鱼翅类食品中鲨鱼成分 PCR 鉴定方法研究

覃芳芳[1]，王德莲[1]，冼燕萍[1,2]，罗海英[1]，吴玉銮[1]，罗东辉[1]，王莉[1]，王斌[1]
（1.广州质量监督检测研究院，广东广州 510110）（2.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：本文针对鱼翅中的鲨鱼成分进行检测鉴定开发了一种快速灵敏的PCR检测方法，可检测鱼翅类食品中是否存在鲨鱼成分。根据鲨鱼线粒体的细胞色素亚基I基因序列设计了鲨鱼特异性引物，扩增长度为228 bp；为了评价方法的特异性，将设计的引物分别针对22份鱼翅样品DNA和37种其它种类DNA进行PCR检测，结果显示，只在鲨鱼鱼翅中能检测出特异的228 bp条带，其它37种物种中均无条带检出。为了评价方法的灵敏度，将鱼翅DNA中掺入了不同比例土豆DNA的样品采用本方法进行了PCR分析，显示方法可检测灵敏度为0.1%（*m/m*）。随机抽取45份不同类型的鱼翅样品，检测出22份鲨鱼翅均含鲨鱼成分，而21份仿鱼翅均不含鲨鱼成分而含有植物成分。该样品前处理方法、DNA提取方法以及PCR 检测方法可广泛应用于食品中鲨鱼成分检测鉴定。

关键词：PCR；鱼翅；鉴别
文章篇号：1673-9078(2014)4-274-278

Identification of Shark Fins in Food with PCR Method

QIN Fang-fang[1], WANG De-lian[1], XIAN Yan-ping[1,2], LUO Hai-ying[1], WU Yu-luan[1], LUO Dong-hui[1], WANG Li[1], WANG Bin[1]
(1.Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)
(2.College of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to detect the shark ingredients in food, a rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) method was developed. In this method, a pair of primers was designed based on cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, which could produce 228bp band via PCR. To evaluate the specificity of this method, 22 shark fin samples DNA and 37 other species DNA were analyzed by PCR using the new specific primers. The results showed that the specific 228 bp band only be observed in 22 shark fin samples. The sensitivity of the PCR method was tested by mixing shark fin DNA and DNA extracted from potato in different proportions, and it was indicated that the lowest detection limit by this method was 0.1% (*m/m*). Forty-three samples were randomly tested, 22 of them containing shark fins, while 21 imitation samples were detected to contain plant ingredients. This method can be widely used in identification of shark ingredients in food.

Key words: polymerase chain reaction; shark fins; identification

鲨鱼翅在民间通常以“鱼翅”简称。作为中国传统的名贵食品之一，实际是鲨鱼和某些鳐鱼鳍中的细丝状软骨，从鲨身体上割下的新鲜鱼鳍经去砂去骨干燥成片状后称为明翅，明翅煮后将细丝状软骨（翅筋）抽出，干燥成形后称为翅饼，翅筋的主要成分为胶原蛋白，在东亚各国，鱼翅为高档食品，消费量逐年提高。

据新闻报道饭店出售的鱼翅实际有相当一部分是假鱼翅，市场上大约四成是人造鱼翅，原料为淀粉，明胶、海藻酸钠等，成本不到 20 元/千克，在饭店鱼翅则要到几百元甚至上千元一份，高利润使得造假鱼翅早已经形成了一条黑色的利益链，这些鱼翅从合成，到鱼翅精调制，到烧碱明胶双氧水泡制，含有大量损伤人肾脏消化系统和致癌的物质。

PCR是聚合酶链式反应的简称，是分子生物学中广泛运用的一种技术，主要原理是通过热循环，达到目的基因片段的大量扩增。目前这项技术越来越广泛地运用于产品检测之中。例如，运用PCR技术检测食品[1~3]和饲料[4]中的转基因[5]、植物[2]、牛、羊、猪、鸡成分[3~4]等，并制定成相关检测标准进行推广。

但是PCR技术在鉴定食品检测中特异性成分的广泛运用也受到一些限制，主要是因为各种食品经过不同程度的深度加工，食品中所含有的DNA成份遭到不同程度的破坏，并且在食品的生产过程中，需要混入不同的添加剂和佐料，使食品的成份更加复杂，使得DNA的提取更加困难[6]。此外设计出特异性与通用性良好的引物

收稿日期：2014-03-28
基金项目：国家质检总局科研项目（2013QK278）
作者简介：覃芳芳（1978-），女，博士，高级工程师，主要从事食品安全及风险预警方面的研究
通讯作者：吴玉銮（1965-），女，博士，教授级高工，主要从事食品安全及风险预警方面的研究

也是限制性因素之一，因为细胞中的线粒体基因拷贝数多，且基因特异性强，因此线粒体基因引物在PCR进行成分鉴定具有相当的优势[7]。

在国内外有方法报道采用PCR或FINS方法来鉴定鲨鱼的种类[8~11]，用的引物为保守性引物，需要扩展出比较多的条带进行比较分析，条带大小从300~1600 bp不等，无法从单一条带上得到鉴定信息；在黄文胜[12]等报道的FINS鲨鱼种类方法中，设计了PCR扩增单一条带来鉴定鲨鱼种类的方法，扩增条带大小为680 bp，但需要从测序上才能确定鲨鱼的种类，设计的引物为简并引物，合成过程相对繁琐，并且所报道的用FINS方法鉴定鲨鱼种类所设计的引物对其他物质的特异性效果如何，并没有做太多引物特异性比较实验。此外在形成标准的PCR成分检测鉴定方法中，设计引物的扩增目的片段一般在300 bp以下，是因为在食品加工过程中，DNA收到不同程度的破坏，所提取出的DNA大小往往在1000 bp以下，并多在500 bp以下，PCR检测时扩增条带太大会受到限制。郭云霞等报道了感官鉴定鱼翅真假[13]和食品中鲨鱼源性成分真实性PCR鉴别方法[14]，其中后者检测的目的条带为180 bp，符合一般标准方法所通用的大小，但是其只是针对9中鲨鱼翅有特异性，对于市场上其他种类的鲨鱼翅是否能鉴别没有提及，并且其采用的方法为试剂盒方法，没有明确提出设计的引物序列，主要为试剂公司试剂盒产品的应用研究。本研究根据鲨鱼线粒体的细胞色素亚基I基因序列设计了鲨鱼特异性引物，建立了鱼翅产品中鲨鱼成分的检测鉴定方法，并运用于市场检测中。

1 实验部分

1.1 实验材料及仪器

23份鱼翅，20仿鱼翅类食品，以及其他样品为市场采购和国家加工食品质量监督检验中心（广州）提供。Taq DNA 聚合酶，DNA相对分子质量标记，购自大连宝生物工程有限公司。PCR热循环仪（MJ Resear ch，PTC-200）、凝胶成像系统（Bio-Rad，Gel DOX XR）、核酸蛋白分析仪（Bio-Rad，SmartSpec plus）、微量可调移液器（Eppendorf）。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼翅类食品的 DNA 的纯化

将样品用锉刀磨碎，取磨碎的样品0.1~0.5 g，加入600 μL 2%的十六烷基三甲基溴化铵裂解缓冲液，加入10 μL质量浓度为20 mg/mL的蛋白酶K溶液，混匀，置65 ℃恒温水浴30 min，不时摇动。取出，室温冷却后加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），混匀，离心。取上清液，加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1），混匀，离心。取上清液，加入等体积的异丙醇，混匀，4 ℃放置2 h，离心，弃去上清液，保留沉淀物。取沉淀物用75%乙醇洗涤1~2次，室温下将乙醇吹干，将沉淀溶于TE溶液中，即得样品DNA溶液。

1.2.2 PCR 体系及条件

本文所用的引物均委托 invitrogen 生物技术有限公司合成。具体引物信息见表 1。

表 1 鱼翅样品检测用引物信息

Table 1 Primers used for shark fins detection

	引物序列	PCR产物大小/bp	基因性质
鲨鱼内源基因	5’-GCTGAACTTGGGCAACCTGGAT-3’ 5’-AGGCGAGGAGGAGAAGAAATGATGG -3’	228	线粒体基因
植物内源基因	正:5’-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3’ 反:5’-TTCCATTGAGTCTCTGCACCT-3’	180	tRNALeu
真核生物内源基因	5’-AAGTTAGAGATCGGGAGCCT AA-3’ 5’-AAGGTGACAATAGGTAGTCC-3’	137	

PCR体系中的缓冲液，酶和dNTPs均购于TAKARA生物有限公司。反应体系为25 μL体系，其中10×PCR缓冲液2.5 μL、dNTPs 1.0 μL、上、下游引物各0.5 μL、Taq酶0.5 μL，模板DNA 50 ng、灭菌双蒸水补足体积至25 μL。反应循环条件为94 ℃预变性5 min、94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s，共进行35个循环，最后72 ℃延伸10 min，4 ℃保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

将本研究方法所提取得到的DNA用TE缓冲液10倍稀释，产物用分光光度计检测其质量，其浓度和A_{260}/A_{280}比值如表2所示，所提取得鱼翅样品DNA浓度在116~554 ng/μL之间，A_{260}/A_{280}值在1.61~1.78左右，提取的DNA浓度和A_{260}/A_{280}均稍低于仿鱼翅样品（DNA浓度平均在158~867 ng/μL，A_{260}/A_{280}值在1.69~1.83）。分析原因为鱼翅样品相比仿鱼翅样品，蛋白含量较高，虽然采用了

苯酚-氯仿抽提的方式，能去除DNA中的绝大多数蛋白，但仍无法完全去除，导致A_{260}/A_{280}值低于仿鱼翅样品。此外鱼翅样品DNA浓度也稍低于仿鱼翅，分析原因为方法采用锉刀磨碎的方式来粉碎样品，在简化破碎方法的同时，破碎的程度略低，不及用淀粉为原材料的仿鱼翅，导致提取效率稍低。

表 2 鱼翅饮料样品 DNA 提取结果

Table 2 Results of DNA extracted from fins food

样品	DNA 浓度/(ng/μL)	A_{260}/A_{280}
鱼翅	116.7~554.4	1.61~1.78
仿鱼翅样品	158.1~867.5	1.69~1.83

2.2 PCR 结果

为检测所提取的DNA是否能适用于PCR检测，将所提取的43份鱼翅DNA与仿鱼翅食品DNA作为PCR模板，用真核生物内源基因引物进行PCR扩增，部分电泳结果如图1显示，在所有的样品中均能扩增出137 bp的条带，说明虽然提取的鱼翅样品提取的DNA的浓度和A_{260}/A_{280}比值虽然低于仿鱼翅样品，但也能达到PCR要求，可以用于随后的PCR检测实验。

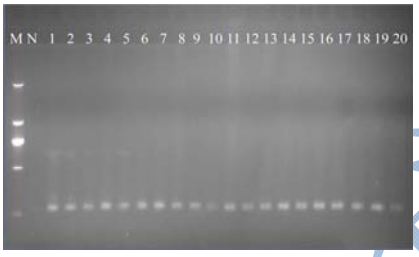


图 1 真核生物内源基因引物 PCR 检测鱼翅类食品 DNA 结果

Fig.1 The PCR results of shark fins DNA used primers of eukaryotes endogenous genes

注：泳道M：DL 2000分子量标记，从下到上片段大小分别为100、500、750、1000、2000 bp；泳道N：空白对照；泳道1~10：鱼翅样品1~10；泳道11~20：仿鱼翅样品1~10。

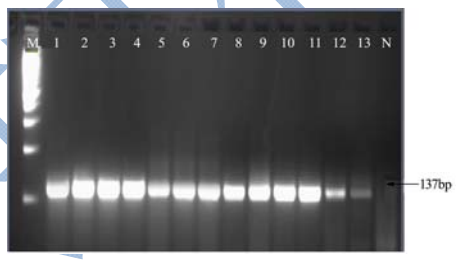


图 2 鱼翅特异性引物温度梯度 PCR 结果

Fig.2 The temperature gradient PCR results of shark DNA used primers of shark endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道1~13：PCR退火温度梯度依次为62.0 ℃、61.1 ℃、60.2 ℃、59.4 ℃、58.3 ℃、57.6 ℃、56.9 ℃、56.3 ℃、55.4 ℃、54.6 ℃、53.7 ℃、52.8 ℃、52.0 ℃。

为了能特异性鉴定检测出鱼翅类食品中的鲨鱼成分，根据鲨鱼线粒体的细胞色素亚基I基因序列设计了鲨鱼特异性引物，设计扩增的产物为228 bp，并探索了该引物的PCR反应最优化的反应条件，如图2所示。采用梯度PCR方式，对设计的引物PCR反应热循环条件进行了摸索，退火温度从52 ℃到62 ℃，最终确定退火温度为60 ℃时反应效果最好。

鲨鱼品种繁多，目前市场上主要的鲨鱼鱼翅来源有青鲨、角鲨、叶吻银鲛、虎鲨等。为检测设计的鲨鱼特异性引物是否适用于市场上各种鲨鱼鱼翅中鲨鱼成分的鉴定，用该引物对22份来源于不同品种的鲨鱼鱼翅样品的DNA进行PCR扩增，结果如图3所示，所有样品均扩增出228 bp条带，说明设计的引物能适用于不同的鲨鱼来源的鱼翅样品，针对鲨鱼的通用性好。

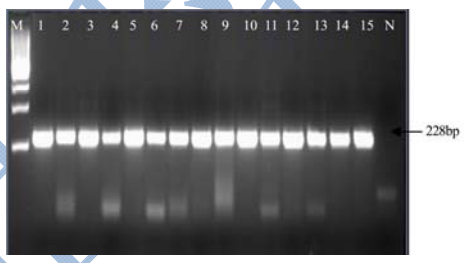


图 3 部分不同种类鱼翅样品鱼翅特异性引物 PCR 结果

Fig.3 The PCR results of part of shark fins DNA used primers of shark endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道1~15：不同品种的鲨鱼翅。

采用PCR方法特异性鉴定鱼翅食品中的鲨鱼成分，要求所设计的鲨鱼特异性引物除了针对鲨鱼的通用性良好外，还需要具有良好的特异性。为检验引物的特异性，运用鲨鱼特异性引物对大米、小米和小黄鱼等其它37种不同物种样品的DNA进行PCR扩增。结果如图4所示，在37种物种DNA中均未有228 bp的扩增条带产生，说明所设计的鲨鱼特异性引物只能特异性的针对鲨鱼种类DNA进行PCR扩增，对于其它物质不会扩增衬衫特异条带，特异性好。

为了检测方法的灵敏度，将土豆DNA代表植物与鱼翅DNA以不同比例混合，分别用鲨鱼特异性引物，植物内源基因引物进行PCR扩增。结果如图5和6所示，在鱼翅DNA中掺入0.2~5%的土豆DNA均能检测出比较亮的条带，而掺入0.1%的土豆DNA只能扩增出非常弱的条带（图5），同样在土豆DNA中掺入0.1%的鱼翅DNA扩增出的条带稍弱（图6），因此认为该检测方法灵敏度能达到0.1%以上。

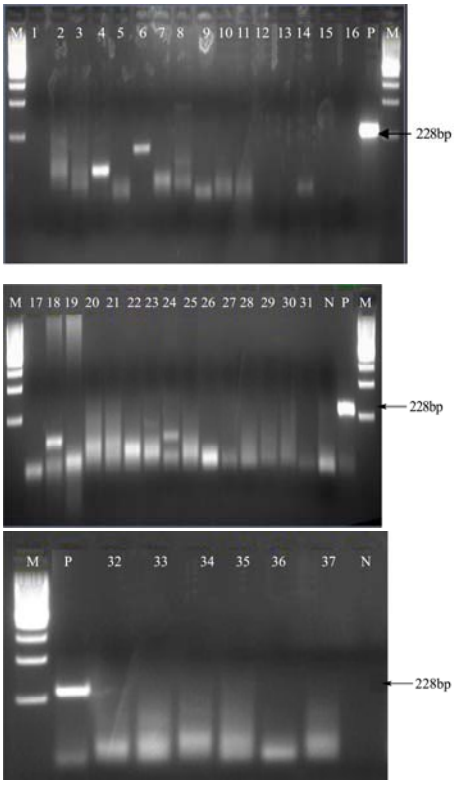


图 4 鱼翅特异性引物其他物种 PCR 结果

Fig.4 The PCR results of other species DNA used primers of shark endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道P：阳性对照；泳道1：鱿鱼；泳道2：虾；泳道3：鲍鱼；泳道4：花甲；泳道5：小黄鱼；泳道6：三文鱼；泳道7：金鲳鱼；泳道8：鸡；泳道9：剥皮牛；泳道10：带鱼；泳道11：土豆；泳道12：香蕉；泳道13：红薯；泳道14：海蜇；泳道15：芒果；泳道16：海带；泳道17：鸭；泳道18：鹅；泳道19：鹌鹑；泳道20：兔；泳道21：花生；泳道22：牛；泳道23：羊；泳道24：猪；泳道25：秋刀鱼；泳道26：平菇；泳道27：竹笋；泳道28：冬瓜；泳道29：白果；泳道30：火龙果；泳道31：板栗；泳道32：玉米；泳道33：大豆；泳道34：小麦；泳道35：大米；泳道36：莲子；泳道37：芸豆。

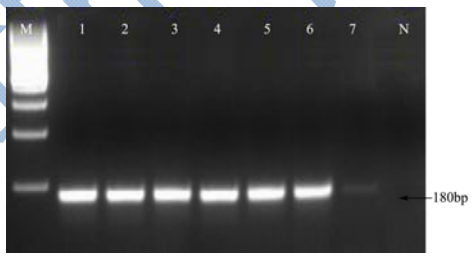


图 5 含不同浓度土豆 DNA 的鱼翅 DNA 植物特异引物 PCR 结果

Fig.5 The PCR results of shark fins DNA which mixed in different proportions potato DNA used primers of plant endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道1：土豆DNA含量10%；泳道2：土豆DNA含量5%；泳道3：土豆DNA含量2%；泳道4：土豆DNA含量1%；泳道5：土豆DNA含量0.5%；泳道；6：土豆DNA含量0.2%；泳道7：土豆DNA含量0.1%。

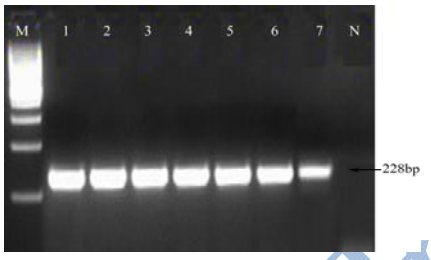


图 6 含不同浓度鱼翅 DNA 的土豆 DNA 鲨鱼特异引物 PCR 结果

Fig.6 The PCR results of potato DNA which mixed in different proportions shark fins DNA used primers of shark endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道1：鱼翅DNA含量10%；泳道2：鱼翅DNA含量5%；泳道3：鱼翅DNA含量2%；泳道4：鱼翅DNA含量1%；泳道5：鱼翅DNA含量:0.5%；泳道6：鱼翅DNA含量0.2%；泳道7：鱼翅DNA含量0.1%。

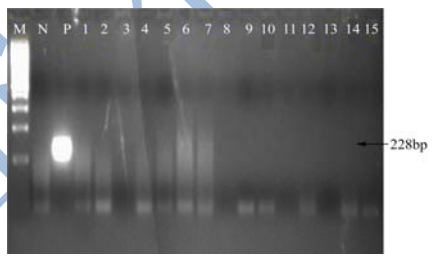


图 7 鱼翅特异引物对仿鱼翅样品 PCR 结果

Fig.7 The PCR results of imitation samples DNA used primers of shark endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道P：正对照；泳道1~15：仿鱼翅样品

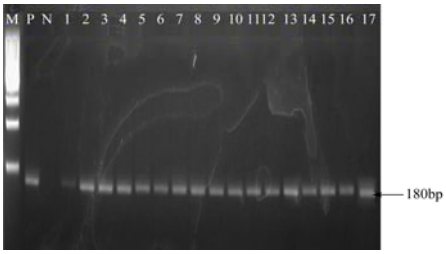


图 8 植物特异性引物对仿鱼翅样品 PCR 结果

Fig.8 The PCR results of imitation samples DNA used primers of plant endogenous genes

注：泳道M：200 bp Ladder；从下到上片段大小分别为200、400、600 bp等；泳道N：空白对照；泳道P：正对照；泳道1~15：仿鱼翅样品。

为检测该方法是否能运用于市场上鱼翅类食品中有鲨鱼成分鉴定，用该引物对市场上所得的21份仿鱼翅DNA样品进行了PCR检测鉴定。在检测结果中我们看

到，在21份仿鱼翅样品中都未扩增得到相应的228 bp条带（图7），而采用植物特异性引物进行扩增时发现21份仿鱼翅样品都有相应扩增条带产生（图8），这个结果说明在仿鱼翅食品中均不含鲨鱼成分，并非来源于鲨鱼，系采用植物来源原料仿制而成。

3 结论

本研究建立了一种简单的食品中鲨鱼成分PCR鉴定检测方法，该方法从鲨鱼线粒体基因的细胞色素亚基I中设计了一对特异性引物。扩增片段为228 bp，在市场上22中不同的鲨鱼翅中均能检测出特异的单一条带，并对其他37种物种进行了特异性检测，证明其特异性好，检测灵敏度为0.1%以上，可以用于市场上鱼翅类产品中的鲨鱼成分鉴定检测。

参考文献

[1] 陈文炳,邵碧英,廖宪彪,等.加工食品中若干动物成分的PCR检测技术应用研究[J].食品科学,2005,8:338-341
CHEN W B, SHAO B Y, LIAO X B, et al. Application of PCR Detection for Some Animal Components in Processed Food [J]. Food Science, 2005, 8: 338-341

[2] 覃芳芳,邓鸿铃,郭新东,等.腊肠中的植物成份的PCR检测方法研究[J].现代食品科技,2008,7:722-724
QIN F F, DENG H L, GUO X D, et al. Detection of Plant Element in Sausage via PCR Method [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 7: 722-724

[3] 黄宇锋,罗海英,罗东辉,等.PCR方法快速鉴别食品中肉的种类[J].现代食品科技,2013,29(7):1725-1729
HUANG Y F, LUO H Y, LUO D H, et al. Rapid Detection of Meat Species in Food by Polymerase Chain Reaction Technique [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1725-1729

[4] 罗家琴,王加启,卜登攀,等.饲料中牛、羊、猪、鸡源性成分的PCR检测方法及其应用[J].中国农业科学, 2008, 41(7): 2112-2119
LUO J Q, WANG J Q, BU D P, et al. Development and Application of a PCR Detection of Bovine, Sheep, Pig and Chicken Derived Materials in Feedstuff [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(7): 2112-2119

[5] 覃文,董洁,高东微,等.PCR-Gene Scan法检测转基因产品[J].生物技术,2001,5:36-39
QIN W, DONG J, GAO D W, et al. Detection of genetically modified soya and maize by PCR-Gene Scan [J]. Biotechnology, 2001, 5: 36-39

[6] 陈颖,王晶,吴亚君,等.动物明胶中3种DNA提取方法的比较研究[J].食品与发酵工业,2006,32(4):42-45
CHEN Y, WANG J, WU Y J, et al. Comparison of Three DNA Extraction Methods from Animal Gelatins [J]. Food and Fermentation Industies, 2006, 32(4): 42-45

[7] Wong EH, Shivji MS, Hanner RH. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach [J]. Mol Ecol, Resour., 2009, 5: 243-256

[8] Danillo P, Otto B, Adriane P, et al. Discrimination of Shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats [J]. Genetics and Molecular Biology, 2008, 31: 361-365

[9] Debra L, Shelley C, Mahmood S. Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement [J]. Conservation Genetics, 2005, 6: 775-788

[10] Blanco M, Perez-Mart R, Soteloj C. Identification of Shark Species in Seafood Products by Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) [J]. Agric. Food Chem., 2008, 56: 9868-9874

[11] Demian DC, Debra LA, Christophe JD, et al. A streamlined, biorganelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the greatwhite shark, Carcharodon carcharias [J]. Conservation Genetics 2003, 4: 415-425

[12] 黄文胜,韩建勋,董洁,等.FINS 方法鉴定鱼翅和鲨鱼软骨的鲨鱼种类[J].食品科技,2011,36(11):265-271
HUANG W S, HAN J X, DONG J, et al. Species identification of shark fins and cartilages with FINS method [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(11): 265-271

[13] 郭云霞,冒海琳,张舒亚等.鱼翅的分类及鉴别方法[J].食品工业,2011,6:96-99
GUO Y X, MAO H L, ZHANG S Y, et al. Classifi cation and Identifi cation of Shark Fin [J]. The Food Industry, 2011, 6: 96-99

[14] 郭云霞,包建强,张舒亚等.食品中鲨鱼源性成分真实性PCR 鉴别研究[J].食品工业科技,2011,32:423-424
GUO Y X, BAO J Q, ZHANG S Y, et al. Study on authentication of shark derived material in food using PCR [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32: 423-424