

实时荧光PCR法鉴定食品中鲑亚科鱼成分

李进波^{1,2}, 李 想^{2,*}, 湛鸿超², 潘良文², 李 正², 宋 青²

(1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘 要: 根据鲑亚科鱼类生长激素基因保守序列设计特异性引物和探针, 建立了一种鉴定食品中鲑亚科鱼类成分的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)方法。结果表明: 建立的检测方法高度特异于鲑亚科鱼类检测, 鲑科的另两个亚科——白鲑亚科和茴鱼亚科样品均无扩增曲线。采用5种常见鲑亚科鱼品种可稳定检测到的最低DNA量为100pg; 分别将大西洋鲑鱼和北极红点鲑鱼肉混入玉米、鸡肉和鲫鱼样品中测定的相对灵敏度为0.01%(m/m)。检测方法的重复性测试结果表明, Ct值标准偏差和相对标准偏差均在可接受范围内。运用建立的实时荧光PCR检测方法对25份市售实际样品进行测试, 有4份标识含有“三文鱼”的样品未检测出鲑亚科鱼类成分。

关键词: 实时荧光聚合酶链式反应; 鲑亚科; 生长激素基因; 鉴定

Identification of *Salmoninae* in Foods by Real-Time PCR

LI Jin-bo^{1,2}, LI Xiang^{2,*}, CHEN Hong-chao², PAN Liang-wen², LI Zheng², SONG Qing²

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: A real-time PCR method was developed to identify the ingredients of *Salmoninae* in foods. Specific primers and probes were designed according to the conserved region of the growth hormone gene of *Salmoninae*. Results showed that the developed method was highly specific for *Salmoninae* detection. The detection limits were 100 pg using five species of *Salmoninae* as the templates. The relative detection limits were 0.01% (m/m) by mixing the fish of *Salmo salar* or *Salvelinus alpinus* with maize, chicken or crucian. Standard deviations and relative standard deviations of Ct values for five DNA concentrations were all in the acceptable range. Twenty-five commercial products labeled “containing salmon” were tested by the real-time PCR assay, and four samples were detected without *Salmoninae* ingredient. Thus, considering its high specificity, sensitivity and repeatability, we believed that the real-time PCR could be used to rapidly and accurately identify *Salmoninae* ingredient in foods.

Key words: real-time polymerase chain reaction; *Salmoninae*; growth hormone gene; identification

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0194-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320041

鲑科(Salmonidae)鱼隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鲑形目(Salmoniformes), 鲑亚目(Salmonoidei), 是重要的世界型名贵经济鱼类, 也是世界三大养殖鱼类之一。鲑科鱼又分为3个亚科7属36种^[1], 主要为鲑亚科(Salmoninae)、白鲑亚科(Coregoninae)和茴鱼亚科(Thymallidae)。其中鲑亚科有5属, 即大马哈鱼属(*Oncorhynchus*)、红点鲑属(*Salvelinus*)、哲罗鲑属(*Hucho*)、细鳞鲑属(*Brachymystax*)和鲑属(*Salmo*), 囊括了鲑科中多数的食用性经济鱼类, 因此需求量最大, 经济价值也最高^[1-2]。目前市场上以“三文鱼”为商品名称的鲑鳟鱼均

属于鲑亚科鱼类。由于鲑科鱼肉含有丰富的蛋白质、 ω 3脂肪酸(EPA、DHA和DPA)和维生素, 营养价值高, 近几年需求量逐年增加。我国是“三文鱼”等鲑鳟鱼类的主要消费国, 而且我国每年的出口量也在日益增大。2009年的数据显示, 世界鲑鳟鱼产量达到366.4万t, 其中我国鲑鳟鱼进口量达到了22万t^[2]。

在鱼制品需求大增的同时, 不断有报道显示国内外市场上鱼类商品标识名称混乱, 很多国家市场上鱼类制品假冒替代现象严重, 仅在美国每年就有约34%水产品乱贴标签, 以次充好, 为此2010年国家质检总局曾发

收稿日期: 2012-10-17

基金项目: 上海市技术性贸易措施应对专项(12TBT011); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011AA100807);

上海出入境检验检疫局科技计划项目(HK001-2011)

作者简介: 李进波(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: jinbo_li@live.com

*通信作者: 李想(1978—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为分子生物学。E-mail: idealne@163.com;

布第57号进口食品、化妆品警示通报,要求对美国输华水产品加强标签检验和品种鉴别^[3]。为保证保费者权益,规范鲑科鱼类销售市场,促进我国鱼类及其制品出口,防止名不副实、以次充好现象的发生,基于物种分子特征性序列建立鲑亚科鱼类特异性检测鉴定方法至关重要。

目前基于DNA的检测方法由于快速、灵敏、省时省力等优点越来越多地应用到物种鉴定中^[4-9]。其中实时荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术以其快速、灵敏、特异等优点,广泛地应用在食品检测中^[10-16]。本研究旨在建立基于鱼类生长激素(growth hormone, GH)基因的特异性序列运用实时荧光PCR方法检测鉴定食品中鲑亚科鱼成分的方法,以确保食品质量安全。

1 材料与方法

1.1 材料

鲑科鱼样本分别由青海民泽龙羊峡生态水产养殖有限公司、黑龙江水产研究所提供或购自北京及新疆,国外鱼种样品来自本实验室储备。收集到的鲑科鱼类样本信息详见表1。

表1 收集的鲑科鱼类样本信息

Table 1 Species and information of the *Salmonidae* samples collected for this study

亚科	属	种	产地	数量/条
鲑亚科 (Salmoninae)	大马哈鱼属 (<i>Oncorhynchus</i>)	虹鳟(<i>O. mykiss</i>)	北京、青海、美国	10
		大麻哈鱼(<i>O. keta</i>)	黑龙江、日本、俄罗斯	10
		山女鲑(<i>O. masou</i>)	日本	18
	红点鲑属 (<i>Salvelinus</i>)	北极红点鲑(<i>S. alpinus</i>)	日本	9
		白点鲑(<i>S. leucomaenis</i>)	日本	10
	哲罗鲑属(<i>Hucho</i>)	太门哲罗鲑(<i>H. taimen</i>)	黑龙江	10
	细鳞鲑属(<i>Brachymystax</i>)	尖吻细鳞鲑(<i>B. lenok</i>)	黑龙江	10
	鲑属 (<i>Salmo</i>)	大西洋鲑(<i>S. salar</i>)	青海、挪威、加拿大、澳大利亚、英国、法罗群岛	40
		褐鳟(<i>S. trutta</i>)	澳大利亚、挪威、智利	15
白鲑亚科 (Coregoninae)	白鲑属 (<i>Coregonus</i>)	乌苏里白鲑(<i>C. ussuriensis</i> Berg)	黑龙江	3
		高白鲑(<i>C. Peled</i>)	新疆、青海	13
		齐尔白鲑(<i>C. nasus</i>)	青海	10
		图页白鲑(<i>C. tugun</i>)	青海	10
		目笋白鲑(<i>C. muksun</i>)	青海	10
		海狼河茴鱼(<i>T. thymallus</i>)	黑龙江	10
茴鱼亚科 (Thymallidae)	茴鱼属 (<i>Thymallus</i>)	鸭绿江茴鱼(<i>T. arcticusaluensis</i>)	黑龙江	3
		北极茴鱼(<i>T. arcticus</i>)	黑龙江	3
		黑龙江茴鱼(<i>T. grubii</i>)	黑龙江	3
		下游黑龙江茴鱼(<i>T. brevirostris</i>)	黑龙江	3

同时收集购买鲑科鱼类的近缘科、目的鱼类,包括狗头鱼(*Arthron hispicus*)、白斑狗鱼(*Esox lucius*)、银鱼(*Hemisalanx prognathus* Regan)、黄菇鱼(*Nibea albiflora*)、白菇鱼(*Argyrosomus argentatus*)、大眼菇鱼(*Atrubucca alcocki*)、左口鱼(*Pseudorhombus swinhonis*)、格陵兰庸鲽鱼(*Hippoglossus*)、巴沙鱼(*Pangasius bocourti*)、金线

鱼(*Nemipterus virgatus*)、金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、黄鳍棘鲷鱼(*Sparus latus* Houttuyn)、虎头鱼(*Sebastiscus marmoratus*)、鲐鱼(*Pneumatophorus japonicus*)、旗鱼(*Histiophorus orientalis*)、鲯鱼(*Tenualosa reevesii*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、接吻鱼(*Helostoma temminckii*)、鳕鱼(*Gadus*)、罗非鱼(*Tilapia*)和马鲛鱼(*Scomberomorus niphonius*); 常见动植物材料包括鸡、鸭、鹅、猪、黄牛、绵羊、玉米、小麦用于对建立的鲑亚科鱼类检测方法进行特异性鉴定。

实际样品均购自上海市各大超市,包括味嘈渍秋鲑、三文鱼块、鱼子酱、烟熏三文鱼、狗鲑鱼扒、香草三文鱼、腌渍大麻哈鱼、香肠、三文鱼营养米粉、三文鱼蔬菜泥、三文鱼营养面条、三文鱼蔬菜米粉、红三文鱼色拉、鱼肉酥、三文鱼颗粒面、蜜汁三文鱼、三文鱼籽、三文鱼奶酪及火腿肠,所有样品均标记含有鲑亚科鱼成分或标注为鲑亚科鱼制品。

1.2 试剂与仪器

#69504 DNeasy® Blood & tissue试剂盒 德国Qiagen公司; 2×Premix Ex Taq HS 宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taqman Master Mix 美国Applied Biosystems公司。

6850型冷冻研磨机 美国Spex SamplePrep公司; BP310S千分之一天平 德国Sartorius公司; Nano Plus微量分光光度计 美国GE公司; Mastercycler ProS PCR仪 德国Eppendorf公司; 2S-2200型凝胶成像系统 美国Alpha公司; AB PRISM(R) 7300定量PCR仪 美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理和制备

对于整鱼样本,用无菌手术刀切去表层鱼肉,从贴近鱼骨处切取鱼肉1块(防止表层鱼肉有污染),完全冷冻后研磨成均匀的粉末。解冻后用于DNA提取。

为了测定建立的检测方法的相对灵敏度,选取3种食品基质(玉米、鸡肉和鲫鱼)以及代表性的鲑亚科鱼(大西洋鲑和北极红点鲑)制备混合样品。首先将鸡肉、鲫鱼及鲑科鱼样分别烘干,使用冷冻研磨机分别将其研磨成均匀的干粉。然后配制质量梯度的混合样品。称取13.50g玉米粉和1.50g大西洋鲑鱼干粉,混合后使用冷冻研磨机将其充分混匀,制成10%(m/m)混合样品(编号为Aa1)。然后称取13.50g玉米粉和1.50g Aa1混合样品,用冷冻研磨机将其充分混匀制成1%(m/m)混合样品(Aa2)。采用同样的方法制备0.1%、0.01%、0.001%的混合样品(Aa3、Aa4、Aa5)。鸡肉、鲫鱼与大西洋鲑的混合样品(编号分别为Ab1~Ab5、Ac1~Ac5)以及玉米、鸡肉和鲫鱼与北极红点鲑的混合样品(编号分别为Ba1~Ba5、Bb1~Bb5、Bc1~Bc5)采用同样方法配制。

1.3.2 DNA提取

称取研磨后的100mg鱼肉、混合样品或实际样品,使用DNA提取试剂盒并按其操作步骤提取DNA,每次DNA提取均设置提取空白对照。用微量分光光度计测定DNA质量浓度后,置于-20℃保存备用。

1.3.3 引物和探针设计

在NCBI网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)搜集鲑科鱼GH基因序列(GenBank序列号L04688.1、EU090916.1、J03797.1、AY498872.1、AY125210.1),根据鲑亚科鱼与白鲑亚科和茴鱼亚科鱼的差异性序列,采用Clustal W软件对鲑科鱼GH基因进行比对,然后使用Primer Express软件设计引物(FPN 5'-CCA TCA CTC TCT AAT CGG CG-3', RPN 5'-GGA GCA GCT TCA GGA CCT G-3')和探针(PN 5'-FAM-TCA TGT AAA TGA TAT GGC ATC TCA AGC TG-BHQ1-3')用于鲑亚科鱼成分鉴定,扩增产物为GH基因上1段151bp片段。在NCBI网站上使用BLAST数据库比对引物和探针的理论特异性。18S rRNA引物序列(18S rRNA1 5'-TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A-3', 18S rRNA2 5'-AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T-3')^[17]和12S rRNA引物序列(12S-Fish-1F 5'-TAA GAG GGC CGG TAA AAC TC-3', 12S-Fish-2R 5'-GTG GGG TAT CTA ATC CCA G-3')^[18]分别用于扩增所提取的DNA。18S rRNA引物可在所有植物和动物来源的DNA中扩增出目的条带,12S rRNA可在所有鱼来源DNA样品中扩增出目的条带。引物和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3.4 PCR反应条件

1.3.4.1 普通PCR

普通PCR反应体系为25μL,包含2×Premix Ex Taq HS 12.5μL,上、下游引物各加入1μL至终浓度400nmol/L,模板DNA 5μL,不足体积用ddH₂O补齐。然后进行PCR扩增。

18S rRNA PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性20s,56℃退火30s,72℃延伸30s,36个循环;72℃延伸5min。

12S rRNA PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性20s,55℃退火30s,72℃延伸30s,36个循环;72℃延伸5min。

PCR产物检测方法:取8μL PCR产物,在2.0%琼脂糖凝胶和0.2% TAE缓冲液中电泳20min(120V),然后采用凝胶成像系统拍照存档。

1.3.4.2 实时荧光PCR

实时荧光PCR反应体系为25μL,包含2×TaqMan Master Mix 12.5μL,上、下游引物各加入1μL至终浓度400nmol/L,探针加入0.5μL至终浓度200nmol/L,5μL模

板DNA,用ddH₂O补足至25μL。采用实时荧光PCR系统进行扩增。实时荧光PCR反应参数:95℃、10min;95℃、10s,60℃、30s,45个循环。荧光信号在60℃时收集。

1.3.5 检测方法的特异性和灵敏度测试

对检测方法的特异性测试采用9种鲑亚科,白鲑亚科5个种和茴鱼亚科5个种不同产地样品,22种近缘科目鱼类样品,以及8种常见动、植物样品DNA为模板,采用建立的实时荧光PCR检测方法进行扩增。

对检测方法的灵敏度测试包括绝对灵敏度和相对灵敏度测试。绝对灵敏度测试选取代表性的鲑亚科鱼样品虹鳟、北极红点鲑、太门哲罗鲑、尖吻细鳞鲑和大西洋鲑,分别将提取的DNA溶液稀释至100、10、1、0.1、0.02、0.01、0.001ng/μL,进行实时荧光PCR扩增,每个质量浓度设置5个平行,实验重复4次,即每个质量浓度得到20个对应的Ct值,以满足不小于95%置信区间的要求,计算阳性扩增的次数。相对灵敏度测试采用配制的Aa1~Aa5、Ab1~Ab5、Ac1~Ac5、Ba1~Ba5、Bb1~Bb5、Bc1~Bc5混合样品DNA为模板,采用建立的实时荧光PCR方法进行测试,每个重量分数设置5个平行,重复4次,即每个梯度得到对应的20个Ct值,计算阳性扩增次数。

1.3.6 检测方法的重复性测试

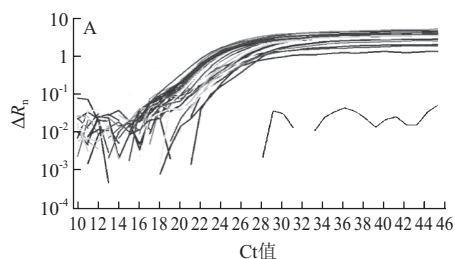
采用虹鳟和大西洋鲑鱼样品DNA的5个质量浓度梯度稀释液分别进行扩增,每个质量浓度重复3次,计算Ct值的标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD)。

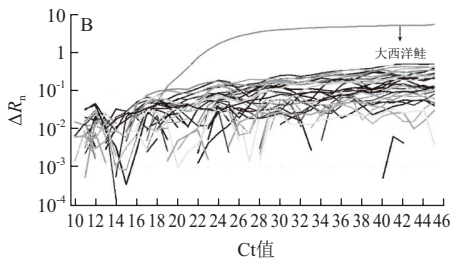
1.3.7 实际样品检测

对收集购买的标注含有“三文鱼”成分的25份实际样品进行测试。每个样品取样2份,提取DNA后分别采用18S rRNA、12S rRNA引物以及建立的鲑亚科鱼类检测引物和探针进行扩增,每个样品重复扩增2次。用18S rRNA、12S rRNA引物进行扩增是为了确保DNA的有效提取,避免假阴性出现。

2 结果与分析

2.1 检测方法的特异性





A. 20个鲑亚科鱼样及空白对照；B.大西洋鲑、41个非鲑亚科鱼样及空白对照。

图1 实时荧光PCR检测的特异性测试

Fig.1 Specificity of the real-time PCR method

如图1A所示,所有鲑亚科鱼类样品均产生显著的荧光增幅,Ct值介于20~26之间;而以白鲑亚科、茴鱼亚科和近缘科目的其他鱼类以及常见动植物样品DNA为模板均无荧光扩增信号(图1B),采用18S rRNA和12S rRNA引物对所有样品进行扩增,均可见目的条带(数据未在此呈现)。因此,建立的实时荧光PCR检测方法特异于鲑亚科鱼类检测。

2.2 检测方法的灵敏度

表2 实时荧光PCR检测的绝对灵敏度

Table 2 Absolute LOD of the real-time PCR method

样品	质量浓度/(ng/ μ L)						
	100	10	1	0.1	0.02	0.01	0.001
虹鳟	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	11/20*
北极红点鲑	20/20	20/20	20/20	20/20	19/20	16/20	5/20
太门哲罗鲑	20/20	20/20	20/20	20/20	19/20	8/20	0/20
尖吻细鳞鲑	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	13/20	8/20
大西洋鲑	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	19/20	9/20

注:数据均为检出次数/检测次数。表3同。

如表2所示,虹鳟和大西洋鲑样品可稳定检出的最低质量浓度为0.01ng/ μ L,即检测下限为50pg(模板为5 μ L)。北极红点鲑、太门哲罗鲑和尖吻细鳞鲑可稳定检出的最低质量浓度为0.02ng/ μ L,即检测下限为100pg。综合5个鱼种的检测结果,本研究建立的实时荧光PCR体系的绝对灵敏度可达到100pg DNA。

表3 实时荧光PCR检测的相对灵敏度

Table 3 Relative LOD of the real-time PCR method

样品	基质	样品编号	质量分数/(%) (编号)				
			10(1)	1(2)	0.1(3)	0.01(4)	0.001(5)
大西洋鲑	玉米粉	Aa	20/20	20/20	20/20	20/20	19/20
	鸡肉粉	Ab	20/20	20/20	20/20	20/20	8/20
	鲫鱼粉	Ac	20/20	20/20	20/20	20/20	9/20
北极红点鲑	玉米粉	Ba	20/20	20/20	20/20	20/20	5/20
	鸡肉粉	Bb	20/20	20/20	20/20	20/20	5/20
	鲫鱼粉	Bc	20/20	20/20	20/20	20/20	7/20

相对灵敏度测试是将鲑亚科鱼样本按照不同的质量分数掺入植物基质(玉米粉)、禽肉基质(鸡肉泥)或其他鱼肉

基质(鲫鱼泥)中,测定可以稳定扩增的最低质量分数,结果如表3所示。当大西洋鲑肉混入玉米粉中可以稳定检出的最低质量分数为0.001%。而大西洋鲑鱼肉混入鸡肉粉和鲫鱼粉,或北极红点鲑肉混入3种基质中的样品可稳定检出的最低质量分数均为0.01%。综合上述结果,本研究建立的实时荧光PCR体系的相对灵敏度可达到0.01%。

2.3 检测方法的重复性

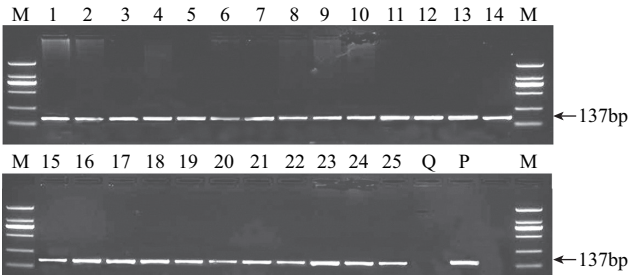
表4 实时荧光PCR重复性

Table 4 Repeatability of the real-time PCR method

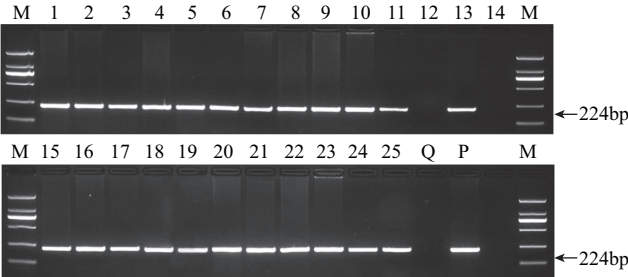
样品	质量浓度/(ng/ μ L)	Ct值			平均Ct值	SD	RSD/%
		REP1	REP2	REP3			
虹鳟	100	22.67	22.51	22.44	22.54	0.12	0.53
	10	26.20	26.22	26.54	26.32	0.19	0.72
	1	29.97	29.99	29.97	29.98	0.01	0.03
	0.1	33.15	33.28	33.23	33.22	0.07	0.21
	0.01	36.17	36.40	36.02	36.20	0.19	0.52
大西洋鲑	100	23.17	23.27	23.05	23.16	0.11	0.47
	10	26.99	27.06	27.23	27.09	0.12	0.44
	1	30.72	30.89	30.92	30.84	0.11	0.36
	0.1	33.72	33.88	34.01	33.87	0.15	0.44
	0.01	35.42	35.76	35.48	35.55	0.18	0.51

如表4所示,虹鳟鱼样品5个质量浓度样品的Ct值的SD介于0.01~0.19之间,RSD介于0.03~0.72之间;大西洋鲑样品各质量浓度DNA扩增Ct值的SD介于0.11~0.18之间,RSD介于0.36~0.51之间,均在可接受范围内。因此,建立的实时荧光PCR检测体系具有较好的重复性。

2.4 实际样品的测定



A. 18S rRNA引物扩增图



B. 12S rRNA引物扩增图

泳道1~25分别为表5中1~25号测试样品的扩增结果; M. DL 2000分子质量标准; B. 空白对照; P. 阳性对照。

图2 实际测试样品DNA的PCR扩增结果

Fig.2 PCR results of 25 commercial samples

对25份购买的市售实际样品测定结果表明,所有样品在采用18S rRNA引物时均可扩增出目的条带(图2A),表明所有样品均成功提取出适于扩增的DNA;采用12S rRNA引物(用于鱼类成分鉴定)可在除12号和14号样品为模板的扩增中出现目的条带(图2B),表明除12和14号样品外其余23个样品均含有鱼类成分。

采用建立的鲑亚科鱼类实时荧光PCR方法进行扩增时(表5),在12、14、16、18号样品中没有显著的荧光信号,即无阳性扩增曲线,表明上述4个样品未检出鲑亚科鱼类成分。而根据12S rRNA的扩增结果,16、18号样品有目标条带产生,表明可能存在用其他鱼代替鲑亚科鱼的假冒现象。

表5 实际样品实时荧光PCR检测结果

Table 5 Results of real-time PCR detection of commercial products

编号	商品名称	检测结果	编号	商品名称	检测结果	编号	商品名称	检测结果
1	味噌渍秋鲑	+	10	香肠	+	19	三文鱼颗粒面	+
2	三文鱼块一	+	11	三文鱼营养米粉	+	20	蜜汁三文鱼	+
3	鱼子酱	+	12	三文鱼蔬菜泥一	-	21	三文鱼蔬菜泥二	+
4	烟熏三文鱼	+	13	三文鱼营养面条一	+	22	三文鱼籽	+
5	狗鲑鱼扒	+	14	三文鱼蔬菜米粉	-	23	三文鱼奶酪	+
6	三文鱼块二	+	15	三文鱼营养面条二	+	24	火腿肠	+
7	香草三文鱼一	+	16	三文鱼营养面条三	-	25	香草三文鱼二	+
8	腌渍大麻哈鱼一	+	17	红三文鱼色拉	+			
9	腌渍大麻哈鱼二	+	18	鱼肉酥	-			

注: +, 有荧光扩增信号; -, 无荧光扩增信号。

3 讨论

鲑亚科鱼类作为重要的经济鱼类在全世界需求量逐年增加。由于鲑亚科鱼类大多价格较高,受利益驱使,市场上鱼龙混珠、以次充好现象时有发生。新鲜鱼肉从外观上本来就很难鉴别真伪,经过加工后就更难分辨。对于鲑亚科鱼类的鉴定,仅在10年前有学者采用RFLP标记方法鉴定大西洋鲑鱼和虹鳟的报道^[19-20],近来有研究者基于*ITS1*基因建立了实时荧光PCR方法鉴定大西洋鲑鱼^[15]。而目前国内外还没有针对鲑亚科鱼类鉴定方法的报道。

基于此,本研究利用鲑亚科鱼类的保守基因——生长激素基因建立了实时荧光PCR方法用于检测食品中鲑亚科鱼类成分。经实验室的全面测试,建立的检测方法特异于鲑亚科鱼类的检测,且具有很好的重复性;检测方法可稳定检测到的DNA量达100pg,相对灵敏度为0.01%鲑亚科鱼类成分,与对大西洋鲑鱼建立的实时荧光PCR检测方法的检测灵敏度相当^[6],可以满足日常检测的要求。对市售实际样品的检测结果表明,25份样品有4份未检出鲑亚科鱼类成分,而其中2份检出了鱼源性成分,表明存在以其他鱼种假冒鲑亚科鱼类的可能性。

参考文献:

- [1] 孙大江, 王炳谦. 鲑科鱼类及其养殖状况[J]. 水产学杂志, 2010, 2(23): 56-63.
- [2] 周井娟, 陈林兴. 世界三文鱼的贸易格局及发展预测[J]. 农业经济与管理, 2012(2): 86-92.
- [3] 国家质检总局. 进口食品、化妆品警示通报. 2010年第57号, 关于美国进口水产品的警示通报[R].
- [4] ROSALEE S R, MICHAEL T M. Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009, 8(2): 118-154.
- [5] FABRICE T. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2009, 19(3): 265-293.
- [6] BARDAKCI F, SKIBINSKI D O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification[J]. Heredity, 1994, 73 (Pt2): 117-123.
- [7] PALOMA M, EVA G V. Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology[J]. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2006, 34(2): 121-124.
- [8] 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.
- [9] 刘帅帅, 李宏, 罗世芝, 等. PCR技术在肉类掺假检验中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 22(6): 280-284.
- [10] 史艳宇, 刘金华, 逢晓阳, 等. 实时荧光PCR方法检测食品中痕量荞麦成分[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 312-315.
- [11] 岳巧云, 陈定虎, 伍朝晖, 等. 实时荧光PCR在鉴别奶粉中掺入大豆成分的应用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(12): 190-193.
- [12] HIRD H J, HOLD G L, CHISHOLM J, et al. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR[J]. European Food Research and Technology, 2005, 220(5/6): 633-637.
- [13] MARÍA R, ISABEL G, MIGUEL Á P, et al. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market[J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 523-531.
- [14] JOHN J D, KELLY E P, STEPHEN D G, et al. Detection of meat species using *TaqMan* real-time PCR assays[J]. Meat Science, 2004, 68(3): 431-438.
- [15] HERRERO B, VIEITES J M, ESPÍÑEIRA M. Authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1268-1272.
- [16] JASON S, CLARE W, DELLA S, et al. Real-time PCR for quantitative meat species testing[J]. Food Control, 2003, 14(8): 579-583.
- [17] MEYER R, CANDRIAN U, LÜTHY J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction[J]. Journal of AOAC International, 1994, 77(3): 617-622.
- [18] DALMASSO A, FONTANELLA E, PIATTI P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs[J]. Molecular and Cellular Probes, 2004, 18(2): 81-87.
- [19] CARRERA E, GARCIA T, CÉSPEDES A, et al. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(3): 410-413.
- [20] CARRERA E, GARCÍA T, CÉSPEDES A, et al. Identification of smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-Restriction fragment length polymorphism of the p53 Gene[J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(2): 341-346.