

实验技术与方法

鱼肉制品中巴沙鱼源性成分的实时荧光聚合酶链式反应快速检测法

李杰¹, 钱云开², 张新¹, 王家芳¹, 李学红¹, 林鹏¹, 王建昌³, 孙运达¹

(1. 临沂市检验检测中心, 山东 临沂 276000; 2. 秦皇岛海关技术中心, 河北 秦皇岛 066004; 3. 石家庄海关技术中心, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 建立巴沙鱼源性成分的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)快速检测手段。方法 根据巴沙鱼的线粒体 *cytb* 基因序列设计引物, 使用实时荧光 PCR 进行扩增, 从而达到快速检测产物的目的。结果 此方法特异性良好, 巴沙鱼基因组 DNA 灵敏度可达到 10^{-4} ng, 在与婴幼儿米粉、儿童辅食芝麻粉、鸡肉粉和大西洋鳕鱼粉混合的鱼肉制品中均可检测, 且质量分数灵敏度均可达到 0.01%。结论 本方法检测特异性高、时间短、灵敏度高, 可满足鱼肉制品中巴沙鱼掺假的检测要求。

关键词: 巴沙鱼; 实时荧光聚合酶链式反应; 鱼肉制品; 掺假; 检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)04-0426-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.04.004

Real-time polymerase chain reaction method for rapid detection of *Pangasius bocourti*-derived components in fish products

LI Jie¹, QIAN Yunkai², ZHANG Xin¹, WANG Jiafang¹, LI Xuehong¹, Lin Peng¹, WANG Jianchang³, SUN Yunda¹

(1. Linyi Inspection and Testing Center, Shandong Linyi 276000, China; 2. Qinhuangdao Customs Technology Center, Hebei Qinhuangdao 066004, China; 3. Shijiazhuang Customs Technology Center, Hebei Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To establish a real-time polymerase chain reaction (PCR) rapid detection method for *Pangasius bocourti*-derived components. **Methods** Primers were designed according to the mitochondrial *cytb* gene sequence of *Pangasius bocourti*, and real-time PCR was used for amplification to achieve the purpose of rapid detection of products. **Results** This method had good specificity, and the sensitivity could reach 10^{-4} ng *Pangasius bocourti* DNA. *Pangasius bocourti cytb* gene could be detected in fish products mixed with rice noodles, sesame powder, chicken powder and atlantic cod meal, and the sensitivity could reach 0.01%. **Conclusion** This method had high specificity, short time and high sensitivity, and could meet the detection requirements of *Pangasius bocourti* adulteration in fish meat products.

Key words: *Pangasius bocourti*; real-time polymerase chain reaction; fish products; adulteration; detection

巴沙鱼 (*Pangasius bocourti*) 属鲶形目, 鲇鲶属 (*Paugusius*), 为无鳞鱼类^[1], 呈纺锤形^[2], 是东南亚国家重要的淡水养殖品种, 湄公河流域中一种特有的优质经济鱼类^[3]。巴沙鱼的适应性很强, 它食性广、耐缺氧、不易生病, 对水质要求不高, 特别适合高密度养殖, 且生长十分迅速, 非常高产, 平均亩产可以超过 5 t, 相对于其他养殖鱼类, 成本优势非常

明显。巴沙鱼肉质白嫩, 无肌间小刺, 利于加工, 且没有土腥气。因此当巴沙鱼制成与肉制品(如鱼排、鱼柳等), 普通消费者无法分辨, 因此常被不良商家用来冒充龙利鱼、鲷鱼、鳕鱼等海鱼出售^[4]。近几年, 鳕鱼和三文鱼在中国的销量迅速增长, 有商家在婴幼儿米粉、儿童辅食芝麻粉、水饺和代餐中添加鳕鱼、三文鱼等进口海鱼, 使其营养更加丰富, 口味更好, 一旦有不良商家在这类食品中用价格低廉的巴沙鱼冒充价格昂贵的鳕鱼或三文鱼, 消费者仅凭口感无法分辨。以 DNA 分子特异基因扩增技术为基础的实时荧光聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 具有简单、快速、灵敏度高和准确性高的优点, 目前已是肉制品物种源性成分鉴定普遍采用的方法^[5]。本文采用实时

收稿日期: 2021-04-19

基金项目: “科技冬奥”国家重点研发计划 (2020YFF0305000); 海关总署计划 (2018IK006)

作者简介: 李杰 男 主管药师 研究方向为食品药品安全

E-mail: sdys373@163.com

通信作者: 孙运达 男 研究员 研究方向为食品质量安全

E-mail: ly8961112@163.com

SYBR Green I 荧光 PCR 技术对鱼肉制品中巴沙鱼源性成分进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测样品

巴沙鱼、龙利鱼、大西洋鳕鱼、大西洋鲑鱼(三文鱼)、鲷鱼均通过京东商城购买,草鱼、鲤鱼、猪肉、牛肉、山羊肉、鸡肉均在临沂当地超市购买。

1.1.2 主要仪器与试剂

荧光定量 PCR 仪(LightCycler96,瑞士罗氏),电热恒温干燥箱(UFB500,德国墨尔特),超微量分光光度计(ND2000,美国 Thermo),匀浆仪(HTY-761,浙江泰林),微量管离心机(MIKRO 200R,德国 Hettich)。

DNA 提取试剂:QIAamp Fast DNA Tissue Kit 组织基因组 DNA 提取试剂盒,荧光 PCR 试剂:2×SYBR Green qPCR Master Mix(美国 Bimake)。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取

用无菌剪刀取样品 25 mg,捣碎成肉糜,置于 DNA 提取试剂盒提供的管中,按照 DNA 提取试剂盒的步骤进行操作。

1.2.2 引物设计与反应体系

通过 GenBank 下载巴沙鱼与龙利鱼、大西洋鳕鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼,以及常见的动物(猪、牛、山羊、鸡)的 *cytb* 基因序列,利用 ClustalX 软件对上述物种 *cytb* 基因序列进行比对,找出序列差异处,通过 NCBI 网站的引物设计工具 Primer-BLAST 设计一对特异性引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

上游引物 F: 5'-TATCGCAGCCACAGTACTA CATGC-3';

下游引物 R: 5'-GGGCTAAAGATGCAAGGG CTG-3'。

通过对引物浓度和循环数进行 PCR 反应程序的条件优化,最终确定了以下条件:

实时荧光 PCR 反应体系(20 μ L): 10 μ L 2×SYBR Green qPCR Master Mix,上下游引物各 0.4 μ L(终浓度为 5 μ mol/L),提取 DNA 模板 1 μ L,纯水 8.2 μ L。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。

1.2.3 特异性试验

利用超微量分光光度计测定样品 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。当 A_{260}/A_{280} 值在 1.7~1.9, 适宜于 PCR 扩增^[6]。利用检测

巴沙鱼源性成分的特异性引物,分别以龙利鱼、大西洋鳕鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼、猪、牛、山羊、鸡等动物的 DNA 为模板,利用超微量分光光度计测定上述样品 DNA 浓度,将 DNA 浓度稀释成 1 ng/ μ L,以纯水为模板作为空白对照,进行实时荧光 PCR,验证引物的特异性。并对巴沙鱼样品的扩增产物进行测序,在 NCBI 中比对测序结果。

1.2.4 基因组灵敏度试验

利用超微量分光光度计测定巴沙鱼样品 DNA 浓度,用超纯水 10 倍梯度稀释巴沙鱼 DNA,依次稀释 5 个数量级,按照 1.2.2 的步骤进行实时荧光 PCR 检测。

1.2.5 混合米粉样品的检验

制作含有鱼肉成分的米粉和代餐粉模拟试验。取巴沙鱼样品煮熟,置于电热恒温鼓风干燥箱中,105 $^{\circ}$ C 烘干,匀浆仪打磨成干粉,与不含鱼源性成分的米粉按照干重质量比 1:9 混合,再置于匀浆仪中充分打磨混合,制成含有 10% 巴沙鱼干粉的米粉。按照此法依次制成含有 1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.000 1% 巴沙鱼干粉的米粉。按照 1.2.1, 1.2.2 的方法进行 DNA 提取和实时荧光 PCR 检测。

1.2.6 混合芝麻粉样品的检验

制作含有鱼肉成分的芝麻粉模拟试验。按照 1.2.5 的步骤制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 巴沙鱼干粉的芝麻粉。按照 1.2.1, 1.2.2 的方法进行 DNA 提取和实时荧光 PCR 检测。

1.2.7 混合鸡肉粉样品的检验

制作含有巴沙鱼粉和鸡肉成分的鱼水饺模拟试验。取鸡肉样品煮熟,置于电热恒温鼓风干燥箱中,105 $^{\circ}$ C 烘干,匀浆仪打磨成鸡肉干粉。按照 1.2.5 的方法制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 巴沙鱼干粉的鸡肉粉。按照 1.2.1, 1.2.2 的方法进行 DNA 提取和实时荧光 PCR 检测。

1.2.8 混合大西洋鳕鱼粉样品的检验

制作含有巴沙鱼粉和大西洋鳕鱼粉的混合鱼粉模拟试验。取大西洋鳕鱼样品煮熟,置于电热恒温鼓风干燥箱中,105 $^{\circ}$ C 烘干,匀浆仪打磨成鱼肉干粉。按照 1.2.5 的方法制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 巴沙鱼干粉的大西洋鳕鱼粉。按照 1.2.1, 1.2.2 的方法进行 DNA 提取和实时荧光 PCR 检测。

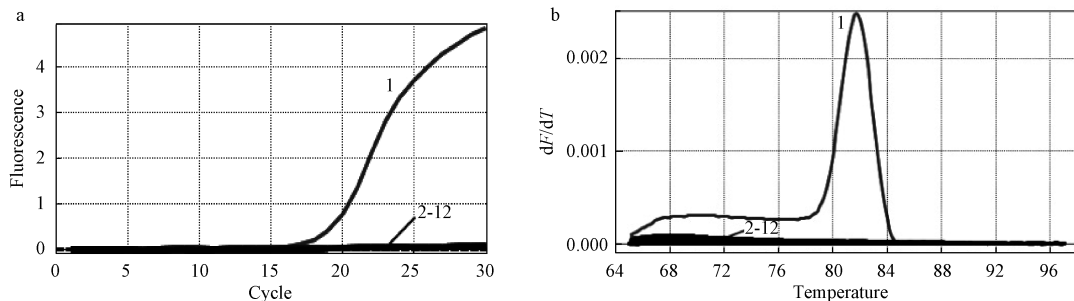
2 结果

2.1 特异性试验结果

样品 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值均在 1.7~1.9, 适宜于 PCR 扩增。检测结果如图 1 所示, 1 号样品(巴沙

鱼)出现阳性扩增曲线, C_t (Cycle threshold) 值为 18.09, 其他样品没有巴沙鱼源性成分 DNA, 无荧光信号检出。通过溶解曲线可知巴沙鱼样品的溶解温度 T_m 值大约在 82 °C, 无引物二聚体和非特异性

扩增产物的出现, 将阳性样本扩增产物的测序序列在 NCBI 进行 BLAST 比对, 样本序列与巴沙鱼 *cytb* 基因序列相似度大于 99%, 说明上述引物具有良好的特异性。



a. 扩增曲线, b. 溶解曲线。1. 巴沙鱼; 2. 龙利鱼; 3. 大西洋鲑鱼; 4. 大西洋鲑鱼; 5. 鲷鱼; 6. 草鱼; 7. 鲤鱼; 8. 猪肉; 9. 牛肉; 10. 山羊肉; 11. 鸡肉; 12. 空白对照

图1 特异性试验曲线

Figure 1 Curves of specific test

2.2 基因组灵敏度实验结果

利用超微量分光光度计测定巴沙鱼样品 DNA 浓度, 反应体系模板 DNA 的量分别为 1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} ng, 当 DNA 量 $\geq 10^{-4}$ ng 时均可出现特异性扩增曲线(图 2), C_t 值分别为 1 ng: 15.38; 10^{-1} ng: 18.39; 10^{-2} ng: 22.10; 10^{-3} ng: 25.98; 10^{-4} ng: 27.57。

22.85; 0.1%: 25.39; 0.01%: 26.93。

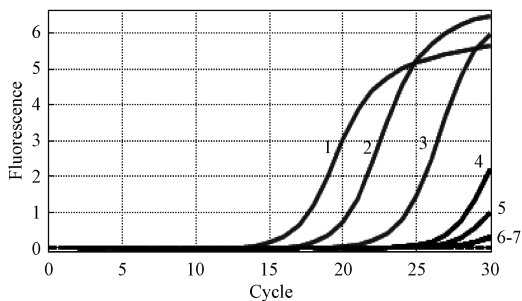
2.3.4 混合大西洋鲑鱼粉样品试验结果

当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.01\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图 3d), C_t 值分别为 10%: 18.36; 1%: 22.47; 0.1%: 25.19; 0.01%: 26.57。

本试验中巴沙鱼质量分数降低, C_t 值相应变大, 说明 DNA 提取效率也随之下降。

3 讨论

巴沙鱼具有出肉率高、资源量巨大等优势, 近年来, 巴沙鱼进入中国市场后, 消费量呈现火箭式的增长^[7]。由于巴沙鱼无小刺、肉质软、易消化、营养比较丰富、价格低^[8], 预计未来巴沙鱼在国内的消费量还会持续增长。龙利鱼俗称舌鳎鱼, 属舌鳎科, 舌鳎属, 是一种生活在中国近海大型底层的暖温性鱼类。该鱼味道鲜美、营养丰富, 属于高蛋白鱼类。但其自然资源量少, 出肉率偏低。目前, 在鱼类水产市场中, 消费者对巴沙鱼和龙利鱼认知混淆, 水产市场、餐饮行业将“巴沙鱼”冠名为“龙利鱼”进行销售^[9]。基于荧光 PCR 技术对于鱼肉真假的鉴别, 出台了对于石斑鱼等 7 种鱼类的检测标准方法^[6], 有学者通过荧光 PCR 法鉴别大西洋鲑鱼和虹鳟鱼^[10], 但是应用荧光 PCR 技术对于巴沙鱼源性成分进行检测的方法未见报道。SYBR Green I 是一种结合于所有双链 DNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。在游离状态下, SYBR Green I 发出微弱的荧光, 但一旦与双链 DNA 结合后, 荧光大大增强^[11]。SYBR Green I 实时荧光 PCR 具有灵敏度高、特异性好、反应时间短等优点^[12], 相比于探针法实时荧光 PCR 成本较低。本研究建立了一种可以快速检测鱼肉制品中巴沙鱼



1. 1 ng; 2. 10^{-1} ng; 3. 10^{-2} ng; 4. 10^{-3} ng; 5. 10^{-4} ng; 6. 10^{-5} ng; 7. 空白对照

图2 灵敏度试验扩增曲线

Figure 2 Amplification curve of sensitivity test

2.3 混合样品试验结果

2.3.1 混合米粉样品试验结果

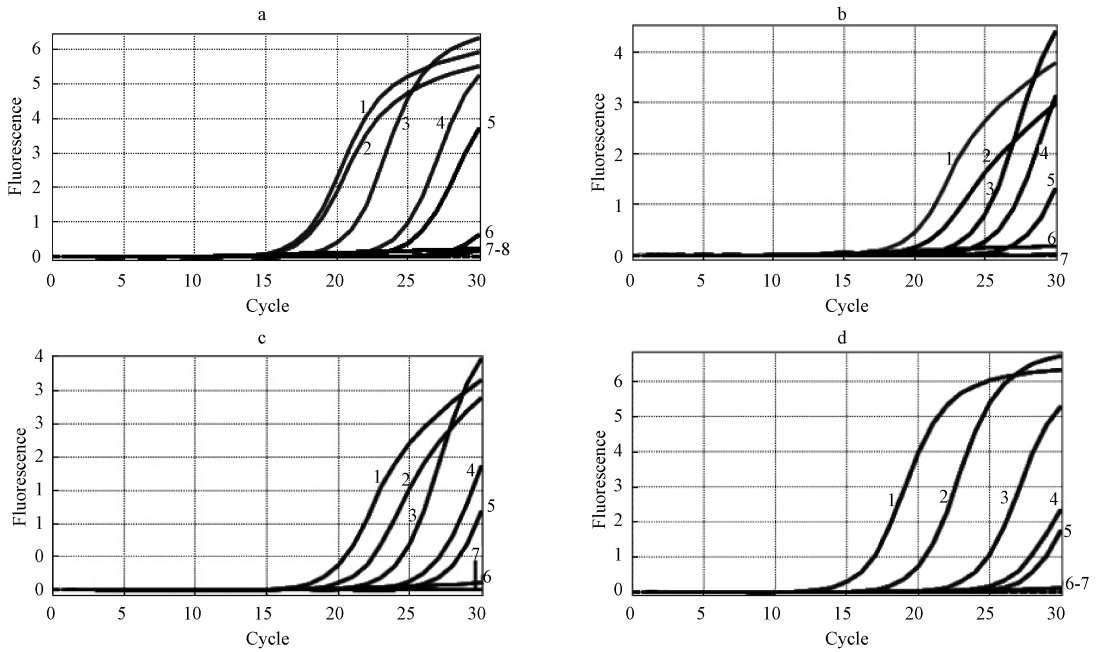
当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.01\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图 3a), C_t 值分别为 10%: 16.01; 1%: 19.04; 0.1%: 22.71; 0.01%: 24.03。

2.3.2 混合芝麻粉样品试验结果

当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.01\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图 3b), C_t 值分别为 10%: 20.44; 1%: 22.91; 0.1%: 24.60; 0.01%: 27.05。

2.3.3 混合鸡肉粉样品试验结果

当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.01\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图 3c), C_t 值分别为 10%: 20.69; 1%:



a. 混合米粉样品试验:1. 阳性对照;2. 10%;3. 1%;4. 0.1%;5. 0.01%;6. 0.001%;7. 0.0001%;8. 空白对照
 b. 混合芝麻粉样品试验:1. 阳性对照;2. 10%;3. 1%;4. 0.1%;5. 0.01%;6. 0.001%;7. 空白对照
 c. 混合鸡肉粉样品试验:1. 阳性对照;2. 10%;3. 1%;4. 0.1%;5. 0.01%;6. 0.001%;7. 空白对照
 d. 混合大西洋鲑鱼粉样品试验:1. 阳性对照;2. 10%;3. 1%;4. 0.1%;5. 0.01%;6. 0.001%;7. 空白对照

图3 混合样品试验扩增曲线

Figure 3 Amplification curve of mixed sample test

源性成分的 SYBR Green I 实时荧光 PCR 法,可以有效解决鱼肉制品中用巴沙鱼冒充海鱼的掺假问题。本研究反应时间约为 1 h,大大节约了时间成本,巴沙鱼基因组 DNA 检测灵敏度可达到 10^{-4} ng,在各项鱼肉制品模拟试验中,质量分数灵敏度均达到 0.01%。本研究为加强鱼肉制品的监管力度,打击鱼肉制品的掺假行为,保护消费者的合法权益提供了有效的技术手段,并且在鱼肉制品的快速检测方面具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 陈辉崇,孙汉滨,曹明. 巴沙鱼产业发展前景探析[J]. 中国水产, 2018 (10): 39-41.
 [2] 魏于生,吴遵霖,齐彩霞,等. 湄公河流域巴沙鱼生物学的研究[J]. 淡水渔业, 1996, 26 (6): 25-26.
 [3] 贾敬德. 湖北省渔业协会. 中越水产专家科技研讨会文集, 1999(10): 83.
 [4] 钟凯. 巴沙鱼还是龙利鱼,你分得清吗? [J]. 百科知识, 2017(3): 51-52.

[5] 孙艳华,张智禹,牛晋阳,等. PCR 法检测肉制品中肉类来源的灵敏度研究[J]. 食品工业, 2010, 31 (3): 93-94.
 [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3589. 7-2013 出口食品中常见鱼类及其制品的鉴别方法 第7部分: 鲑鱼成分检测 实时荧光 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
 [7] 邓立青. 正交试验优化巴沙鱼豆腐关键工艺参数[J]. 肉类工业, 2018 (1): 29-33.
 [8] 李靓莉. 辅食选哪个,龙利鱼 or 巴沙鱼? [J]. 饮食科学, 2018 (21): 12-13.
 [9] WANG D N, HSIEH Y H. The use of imported pangasius fish in local restaurants[J]. Food Control, 2016, 65: 136-142.
 [10] 周露,丁清龙,杨晨,等. 双重实时荧光 PCR 法鉴别大西洋鲑鱼和虹鳟鱼[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (13): 4145-4151.
 [11] 孙晓飞,蒋丹,万超,等. 建立一种快速鉴定大西洋鲑鱼及其制品的 SYBR Green 荧光 PCR 方法[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2019, 49 (3): 127-130.
 [12] 袁亚男,刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (3): 27-30.