

论著

应用 DNA 条形码技术鉴定烤鱼片、鱼干中河鲀鱼鱼种

李楠¹, 江涛¹, 沈青², 王佳慧¹, 韩春卉¹, 张靖¹, 李凤琴¹, 徐进¹, 计融¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 青岛大学医学院流行病与卫生统计学教研室, 山东 青岛 266021)

摘要:目的 应用 DNA 条形码技术对北京和厦门市市售烤鱼片、鱼干中河鲀鱼成分进行鉴定。方法 以烤鱼片、鱼干中提取基因组 DNA 为模板, 利用针对河鲀鱼细胞色素氧化酶亚基 I (*CO I*) 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物克隆并测定线粒体 *CO I* 基因序列。将测序结果与 GenBank 中已有河鲀鱼的 DNA 序列进行 BLAST 比对, 并且构建分子进化树。结果 本研究 27 份样品中有 15 份能扩增出特异性条带。通过 BLAST 比对和进化树分析, 将 15 份样品归属到不同的河鲀鱼鱼种中。结论 北京和厦门市市售烤鱼片和鱼干中存在混入河鲀鱼的现象, 应加强监管和规范产品的加工程序以避免中毒事件发生。

关键词: 河鲀鱼; 烤鱼片; 鱼干; DNA 条形码; *CO I* 基因; 掺假; 水产品; 食品安全

中图分类号: Q7; R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)02-0111-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.02.002

Application of DNA barcode to identify the species of puffer fish in roasted fish fillet and dried fish

LI Nan, JIANG Tao, SHEN Qing, WANG Jia-hui, HAN Chun-hui, ZHANG Jing, LI Feng-qin, XU Jin, JI Rong

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective Using DNA barcode to identify species of puffer fish in roasted fish fillet and dried fish sold in Beijing and Xiamen markets. **Methods** Genome DNA from roasted fish fillet and dried fish was extracted, amplified by specific primer of cytochrome oxidase subunit I of puffer fish and sequenced. BLAST comparison was made between the sequencing results and Genebank, and phylogenetic tree was built. **Results** Specific straps were amplified by PCR in 15 out of 27 samples. According to the BLAST comparison and phylogenetic tree analysis, the 15 samples were classified in different puffer fish species. **Conclusion** Some commercial roasted fish fillet and dried fish was made by puffer fish in Beijing and Xiamen. The supervision should be strengthened and the processing procedures should be standardized to avoid tetrodotoxin poisoning.

Key words: Puffer fish; roasted fish fillet; dried fish; DNA barcode; *CO I* gene; adulterate; aquatic product; food safety

河鲀鱼是硬骨鱼纲、辐鳍亚纲、鲈形总目、鲀形目中所有鱼的统称, 而一般所说的河鲀, 指鲀科的各种鱼类^[1], 主要分布在中国、朝鲜、日本沿海。一些河鲀鱼鱼种含有剧毒物质——河鲀毒素 (tetrodotoxin, TTX), 毒性极强, 1 g TTX 的毒性相当于 1 g 氰化物的 1 万倍^[2], 对人的致死剂量约为 8 μg/kg^[3], 中毒后缺乏有效的治疗措施, 病死率极高, 因此我国监管部门一直禁止河鲀鱼的鲜食鲜售。近年来随着各地渔业的迅速发展, 各种鱼类加

工产品(如烤鱼片等)的数量逐渐增多, 而其中是否可能混杂含毒素的河鲀鱼引起关注。由于烤鱼片是将鱼肉打碎混合后烘烤、碾压制成, 无法从形态学上鉴定是否是河鲀鱼, 因此探讨通过建立有效的技术手段对失去形态学特征的加工产品进行河鲀鱼的鉴定和鱼种溯源是本研究的核心内容。

DNA 条形码技术由加拿大分类学家 Paul Hebert 在 2003 年首次提出, 可有效地对海洋鱼类进行分类^[4]。它是基于对线粒体氧化呼吸链的重要成员细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, *CO I*) 特定区段的 DNA 序列进行物种鉴定和序列的分析比较, 并通过系统发育分析所推断出来的进化关系(即进化树)来描述物种间的亲缘关系, 进而对物种进行鉴定。本研究针对河鲀鱼线粒体 *CO I* 设计了特异性引物, 对烤鱼片、鱼干 DNA 进行基因提取、扩增、测序, 分析其线粒体 *CO I*

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划—863 计划(2012AA101603)

作者简介: 李楠 女 助理研究员 研究方向为食品卫生

E-mail: linan100041@cfsa.net.cn

通讯作者: 计融 男 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail: jirong36@cfsa.net.cn

的 DNA 序列,并将序列与 GenBank 中已有河鲀鱼序列进行分析比较,绘制进化树,进行鱼种鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

试验所用 27 份样品分别于 2010 年 6~7 月在

北京的部分超市采集 18 份,2013 年 5 月在福建厦门菜市场采集 9 份。其中,采自北京的样品均为经打碎后混合加工制成的烤鱼片,厦门的样品多数为整鱼或整块的鱼干。所有样品用 ELISA 试剂盒测定 TTX 含量,检出限为 10 ng/g。27 份含 TTX 的样品详细信息见表 1。

表 1 样品详细信息表

Table 1 The detailed information of samples

采样地点	样品编号	性状	标示/标称成分	TTX 含量 /($\mu\text{g/g}$)	采样地点	样品编号	性状	标示/标称成分	TTX 含量 /($\mu\text{g/g}$)	
北京	1	碎肉压制鱼片	鱼片	5.46	厦门	121	碎肉压制鱼片	鱼片	2.86	
	2	碎肉压制鱼片	鱼片	4.52		130	碎肉压制鱼片	海鱼排	0.17	
	13	碎肉压制鱼片	鱼片	1.47		142	碎肉压制鱼片	鱼片	1.83	
	25	碎肉压制鱼片	鱼片	1.44		144	碎肉压制鱼片	鱼片	0.44	
	32	碎肉压制鱼片	鱼肉	0.21		153	无头整鱼干	鱼干	0.19	
	36	碎肉压制鱼片	鱼肉	0.36		154	无头整鱼干	大河鲀鱼干	0.18	
	48	碎肉压制鱼片	马步鱼肉	0.27		155	无头整鱼干	大河鲀鱼片	23.00	
	52	碎肉压制鱼片	海鲜鱼	0.71		157	无头整鱼干	黄花鱼片	0.13	
	65	碎肉压制鱼片	鱼糜	0.41		158	碎肉压制鱼片	鳕鱼片	0.12	
	83	碎肉压制鱼片	鱼肉	0.33		159	碎块鱼干	海鳗鱼片	0.13	
	90	碎肉压制鱼片	鱼片	1.69		161	碎鱼块干	鳕鱼	0.10	
	92	碎肉压制鱼片	鱼片	0.30		162	无头整鱼干	鱼干	0.18	
	94	碎肉压制鱼片	鱼片	0.10		163	无头整鱼干	小黄鱼干	0.12	
	106	碎肉压制鱼片	鳕鱼肉	0.51						

1.1.2 主要仪器与试剂

微量可调移液器(德国 Brand)、基因扩增仪(美国 MJ Research)、电泳仪、恒温混匀仪、成像系统、小型高速离心机、微量紫外分光光度计、涡旋振荡器。

引物由北京英骏生物技术有限公司合成,100 bp DNA Ladder、Pfu PCR MasterMix(2 \times)、海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型)、pGM-T 平末端连接试剂盒、质粒小提中量试剂盒(离心柱型)均购自天根生化科技(北京)有限公司,TTX 毒素检测 ELISA 试剂盒(北京中卫食品卫生科技公司),三羟甲基氨基甲烷(美国 Sigma),乙二胺四乙酸二钠,无水乙醇(分析纯),冰醋酸(分析纯)等。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及浓度测定

用洗净并高压过的剪刀取样,每份样品各用一把剪刀。每份样品中随机抽取一片鱼片,在其上随机选 3 个点(尽量选择靠近边缘、未烤焦、加工过程对肉质影响较低的位置),每个点取 30 mg 鱼肉组织,分别放入 3 只离心管中,按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取。洗脱时用 60 μl 水依次洗脱,先将水加入第 1 支吸附柱,收集洗脱液加入第 2 支吸附柱,再收集洗脱液加入第 3 支吸附柱。将洗脱液收集到离心管中,测定 DNA 浓度及纯度, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 线粒体 *CO I* 基因的克隆与筛选

1.2.2.1 引物设计

参照 GenBank 发布的河鲀鱼 DNA 序列,选择位于 *CO I* 两侧保守性较高的区域,设计合成 *CO I* 的 PCR 扩增引物。具体序列见表 2。

表 2 *CO I* 引物序列

Table 2 Sequences of the primer *CO I*

引物名称	引物序列
上游引物 FP	5'-TGTA AACGACGGCCAGTGTGCCAATCACACGCTGATT-3'
下游引物 RP	5'-CAGGAACAGCTATGACACCATGCCCCATRTARCCRAA-3'

1.2.2.2 PCR 反应体系及条件

PCR 反应体系 50 μl : Pfu PCR MasterMix(2 \times) 25 μl , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μl , DNA 模板 11 μl , ddH₂O 10 μl 。PCR 扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。

1.2.2.3 扩增产物的回收及阳性产物的筛选

采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,在紫外灯下将大小约 850 bp 的目标条带切下放入干净离心管中,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收 DNA。回收的 DNA 片段使用 pGM-T 平末端连接试剂盒进行目的片段的连接和克隆,转化 TOP10 感受态,进行蓝白斑筛选。挑选白色菌落接种到 5 ml LB(含终浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素)培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养过夜,用试剂盒提取质粒。

1.2.3 序列测定和系统发育分析

选取3个经鉴定的重组质粒送北京英骏生物技术有限公司测序。将测出的线粒体 *CO I* 序列,与 GenBank 数据库中已有河鲀鱼线粒体 *CO I* 序列进行比较。DNA 序列采用 Clustal X 软件进行比对,应用 MEGA (Version 4.0) 中的 Kimura's 2-Parameter 模型计算遗传距离,邻接法 (NJ) 构建分子系统树,置信度 (bootstrap) 1 000 次循环检查。

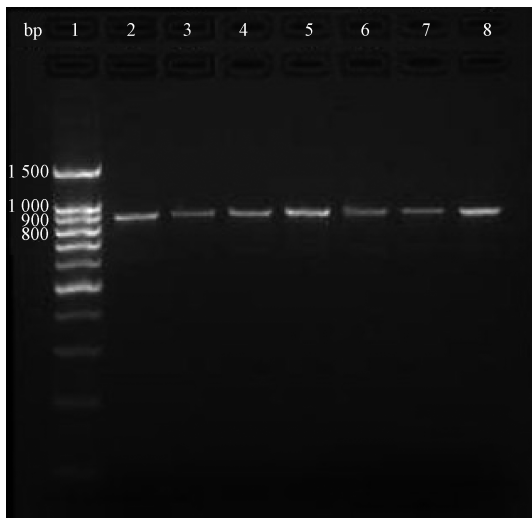
2 结果

2.1 样品 DNA 浓度及纯度

经紫外分光光度计测定,所提取样品的 DNA 浓度在 28.2 ~ 337.0 ng/ μ l 范围内, OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,满足常规 PCR 检测的要求。

2.2 线粒体 *CO I* 基因的扩增和克隆

本研究设计的引物扩增目标片段约为 850 bp,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测的 PCR 扩增产物分子量与设计相符 (见图 1)。将 DNA 片段分离纯化,克隆到载体质粒上,筛选阳性质粒送英俊生物技术公司测序。所有 27 份含 TTX 的样品中有 15 份扩增出目标条带,占 55.56%。其中 10 份样品采集自北京,5 份采集自厦门。



注:1 为 Marker,2~8 为样品扩增条带

图 1 样品 mtDNA *CO I* 基因片段的 PCR 电泳图
Figure 1 Electrophoresis of mtDNA *CO I* gene amplified by PCR

2.3 *CO I* 基因片段的序列比较

将 15 份扩增出目标条带的样品的线粒体 *CO I* 基因序列与 GenBank 中已有河鲀鱼 *CO I* 基因的 DNA 序列进行 BLAST 比较 (见表 3)。为了进一步对河鲀鱼鱼种进行鉴定,再对 15 份样品建立分子进化树 (见图 2)。通过 BLAST 和进化树分析,将 15 份样品归属到不同的河鲀鱼鱼种中,二者鉴定结果一致。

表 3 样品鱼种鉴定结果

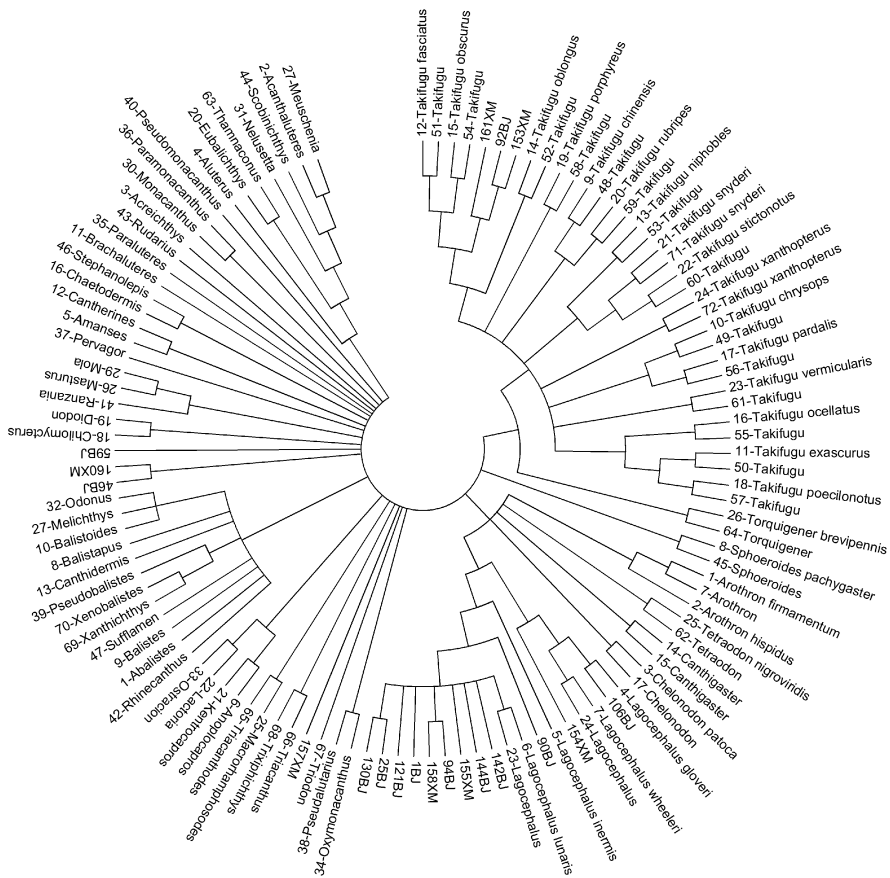
采样地点	样品编号	性状	标示/标称成分	TTX 含量/ (μ g/g)	BLAST 比对结果
北京	1	碎肉压制鱼片	鱼片	5.46	月尾兔头鲀
	25	碎肉压制鱼片	鱼片	1.44	月尾兔头鲀
	90	碎肉压制鱼片	鱼片	1.69	月尾兔头鲀
	92	碎肉压制鱼片	鱼片	0.30	暗纹东方鲀
	94	碎肉压制鱼片	鱼片	0.10	月尾兔头鲀
	106	碎肉压制鱼片	鳕鱼肉	0.51	克氏兔头鲀
	121	碎肉压制鱼片	鱼片	2.86	月尾兔头鲀
	130	碎肉压制鱼片	海鱼排	0.17	月尾兔头鲀
	142	碎肉压制鱼片	鱼片	1.83	月尾兔头鲀
	144	碎肉压制鱼片	鱼片	0.44	月尾兔头鲀
厦门	153	无头整鱼干	鱼干	0.19	暗纹东方鲀
	154	无头整鱼干	大河鲀鱼干	0.18	克氏兔头鲀
	155	无头整鱼干	大河鲀鱼片	23.00	月尾兔头鲀
	158	碎肉压制鱼片	鳕鱼片	0.12	月尾兔头鲀
	161	碎鱼块干	鳕鱼	0.10	暗纹东方鲀

15 份样品中月尾兔头鲀占 66.7% (10/15),暗纹东方鲀占 20% (3/15),克氏兔头鲀占 13.3% (2/15)。可见,混入的河鲀鱼主要是月尾兔头鲀,其次是暗纹东方鲀和克氏兔头鲀。这 3 种河鲀鱼均为带 TTX 鱼种,其中月尾兔头鲀毒性极强,极易引起中毒^[5]。克氏兔头鲀内脏有弱毒,亦有报告指出卵巢及肝脏有毒^[6]。野生暗纹东方鲀卵巢、肝脏等毒性较高,养殖可以做到无毒^[7]。

3 讨论

能够作为条形码的基因,必须具备两个看似矛盾的特征:①具有相对的保守性,便于用通用引物扩增出来;②要有足够的变异性,能够将物种区分开来。*CO I* 基因是一种线粒体蛋白质编码基因,密码子在第 3 位点进化最快,而第 2 位点最为保守,其序列的整体进化速率比 *Cytb* 略低,其种间差异远大于种内差异;*CO I* 基因自身既有足够的变异位点、容易被扩增,又有蛋白编码基因所共有的特点;且动物生命中绝大部分阶段都有明显的 *CO I* 基因序列,可以被通用引物所扩增,因此目前动物界的物种鉴定通常选择 *CO I* 基因^[8-9]。本研究小组在先期的 *CO I* 基因鉴定鲜河鲀鱼鱼种工作基础上,进一步分析 *CO I* 基因鉴定烤鱼片、鱼干中河鲀鱼鱼种的可行性。

本研究选取了 27 份经检测含 TTX 的烤鱼片、鱼干样品进行物种鉴定,理论上检出 TTX 的样品即可认定为含有河鲀鱼成分,但只有 15 份样品经 PCR 扩增出目标条带,测序后经序列比对这 15 份样品均为河鲀鱼,其中 12 份为兔头鲀,3 份为东方鲀。另外 12 份未检出河鲀鱼成分,分析其原因主要有以下三点:①取样时未取到河鲀鱼成分。由于鉴定所需



注:BJ、XM 分别代表北京、厦门,如北京的1号样品标识为1BJ

图2 15份样品的分子进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of 15 samples

样品量小(90 mg),因此如果混入的河鲀鱼较少或分布不均,则有可能取不到河鲀鱼成分;而 TTX 检测用的样品量相对较大(5 g),取到河鲀鱼成分的机率较大。因此在今后的鉴定中可以考虑将 TTX 检测的样品充分打碎后,从中取样进行成分鉴定,尽量保证毒素检测和物种鉴定所用样品的一致性;②样品 DNA 目标检测片段断裂。烤鱼片、鱼干不同于鲜鱼,其加工过程中的烘烤等步骤可能会对 DNA 造成影响,使目标片段断裂,从而无法扩增出目标条带。因此在鉴定中尽量选择加工过程对肉质影响较低的位置取样,并且多点取样;③ELISA 结果假阳性。ELISA 检测可能由于交叉反应或提取液中杂质干扰等原因导致出现假阳性结果,因此 PCR 鉴定不含河鲀鱼成分。

本研究为了获得更为准确的数据,采用 BLAST 与分子进化树两种方法进行分析,结果完全一致。研究表明,无论是出于何种原因,鱼片、鱼干中混入河鲀鱼已是一种较为普遍的现象,15 份检出河鲀鱼成分样品中只有 2 份标示成分为河鲀鱼片,其余均未标示;河鲀毒素含量最高的样品达到 23 μg/g,体重 70 kg 的人食用 24.3 g 即可死亡,因此对身体健康和生命安全造成的潜在威胁是显而易见的。在此建议有关部门应该加强对烤鱼片、鱼干的市场监管,从生

产的源头抓起,同时加强宣传,提高公众的安全意识,最大限度地降低河鲀鱼对人民群众造成的危害。

参考文献

[1] 王奎旗,陈梅,高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(6):855-860.
 [2] 刘燕婷,雷红涛,钟青萍. 河豚毒素的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(2):156-160.
 [3] 沈晓书,顾明松,谢剑炜. 河豚毒素分析方法研究进展[J]. 军事医学科学院院刊,2006,30(3):295-298.
 [4] Carole C B, Balam J B, David G S, et al. Identification of early life-history stages of Caribbean *Apogon* (Perciformes: Apogonidae) through DNA barcoding[J]. Zootaxa, 2011, 3133(1):1-36.
 [5] 台湾鱼类资料库[EB/OL]. [2014-02-11]. <http://fishdb.sinica.edu.tw/chi/species.php?id=383034>.
 [6] 台湾鱼类资料库[EB/OL]. [2014-02-11]. <http://fishdb.sinica.edu.tw/chi/species.php?id=383032>.
 [7] 金传荫,刘永定,宋立荣,等. 野生和人工养殖的暗纹东方鲀毒性的比较[J]. 水生生物学报,2002,26(2):192-193.
 [8] Hebert P D, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartesfulgurator*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(41):14812-14817.
 [9] 肖金花,肖晖,黄大卫. 生物分类学的新动向——DNA 条形码编码[J]. 动物学报,2004,50(5):852-855.