

鱼翅制品中鲨鱼源性成分的实时荧光 PCR 检测方法

王德莲, 刘冬虹, 许丽珠, 曾国权, 高利海, 张慧, 陈遂, 冼燕萍, 郭新东

(广州质量监督检测研究院, 广东广州 510110)

摘要: 本研究通过鲨鱼线粒体基因组的部分序列, 设计了鲨鱼的特异性引物和探针, 建立了鱼翅制品中鲨鱼源性成分检测的一种新方法, 据此可鉴别鱼翅制品的品质。通过物种特异性实验和灵敏度测试, 表明所设计的引物和探针具有较好的物种特异性, 所建立的方法具有较高的灵敏度: DNA 浓度的检测灵敏度可达 0.01 ng/ μ L, 重量检测灵敏度可达 0.1% (m/m)。采用该方法并结合植物源性基因检测方法对市场随机抽取的 25 份鱼翅制品进行检测, 其中 18 份样品检出鲨鱼源性成分而未检出植物源性成分, 7 份样品未检出鲨鱼源性成分而检出植物源性成分, 表明这 7 份样品不是真鱼翅制品, 而是采用了植物成分仿制而成。本研究所建立的方法快速、灵敏、简单, 适用于市场上鱼翅制品中鲨鱼源性成分的快速检测。

关键词: 鱼翅制品; 鲨鱼源性成分; 检测; 实时荧光 PCR

文章编号: 1673-9078(2015)4-289-293

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.047

A Real-time PCR Method for the Detection of Shark-origin Components in Shark Fin Products

WANG De-lian, LIU Dong-hong, XU Li-zhu, ZENG Guo-quan, GAO Li-hai, ZHANG Hui, CHEN Sui,

XIAN Yan-ping, GUO Xin-dong

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, china)

Abstract: Specific primers and probes were designed using a portion of the shark mitochondrial genome to establish a novel method for the detection of components of shark-origin in shark fin products, in order to determine product quality. The results of this study indicated that this method had good species specificity, as well as a high sensitivity of 0.01 ng/ μ L DNA concentration or 0.1% (m/m) weight. This method was then combined with a detection method developed for the identification of plant-origin genes; this combined method was used to examine 25 shark fin products available in the market (randomly chosen). The results of this analysis revealed the presence of shark-origin components (and not plant-origin components) in 18 samples, and of plant-origin components (and not shark-origin components) in the remaining 7 samples; this indicated that the latter 7 samples were imitation fin products prepared using plant ingredients. The method established in this study is fast, sensitive, and simple, and suitable for the rapid detection of shark-origin components in shark fin products available in the market.

Key words: shark fin products; shark-origin components, detection; real-time polymerase chain reaction

鱼翅是海味八珍之一, 是鲨鱼的鳍经干制而成。由于鱼翅营养丰富, 常与“燕窝”、“鲍鱼”、“海参”等相提并论。近年来, 随着人们生活水平的提高, 鱼翅的消费量也逐年增加, 一些不法商贩为追求高额利润, 各种造假鱼翅也应运而生。因此, 建立鱼翅真伪鉴别的方法尤为重要。

目前, 对鱼翅制品的研究国内外主要侧重于对鱼翅的来源^[1]、鱼翅贸易对鲨鱼种类和数量的影响^[2]、鱼

翅贸易的监控和管理^[3]、鱼翅营养成分的提取和分析^[4]、鱼翅加工工艺和仿鱼翅的研制^[5]、鲨鱼种类的鉴别^[6]。

对于鱼翅真伪的鉴别, 国内外都还没有相关的标准。近年来, 鱼翅真伪鉴别的技术陆续有相关的文献报道, 国外对于鱼翅的种类鉴别主要使用 PCR(polymerase chain reaction)、实时荧光 PCR 等相关技术^[7~9], 国内也有相关文献报道, 如郭云霞等^[10]采用常规 PCR 试剂盒的方法对 9 个鲨鱼品种中的鲨鱼成分进行了检测, 均检测到鲨鱼特异性扩增条带; 覃芳芳等^[11]根据鲨鱼线粒体细胞色素亚基的基因序列设计了鲨鱼的特异性引物, 采用常规 PCR 方法对 22 种鲨鱼进行了检测, 均检测到了鲨鱼特异性扩增条带。由于鱼翅在加工过程中需要经过脱沙、漂白等工艺, 对鱼翅

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: 国家质检总局科研项目 (2013QK278)

作者简介: 王德莲 (1975-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品安全检测技术研究

通讯作者: 郭新东 (1976-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品安全检测技术研究

的核酸有一定程度的破坏,因此,在鱼翅的 PCR 鉴别过程中要求扩增的片段小、灵敏度高。实时荧光 PCR(Real Time PCR)是在常规 PCR 的基础上发展起来的一种新的检测技术,与常规 PCR 比较,实时荧光 PCR 在常规 PCR 的基础上引入了一条与模板匹配的带有荧光基团的探针,提高了该方法的检测特异性,在对结果的判定上与常规 PCR 相比更为客观,在检测的准确度、灵敏度和防污染方面均优于常规 PCR 方法^[12]。因此,该方法已广泛应用于食品原料、加工和深加工产品中物种属鉴别和转基因成分的检测,并被制定成方法标准进行推广使用^[13-14]。

由于动物线粒体基因组具有分子量小、结构简单、母系遗传等特点,被广泛应用于物种的鉴别研究^[15],如,根据线粒体细胞色素氧化酶基因,采用 DNA 条形码技术^[16]对物种进行准确、快速地鉴定。本研究通过比较鲨鱼的线粒体基因组,根据序列保守区域设计鲨鱼的特异性引物和探针,建立了鱼翅制品中鲨鱼源性成分的实时荧光定性 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

用于鲨鱼源性成分特异性检测样品皆由本实验室提供,包括:冷冻鲨鱼肉 4 份、猪肉、羊肉、牛肉、鸡肉、兔肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、罗非鱼肉、草鱼肉、鲤鱼肉、草虾肉;大豆、花生、土豆、番茄、玉米、棉花、芸豆、芝麻等共 22 种物种。市售鱼翅制品共 25 份,包括干鱼翅 16 份、冻干鱼翅 2 份、泡发鱼翅 5 份、仿鱼翅 2 份。DNA 提取试剂盒采用 QIAGEN 的 DNeasy mericon food kit; 氯仿、PCR 反应体系中的 10×Exbuffer、dNTP、TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物;所用引物和探针由 Invitrogen 公司合成。

根据鲨鱼线粒体基因组部分序列,采用 Primer5.0 设计了鲨鱼源性成分检测的 3 对引物,经多次实验最终确定引物和探针序列为 5'-CTATCTTCCCGAAA CTAAACGAG-3', 5'-GACAACCAGCTATCACTAA A-3', 5'-FAM-CGAGCTACTCCGAAGCAGCATT-TA MARA-3'。

采用真核生物 18SrRNA 特异性基因引物和探针^[13]检测样品所提取的 DNA 质量,引物和探针序列为: 5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3', 5'-CGTGTCCAGG ATTGGGTAAT-3'; 5'-FAM-TGC GCGCCTGCTGCCT TCCT-TAMRA-3'。

3-30K 冷冻离心机, SIGMA 公司; DK-8D 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司; Sartorius 电子天

平,北京赛多利斯天平有限公司; CP02 难处理样品破碎仪, Covaris 公司; 美国 A10 超纯水仪, MILLIPORE 公司; Smartspec plus 核酸蛋白分析仪, BIO-RAD 公司; eppendorf 移液器,德国艾本德公司; ABI7300 实时荧光 PCR 仪,美国 AB 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

鲨鱼肉和罗非鱼肉样品经烘干后研磨成粉状;鱼翅样品和其他动物样品采用难处理样品破碎仪打碎;其他植物样品经搅拌器磨成粉末状。用于 DNA 提取。

取粉状的鲨鱼肉样品按照 10%、1%、0.1%、0.01% 的重量百分比添加到粉状的罗非鱼样品中,混合均匀。用于重量灵敏度的测定。

1.2.2 DNA 提取

将上述样品采用 DNeasy mericon food kit 试剂盒进行 DNA 提取,提取步骤按照操作说明书进行。考虑到鱼翅制品含水量少、蛋白含量高等特点,在 DNA 提取过程中将水浴时间延长到 1 小时,并采用苯酚:氯仿(1:1)进行二次抽提。最后加入试剂盒中的 EB 溶液 100 μ L,温浴 5 min,离心收集到的液体即为提取到的 DNA 溶液。

1.2.3 PCR 扩增

经多次实验确定鲨鱼源性成分检测的实时荧光 PCR 反应体系为: 10×Exbuffer 3 μ L、dNTP 2.4 μ L、上、下游引物各 0.5 μ L(20 pm/ μ L)、ExTaqDNA 聚合酶 0.2 μ L(5 U/ μ L),探针 0.2 μ L(20 pm/ μ L),加水至反应总体积为 30 μ L。实时荧光 PCR 反应参数为: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

DNA 提取的质量直接影响到后续的 PCR 扩增,为了检测本实验所提取的样本 DNA 的质量,将所提取的 DNA 稀释 10 倍,采用 Smartspec plus 核酸蛋白分析仪进行 DNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280})的测定。DNA 浓度及纯度的测定结果见表 1。结果表明,未加工的动植物样品及鲨鱼肉样品的 DNA 的提取质量明显高于加工过的鱼翅制品 DNA 质量。分析其原因,主要有两个方面,一是干鱼翅的蛋白质含量高达 80% 左右, DNA 提取过程中无法完全去除;二是鱼翅在加工过程中及 DNA 提取过程中有部分 DNA 的损失。对于仿鱼翅和泡发鱼翅,由于加工原料多为明胶和淀粉

的混合物^[11], DNA 的提取质量也相对较低。

为了考察本实验所提取的 DNA 质量, 选取 DNA 提取质量较低的 25 份鱼翅制品样品, 采用真核生物 18SrRNA 特异性基因引物和探针对所提取的 DNA 进行扩增, 结果显示, 25 份样品的 DNA 均出现了有效的扩增曲线 (Ct 值约为 27) (见图 1), 表明本实验所采用的 DNA 提取试剂盒能有效提取到足够的、可满足后续 PCR 检测的 DNA。

表 1 实验样品 DNA 提取结果

Table 1 Results of DNA extraction from samples

样品	DNA 浓度/(ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
未加工的动植物样品及鲨鱼肉 (25 份)	656~987	1.80~2.0
鱼翅干制品(16 份)	182~200	1.70~1.80
冻干鱼翅 (2 份)	190, 198	1.75, 1.82
泡发鱼翅 (5 份)	152~164	1.65~1.75
仿鱼翅 (2 份)	153, 160	1.60, 1.70

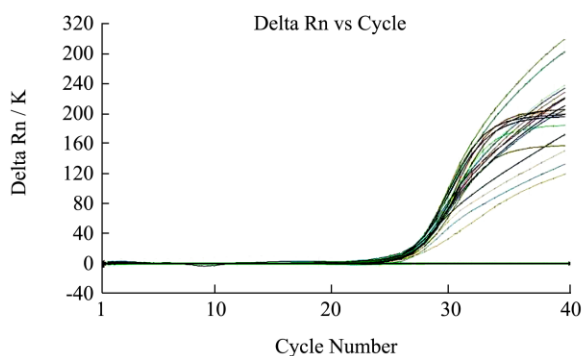


图 1 25 份鱼翅制品的真核生物内源基因实时荧光 PCR 扩增图谱

Fig.1 Real-time PCR amplification curves of eukaryotic endogenous genes in 25 shark fin product samples

2.2 鲨鱼源性成分实时荧光 PCR 物种特异性

检测结果

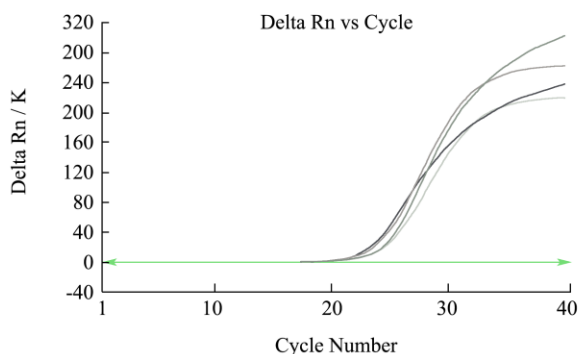


图 2 鲨鱼源性成分实时荧光 PCR 特异性检测图谱

Fig.2 Specific detection of shark-origin components by real-time PCR

采用本研究设计的鲨鱼源性引物和探针对 4 份鲨鱼肉和 21 种其他动植物 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增, 结果显示, 只有鲨鱼肉样品的 DNA 有扩增曲线 (Ct 值约为 22), 而 21 种其他动植物样品的 DNA 均未出现扩增曲线 (见图 2)。结果表明, 本实验所设计的引物和探针具有较好的种属特异性。

2.3 鲨鱼源性成分实时荧光 PCR 灵敏度测试

结果

采用本研究所设计的鲨鱼源性引物和探针对浓度为 10、1、0.1、0.01 ng/μL 的鲨鱼肉 DNA 进行检测, 从扩增图谱 (图 3) 可以看出, 在浓度为 0.01 ng/μL 以上的鱼翅 DNA 中均出现了扩增曲线 (图 3)。其 Ct 值依次约为 22、26、30、35。按照食品检测标准^[13], 一般认为, Ct 值小于等于 36 为阳性扩增。因此, 本实验结果表明, 该方法对鲨鱼源性成分检测的 DNA 浓度灵敏度为 0.01 ng/μL 以上。与郭云霞^[10]、覃芳芳^[11]等采用的常规 PCR 方法相比较, 检测的灵敏度更高, 是常规 PCR 的 10 倍。

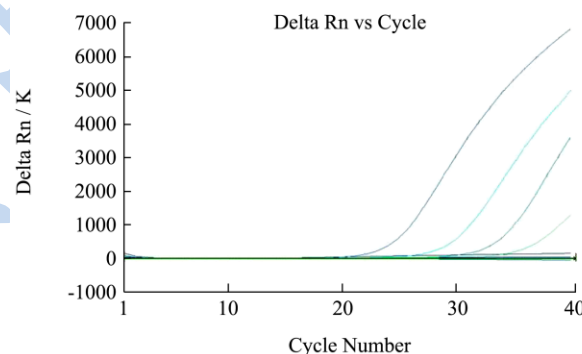


图 3 鲨鱼源性成分 DNA 浓度灵敏度实时荧光 PCR 检测扩增图谱

Fig.3 Amplification curves indicating the sensitivity (DNA concentration) of real-time PCR for the detection of shark-origin components

注: 扩增曲线从左到右依次为: 鲨鱼肉 DNA 浓度为 10 ng/μL (Ct 值 22)、鲨鱼肉 DNA 浓度为 1 ng/μL (Ct 值 27)、鲨鱼肉 DNA 浓度为 0.1 ng/μL (Ct 值 32)、鲨鱼肉 DNA 浓度为 0.01 ng/μL (Ct 值 35)。

将按 1.2.1 混合的鲨鱼肉和罗非鱼样品提取 DNA, 将提取到的 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增, 混合物中鲨鱼肉重量百分比在 0.1% 及以上的样品均出现了有效的扩增曲线 (见图 4), Ct 值依次为 19、26、33。结果表明, 该方法能检测出原料产品中 0.1% (m/m) 的鲨鱼源性成分。

2.4 鱼翅制品中鲨鱼源性成分检测的应用

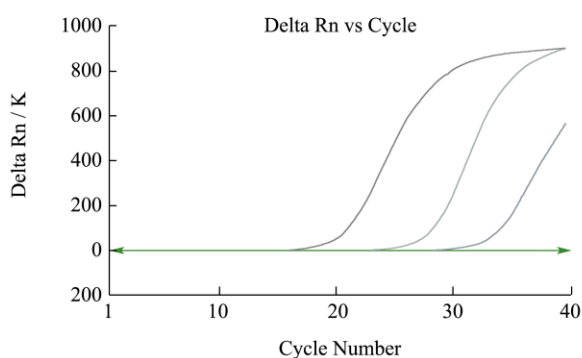


图4 鲨鱼源性成分实时荧光 PCR 重量灵敏度检测图谱

Fig.4 Amplification curves indicating the sensitivity (weight) of real-time PCR for the detection of shark-origin components

注：扩增曲线从左到右依次为：含10%鲨鱼肉样品的扩增曲线（Ct值19）；含1%鲨鱼肉样品的扩增曲线（Ct值26）；含0.1%鲨鱼肉样品的扩增曲线（Ct值33）。

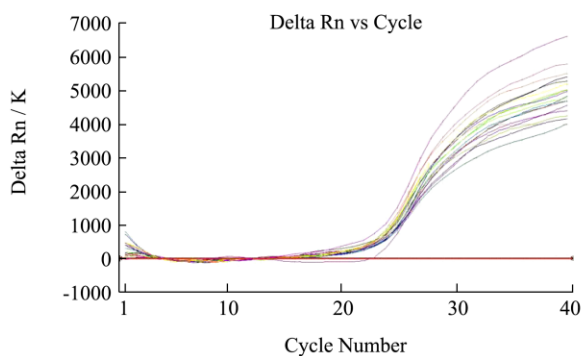


图5 干鱼翅中鲨鱼源性成分实时荧光 PCR 检测扩增图谱

Fig.5 Real-time PCR amplification curves indicating the presence of shark-origin components in dried shark fin products

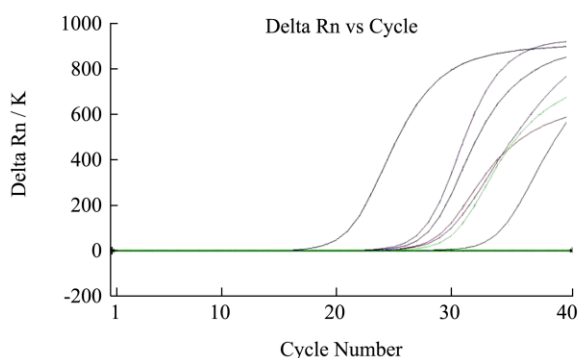


图6 仿鱼翅制品中植物源性成分实时荧光 PCR 扩增图谱

Fig.6 Real-time PCR amplification curves indicating the presence of plant-origin components in imitation shark fin products

为了检测本研究所建立的方法是否适用于市售鱼翅制品的检测，采用本研究的方法对 25 份样品（1.1）进行 DNA 提取和实时荧光 PCR 扩增，其中 18 份干鱼翅、冻干鱼翅均出现了扩增曲线，而另外 7 份泡发鱼

翅和仿鱼翅均未出现扩增曲线（见图 5）。根据本研究组的前期检测研究^[11]，泡发鱼翅和仿鱼翅多是以淀粉和明胶为原料制作而成，通常含有植物成分而不含鲨鱼源性成分。为了验证这个结果，本研究对 25 份样品采用植物源性检测引物和探针^[14]进行检测，结果显示 18 份干鱼翅、冻干鱼翅均未检出植物源性成分，而 7 份泡发鱼翅和仿鱼翅均检出了植物源性成分（见图 6），表明本研究中的泡发鱼翅和仿鱼翅并非来源于鲨鱼，而是采用了植物成分仿制而成。

3 结论

本研究通过设计鲨鱼的特异性引物和探针，建立了鱼翅制品中鲨鱼源性成分检测的实时荧光 PCR 方法。通过特异性和灵敏度试验表明，本方法所设计的引物和探针具有较强的物种特异性，所建立的方法具有较高的灵敏度：DNA 浓度灵敏度可达 0.01 ng/ μ L，与郭云霞^[10]、覃芳芳^[11]等采用的常规 PCR 方法相比较，检测的灵敏度更高，是常规 PCR 的 10 倍。重量灵敏度经实验证明可达 0.1%。采用本方法对市场随机抽取的 25 份鱼翅制品进行了检测，其中 18 份检测到了鲨鱼源性成分，未检出植物源性成分。而未检出鲨鱼源性成分的 7 份泡发鱼翅和仿鱼翅均检出了植物源性成分。综上所述，本研究在建立鲨鱼源性成分检测方法的同时，加以植物源性成分进行辅助检测，可成功地鉴别鱼翅制品的属性来源。该方法可应用于鱼翅制品中鲨鱼源性成分的检测，可作为鱼翅制品真伪鉴别的一种参考方法，对于打击制假售假、规范市场秩序、保障消费者权益和身体健康具有重要的意义。

参考文献

- [1] Bronwyn H Holmes, et al. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding [J]. Fisheries Research, 2009, 95: 280-288
- [2] Quentin S W Fong, et al. International shark fin markets and shark management: an intergrated market preference-cohort analysis of the blacktip shark [J]. Ecological Economics, 2002, 40: 117-130, 333
- [3] Debra L Abercrombie, et al. Global-scale genetic identification of hammerhead sharks [J]. Conservation Genetics, 2005, 6: 775-788, 333
- [4] 徐凤香,高昕,李昭勇,等.鱼翅营养成分提取与定性分析[J]食品工业科技,2007,28(1):225-227
XU Feng-xiang, GAO Xin, LI Zhao-yong et al.The extraction and qualitative analysis of nutritional elements in shark fin [J]. Science and Technology of food industry ,2007, 28(1): 225-227

- [5] 陈胜军,李来好,杨贤庆,等.鱼翅加工工艺与品质鉴定[J].中国水产,2008,10:72-74
CHEN Sheng-Jun, LI Lai-hao, YANG Xian-qing et al. Processing technic and quality identify for shark fin [J]. China aquatic product, 2008, 10, 72-74
- [6] 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 Wen-Sheng, HAN Jian-xun, DONG Jie, et al. Species identification of shark fins and cartilages with FINS method [J]. Food science and technology, 2011, 36(11) 265-271
- [7] Shelley C Clarke, Jennifer E, Magnussen, Debra L Abercrombie, et al. Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records [J]. Conservation Biology, 2006, 20(1): 201-211
- [8] Blanco M, P érez-Mat ín RI, Sotelo CG. Identification of shark species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS) [J]. J. Agric. Food Chem., 2008, 56(21):9868-9874
- [9] Yancy Haile F, Zemlak Tyler S, Mason Jacqueline A., et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the Regulatory Fish Encyclopedia [J]. J. Food Prot., 2008, 71(1): 210-217
- [10] 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(10):421-424
GUO Yun-xia, BAO Jian-qiang, ZHANG Shu-ya, et al. Study on authentication of shark derived material in food using PCR [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(10): 421-424
- [11] 覃芳芳,王德莲,洗燕萍,等.鱼翅类食品中鲨鱼成分PCR鉴定方法研究[J].现代食品科技,2014,30(4):274-278
QIN Fang-fang, WANG De-lian, XIAN Yan-ping, et al. Identification of shark fins in food with PCR method [J]. Modern Food Science and Technology. 2014, 30(4): 274-278
- [12] 王明旭,朱永芳,罗宽,等.松材线虫rDNA-ITS2的TaqMan探针实时荧光PCR检测[J].林业科学,2005,41(2):82-85
WANG Ming-xun, ZHU Yong-fang, LUO Kuan, et al. Studies on real_time fluorescent PCR with TaqMan probe for Rdna-TIS2 of pine wood nematode [J].Scientia Silvae Sinicae. 2005, 41(2): 82-85
- [13] GB/T 25165-2010《明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法实时荧光PCR方法》[S]
GB/T 25165-2010 Protocol of identification of bovine, ovine and porcine derived materials in gelatin-Real time PCR method [S]
- [14] SN/T 1204-2003《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光PCR定性检验方法》[S]
SN/T 1204-2003 Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified plants and their derived products [S]
- [15] 王加连,杨光,刘海,等.线粒体DNA序列分析在中国水域真海豚物种鉴定中的初步应用[J].兽类学报,2003,23(2):252-258
WANG Jia-lian, YANG Guang, LIU Hai, et al. Application of mitochondrial DNA sequences in the species identification of common dolphins (Genus Delphinus) in Chinese waters [J]. Acta Therilologica Sinica, 2003, 23(2): 252-258
- [16] 李新光,王璐,赵峰,等.DNA条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用.[J]食品科学,2013,34(18):337-342
LI Xin-guang, WANG Lu, ZHAO Feng, et al. Application of DNA barcoding to identify commercial fish and fish products [J]. Food Science, 2013, 34(18): 337-342