

- [11] 和莹,范智超,张秦铭,等.自动固相萃取-气相色谱质谱法测定水中半挥发性有机物[J].安徽农学通报,2015,21(18):26-27,36.
- [12] U. S. EPA. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS):Method 8270D [S].2014.
- [13] 宋洲,兰秀敏,赵晶臻.水体中有机磷农药分析基质效应影响及其补偿方式研究[J].资源环境与工程,2017,31(6):802-807.

实验技术与方法

双重实时荧光聚合酶链式反应检测棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭

温智清^{1,2}, 阚式绂³, 郑晓聪^{1,2}, 刘莹^{1,2}, 王津津^{1,2}, 史秀杰^{1,2}, 兰文升^{1,2}, 贾鹏^{1,2}, 刘荭^{1,2}

(1.深圳海关动植物检验检疫技术中心,广东深圳 518045; 2.深圳市检验检疫科学研究院,广东深圳 518001; 3.深圳市农产品质量检验检测技术中心,广东深圳 518004)

摘要:目的 建立检测棘鳞蛇鲭(*Ruvettus pretiosus*, RP)和异鳞蛇鲭(*Lepidocybium flavobrunneum*, LF)两种油鱼的双重实时荧光聚合酶链式反应(PCR)方法。方法 基于棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I)基因分别设计特异性引物和探针,并对方法进行灵敏度、特异性和重复性分析,建立双重实时荧光 PCR 方法。结果 模板量在 $8.4 \times 10^5 \sim 8.4 \times 10^0$ copies/ μl 范围内,方法具有良好的线性关系,棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭的线性回归方程分别为 $y = -3.18x + 41.0$ ($R^2 = 0.9988$) 和 $y = -3.37x + 44.5$ ($R^2 = 0.9986$),方法组内相对标准偏差(RSD)为 0.29%~0.84%。其中,检测棘鳞蛇鲭的组内 RSD 为 0.29%~0.84%,检测异鳞蛇鲭的组内 RSD 为 0.29%~0.62%。方法最低检测限为 16.8 copies/反应,并且从随机购买的 50 份鳕鱼样品中鉴定出油鱼成分棘鳞蛇鲭。结论 本试验建立的双重实时荧光 PCR 方法能够特异性地鉴定出棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭,具有实际应用潜力。

关键词:棘鳞蛇鲭;异鳞蛇鲭;双重实时荧光聚合酶链式反应

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)06-0540-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.06.007

Development of a duplex real-time polymerase chain reaction for *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*

WEN Zhiqing^{1,2}, KAN Shifu³, ZHENG Xiaocong^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, WANG Jinjin^{1,2},
SHI Xiujie^{1,2}, LAN Wensheng^{1,2}, JIA Peng^{1,2}, LIU Hong^{1,2}

(1. Animal and Plant Inspection Quarantine Technical Centre Shenzhen Customs District, Guangdong Shenzhen 518045, China; 2. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine Sciences, Guangdong Shenzhen 518001, China; 3. Shenzhen Supervision and Testing Center for Quality and Safety of Agri-products, Guangdong Shenzhen 518004, China)

Abstract: Objective To establish a duplex real-time polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous detection of the *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*. **Methods** The specific primers and probes were designed base on cytochrome C oxidase subunit I gene of *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*, respectively. The performance of method was assessed, including sensitivity, specificity and repeatability. The method was applied to detect the *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum* from fish products. **Results** The result indicated that duplex real-time PCR method was specific to *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*. The method showed good linear relationship between Ct value and sample copies in $8.4 \times 10^5 \sim 8.4 \times 10^0$ copies/ μl , and the linear regression equation were $y = -3.18x + 41.0$ ($R^2 = 0.9988$) and $y = -3.37x + 44.5$ ($R^2 = 0.9986$) for *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*, respectively. The limit of quantification (LOQ) was 16.8 copies. The relative standard deviation (RSD) of this duplex real-time PCR was 0.29%-0.84%, the RSD was 0.29%-0.84% and 0.29%-0.62% for *Ruvettus pretiosus* and

收稿日期:2019-09-12

基金项目:海关总署科技项目(2015IK246,2017IK306)

作者简介:温智清 男 兽医师 研究方向为水生动物检验检疫 E-mail:421192034@qq.com

通信作者:刘荭 女 研究员 研究方向为水生动物检验检疫 E-mail:709274714@qq.com

Lepidocybium flavobrunneum, respectively. The *Ruvettus pretiosus* were identified using this method from 50 codfish products. **Conclusion** This duplex real-time PCR was a sensitive, sepecific and stable method. It would be useful for detection of the *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*.

Key words: *Ruvettus pretiosus*; *Lepidocybium flavobrunneum*; duplex real-time polymerase chain reaction

油鱼是棘鳞蛇鲭 (*Ruvettus pretiosus*, RP) 和异鳞蛇鲭 (*Lepidocybium flavobrunneum*, LF) 的通称, 含有人体不能消化的蜡脂, 食用后油脂囤积在直肠, 导致胃肠痉挛、排油性腹泻等不良症状。油鱼多做工业用途, 用来提炼工业润滑油, 而不建议食用。日本和意大利明确将其列入禁止进口名单, 我国目前对此尚无规定。由于油鱼和鳕鱼的外形相似, 切割加工后更是难以区分, 不法商贩用低价值油鱼冒充高价值鳕鱼, 将其称之为“龙鳕鱼”“圆鳕鱼”误导消费者。2012年,《劳动报》报道家乐福把油鱼当成鳕鱼卖^[1], 2018年12月《成都商报》一篇报道也质疑超市19.8元/斤的鳕鱼的真假^[2], 成为当时的网络热点话题。目前, 仍不断有“油鱼冒充鳕鱼”的关键词流行于互联网, 油鱼鳕鱼真假难辨。

目前的研究多见于对鳕鱼及其制品的物种鉴定分类^[3-9], 而国内少有针对油鱼鉴定方法的研究报道。本试验通过建立检测棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭的双重实时荧光聚合酶链式反应 (PCR) 方法, 为油鱼的鉴别提供准确快速的技术支持, 为食品消费安全提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

油鱼样品: 棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭阳性样品由本实验室保存。

太平洋鳕鱼 (*Gadus macrocephalus*)、大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)、格陵兰鳕鱼 (*Gadus ogac*)、狭鳕 (*Theragra chalcogramma*)、蓝鳕 (*Micromesistius poutassou*)、黑线鳕 (*Melanogrammus aeglefinus*)、远东宽突鳕 (*Eleginus gracilis*)、青鳕 (*Pollachius pollachius*)、澳洲无须鳕 (*Merluccius australis*)、南非无须鳕 (*Merluccius capensis*)、阿根廷无须鳕 (*Merluccius hubbsi*)、北太平洋无须鳕 (*Merluccius productus*)、裸盖鱼 (*Anoplopomafimbria*)、细鳞壮鳕 (*Albatrossia pectoralis*)、鲭鱼 (*Scomber*)、马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、鳕鱼 (*Siniperca*)、鲱鱼 (*Hilsareevesi*)、鲱鱼 (*Pneumatophorus japonicus*)、蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus maccoyii*)、海鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、鳊鱼 (*Carnis megalobra-mae*)、石斑鱼 (*Epinephelus*)、马鲛鱼 (*Scombero-morus niphonius*)、庸鲷 (*Hippoglossus*)、金

线鱼 (*Nemipterus virgatus*)、黄姑鱼 (*Nibea albiflora*)、巴沙鱼 (*Pangasius hypophthalmus*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*)、花鲢 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、秋刀鱼 (*Cololabis saira*)、武昌鱼 (*Megalobrama amblycephala*) 样品由实验室保存或超市购买。

1.1.2 主要仪器与试剂

ABI 7500 双重实时荧光 PCR 仪 (美国 ABI), QIAcube 核酸抽提仪、QIAamp® mini Rotor Adapter 核酸抽提试剂盒均购自德国 QIAGEN, Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

取 30 mg 研磨后的鱼肉样品, 使用核酸抽提试剂盒提取 DNA, 每次 DNA 提取均设置空白对照和阴性对照, 以水为空白对照, 大豆为阴性对照。

1.2.2 引物、探针和标准质粒的设计与合成

根据 GenBank 中棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (cytochrome C oxidase subunit I, COI) 基因序列, 应用 Clustal X2 对 Genbank 中 9 条棘鳞蛇鲭线粒体基因进行序列分析, 选取保守区域设计引物。以棘鳞蛇鲭线粒体全长基因 (参考序列 GenBank 序列号: AP012506) 为模板, 使用 Primer Express 和 Primer Premier 5.0 生物学软件设计引物和探针, 棘鳞蛇鲭双重实时荧光 PCR 引物和探针, 见表 1 和图 1。相同方法, 以 GenBank 序列号为 AP012519 的异鳞蛇鲭 COI 基因为模板设计其特异性引物和探针, 见表 1 和图 2。引物探针均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 双重实时荧光 PCR 引物探针

Table 1 Primers and probes for duplex real-time PCR

引物名称	序列 (5'-3')	产物大小/bp	扩增基因
RP-F	CGGAACCGGATGAACAGTTT		
RP-R	AGATGGTGAGGTCAACTGATGCT	76	COI
RP-Probe	FAM-CCCTCTCGCCGAAACCTAGCC-BHQ1		
LF-F	TGGAACCGGGTGGACAGTAT		
LF-R	AATRGTAGGTCAACGGATGCT	76	COI
LF-Probe	VIC-CCCYCCCTGGCCGTAATYTAGC-BHQ1		

1.2.3 质粒标准品构建

分别将棘鳞蛇鲭 COI 基因片段 (5 836~5 937 nt) 和异鳞蛇鲭 COI 基因片段 (6 570~6 671 nt) 人工合成至 PUC57 载体, 分别构建棘鳞蛇鲭和异鳞蛇

	5 847~5 866 nt	5 871~5 892 nt	5 901~5 922 nt
Species/Abbrev	*****	*****	*****
1. AP012506	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
2. RP Primers and Probe	CGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	CCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	AGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
3. MF959467	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
4. MF959466	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
5. KY176596	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
6. KY018767	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
7. K1945002	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
8. LN907525	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
9. LN907523	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT
10. LN907521	GGAGCCGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	TATCCCTCTCGCCGGAACCTAGCCATGC	GCCGGAGCATCAGTTGACCTCACCATCTTTCT

图1 棘鳞蛇鲭实时荧光 PCR 方法引物和探针

Figure 1 Alignment of primers and probe for detecting *Ruvettus pretiosus*

	6 581~6 600 nt	6 602~6 625 nt	6 635~6 656 nt
Species/Abbrev	*****	*****	*****
1. AP012519	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
2. LF Primers and probe	TGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	CCCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	AGCATCAGTTGACCTAACCATTTTTC
3. EU752107	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
4. LN907515	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
5. EU003560	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
6. FJ605797	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
7. EU752106	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
8. EU003559	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
9. K1945004	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC
10. KJ768247	GGAGCTGGAACCGGATGAACAGTTATCCC	GTATACCTCCCTGGCCGTAATTTAGCCATG	GCTGGAGCATCCGTTGACCTAACCATTTTTC

图2 异鳞蛇鲭实时荧光 PCR 方法引物和探针

Figure 2 Alignment of primers and probe for detecting *Lepidocybium flavobrunneum*

鲭标准质粒,用于两种油鱼成分双重实时荧光 PCR 方法的标准曲线的建立和灵敏度分析。两种标准质粒浓度约为 8.4×10^6 copies/ μ l。标准质粒和质粒浓度测定均委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.4 双重实时荧光 PCR 方法的建立

使用 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 试剂盒配制 25 μ l PCR 反应体系: Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12.5 μ l、ROX Reference II 0.25 μ l、DNA 模板 2 μ l,棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭的引物和探针(浓度均为 20 μ mol/L)、焦碳酸二乙酯(DEPC)水。应用矩阵法对引物和探针进行最佳配比和筛选,根据双重实时荧光 PCR 结果曲线和循环阈值(Ct 值)确定最佳引物浓度配比和反应程序。

1.2.5 特异性试验

以太平洋鳕鱼等 36 种非油鱼以及棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭 2 种油鱼为模板,对本试验所建立方法的特异性进行评价。

1.2.6 重复性测试和标准曲线建立

以 10 倍系列稀释的棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭标准质粒混合液 ($8.4 \times 10^5 \sim 8.4 \times 10^0$ copies/ μ l) 作为模板,进行双重实时荧光 PCR 检测,模板加 2 μ l,每个稀释度做 3 个平行,根据 Ct 值计算标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD),并建立标准曲线。

1.2.7 灵敏度试验

将浓度为 84 copies/ μ l 的棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭标准质粒混合,再用 DEPC 水稀释至 8.4、0.84 和 0.084 copies/ μ l 用于方法定量限(LOQ)的分析,每个浓度做 16 个重复。通过对 Ct 值进行统计学分析,判定方法的 LOQ。

1.2.8 市售样品检测

在市场随机购买 50 份商品名标注为鳕鱼的产

品。其中,线下实体商场超市 20 份,线上网络商城 30 份。用本试验所建立的方法对其进行油鱼成分检测,以评价方法的临床应用效果。

2 结果与分析

2.1 双重实时荧光 PCR 检测方法的建立

通过将引物和探针加样在 0.1~0.8 μ l 之间进行调整,最后用 DEPC 水补足 25 μ l。将反应体系置于双重实时荧光 PCR 仪进行扩增,反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 50~60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环,选取最佳的退火温度。最终确定双重实时荧光 PCR 反应体系如下: Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12.5 μ l, ROX Reference II 0.25 μ l, 棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭正反向引物(20 μ mol/L)各 0.25 μ l, 探针(20 μ mol/L)各 0.25 μ l, 模板 2 μ l, 加 DEPC 水至总体积为 25 μ l。PCR 反应退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 同时收集 2'-氯-7'-苯基-1,4-二氯-6-羧荧光素(VIC)和 6-羧基荧光素(FAM)两种荧光信号。PCR 结果显示棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭阳性对照分别出现典型的“S”型扩增曲线,空白和阴性对照无扩增曲线,见图 3。

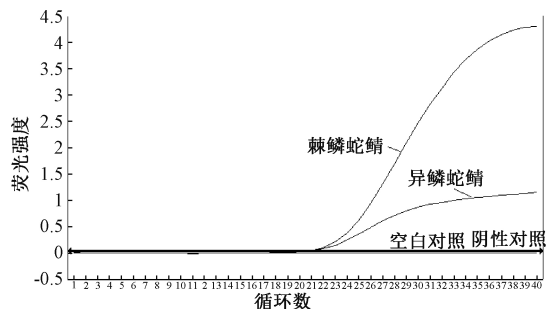


图3 双重实时荧光 PCR 建立结果

Figure 3 Amplification results of duplex real-time PCR

2.2 特异性测试

应用本试验建立的方法对太平洋鲑鱼等 36 种非油鱼以及棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭两种油鱼样品进行检测,结果表明 36 种非油鱼样品均未收集到荧光信号,而棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭收集到荧光信号,出现“S”型扩增曲线,结果表明建立的方法具有较好的特异性。

2.3 重复性试验及标准曲线建立

重复性试验结果表明,在稀释度为 $8.4 \times 10^5 \sim 8.4 \times 10^0$ copies/ μl 范围内,方法的总体 RSD 为 0.29%~0.84%。其中,检测棘鳞蛇鲭的组内 RSD 为 0.29%~0.84%,检测异鳞蛇鲭的组内 RSD 为 0.29%~0.62%,见表 2。

表 2 双重实时荧光 PCR 重复性结果
Table 2 Repeatability of inner group of duplex real-time PCR

浓度 /(copies/ μl)	棘鳞蛇鲭				异鳞蛇鲭			
	Ct 值	平均 Ct 值	SD	RSD/%	Ct 值	平均 Ct 值	SD	RSD/%
8.4×10^5	18.79,18.85,18.90	18.85	0.05	0.29	21.28,21.37,21.40	21.35	0.06	0.29
8.4×10^4	22.21,22.22,22.36	22.26	0.08	0.38	24.36,24.40,24.51	24.42	0.08	0.32
8.4×10^3	24.92,25.04,25.13	25.03	0.11	0.42	27.75,27.76,27.94	27.81	0.11	0.38
8.4×10^2	28.47,28.55,28.68	28.57	0.11	0.37	31.04,31.12,31.23	31.13	0.10	0.31
8.4×10^1	31.52,31.61,31.88	31.67	0.18	0.59	34.26,34.43,34.51	34.40	0.13	0.37
8.4×10^0	34.60,34.65,35.13	34.79	0.29	0.84	38.27,38.52,38.75	38.51	0.24	0.62

以标准质粒拷贝数 log 值为横坐标,Ct 值为纵坐标建立标准曲线。方法在检测棘鳞蛇鲭的回归方程为 $y = -3.18x + 41.0$,相关系数 $R^2 = 0.9988$,扩增效率为 106%;方法在检测异鳞蛇鲭的回归方程为 $y = -3.37x + 44.5$, $R^2 = 0.9986$,扩增效率为 98%,两者线性相关性和扩增效率均良好。

2.4 灵敏度测试

采用浓度为 $8.4 \times 10^0 \sim 8.4 \times 10^{-2}$ copies/ μl 的棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭标准质粒混合液分析方法的灵

敏度,模板量 2 μl ,每个浓度 16 个重复。结果表明,当模板量为 16.8 copies/反应时,本方法可以稳定检出两种油鱼成分。当模板量为 1.68 copies/反应时,在检测棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭时均出现不同程度漏检,棘鳞蛇鲭假阴性率为 62.5% (10/16),异鳞蛇鲭假阴性率为 37.5% (6/16)。当模板量降低至 0.168 copies/反应时,本试验建立的方法均不能检测两种油鱼成分,见表 3,因此,本试验所建立双重实时荧光 PCR 的 LOQ 为 16.8 copies/反应。

表 3 灵敏度测试结果 (n=16)
Table 3 Sensitivity of duplex real-time PCR

模板量 /(copies/反应)	棘鳞蛇鲭				异鳞蛇鲭			
	阳性结果次数	平均 Ct 值	SD	RSD/%	阳性结果次数	平均 Ct 值	SD	RSD/%
16.8	16	34.98	0.24	0.68	16	38.43	0.20	0.52
1.68	6	—	—	—	10	—	—	—
0.168	0	—	—	—	0	—	—	—

注:—表示不适用

2.5 市售样品检测结果

用所建立的方法对采集的 50 份鲑鱼样品进行油鱼成分检测。结果显示,在网络商城上购买的 30 份鲑鱼产品中,3 份含棘鳞蛇鲭成分,结果见表 4。

表 4 市售样品检测结果

Table 4 Result of *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum* for comercial cod product

样品来源	样品份数	含棘鳞蛇鲭成分样品份数	含异鳞蛇鲭成分样品份数	不含油鱼成分样品份数
实体商场超市	20	0	0	20
网络商城	30	3	0	27

3 讨论

生物分类学中,鲑鱼属于辐鳍鱼纲 (Actinopterygii) 鲑形目 (Gadiformes)。鲑形目包含鼠尾学

科 (Macrouridae) 等多科,约 27 个属 89 个种^[10],分类复杂。油鱼属于辐鳍鱼纲 (Actinopterygii) 鲈形目 (Perciformes) 蛇鲭科 (Gempylidae),该科包含棘鳞蛇鲭属 (*Ruvettus*) 和异鳞蛇鲭属 (*Lepidocybium*)^[11],每个属均含有 1 个种,即棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭。虽然鲑鱼和油鱼均属于辐鳍鱼纲,但是属于不同目,所以两者在生物学形态上具有一定差异。鲑鱼的鱼段皮为发白或灰白,色淡,肉质细腻较软,入口即化,味香浓;油鱼的皮为灰黑色,色深,网格状,肉质较硬且粗糙,入口油腻,口感差,过多食用会引起胃部不适或腹泻。但是,仅凭形态学现实中难以对其进行区别,尤其加工后的油鱼和鲑鱼十分相似,更加难以辨认。由于分子生物学方法在进行物种鉴别时具有更高的特异性、灵敏度和可靠性,被广泛应用于食品和农产品中特定成分的检测^[12-14]。

目前,荧光 PCR 方法和普通 PCR 方法已经应用于鳕鱼成分的鉴定^[3-9],应用效果良好。然而,用于鉴定油鱼的 PCR 方法国内还未见报道。本试验根据 GenBank 中棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭线粒体 *COI* 基因,设计特异性引物和探针,建立了检测棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭的双重实时荧光 PCR 方法。本方法采用 DNA 为基础的 PCR 检测技术,不受食品制作加工影响,可用于任何形式的冷冻、罐装、烟熏、熟制等深度加工海产品中混合微量油鱼的检测。可一次性对单份样品进行两种油鱼成分鉴定,无需 PCR 后续电泳操作,具有良好的稳定性、特异性、灵敏度和实际应用潜力。

本试验从 50 份购买的鳕鱼中,鉴定出 3 份来自网络商城的鳕鱼含有棘鳞蛇鲭成分,说明市场上以油鱼充当鳕鱼欺骗消费者的行为仍然存在。建议我国应尽快出台针对鳕鱼命名标准和市场规范的准则,以提升市场辨识度。同时借鉴中国香港^[15]等地做法,将棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭的俗名定为“蜡油鱼”和“oilfish”,不可使用“鳕鱼”等其他俗名,以供业界和消费者分辨,同时包装上还应提示食用的风险和后果并给出食用建议。

参考文献

[1] 劳动报.家乐福被指把油鱼当成鳕鱼卖[EB/OL]. (2019-04-24) [2019-08-05]. <http://www.labour-daily.cn/ldb/node59/u1a6934.html>.

[2] 遼望一,陈红.儿子腹泻后的追问:超市 19.8 元/斤的“鳕鱼”是真的吗?[EB/OL]. (2018-12-05)[2019-08-05]. https://sichuan.scol.com.cn/eddt/201812/56718_162.html.

[3] SANCHEZ A, QUINTEIRO J, REY-MENDEZ M. Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR[J]. *Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3397-3403.

[4] BEATRIZ H, MARIA M, VIEITES J M. Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real time PCR [J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58(8): 4794-4799.

[5] TAYLOR M, FOX C J, RICO I J, et al. Species-specific TaqMan probes for simultaneous identification of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2(4): 599-601.

[6] 尹伟力,方绍庆,耿金培,等. 鳕鱼物种特异性鉴定的 PCR 方法研究[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(2): 19-24.

[7] 李富威,张舒亚,任硕,等. 鳕鱼成分的实时荧光 PCR 检测方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(12): 80-85.

[8] AKASAKI T, YANAGIMOTO T, YAMAKAMI K, et al. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in codfish (order *Gadiformes*) products [J]. *Food Sei*, 2006, 71(3): 190-195.

[9] COMI G, LACUMIN L, RANTSIOU K, et al. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect comercial frauds [J]. *Food Control*, 2005, 16(1): 37-42.

[10] RICHARDS W J. Order *Gadiformes* [M]//RICHARDS W J. Early stages of Atlantic fishes: an identification guide for the Western Central North Atlantic. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2019: 2640.

[11] CARPENTER K E, NIEM T H. Gempylidae, Trichiuridae [M]//CARPENTER K E, NIEM T H. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. Rome: FAO, 2001: 3381-4218.

[12] 张丽,张良,刘书成,等. DNA 技术在海洋食品物种鉴定中的应用[J]. *遗传*, 2010, 32(6): 555-560.

[13] 李富威,高琴,张舒亚,等. 实时荧光 PCR 方法在食品真伪辨别中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(14): 367-370.

[14] 张舒亚,金丽琴,蒋剑琼,等. 食品中鱼源性成分 PCR 检测方法研究[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(1): 142-145.

[15] 香港食物安全中心.有关识别及标签油鱼/鳕鱼的指引[Z]. 香港食物安全中心,2007.

· 资讯 ·

当归等 6 种新增按照传统既是食品又是中药材的物质目录

序号	名称	植物名/ 动物名	拉丁学名	所属科名	部位	备注
1	当归	当归	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	伞形科	根	仅作为香辛料和调味品
2	山柰	山柰	<i>Kaempferia galanga</i> L.	姜科	根茎	仅作为香辛料和调味品
3	西红花	番红花	<i>Crocus sativus</i> L.	鸢尾科	柱头	仅作为香辛料和调味品,在香辛料和调味品中又称“藏红花”
4	草果	草果	<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost et Lemaire	姜科	果实	仅作为香辛料和调味品
5	姜黄	姜黄	<i>Curcuma longa</i> L.	姜科	根茎	仅作为香辛料和调味品
6	荜茇	荜茇	<i>Piper longum</i> L.	胡椒科	果穗	仅作为香辛料和调味品

备注:列入按照传统既是食品又是中药材的物质目录的物质,作为食品生产经营,应当符合《食品安全法》的规定。