双蒸水为模板作空白对照,进行 3 个平行的 qPCR 试验。在利用 16S rDNA 基因区分鳕科和非鳕科鱼类试验中,上述 3 种鳕科鳕鱼为试验组,非鳕科品种(南极犬牙鱼和异鳞蛇鲭)为阴性对照,以无菌双蒸水为模板作空白对照,进行 3 个平行的 qPCR 试验。

qPCR 反应体系为 20 μL ,包含 10 μL TB GreenTM Premix Ex TaqTM 反应液、0.3 μL 正向引物和反向引物(各 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.5 μL DNA 模板、7.9 μL 无菌双蒸水。大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼特异性体系反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。南极犬牙鱼的反应条件与上述相同,仅退火温度设定为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。此外,黑线鳕、异鳞蛇鲭的反应体系及 16S rDNA 体系反应条件也与上述相同,仅将退火温度设定为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 扩增效率与可靠性 单一鱼肉样品:将各测试

鱼类 DNA 进行 10 倍连续梯度稀释,分别进行各浓度 DNA 样品的 qPCR 试验,每个浓度设置 3 个平行试验。以目标鳕鱼 DNA 浓度($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)对数值为横坐标,该浓度对应的平均循环阈值(C_t)为纵坐标,建立各体系的标准曲线。计算曲线的 R^2 值,并根据曲线斜率(slope)得出反应效率: $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100\%$,以此判断每个体系的反应效率和目标 DNA 浓度检测区间。

混合鱼肉样品:选取大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼和黑线鳕 3 种样品,分别对含 10%、1%、0.1%、0.01% 及 0.001% (w/w) 目标鳕鱼肉的混合鱼肉样品 DNA 进行各质量分数的 qPCR 试验,设置 3 个平行试验。以质量分数(%)对数值为横坐标,该浓度对应的平均循环阈值(C_t)为纵坐标,构建各特异性体系的标准曲线。并根据曲线斜率(slope)得出反应效率,以此判断每个体系的反应效率和相对浓度检测区间。

1.3.5 市售鳕鱼及鳕鱼深加工制品的检测 qPCR 检测:为验证所建立 qPCR 体系的实际应用性,从当地市场购得 13 种鳕鱼及鳕鱼深加工制品,试验重复 3

次。

常规 PCR 检测:常规 PCR 反应体系为 20 μL , 包含 10 μL PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 反应液、0.5 μL 正向引物和反向引物(同 qPCR, 各 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL DNA 模板、8 μL 无菌双蒸水。常规 PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环。反应结束后取 5 μL 产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 样品 DNA 提取

通过紫外可见分光光度计在 260 nm 波长下测定分析,大西洋鲑鱼 DNA 的浓度为 380 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,太平洋鲑鱼 DNA 的浓度为 470 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,黑线鲑 DNA 的浓度为 345 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,南极犬牙鱼 DNA 的浓度为 465 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,异鳞蛇鲑 DNA 的浓度为 435 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 qPCR 体系的优化

通过调整反应退火温度和引物浓度来优化 qPCR 体系,最终确定大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼特异性体系反应的退火温度为 61 $^{\circ}\text{C}$;南极犬牙鱼特异性体系反应的退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$;黑线鲑、异鳞蛇鲑特异性反应体系及 16S rDNA 体系反应的退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$;qPCR 体系正向引物和反向引物的浓度均为 300 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能获得较强的荧光信号和较低的检出时间(C_t 值)。

2.3 qPCR 体系的特异性

通过测试目标物种与其他物种的扩增性能来评估各反应体系的特异性。为区分非特异性扩增,将 C_t 值小于 33 的试验结果判定为有效,即阳性扩增。由图 1 可知,每个体系中对应的目标基因都出现 S 型扩增曲线(阳性),而非目标基因及空白对照在 C_t 值小于 33 时并未出现扩增反应(阴性),表明本研究设计的六组 qPCR 体系具有较强的特异性。

2.4 qPCR 体系的标准曲线分析

针对单一鱼肉样品,将各测试鱼类样品 DNA 连续梯度稀释后,分别对各浓度样品进行 qPCR 反应,并根据试验结果评估各反应体系的绝对灵敏度并构建标准曲线。结果显示,大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼和黑线鲑的 16S rDNA 体系标准曲线(图 2-A)斜率分别为-3.174、-3.584、-3.409,对应的扩增效率最低 90.11%,最高 106.56%,曲线的 R^2 值分别为 0.999 6、0.998 3、0.999 0。品种特异性扩增体系中,大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼、黑线鲑、异鳞蛇鲑和南极犬牙鱼标准曲线(图

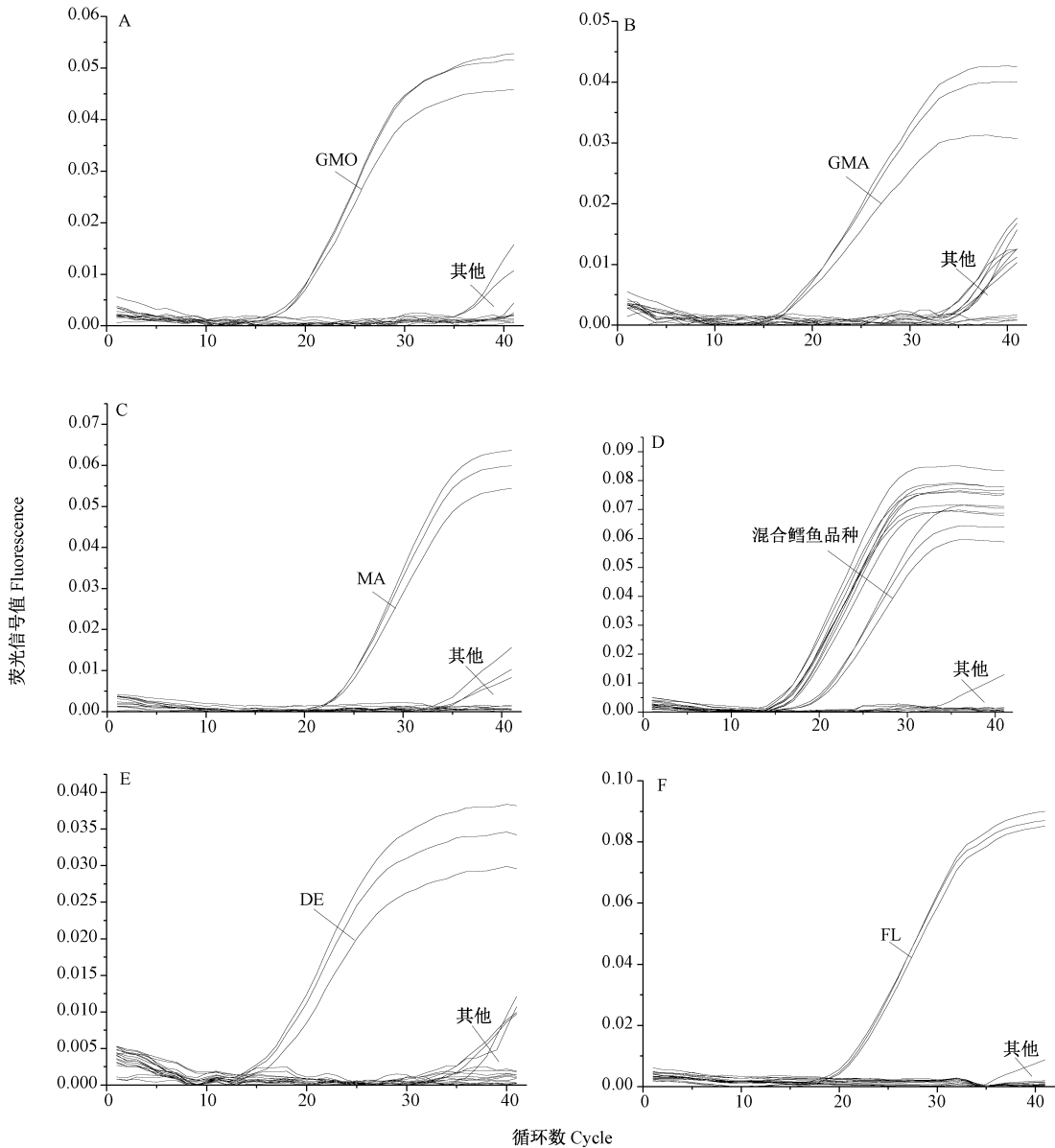
2-B)的斜率分别为-3.093、-3.399、-3.244、-3.464、-3.259,对应的扩增效率分别为 110.53%、96.88%、103.36%、102.69%、94.39%, R^2 值分别为 0.991 2、0.999 2、0.999 9、0.999 1、0.997 9。

为了研究各反应体系的相对灵敏度,对含 0.001%~10% (w/w) 目标鲑鱼肉的混合鱼肉样品 DNA 分别进行各质量分数样品的 qPCR 试验。结果显示,16S rDNA 体系中大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼和黑线鲑的标准曲线斜率分别为-3.262、-2.649、-2.697 (图 2-C),对应的扩增效率最低 102.56%,最高 138.51%,曲线的 R^2 值最低 0.992 4,最高 0.997 0。品种鉴定特异性扩增试验体系中大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼和黑线鲑的标准曲线的斜率分别为-3.507、-2.954、-2.896 (图 2-D),对应的扩增效率最低 92.81%,最高 121.46%, R^2 值最低 0.991 8,最高 0.999 6。

上述结果体现出单一样品中模板浓度对数值以及混合样品中质量分数对数值与 C_t 值之间均存在良好的线性关系,说明所有体系都具有良好的重复性。且扩增效率可以满足 qPCR 反应的要求,根据建立的标准曲线,可对单一或混合样品中目标鲑鱼的含量进行推算。

2.5 市售鲑鱼及鲑鱼深加工制品的检测

从当地市场购得 13 种鲑鱼产品(含 6 种深加工制品),采用本研究建立的 qPCR 体系进行物种检测,并采用常规 PCR 方法进行平行检测。由表 3 可知,13 个检测样品中有 8 个在 16S rDNA 体系中显示阳性,表明其确实属于鲑科(与产品标签一致),其中挪威北极鲑(9 号和 10 号样品)是大西洋鲑鱼中的一种,是挪威海产局为了强调产地和物种另起的商品名称。13 个所测鲑鱼产品中未检出黑线鲑,可能是由于黑线鲑主要销售于英国市场,在国内市场比较少见。深加工样品(2 号和 6 号)中出现大西洋鲑鱼和太平洋鲑鱼同时检出的现象,由于国内市场太平洋鲑鱼价格低于大西洋鲑鱼,因此在加工制品中存在以次充好的现象,但 13 个检测样品中未出现使用异鳞蛇鲑假冒鲑鱼的情况。此外,1、4、7、8、12 号样品产品名称分别为鲑鱼肠、鲑鱼饼、鲑鱼切片、无头鲑鱼和黑鲑鱼,但检测结果发现其不属于常见的大西洋鲑鱼、太平洋鲑鱼和黑线鲑,也不属于鲑科鱼类,该结果与常规 PCR 检测结果一致(图 3),表明市场上可能存在标签造假的现象,但也有可能是鲑形目种类繁多,而本研究中设计的鉴定鲑科的 qPCR 引物不能全面覆盖。



注:A~C和E~F中,“其他”表示除该体系针对的目标鳕鱼外的品种;

D中,“其他”表示除3种目标鳕鱼品种外的其他鱼类品种。

Note: In A, B, C, E and F, ‘others’ represents the non-target cod species tested in the system.

In D, ‘other’ represents the other fish species except GMO, GMA and MA.

图1 qPCR 特异性扩增曲线

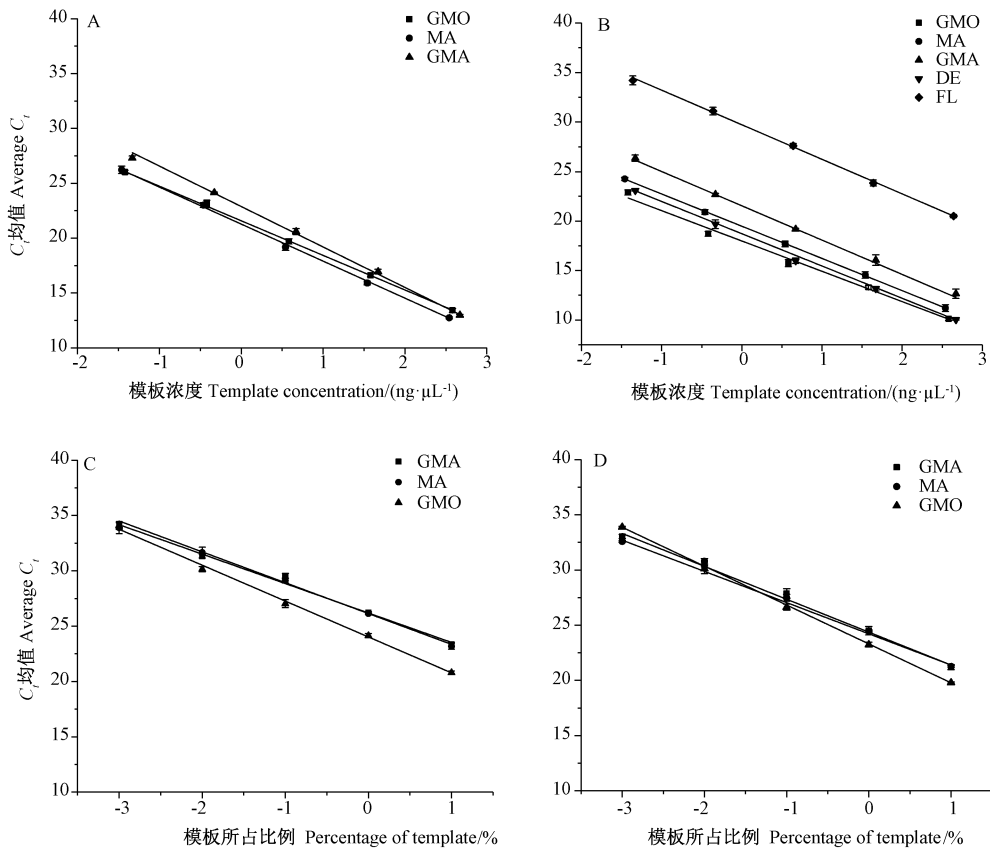
Fig.1 Specific amplification curve of quantitative real-time PCR

3 讨论

当前,我国对鳕鱼产品的需求量越来越大,各种鳕鱼产品的掺假问题引起了媒体和消费者的广泛关注。虽然本研究中并未发现异鳞蛇鲭假冒鳕鱼的情况,但利用异鳞蛇鲭等鱼类对鳕鱼进行掺伪的行为在世界各国均有报道^[21-23]。除鲜销外,鳕鱼也被加工制成烤鳕鱼片、鳕鱼肠等制品。这对鳕鱼种类鉴定方法的有效

性和准确性提出了更高的要求^[24-27]。本试验在准确鉴定鳕鱼种类的基础上,建立了检测3种单一鳕鱼样品(大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼及黑线鳕)和混合鱼肉样品中鳕科鳕鱼成分含量的标准曲线,可用于定量分析。

目前 qPCR 法在肉类物种鉴定中已广泛使用^[28-29],主要包括 SYBR Green I、Taq Man 和 Molecular Beacon 3种方法。其中 SYBR Green I 法最为简便,适用性广,适用于目的基因定量分析、基因表达量的研究及物种鉴别,但荧光染料是与体系中的所



注: 在 16S rDNA 体系 (A) 中, $GMO: y = -3.174x + 21.619$ ($R^2 = 0.9996$, $E = 106.56\%$); $GMA: y = -3.584x + 23.12$ ($R^2 = 0.9983$, $E = 90.11\%$); $MA: y = -3.409x + 21.259$ ($R^2 = 0.9990$, $E = 96.49\%$)。在品种特异性体系 (B) 中, $GMO: y = -3.093x + 17.948$ ($R^2 = 0.9912$, $E = 110.53\%$); $GMA: y = -3.399x + 21.975$ ($R^2 = 0.9992$, $E = 96.88\%$); $MA: y = -3.244x + 19.478$ ($R^2 = 0.9999$, $E = 103.36\%$); $DE: y = -3.259x + 19.59$ ($R^2 = 0.9979$, $E = 102.69\%$); $FL: y = -3.464x + 29.669$ ($R^2 = 0.9991$, $E = 94.39\%$)。在 16S rDNA 体系 (C) 中, $GMO: y = -3.262x + 23.982$ ($R^2 = 0.9970$, $E = 102.56\%$); $GMA: y = -2.694x + 26.251$ ($R^2 = 0.9924$, $E = 138.51\%$); $MA: y = -2.697x + 26.109$ ($R^2 = 0.9963$, $E = 134.84\%$)。在品种特异性体系 (D) 中, $GMA: y = -2.954x + 24.44$ ($R^2 = 0.9957$, $E = 118.03\%$); $GMO: y = -3.507x + 23.225$ ($R^2 = 0.9996$, $E = 92.81\%$); $MA: y = -2.896x + 24.424$ ($R^2 = 0.9918$, $E = 121.46\%$)。

Note: For 16S rDNA system (A), $GMO: y = -3.174x + 21.619$ ($R^2 = 0.9996$, $E = 106.56\%$). $GMA: y = -3.584x + 23.12$ ($R^2 = 0.9983$, $E = 90.11\%$). $MA: y = -3.409x + 21.259$ ($R^2 = 0.9990$, $E = 96.49\%$). For species-specific detection systems (B), $GMO: y = -3.093x + 17.948$ ($R^2 = 0.9912$, $E = 110.53\%$). $GMA: y = -3.399x + 21.975$ ($R^2 = 0.9992$, $E = 96.88\%$). $MA: y = -3.244x + 19.478$ ($R^2 = 0.9999$, $E = 103.36\%$). $DE: y = -3.259x + 19.59$ ($R^2 = 0.9979$, $E = 102.69\%$). $FL: y = -3.464x + 29.669$ ($R^2 = 0.9991$, $E = 94.39\%$). For 16S rDNA system (C), $GMO: y = -3.262x + 23.982$ ($R^2 = 0.9970$, $E = 102.56\%$). $GMA: y = -2.694x + 26.251$ ($R^2 = 0.9924$, $E = 138.51\%$). $MA: y = -2.697x + 26.109$ ($R^2 = 0.9963$, $E = 134.84\%$). For species-specific systems (D), $GMA: y = -2.954x + 24.44$ ($R^2 = 0.9957$, $E = 118.03\%$). $GMO: y = -3.507x + 23.225$ ($R^2 = 0.9996$, $E = 92.81\%$). $MA: y = -2.896x + 24.424$ ($R^2 = 0.9918$, $E = 121.46\%$).

图 2 16S rDNA 和品种特异性荧光定量 PCR 检测体系标准曲线

Fig.2 Standard curves of species-specific and 16S rDNA genes in quantitative real-time PCR assay

有双链 DNA 非特异性结合, 结果可能受引物非特异性扩增或二聚体的影响^[30]。因此该方法对引物的设计要求比较高。

本研究使用 DNASTar 软件的 MegAlign 工具分析比较了不同鳕鱼之间线粒体 DNA 序列的差异, 发现 *Cytb* 基因表现出的种内和种间差异高于 16S rDNA、12S rDNA 及 *COI* 基因, 而差异最小的为 16S rDNA 基因。因此, 选择 16S rDNA 基因设计区分鳕科与非鳕

科的引物, 选择 *Cytb* 基因设计鳕鱼种类特异性引物。但本试验所研究的 3 种鳕鱼的遗传关系较近, *Cytb* 基因差距较小, 对引物设计时的高特异性要求有一定的影响。因此, 在 3 种鳕鱼的特异性扩增体系中, 当 C_t 值达到 33 之后出现了非特异性扩增, 于是将反应的截止点设定为 33 循环, 即反应的 C_t 值大于 33 时出现的扩增判定为阴性 (未检出)。此外, 在设计反应体系时, 退火温度极为重要, 最佳退火温度一般取决于体系

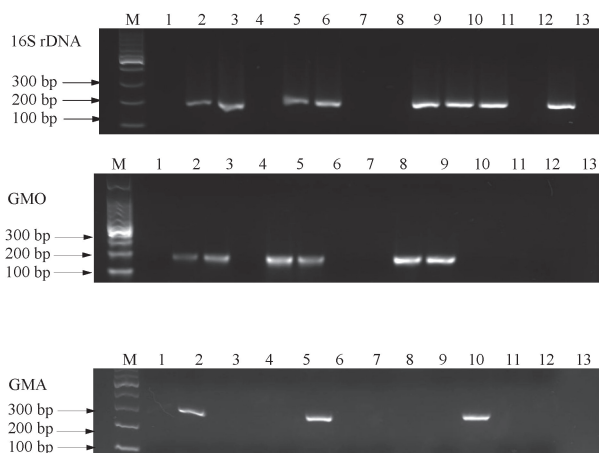
表3 市售鳕鱼产品的 qPCR 检测

Table 3 Detection of commercial cod products by quantitative real-time PCR assays

样品编号 Sample	产品名称 Product description	产品标签 Product label	qPCR 检测 Quantitative real-time PCR assay					
			16S rDNA	GMO	GMA	MA	DE	FL
1	鳕鱼肠	鳕鱼肉,鸡肉,猪肉	-	-	-	-	-	-
2	鳕鱼肠	冷冻鱼糜,鳕鱼肉	+	+	+	-	-	-
3	鳕鱼棒	鳕鱼肉	+	+	-	-	-	-
4	鳕鱼饼	鳕鱼肉	-	-	-	-	-	-
5	烤鱼片	鳕鱼	+	+	-	-	-	-
6	鲜烤鱼片	鳕鱼肉	+	+	+	-	-	-
7	鳕鱼切片	/	-	-	-	-	-	-
8	无头鳕鱼	/	-	-	-	-	-	-
9	挪威北极鳕	挪威北极鳕	+	+	-	-	-	-
10	挪威北极鳕鱼排	挪威北极鳕	+	+	-	-	-	-
11	鲜活鳕鱼	/	+	-	+	-	-	-
12	野生黑鳕鱼	黑鳕鱼	-	-	-	-	-	-
13	狭鳕鱼片	狭鳕	+	-	-	-	-	-

注:“+”:检出;“-”:未检出。

Note: ‘+’: Positive. ‘-’: Negative.



注: M: 100 bp DNA marker; 1~2: 鳕鱼肠; 3: 鳕鱼棒; 4: 鳕鱼饼; 5: 烤鱼片; 6: 鲜烤鱼片; 7: 鳕鱼切片; 8: 无头鳕鱼; 9: 挪威北极鳕鱼; 10: 挪威北极鳕鱼排; 11: 鲜活鳕鱼; 12: 野生黑鳕鱼; 13: 狭鳕鱼片。

Note: M: 100 bp DNA marker. 1~2: Cod sausage. 3: Cod stick. 4: Cod cake. 5: Roast fish fillets. 6: Fresh roast fish fillets. 7: Cod fillet. 8: Headless cod. 9: Norwegian Arctic cod. 10: Norwegian Arctic cod steak. 11: Fresh cod. 12: Black cod. 13: Pollock fillt.

图3 市售鳕鱼产品的常规 PCR 检测

Fig.3 Detection of commercial cod products by conventional PCR assays

引物需要不断调试退火温度。最终确定大西洋鳕鱼和太平洋鳕鱼特异性体系反应的退火温度为 61℃; 南极犬牙鱼特异性体系反应的退火温度为 55℃; 黑线鳕, 异鳞蛇鲭特异性反应体系及 16S rDNA 体系反应的退火温度为 58℃。

本研究在市售样品检测中发现, 有 5 种样品不属于鳕科。其中, 12 号样品野生黑鳕鱼学名裸盖鱼, 为鲉形目黑鲉科鱼类, 其外形与鳕鱼相似, 因此也被称为黑鳕鱼。但本研究并未针对裸盖鱼设计品种鉴定引物, 因此无法对其是否与标签一致做出判断, 只验证了属于鳕科的物种。事实上, “鳕鱼”并不代表任何特定的物种, 需要添加“大西洋”或“太平洋”等限定词来确定物种^[21]。这些结果表明市场上对海鲜产品缺乏系统的命名, 而从为商业欺诈创造了条件。此外, 当鳕鱼被制成深加工制品时, 会有不良商家以次充好, 掺杂价格较低的鳕鱼或者其他肉类, 如鸡肉等。在加工过程中, DNA 的降解以及反应抑制剂的存在会影响扩增时的 C_t 值, 对正确的物种鉴定造成障碍^[32]。而本研究建立的 16S rDNA 体系能够顺利检测出样品是否含有鳕鱼 DNA, 利用种类特异性体系能够区分出常见的 3 种鳕鱼, 结合标准曲线, 根据 C_t 值对其中的鳕鱼含量进行定量分析。本研究建立的 16S rDNA 体系及 3 种鳕鱼特异性体系在模拟混合样品的相对灵敏度均可达 0.01%, 通过对 13 种市售样品的检测, 可检测出未加

中引物的熔解温度 (T_m 值)^[9,31]。本研究采用三步法进行试验, 为确保体系的高扩增效率和高特异性, 每种

工及深加工产品中的鳕鱼成分,且整个过程能在半个工作日内完成。

4 结论

本研究选择 16S rDNA 基于设计了针对鳕科鱼类的特异性引物,选择线粒体 *Cytb* 基因设计区分常见的 3 种鳕鱼(大西洋鳕、太平洋鳕和黑线鳕),首次建立了针对黑线鳕的 qPCR 体系。16S rDNA 体系和 3 种物种特异性体系都具有较强的特异性。在此基础上建立了两套标准曲线,能对单一或混合样品中的目标鳕鱼进行定量检测。通过 13 种鳕鱼类产品检测表明本研究建立的 qPCR 体系具有较强的实用性,能满足日常检测的要求。

参考文献:

[1] Paracchini V, Petrillo M, Lievens A, Kagkli D M, Angers-Lousta A. Nuclear dna barcodes for cod identification in mildly-treated and processed food products [J]. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 2019, 36(1): 1-14

[2] Carvalho D C, Palhares R M, Drummond M G, Gadanho M. Food metagenomics: Next generation sequencing identifies species mixtures and mislabeling within highly processed cod products [J]. *Food Control*, 2017, 80: 183-186

[3] 李栋. 鳕鱼市场乱象全景揭秘 [J]. *农村·农业·农民(B 版)*, 2016(7): 27-28

[4] Dalama J, Vieites J M, Espiñeira M. Detection of the causal agents of Keriorrhea (*Lepidocybium flavobrunneum* and *Ruvettus pretiosus*) by means of real time PCR [J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 326-329

[5] 香港食品安全中心. 《有关识别及标签: 油鱼/鳕鱼的指引》[M]. 中国香港: 食品安全中心, 2007: 1-59

[6] 林霖, 陈国培, 何永盛, 张世伟, 杨国武, 赖心田. 鳕鱼产品属性鉴别及细鳞壮鳕检测方法建立 [J]. *食品工业*, 2017(4): 208-212

[7] Saull J, Duggan C, Hobbs G, Edwards T. The detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process [J]. *Food Control*, 2016, 59: 306-313

[8] Helyar S J, Lloyd H A D, de Bruyn M, Leake J, Bennett N, Carvalho G R. Fish product mislabelling: Failings of traceability in the production chain and implications for illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98691

[9] 叶剑. 常见柔鱼科鱿鱼品种的分子鉴定技术研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017: 5-7

[10] 蒋芝华, 丁棒棒, 王熠, 丁艳菲, 朱诚. 石首鱼科海洋鱼类 DNA 条形码的构建 [J]. *核农学报*, 2018, 32(4): 673-680

[11] Carvalho D C, Palhares R M, Drummond M G, Frigo T B. DNA barcoding identification of commercialized seafood in south Brazil: A

governmental regulatory forensic program [J]. *Food Control*, 2015, 50: 784-788

[12] Kane D E, Hellberg R S. Identification of species in ground meat products sold on the U. S. commercial market using DNA-based methods [J]. *Food Control*, 2016, 59: 158-163

[13] Rasinussen H R S, Morrissey M T. Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market [J]. *Journal of Laboratory Automation*, 2011, 16(4): 308-321

[14] Madisha M T, Ponsonby D, Schwaibold U, Kotzé A, Jansen R, Brettschneider H, Dalton D L. Differentiation of two South African otter species (*Aonyx capensis* and *Lutra maculicollis*) from spraint based on partial CytB primer sets [J]. *Global Ecology and Conservation*, 2015, 4: 8-13

[15] Ghatani S, Shylla J A, Roy B, Tandon V. Multilocus sequence evaluation for differentiating species of the trematode Family Gastrothylacidae, with a note on the utility of mitochondrial COI motifs in species identification [J]. *Gene*, 2014, 548(2): 277-284

[16] Soto-Calderón I D, Clark N J, Wildschutte J V H, DiMattio K, Jensen-Seaman M I, Anthony N M. Identification of species-specific nuclear insertions of mitochondrial DNA (numts) in gorillas and their potential as population genetic markers [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014, 81: 61-70

[17] Hwang I K, Lee H Y, Kim M H, Jo H S, Choi D H, Kang P W, Lee Y H, Cho N S, Park K W, Chae H Z. Development of real-time PCR assay for genetic identification of the mottled skate, *Beringraja pulchra* [J]. *Forensic Science International*, 2015, 255: 80-84

[18] Chapela M J, Sotelo C G, Perez-Martin R L, Pardo M A, Pérez-Villareal B, Gilardi P, Riese J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification [J]. *Food Control*, 2007, 18(10): 1211-1215

[19] Quinteiro J, Sotelo C G, Rehbein H, Pryde S E, Medina I, Pérez-Martín R I, Rey-Méndez M, Mackie I M. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(4): 1662-1669

[20] Rehbein H, Mackie I M, Pryde S, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martín R, Quinteiro J, Rey-Méndez M. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: Validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns [J]. *Food Chemistry*, 1999, 64(2): 263-268

[21] Xiong X, Guardone L, Giusti A, Castiglioglio L, Gianfaldoni D, Guidi A, Andrea A. DNA barcoding reveals chaotic labeling and misrepresentation of Cod (Xue) products sold on the Chinese market [J]. *Food Control*, 2015, 60: 519-532

[22] Bréchon A L, Hanner R, Mariani S. A systematic analysis across North Atlantic countries unveils subtleties in cod product labelling [J]. *Marine Policy*, 2016, 69: 124-133

[23] Betancur R R, Acero P A, Duque-Caro H, Santos S R. Phylogenetic and morphologic analyses of a coastal fish reveals a

- marine biogeographic break of terrestrial origin in the southern Caribbean [J]. PLoS One, 2010, 5(7): 151-160
- [24] 于浩, 曾晓起, 黄良敏. 北太平洋深海鳕科鱼类分类和分布的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2004(1): 38-43
- [25] 高天翔, 杜宁, 张义龙, 薛莹, 李文涛. 大头鳕 *Gadus macrocephalus* Tilesius 摄食食性的初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2003(4): 74-78
- [26] 高天翔, 武云飞, 张秀梅, 王丹, 王迎宾, 李朝秀. 四种鳕鱼的形态学研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2002, 32(6): 884-890
- [27] 孙晓飞, 蒋丹, 万超, 刘淑艳, 吴斌. 建立一种快速鉴定大西洋鳕鱼及其制品的 SYBR Green 荧光 PCR 方法[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2017, 49(3): 127-130
- [28] 陈益春, 牛海力, 孔保华. 实时荧光定量 PCR 技术在肉及肉制品中的应用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 324-328
- [29] 赵亚运, 张玉, 曹明月, 黄红丽, 李娟, 薛良义. 大黄鱼 microRNA 荧光定量 PCR 中内参基因的选择与评价[J]. 核农学报, 2017, 31(7): 1299-1309
- [30] 李新光. 基于 DNA 条形码的鱼片(肉)真伪鉴别技术研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 7-9
- [31] Chuang P S, Chen M I, Shiao J C. Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 1055-1061
- [32] Espineira M, Vieites J M. Rapid method for controlling the correct labeling of products containing common octopus (*Octopus vulgaris*) and main substitute species (*Eledone cirrhosa* and *Dosidicus gigas*) by fast real-time PCR [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2439-2444

Rapid Identification of Three Cod Species by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

WANG Yi¹ FENG Junli^{1,2,*} DAI Zhiyuan^{1,2} TIAN Xiaolan¹

(¹Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310012;

²Key Lab of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012)

Abstract: A quantitative real-time PCR assay was established for analyzing and identifying three cod species (*Gadus morhua*, *G. macrocephalus*, and *Melanogrammus aeglefinus*). 16S rDNA gene was used to design primers for distinguishing the *Gadidae* and non-*Gadidae* species, and the mitochondrial *Cytb* gene was selected for discriminating three cod species. The results showed that the RT-PCR assay systems with either 16S rDNA or species-specific gene performed well. Using the standard curves constructed for each gene, the content of target cod species could be quantitatively detected in single or mixed samples. And the relative detection limit reached 0.01% in simulated mixture samples. Through the detection of 13 commercial cod products, the qPCR system could detect the cod species in raw materials and deep-processed products. In conclusion, the methods developed in this study have strong practicability could meet the needs of routine testing, and have the possibility to be adopted as a routine method for cod market management in future.

Keywords: cod, quantitative real-time PCR, species identification