

实验技术与方法

鱼肉制品中龙利鱼和巴沙鱼的鱼源性成分的双重实时荧光PCR快速检测法

李杰¹,钱云开²,王建昌³(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 建立龙利鱼和巴沙鱼源性成分的双重实时荧光聚合酶链式反应(PCR)快速检测方法。方法 根据13种龙利鱼的线粒体16S rRNA序列,设计通用引物和探针,根据巴沙鱼的线粒体*cytb*基因序列设计引物和探针,通过优化扩增反应体系进行双重实时荧光PCR扩增,达到快速检测产物的目的。结果 本方法特异性良好,龙利鱼基因组DNA灵敏度可达到 10^{-3} ng,在与鲤鱼粉混合的鱼肉制品中可检测,质量分数灵敏度达到1%。巴沙鱼基因组DNA灵敏度可达到 10^{-4} ng,在与龙利鱼粉、大西洋鳕鱼粉混合的鱼肉制品中均可检测,质量分数灵敏度达到0.1%,在与米粉混合的鱼肉制品中可检测,质量分数灵敏度达到0.001%。结论 本方法检测特异性高、所需时间短、灵敏度高,可满足鱼肉制品中龙利鱼真伪鉴别和巴沙鱼掺假的检测要求。

关键词:龙利鱼;巴沙鱼;舌鳎;实时荧光PCR;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(2022)03-0539-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.022

Dual real-time PCR method for rapid detection of sole fish and *Pangasius bocourti*-derived components in fish products

LI Jie¹, QIAN Yunkai², WANG Jianchang³

(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 dual real-time PCR rapid detection method for sole fish and *Pangasius bocourti*-derived components. **Methods** Universal *TaqMan* primers and probe sets were designed according to the mitochondrial 16S rRNA gene sequence of 13 species of sole fish. *TaqMan* primers and probe sets were designed according to the mitochondrial *cytb* gene sequence of *Pangasius bocourti*, and the amplification reaction system was optimized for real-time PCR to achieve the purpose of rapid detection of products. **Results** This method had good specificity, and the sensitivity could reach 10^{-3} ng sole fish DNA. Sole fish 16S rRNA gene could be detected in fish products mixed with carp meal, and the mass fraction sensitivity could reach 1%. The sensitivity could reach 10^{-4} ng *Pangasius bocourti* DNA. *Pangasius bocourti cytb* gene could be detected in fish products mixed with sole fish, atlantic cod meal and rice noodles, the mass fraction sensitivity of sole fish and atlantic cod meal could reach 0.1%, and the mass fraction sensitivity of rice noodles could reach 0.001%. **Conclusion** This method had high specificity, high speed and high sensitivity, and could meet the detection requirements of sole fish authenticity and *Pangasius bocourti* adulteration in fish meat products.

Key words: Sole fish; *Pangasius bocourti*; *Cynoglossus*; real-time PCR; fish products; adulteration; detection

龙利鱼俗称舌鳎鱼,属舌鳎科,舌鳎属

(*Cynoglossus*),是舌鳎属所有鱼类的俗称,是一种生活在中国近海大型底层暖温性鱼类。全世界的舌鳎属约有72种,主要分布于西太平洋及印度洋热带及亚热带海域,少数种可生活于淡水流域^[1]。龙利鱼味道鲜美、营养丰富,属于高蛋白鱼类。但其自然资源量少,出肉率偏低^[2]。据报道,仅山东半岛海域分布的舌鳎属鱼类就有短吻红舌鳎

收稿日期:2021-11-16

基金项目:海关总署科研项目(2020HK229);河北省重点研发计划(21375501D)

作者简介:李杰 男 工程师 研究方向为食品药品安全
E-mail:sdys373@163.com

通信作者:钱云开 男 高级工程师 研究方向为食品安全
E-mail:qyk-1@163.com

(*Cynoglossus joyneri*, *C. joyneri*)、长吻红舌鳎(*C. lighti*)、宽体舌鳎(*C. robustus*)、窄体舌鳎(*C. gracilis*)、半滑舌鳎(*C. semilaevis*)、紫斑舌鳎(*C. purpureomaculatus*)和短吻三线舌鳎(*C. abbreviatus*) 7种,均具有较高的经济价值^[3]。巴沙鱼(*Pangasius bocourti*)属鲶形目,芒鲶属(*Paugusiushamiltona*),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^[4]。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量呈现火箭式的增长^[5]。由于巴沙鱼无小刺,肉质软,易消化,营养比较丰富,价格低^[6],预计未来巴沙鱼在国内的消费量还会持续增长。巴沙鱼肉质白嫩,无肌间小刺,利于加工,而且没有土腥气。巴沙鱼如果做成鱼排、鱼柳,普通消费者无法分辨,且做熟后没有明显的腥味,因此常被不良商家冒充龙利鱼、鳕鱼、三文鱼等海鱼出售^[7]。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^[2],损害了消费者的合法权益。以DNA分子特异基因扩增技术为基础的实时荧光PCR(Real-Time polymerase chain reaction, RT-PCR)技术具有简单、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^[8]。本文采用双重实时荧光PCR技术对鱼肉制品中13种龙利鱼和巴沙鱼源性成分进行检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

LightCycler96 荧光定量PCR仪(瑞士罗氏);UFB500 电热恒温干燥箱(德国墨尔特);ND2000 微量分光光度计(美国 Thermo);HTY-761 匀浆仪(浙江泰林);MIKRO 200R 微量管离心机(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:宝生物 Premix Ex Taq™(Probe qPCR);半滑舌鳎、短吻红舌鳎、长吻红舌鳎、宽体舌鳎、窄体舌鳎、紫斑舌鳎、短吻三线舌鳎(舌鳎鱼通过日照海鲜市场购买);巴沙鱼、大西洋鳕鱼、大西洋鲑鱼(三文鱼)、鲷鱼通过京东商城购买;草鱼、鲤鱼、猪肉、牛肉、山羊肉、鸡肉通过临沂当地超市购买。

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

本研究选取了13种龙利鱼[包括:半滑舌鳎(*C. semilaevis*)、短吻红舌鳎(*C. joyneri*)、长吻红舌鳎(*C. lighti*)、宽体舌鳎(*C. robustus*)、窄体舌鳎(*C. gracilis*)、紫斑舌鳎(*C. purpureomaculatus*)、短吻三线舌鳎(*C. abbreviatus*)、双线舌鳎(*C. bilineatus*)、中华舌鳎(*C. sinicus*)、褐斑三线舌鳎(*C. trigrammus*)、黑鳃舌鳎(*C. roulei*)、斑头舌鳎(*C. puncticeps*)、少鳞舌鳎(*C. oligolepis*)]进行研究,基本涵盖了我国舌鳎属中的典型物种^[9]。通过GenBank下载上述13种龙利鱼和巴沙鱼、大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼,以及猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅这些常见肉类的16S rRNA基因序列,利用clustalx软件对此13种龙利鱼的16S rRNA基因序列进行比对,找出13种龙利鱼的相同序列,以及与巴沙鱼、大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼、猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅的16S rRNA基因存在差异的序列,通过NCBI网站的引物设计工具Primer-BLAST和探针设计软件Primer Express 3.0设计一组13种龙利鱼的通用引物和探针,将引物和探针序列与13种龙利鱼的Genbank序列进行比对,确保一致。由北京擎科生物工程有限公司合成。

上游引物 F:5'-AGACGAGAAGACCCTGTGGA-3';

下游引物 R:5'-ATTGCGCTGTTATCC CTGG-3';

探针序列 P:5'-(FAM)ATCTTCAGTTGGGGCGAC-3'(MGB)。

通过GenBank下载巴沙鱼、上述13种龙利鱼、大西洋鳕鱼、太平洋鳕鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼,以及常见的肉类猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅的*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和探针设计软件Primer Express 3.0设计一组巴沙鱼特异性引物和探针,由北京擎科生物工程有限公司合成。

上游引物 F:5'-TATCGCAGCCACAGTACTAC ATGC-3';

下游引物 R:5'-GGGCTAAAGATGCAAGG GCTG-3';

探针序列 P:5'-(Hex)ACACGAAACAGGATCC AAC-3'(MGB)。

1.2.3 单重荧光PCR扩增

通过对引物浓度和循环数进行PCR反应程序的条件优化,确定了以下条件:

龙利鱼实时荧光PCR反应体系:10 μL Premix Ex Taq™,上下游引物、TaqMan 探针各0.8 μL(浓度为10 μmol/L),提取DNA模板1 μL,用灭菌水补足

至总体积 20 μL 。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。

巴沙鱼实时荧光 PCR 反应体系:10 μL *Premix Ex Taq*TM,上下游引物、*TaqMan* 探针各 0.4 μL (浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$),提取 DNA 模板 1 μL ,用灭菌水补足至总体积 20 μL 。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。

1.2.4 双重荧光 PCR 体系的构建

通过对退火温度(58、60、62 $^{\circ}\text{C}$),退火时间(20、30、40、50、60 s)进行双重荧光 PCR 反应程序的条件优化,最终确定了以下条件:

双重实时荧光 PCR 反应体系:10 μL *Premix Ex Taq*TM,龙利鱼上下游引物、*TaqMan* 探针各 0.8 μL (浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$),巴沙鱼上下游引物、*TaqMan* 探针各 0.4 μL (浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$),提取 DNA 模板 1 μL ,用灭菌水补足至总体积 20 μL 。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。

1.2.5 特异性试验

利用超微量分光光度计测定样品 DNA 在 260 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间,适宜于 PCR 扩增^[10]。利用 1.2.4 设计的双重荧光 PCR 体系,分别以半滑舌鲷、短吻红舌鲷、长吻红舌鲷、宽体舌鲷、窄体舌鲷、紫斑舌鲷、短吻三线舌鲷、巴沙鱼、大西洋鲑鱼、大西洋鲑鱼、鲷鱼、草鱼、鲤鱼、猪、牛、羊、鸡、鸭动物的 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/ μL ,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。并对半滑舌鲷和巴沙鱼样品的扩增产物进行测序,将测序结果在 NCBI 中进行比对。

1.2.6 基因组灵敏度试验

选取半滑舌鲷作为 13 种龙利鱼的代表,利用超微量分光光度计测定半滑舌鲷和巴沙鱼样品 DNA 浓度,用超纯水 10 倍梯度稀释半滑舌鲷和巴沙鱼 DNA,按照 1.2.4 的步骤进行实时荧光 PCR 检测。

1.2.7 龙利鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验

取半滑舌鲷和巴沙鱼样品,置于电热恒温鼓风干燥箱中,105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,匀浆仪打磨成干粉,将巴沙鱼和半滑舌鲷干粉按照干重质量比 1:9 混合,再置于匀浆仪中充分打磨混合,制成含有 10% 巴沙鱼干粉的半滑舌鲷粉。按照此法依次制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 巴沙鱼干粉的半滑舌鲷

粉。按照 1.2.1、1.2.4 的方法进行 DNA 提取和实时双重荧光 PCR 检测。

1.2.8 大西洋鲑鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验

取大西洋鲑鱼和巴沙鱼样品。按照 1.2.7 的步骤制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 巴沙鱼干粉的大西洋鲑鱼粉。按照 1.2.1、1.2.4 的方法进行 DNA 提取和实时双重荧光 PCR 检测。

1.2.9 米粉中巴沙鱼质量分数灵敏度试验

取米粉和巴沙鱼样品。按照 1.2.7 的步骤制成含有 10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001% 巴沙鱼干粉的米粉。按照 1.2.1、1.2.4 的方法进行 DNA 提取和实时双重荧光 PCR 检测(选取 40 个循环和 35 个循环两组试验)。

1.2.10 鲤鱼中龙利鱼质量分数灵敏度试验

取鲤鱼和半滑舌鲷样品。按照 1.2.7 的步骤制成含有 10%、1%、0.1% 半滑舌鲷干粉的鲤鱼粉。按照 1.2.1、1.2.4 的方法进行 DNA 提取和实时双重荧光 PCR 检测。

1.3 数据处理

使用瑞士罗氏 LightCycler96 荧光定量 PCR 仪的 LightCycler® 96 SW 1.1 软件对数据进行分析。

2 结果

2.1 特异性试验结果

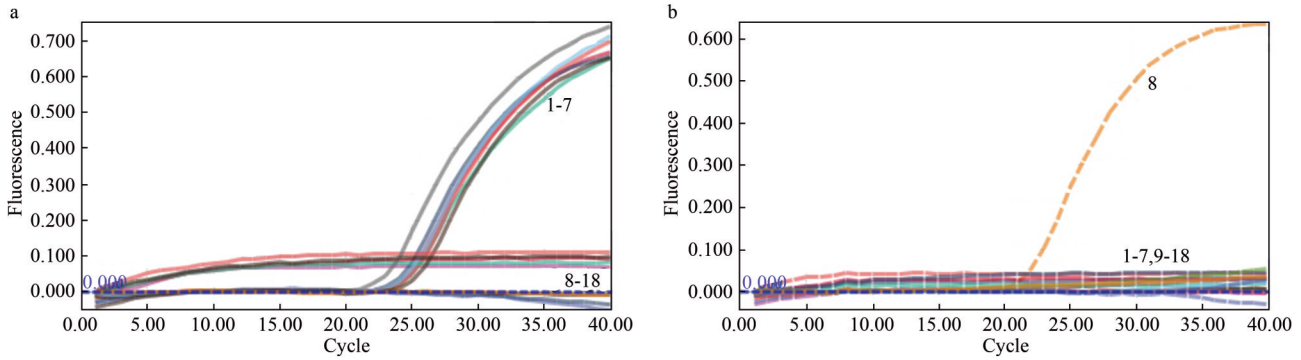
样品 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.7~1.9 之间,适宜于 PCR 扩增。检测结果如图 1 所示,a 图中实线为 FAM 荧光曲线,7 种龙利鱼都出现了荧光曲线,其他样品没有龙利鱼鱼源性成分 DNA,无荧光信号检出。b 图中虚线为 Hex 荧光曲线,巴沙鱼都出现了荧光曲线,其他样品没有巴沙鱼鱼源性成分 DNA,无荧光信号检出。将 1 号样品半滑舌鲷阳性样本扩增产物的测序序列在 NCBI 进行 BLAST 比对,样本序列与半滑舌鲷 16S rRNA 基因序列相似度>99%,将 8 号样品巴沙鱼阳性样本扩增产物的测序序列在 NCBI 进行 BLAST 比对,样本序列与巴沙鱼 *cytb* 基因序列相似度>99%,说明上述引物具有良好的特异性。

2.2 基因组灵敏度试验结果

利用超微量分光光度计测定半滑舌鲷和巴沙鱼样品 DNA 浓度,半滑舌鲷 DNA 量选取 1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ng,巴沙鱼 DNA 量选取 1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ng。当半滑舌鲷 DNA 量 $\geq 10^{-3}$ ng 时可出现特异性扩增曲线,Ct 值分别为 1 ng:23.70; 10^{-1} ng:27.42; 10^{-2} ng:31.04; 10^{-3} ng:34.05(当 Ct<35 时,视为检出)。当巴沙鱼 DNA 量 $\geq 10^{-4}$ ng 时可出现特异性扩增曲线,Ct 值分别为 1 ng:22.03; 10^{-1} ng:

25.45; 10^{-2} ng:28.82; 10^{-3} ng:31.88; 10^{-4} ng:34.59。
模板含量与检测平均 Ct 值结果如图 2, a 中半滑舌

鳎相关系数 $R^2=0.997$, b 中巴沙鱼相关系数 $R^2=0.999$, 扩增效果达到要求。



a.FAM 荧光曲线, b.Hex 荧光曲线. 1.半滑舌鳎;2.短吻红舌鳎;3.长吻红舌鳎;4.宽体舌鳎;5.窄体舌鳎;6.紫斑舌鳎;7.短吻三线舌鳎;8.巴沙鱼;9.大西洋鳕鱼;10.大西洋鲑鱼;11.鲷鱼;12.草鱼;13.鲤鱼;14.猪肉;15.牛肉;16.山羊肉;17.鸡肉;18.空白对照

图1 特异性试验曲线

Figure 1 Curves of specific test

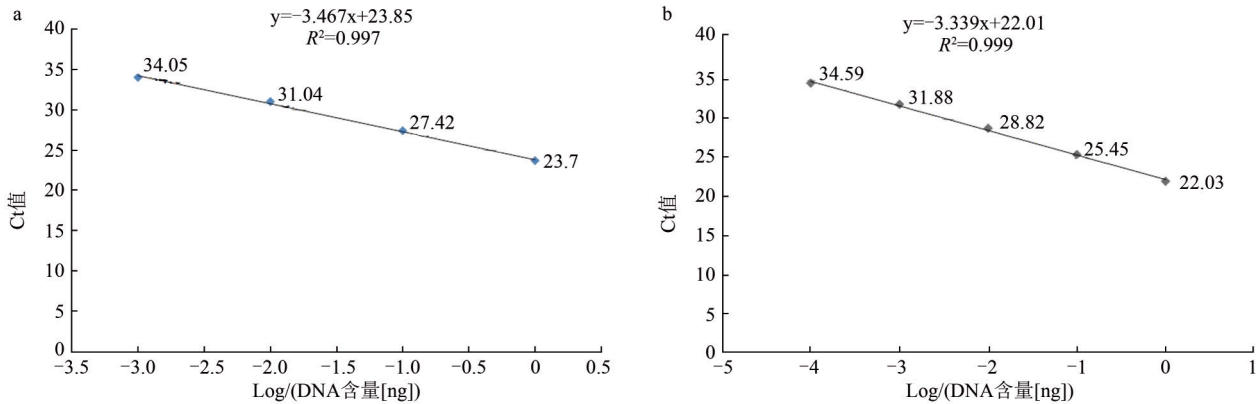


图2 模板含量与 Ct 值的相关线性图

Figure 2 Relationship between the amount of template DNA in the assay and Ct values

2.3 质量分数灵敏度试验结果

2.3.1 龙利鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验结果

当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.1\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图3), a 图中巴沙鱼 Hex 荧光信号(虚线)Ct 值分别为:含 10% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:26.57;含 1% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:28.86;含 0.1% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:33.16。但是由于半滑舌鳎中掺入少量巴沙鱼,受巴沙鱼引物和探针的干扰,当巴沙鱼含量在 $\geq 1\%$ 时, b 图中半滑舌鳎 FAM 荧光信号(实线)无 Ct 值,说明无法将半滑舌鳎检出;当巴沙鱼含量 $\leq 0.1\%$ 时,半滑舌鳎可以检出, FAM 荧光信号 Ct 值分别为:含 0.1% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:26.30;含 0.01% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:27.46;含 0.001% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉:27.10。

2.3.2 大西洋鳕鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验结果

当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.1\%$ 时均可出现特异性

扩增曲线(图4a), Ct 值分别为 10%:22.13;1%:28.52;0.1%:33.35。

2.3.3 米粉中巴沙鱼质量分数灵敏度试验结果

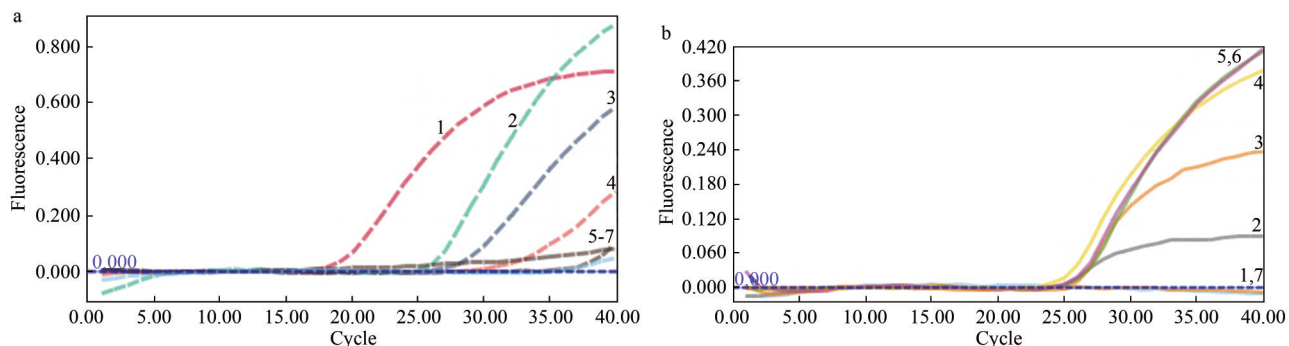
当循环数为 40、巴沙鱼质量分数 $\geq 0.001\%$ 时,均可出现特异性扩增曲线(图4b), Ct 值分别为 10%:20.07;1%:23.45;0.1%:26.69;0.01%:27.65;0.001%:33.20。

当循环数为 35、当巴沙鱼质量分数 $\geq 0.01\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图4c), Ct 值分别为 10%:19.82;1%:23.06;0.1%:26.09;0.01%:26.60。

2.3.4 鲤鱼中龙利鱼质量分数灵敏度试验结果

当半滑舌鳎质量分数 $\geq 1\%$ 时均可出现特异性扩增曲线(图4d), Ct 值分别为 10%:22.69;1%:25.11。

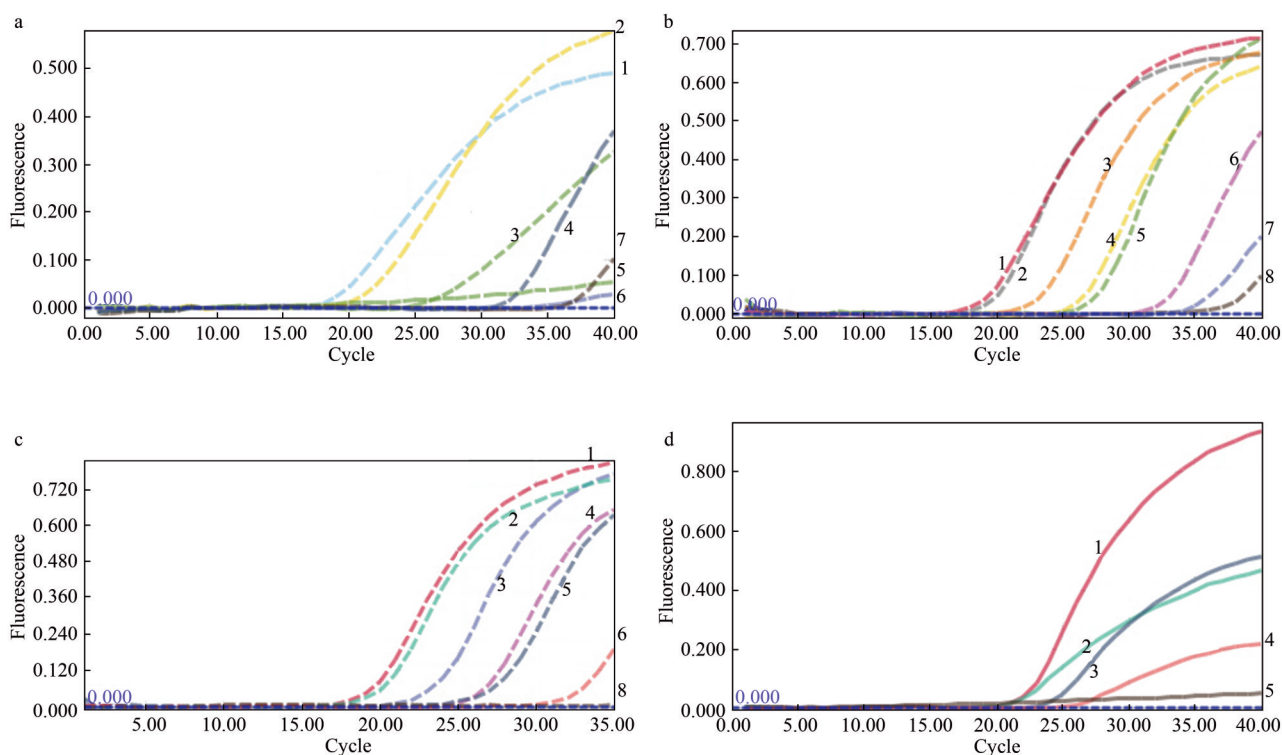
本试验中巴沙鱼和龙利鱼质量分数降低, Ct 值相应变大,说明 DNA 提取效率也随之下降。



注: 龙利鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验. 1. 巴沙鱼原粉; 2. 含 10% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉; 3. 含 1% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉; 4. 含 0.1% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉; 5. 含 0.01% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉; 6. 含 0.001% 巴沙鱼粉的半滑舌鳎粉; 7. 空白对照

图 3 质量分数灵敏度试验曲线 1

Figure 3 Mass fraction sensitivity test curve 1



注: a. 大西洋鲑鱼中巴沙鱼质量分数灵敏度试验. 1. 巴沙鱼原粉; 2. 10% 巴沙鱼; 3. 1% 巴沙鱼; 4. 0.1% 巴沙鱼; 5. 0.01% 巴沙鱼; 6. 0.001% 巴沙鱼; 7. 空白对照

b. 循环数为 40, 米粉中巴沙鱼质量分数灵敏度试验. 1. 巴沙鱼原粉; 2. 10% 巴沙鱼; 3. 1% 巴沙鱼; 4. 0.1% 巴沙鱼; 5. 0.01% 巴沙鱼; 6. 0.001% 巴沙鱼; 7. 0.0001% 巴沙鱼; 8. 空白对照

c. 循环数为 35, 米粉中巴沙鱼质量分数灵敏度试验. 1. 巴沙鱼原粉; 2. 10% 巴沙鱼; 3. 1% 巴沙鱼; 4. 0.1% 巴沙鱼; 5. 0.01% 巴沙鱼; 6. 0.001% 巴沙鱼; 7. 0.0001% 巴沙鱼; 8. 空白对照

d. 鲤鱼中龙利鱼质量分数灵敏度试验. 1. 半滑舌鳎原粉; 2. 10% 半滑舌鳎; 3. 1% 半滑舌鳎; 4. 0.1% 半滑舌鳎; 5. 空白对照

图 4 质量分数灵敏度试验曲线 2

Figure 4 Mass fraction sensitivity test curve 2

3 讨论

有学者对龙利鱼和巴沙鱼从营养成分进行了评价,发现龙利鱼的蛋白质含量要比巴沙鱼高^[11]。近几年,网络上用巴沙鱼来冒充龙利鱼的报道时有发生,中国质量新闻网 2019 年曾报道了一则名为《巴沙鱼柳冒充龙利鱼柳,消费者获 10 倍赔偿》的新闻。鳕鱼、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^[12]。基于荧光 PCR 技术对于鱼肉真伪的鉴别,国家质量监督检验检疫总局出台了对于石斑鱼等 7 种鱼类的检测标准方法^[10],有学者

通过荧光 PCR 法鉴别大西洋鲑鱼和虹鳟鱼^[13],国家市场监督管理总局于 2019 年发布了《鳕鱼及其制品中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分检测 BJS 201907》食品补充检验方法(2019 年第 9 号),分别设计了鳕鱼及其制品中易混淆物种裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)、油鱼(异鳞蛇鲭 *Lepidocybium flavobrunneum*、棘鳞蛇鲭 *Ruvettus pretiosus*)和南极犬牙鱼(小鳞犬牙南极鱼 *Dissostichus eleginoides*、鳞头犬牙南极鱼 *Dissostichus mawsoni*)成分的实时荧光 PCR 检测方法的特异性引物和探针,可用于鳕鱼、鳕鱼片、鳕鱼扒等生鲜或速冻鳕鱼产品的检测^[14]。但是应用荧光 PCR 技术对于龙利鱼和巴沙鱼源性成分进行检测的方法却未见报道。*Taqman* 探针法荧光定量 PCR 技术是利用寡核苷酸序列的 5' 端为荧光报告基团,3' 端为荧光淬灭基团。PCR 扩增前,探针游离于靶序列外,报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收,检测不到荧光。在 PCR 退火时,探针特异性地结合到靶序列上,在延伸阶段,利用 *Taq* 酶 5'-3' 外切酶的活性将探针水解,荧光报告基团与荧光淬灭基团分离,荧光信号被释放,并与 PCR 产物的数量成正比^[15]。在 *Taqman* 探针的基础上研发出了 *Taqman* MGB 探针,该探针的 3' 端除了有淬灭基团外,增加了一种 MGB 基团,该基团能够与双链 DNA 的小沟结合,使探针与靶序列的亲合力增强,探针 *T_m* 可提升 10 度左右,长度可适当减少,降低了合成成本^[16]。

本研究建立了一种可以快速检测鱼肉制品中 13 种龙利鱼和巴沙鱼源性成分的双重实时荧光 PCR 技术。一般在鱼种鉴定时,多采用 *cytb* 和 *COI* 这两种基因,由于本研究中需要对 13 种龙利鱼进行鉴定,采用 *cytb* 基因和 *COI* 基因作为靶基因时,无法获得 13 种的龙利鱼通用引物和探针,故本研究采用了 16s rRNA 作为靶基因。国家质量监督检验检疫总局 2014 发布的《SN/T 3589 出口食品中常见鱼类及其制品的鉴别方法》中鳕鱼成分检测采用鳕鱼的 16s rRNA 基因特异性检测引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增^[10]。本研究选取 25 mg 鱼肉制品提取 DNA(QIAamp Fast DNA Tissue Kit 组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书要求选取 5~25 mg 样品),采用梅特勒托利多万分之一电子天平,将误差降到最低。

由于不良商家通常会将巴沙鱼冠以龙利鱼进行销售,此时可以检出巴沙鱼源性成分;如果样品中同时存在龙利鱼和巴沙鱼,当龙利鱼制品中混入巴沙鱼小于 1% 时,龙利鱼源性成分和巴沙鱼源性成分均可检出;当龙利鱼制品中混入巴沙鱼大于等

于 1% 时,虽然无法检出龙利鱼源性成分,但依旧能够检出巴沙鱼源性成分,故此方法可以有效解决鱼肉制品中用巴沙鱼冒充龙利鱼的掺假问题;当 Hex 荧光的 Ct 值 ≤ 35 时,说明样品中含有巴沙鱼源性成分,说明有用巴沙鱼掺假的问题,当 Hex 荧光的 Ct 值 > 35 时,说明不含巴沙鱼源性成分。当 FAM 荧光的 Ct 值 ≤ 35 时,说明样品中含有龙利鱼源性成分,当 FAM 荧光的 Ct 值 > 35 时,说明不含龙利鱼源性成分。本研究引物特异性强,反应时间约为 55 min,利用一组引物和探针就可以鉴定 13 种龙利鱼,基本涵盖了在中国海域生存的舌鳎属物种,大大节约了时间成本,龙利鱼基因组 DNA 灵敏度可达到 10^{-3} ng,在与鲤鱼粉混合的鱼肉制品中可检测,质量分数灵敏度达到 1%;巴沙鱼基因组 DNA 检测灵敏度可达到 10^{-4} ng,在与龙利鱼粉、大西洋鳕鱼粉混合的鱼肉制品中均可检测,质量分数灵敏度达到 0.1%,在与米粉混合的鱼肉制品中可检测,质量分数灵敏度达到 0.001%。本研究检测巴沙鱼源性成分的方法灵敏度很高,应将“故意掺假”和“加工过程的污染”区分开来,通常不良商家会将巴沙鱼冠以龙利鱼或其他价格较高的鱼类进行销售,在检测前将样品用清水洗净,可以避免出现加工过程污染问题。由于米粉中的鱼粉成细粉状且均匀分布在米粉中,当 Hex 荧光的 Ct 值 > 30 、 ≤ 35 时,可考虑加工过程的污染。参考市售所有米粉,其鱼肉成分不会低于 1%,当循环数为 35 时,质量分数灵敏度为 0.01%,此方法基本可以确定是否为加工过程污染,需要再进行一次循环数为 35 的试验加以确定;当 Hex 荧光的 Ct 值 ≤ 30 ,说明样品中含有巴沙鱼源性成分,有巴沙鱼掺假问题,当 Hex 荧光的 Ct 值 > 30 ,说明含有巴沙鱼源性成分为加工过程的污染。本研究可以实现鉴定 13 种龙利鱼中的其中一种,但不能实现物种鉴定。由于山东沿海只能寻找到 7 种龙利鱼,无法找到我国沿海生存全部的 13 种龙利鱼,这是本研究的一个不足之处。本研究为加强鱼肉制品的监管力度,鉴定龙利鱼真伪,打击巴沙鱼肉掺假行为,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] NELSON J S. Fishes of the world [M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- [2] WANG D N, HSIEH Y H P. The use of imported *Pangasius* fish in local restaurants [J]. Food Control, 2016, 65: 136-142.
- [3] 周晓梦, 郭书新, 宋娜, 等. 短吻红舌鳎鱼卵、仔鱼的 DNA 条形码和形态学鉴定 [J]. 生物多样性, 2017, 25(8):

- 847-855.
- ZHOU X M, GUO S X, SONG N, et al. Identification of *Cynoglossus joyneri* eggs and larvae by DNA barcoding and morphological method[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(8): 847-855.
- [4] 贾敬德. 湖北省渔业协会[R]. 中越水产专家科技研讨会文集, 1999, (10): 83.
- JIA J D. Hubeisheng yuye xiehui [R]. Zhongyue shuichan zhuanjia keji yantaohui wenji, 1999, (10): 83.
- [5] 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.
- DENG L Q. Optimization of critical technology parameters of *Basa fish* tofu by orthogonal experiment [J]. Meat Industry, 2018, (1):29-33.
- [6] 李靓莉. 辅食选哪个, 龙利鱼或巴沙鱼?[J]. 饮食科学, 2018, (21):12-13.
- LI L L. Fushi xuan nage, longliyu or bashayu? [J]. Diet Science, 2018, (21): 12-13.
- [7] 钟凯. 巴沙鱼还是龙利鱼, 你分得清吗? [J]. 百科知识, 2017, (3):51-52.
- ZHONG K. Bashayu haishi longliyu, ni fendeqing ma? [J]. Encyclopedic Knowledge, 2017, (3):51-52.
- [8] 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.
- SUN Y H, ZHANG Z Y, NIU J Y, et al. Sensitivity of PCR method for detecting meat source in processed meat [J]. The Food Industry, 2010, 31(3):93-94.
- [9] 柳淑芳, 刘进贤, 庄志猛, 等. 舌鳎亚科鱼类单系起源和同种异名的线粒体DNA证据[J]. 生物多样性, 2010, 18(3): 275-282.
- LIU S F, LIU J X, ZHUANG Z M, et al. Monophyletic origin and synonymic phenomena in the sub-family *Cynoglossinae* inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. Biodiversity Science, 2010, 18(3):275-282.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3589 出口食品中常见鱼类及其制品的鉴别方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- ZHONGHUARENMINGONGHEGUO GUOJIAZHILIANGJIAN DUJIANYANJIANYIZONGJU. SN/T 3589. Chukoushipin zhong changjian yulei jiqi zhipin de jianweifangfa[S]. Beijing: Zhongguo biaoqun chubanshe, 2014.
- [11] 姜鹏飞, 郭敏强, 祁立波, 等. 巴沙鱼与龙利鱼肌肉中营养成分分析及安全性评价[J]. 大连工业大学学报, 2018, 37(5): 340-344.
- JIANG P F, GUO M Q, QI L B, et al. The nutrients analysis and safety evaluation in muscles of *Pangasius bocouti* and *Cynoglossus robustus* [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2018, 37(5): 340-344.
- [12] 李杰, 钱云开, 张新, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(4): 426-429.
- LI J, QIAN Y K, ZHANG X, et al. Real-time polymerase chain reaction method for rapid detection of *Pangasius bocouti*-derived components in fish products[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(4): 426-429.
- [13] 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.
- ZHOU L, DING Q L, YANG C, et al. Simultaneous identification of *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss* by dual real-time PCR[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(13): 4145-4151.
- [14] 林霖, 张世伟, 吴佳辉, 等. 鲑鱼及其制品中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分检测 BJS 201907[S]中国食品卫生杂志, 2019, 31(02): 105, 115, 158.
- LIN L, ZHANG S W, WU J H, et al. Detection of components derived from slapfish, oil fish and Antarctic toothfish in cod and its products BJS 201907 [S]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(02): 105, 115, 158.
- [15] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量PCR技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020, (6): 1-3.
- LIANG Z Y, LIU F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020, (6): 1-3.
- [16] 马月萍, 戴思兰, 马艳蓉. 荧光定量PCR技术在植物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2011, (7):37-45.
- MA Y P, DAI S L, MA Y R. Application of technique of quantitative real-time PCR in research of plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2011, (7): 37-45.