

鱼肉 DNA 提取方法比较及物种鉴定研究

杨珺茹¹, 熊雄¹, 黄曼虹¹, 袁方颖¹, 陆利霞^{1,2}, 熊晓辉^{1,2}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816)

(2. 江苏省食品安全快速检测公共技术服务中心, 江苏南京 211816)

摘要: 本研究采用改进煮沸法 (BP 法) 以及传统蛋白酶 K 法 (TP 法), 从 16 种鱼肉样品中提取 DNA, 分析比对两种方法提取 DNA 的浓度、纯度、以及普通 PCR 和荧光 PCR 的效果。同时, 运用 BP 法从 70 个市售鱼肉产品中提取总 DNA, 并采用 DNA 条形码技术进行物种鉴定。结果表明, BP 法提取 DNA 耗时较短, 对于大部分鱼肉样品, BP 法提取的 DNA 浓度低于 TP 法, 但两种方法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 无显著差异, 均满足普通 PCR 和荧光 PCR 扩增要求。另外, BP 法提取的 DNA 可用于市售鱼肉产品 DNA 条形码鉴定, 通过比对发现, 81.43% 的鱼肉产品可匹配到相似度 $\geq 98\%$ 的物种, 在种水平和属水平的鉴定成功率分别为 48.57% 和 72.86%。BP 法在提取 DNA 过程中可缩短时间, 降低提取成本, 便于大批量样品的检测。

关键词: DNA 提取; DNA 条形码; 鱼肉制品; 煮沸法

文章编号: 1673-9078(2019)06-161-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.021

Comparison of DNA Extraction Methods and Species Identification of Fish Meat

YANG Jun-ru¹, XIONG Xiong¹, HUANG Man-hong¹, YUAN Fang-ying¹, LU Li-xia^{1,2}, XIONG Xiao-hui^{1,2}

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

(2. Jiangsu Public Technical Service Center for Rapid Detection of Food Safety, Nanjing 211816, China)

Abstract: In this study, an improved boiling method (BP method) and traditional proteinase K method (TP method) were used to extract DNAs from 16 kinds of fish meat samples. Then, the concentration and purity of the extracted DNAs as well as the performance of the common polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence PCR were compared. In the mean time, the total DNA was extracted from 70 commercially available fish products using the BP method and analyzed for species identification using DNA barcode technology. The results showed that the extraction of DNA by the BP method required a shorter time. For most fish samples, the concentration of the DNA extracted by the BP method was lower than that by the TP method, but the two methods led to insignificant difference in the A_{260}/A_{280} ratio of the extracted DNAs, thus, met the requirements for common and fluorescent PCR amplification. Moreover, the DNA extracted by the BP method could be used for DNA barcode identification of commercially available fish products. By comparison, 81.43% of the fish products could be matched with a similarity degree $\geq 98\%$, and the identification success rates at the species and genus levels were 48.57% and 72.86%, respectively. The BP method can shorten the DNA extraction time, reduce the extraction cost, and facilitate the detection of large quantities of samples.

Key words: DNA extraction; DNA barcoding; fish products; boiling method

随着生活水平的不断提高, 鱼肉成为百姓筵席上不可缺少的美食。然而, 在经济利益的驱动下, 鱼肉掺假事件如“真假三文鱼”事件^[1]、“鳕鱼掺假”事件^[2], 严重威胁着消费者的身体健康, 不断磨灭公众对食品监管的信心, 可见, 有效区分和鉴定鱼肉物种具有重要意义。

近年来, 基于 DNA 水平的鉴定方法在鱼类产品

物种鉴定中已展现出巨大的潜力。常见的鉴定方法有 PCR-RFLP^[3]、RAPD-PCR^[4]、PCR-AFLP^[5]和 DNA 条形码^[6]等。其中, DNA 条形码技术被证明是快速进行物种鉴定的可靠方法, 已被广泛应用于鉴定食品中动物源性成分^[7]。针对目前美国严重的海鲜造假行为, FDA 已将该方法作为鉴定存在掺假可能的商品鱼类的重要参考依据^[8]。随着研究的发展, 快速提取鱼肉 DNA 并成功扩增目的片段, 成为提高 DNA 条形码鉴定物种效率的关键。

通常, DNA 提取一般包括细胞裂解、DNA 纯化和 DNA 回收三大步骤。Armani^[9]等报道了一种在裂解

收稿日期: 2018-10-31

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31701688)

作者简介: 杨珺茹 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 熊雄 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 水产品掺假检测

细胞时加入蛋白酶 K 的提取方法,该方法将裂解缓冲液置于 60 ℃ 条件下孵育过夜。Druml^[10]等在裂解缓冲液中加入蛋白酶 K,并置于 50 ℃ 下恒温振荡过夜。Loperabarrero^[11]等在裂解缓冲液中加入蛋白酶 K 混匀后,于 50 ℃ 温浴 12 h。传统蛋白酶 K 法是目前常用的 DNA 提取方法,该方法利用蛋白酶 K 将蛋白质降解为肽链或氨基酸,从而分离释放 DNA^[12]。传统蛋白酶 K 法提取的 DNA 可满足后续实验需要,但耗时较长,严重影响检测效率。

因此,许多学者一直在探索一种高效的鱼肉组织细胞裂解方法。Armani^[13]等尝试在鱼肉裂解液中放入玻璃珠,通过振荡研磨帮助细胞裂解,将裂解时间缩短至 90 min。张志敏^[14]等采用胰 RNA 酶和蛋白酶 K,结合煮沸法提取大鲵 DNA,通过 2~3 h 地裂解,最终获得的 DNA 适用于 PCR 扩增和后续分析。刘甦^[15]等将样品加入裂解液中,于 95 ℃ 加热 10 min 并降至室温后,直接吸取上清进行 PCR 扩增,获得清晰明亮的条带。

基于以上的研究,本文拟采用改进煮沸法(Boiling protocol, BP)以及传统蛋白酶 K 法(Traditional Proteinase K, TP 法),从 16 种鱼肉样品品种提取 DNA,比较分析两种方法提取 DNA 的差异。同时,运用 BP 法从 70 个市售鱼肉产品中提取模板 DNA,采用 DNA 条形码技术进行物种鉴定,验证该方法在大批量市售鱼肉产品物种鉴定的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

采集 16 种新鲜鱼样品,对样品标记和拍照后,根据形态学特征进行物种鉴定(表 1)。用灭菌剪刀取鱼背部肌肉,进行如下 3 种处理:(1)直接提取 DNA (FRESH);(2)-20 ℃ 保藏>24 h (FROZEN);(3)腌渍半小时,在 180 ℃ 烤箱内烘烤 30 min (ROASTED)。

表 1 新鲜鱼样品信息

Table 1 Sample information of the freshly collected fish species

编号	中文名	形态学鉴定	采购地点
FS1	鲈鱼	<i>Lateolabrax japonicus</i>	南京市浦口大润发超市
FS2	昂刺鱼	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	
FS3	鲫鱼	<i>Carassius auratus</i>	
FS4	泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	
FS5	鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i>	南京市浦口凡星综合市场
FS6	黑鱼	<i>Channa argus</i>	
FS7	鳊鱼	<i>Parabramis pekinensis</i>	
FS8	回鱼	<i>Leiocassis longirostris</i>	
FS9	清江鱼	<i>Ictalurus punctatus</i>	
FS10	花鲢	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	
FS11	白鲢	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	
FS12	草鱼	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	
FS13	白鱼	<i>Culter alburnus</i>	
FS14	红眼郎鱼	<i>Deapterus maruadsi</i>	
FS15	桂鱼	<i>Siniperca chuatsi</i>	南京市天印山农贸市场
FS16	加州鲈鱼	<i>Micropterus salmonids</i>	南京市江浦永辉超市

另外,从南京本地超市采集 70 个市售鱼肉产品,包括 2 个新鲜鱼产品、21 个冷冻鱼肉产品和 47 个烤鱼片产品(表 5)。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K, BBI 生命科学有限公司; 10×Reaction Buffer、Bio Ready rTaq、dNTP Mixture、Bio DL100、Bio S50, 杭州博日科技有限公司; 引物合成、PCR 测序, 金斯瑞(南京)生物科技有限公司; 6×Loading

Buffer, 宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖凝胶, 西班牙 Biowest 公司; 核酸凝胶染色剂 (GelRedTM), 美国 BIOTIUM 公司; SG Excel Ultra SYBR Mixture (With Low ROX), 上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备

恒温混匀仪 (MS-100), 杭州奥盛仪器有限公司; 高速离心机 (Laborzentrifugen), 德国 SIGMA 公司; 核酸蛋白测定仪 (BioPhotometerD30), 德国 Eppendorf

公司; LifeExpress 梯度 PCR 仪, 中国杭州博日科技有限公司; 凝胶电泳仪 (JY300C)、电泳槽 (JY-SPFT), 北京君意东方电泳设备有限公司; 凝胶成像系统 (Bio-radChemiDoc MP), 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; 纯水/超纯水器 (GWA-UNI-F40), 北京普析通用仪器有限责任公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler[®]96), 罗氏诊断产品 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与数据分析

1.2.1.1 DNA 的提取方法

第一步, 细胞裂解:

BP 法: 参照张婀娜^[16]等的研究并进行适当改进。用灭菌剪刀取样品约 50 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μ L CTAB 裂解缓冲液 (2% (W/V) CTAB, 2M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5 M Tris, pH=8.0) 和 200 μ L 磷酸缓冲液 (0.3 M NaH₂PO₄, pH=8.0), 并置于恒温混匀仪中 14000 r/min 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min。

TP 法: 参照 Armani^[9]等的提取方法。用灭菌剪刀取样品约 50 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μ L SDS 裂解缓冲液 (2% (W/V) SDS, 0.1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5 M Tris, pH=8.0)、100 μ L 磷酸缓冲液 (0.3 M NaH₂PO₄, pH=8.0) 和 10 μ L 的蛋白酶 K (20 mg/ μ L), 并置于恒温混匀仪中 60 $^{\circ}$ C 温浴过夜。

第二步, DNA 纯化与回收:

BP 法同 TP 法: 将混合物在室温条件下以 14000 r/min 离心 5 min, 取上清液至新的 1.5 mL 离心管, 加入 1 倍体积乙酸钠溶液 (4M CH₃COONa, pH=8.2), 混匀后 14000 r/min 离心 5 min, 取上清至新的离心管中, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 混匀后静置 10 min 后, 12000 r/min 离心 10 min 弃上清。最后, 用 70%乙醇和 100%无水乙醇分别清洗 DNA 两次和一次, 65 $^{\circ}$ C 烘箱烘干后, 加入 20 μ L 灭菌超纯水溶解 DNA, 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.1.2 数据分析

用核酸蛋白测定仪测定提取的 DNA 浓度和 A₂₆₀/A₂₈₀。使用 SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 软件对试验数据进行统计分析, 采用多组样本间差异显著性分析法 (Duncan's multiple-range test, DRMT) 进行比较。

1.2.2 PCR 扩增

1.2.2.1 普通 PCR

PCR 反应采用 20 μ L 体系: 10 $\times$ ReactionBuffer (含

有 15 mM MgCl₂) 2 μ L, dNTPs (2.5 mM) 1 μ L, Bio Ready rTaqDNA 聚合酶 0.5 μ L, 鱼类 COI 基因引物^[17] (10 μ M) 各 0.25 μ L (上游引物: 5'-CACGACGT TGTAAAACGACTCAACYAATCAYAAAGATATYG GCAC-3', 下游引物: 5'-GGATAACAATTCACACA GGACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA-3'), DNA 模板 1 μ L, 灭菌超纯水 12.5 μ L。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.2.2 荧光 PCR

荧光 PCR 采用 20 μ L 反应体系: 2 $\times$ SG Excel Ultra SYBR Mixture (With low ROX) 预混液 10 μ L, 鱼类 Cytb 基因引物^[18] (10 μ M) 各 1 μ L (上游引物: 5'-CG CCCACATTGGNCGAGG-3', 下游引物: 5'-GTGGCC CCTCAGAAGGACATTTGGCC-3'), DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L。

荧光 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 进入荧光 40 个 PCR 循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s), 每个循环结束检测荧光。扩增结束后, 进行溶解曲线分析, 设置 72 $^{\circ}$ C 为起始温度, 升温至 95 $^{\circ}$ C, 再降温至 65 $^{\circ}$ C 保持 60 s, 1 s 升温至 97 $^{\circ}$ C。每个样品设 3 个平行。

反应结束后, 分析扩增曲线, 根据循环阈值 (cycle threshold, Ct 值) 判定不同样品处理方式和提取方法对荧光 PCR 扩增的影响。如 Ct 值 $\leq$ 35.0, 则判定不同处理方式和提取方法对荧光 PCR 扩增无明显影响; 如 Ct 值 $>$ 40.0, 则判定处理方式和提取方法对荧光 PCR 扩增有抑制作用; 如 35.0<Ct 值 $<$ 40.0, 则重复一次。随后分析溶解曲线, 通过溶解温度 (Melting Temperature, Tm 值) 的大小区分不同物种^[19]。

1.2.3 物种鉴定

以 70 个市售鱼肉产品为材料, 采用 BP 法提取的 DNA 为模板, 参照 1.2.2.1 方法进行普通 PCR 扩增, 挑选扩增成功并且条带单一的产物进行双向测序。采用 BioEdit 软件对测序所得的峰图进行校对拼接, 去除正反向引物和低质量的序列后, 提交至 BOLD 数据库 (<http://boldsystems.org>) 比对分析, 根据序列相似度比较的结果 (相似度 $\geq$ 98%), 确认各样品的物种类别。

2 结果与讨论

表2 BP法和TP法提取的DNA浓度

Table 2 Concentration of DNA extracted with BP and TP methods

编号	FRESH		FROZEN		ROASTED	
	BP法	TP法	BP法	TP法	BP法	TP法
FS1	160.47±29.19	801.39±314.06	472.05±9.07	825.88±405.07	871.24±200	1641.19±522.72
FS2	162.52±54.25	800.57±161.17	355.44±150.78	336.23±254.91	398.91±89.29	1126.51±203.70
FS3	958.07±79.02	925.43±743.96	526.22±456.12	892.82±193.76	631.19±181.12	1288.41±113.33
FS4	1133.4±1165.63	1122.62±367.93	316.16±55.13	519.40±92.25	1243.26±33.43	828.57±20.26
FS5	73.31±46.19	395.34±34.64	502.41±51.23	261.21±77.96	1298.79±200.62	1389.99±503.77
FS6	34.13±4.29	728.02±207.96	413.98±108.47	543.96±285.29	709.93±129.68	1183.29±55.63
FS7	81.51±12.40	794.99±360.53	1084.92±91.87	774.91±49.19	379.26±45.51	615.06±220.53
FS8	297.93±75.58	639.47±173.98	666.35±178.39	814.98±25.2	374.49±75.14	923.12±158.26
FS9	301.57±27.05	1244.78±177.01	335.00±83.23	417.41±88.89	492.43±12.15	1133.13±186.18
FS10	108.45±1.27	917.03±660.63	361.04±32.95	568.48±90.84	244.43±47.74	1097.75±81.21
FS11	187.92±5.49	776.14±130.04	297.70±57.81	532.88±205.97	172.16±156.15	952.77±32.43
FS12	330.16±56.61	1137.99±47.05	695.89±285.79	669.48±120.68	395.28±106.05	2030.53±239.14
FS13	278.68±291.85	1301.28±1.87	535.02±35.66	659.70±7.46	294.16±2.25	2194.68±612.96
FS14	155.55±40.71	1568.72±656.53	403.67±170.51	683.16±235.82	157.36±19.70	1264.88±54.45
FS15	231.59±29.66	510.11±49.94	427.00±44.26	414.43±29.93	160.50±15.79	329.51±346.56
FS16	210.96±55.43	615.08±114.15	515.49±92.73	919.95±41.72	817.91±132.45	1052.99±120.70

注：表头中BP法/TP法为采用BP法/TP法提取的DNA浓度的简写；DNA浓度的单位为ng/μL。

表3 BP法和TP法提取的DNA A_{260}/A_{280} Table 3 A_{260}/A_{280} of DNA extracted with BP and TP methods

编号	FRESH		FROZEN		ROASTED	
	BP法	TP法	BP法	TP法	BP法	TP法
FS1	1.97±0.17	1.94±0.11	1.84±0.24	2.09±0.38	1.90±0.18	1.98±0.05
FS2	1.95±0.14	2.01±0.08	1.78±0.11	1.87±0.37	2.03±0.76	1.74±0.54
FS3	2.04±0.16	1.96±0.14	2.00±0.08	1.95±0.24	2.03±0.16	1.96±0.14
FS4	2.02±0.12	1.93±0.10	1.80±0.19	1.91±0.11	1.98±0.17	1.85±0.22
FS5	1.84±0.15	1.90±0.10	1.79±0.36	1.88±0.38	1.77±0.04	1.76±0.33
FS6	1.99±0.13	1.90±0.11	1.85±0.16	1.97±0.22	1.95±0.14	1.85±0.16
FS7	2.00±0.04	1.89±0.14	2.03±0.18	1.71±0.36	1.96±0.13	2.02±0.22
FS8	1.86±0.15	1.85±0.34	1.96±0.29	1.77±0.37	1.72±0.18	1.77±0.39
FS9	1.98±0.08	1.76±0.28	1.84±0.48	2.05±0.08	1.89±0.32	1.82±0.18
FS10	1.81±0.11	1.84±0.23	1.82±0.19	1.76±0.10	1.87±0.09	1.79±0.31
FS11	1.83±0.08	1.81±0.17	1.71±0.36	1.79±0.26	1.75±0.22	1.84±0.15
FS12	1.82±0.07	1.84±0.20	1.74±0.41	1.96±0.03	1.75±0.08	1.75±0.31
FS13	1.81±0.05	1.91±0.12	1.93±0.26	1.95±0.18	1.85±0.22	1.75±0.37
FS14	1.95±0.12	1.90±0.08	1.79±0.14	1.90±0.18	1.86±0.08	1.88±0.13
FS15	1.89±0.23	2.07±0.14	1.93±0.09	1.92±0.31	1.97±0.31	1.77±0.38
FS16	1.97±0.16	2.03±0.02	1.87±0.06	1.80±0.15	1.75±0.57	1.82±0.37

注：表头中BP法/TP法为采用BP法/TP法提取的DNA A_{260}/A_{280} 的简写。

2.1 DNA的浓度与纯度

BP法和TP法均可有效获取一定浓度的鱼肉DNA，但在产率上存在差异。

2.1.1 DNA的浓度

对于FRESH样品，BP法和TP法提取的DNA平

均浓度分别为 294.14 ± 72.88 ng/ μ L 和 892.43 ± 116.80 ng/ μ L。其中,对于 FS3 和 FS4, BP 法和 TP 法提取的 DNA 浓度无显著差异 ($p > 0.05$)。而其他 14 个鱼类品种, BP 法提取的 DNA 浓度均显著低于 TP 法 ($p < 0.05$) (图 1A)。原因可能是新鲜鱼肌肉组织完整性良好, BP 法采用 10 min 沸水浴无法充分裂解细胞,仅部分 DNA 被分离释放至缓冲液中,而 TP 法采用蛋白酶 K 并温浴过夜,使蛋白质完全降解, DNA 充分溶于缓冲液,由于 BP 法和 TP 法均采用同一种 DNA 纯化与回收的步骤,因此, BP 法获得 DNA 的浓度较低。

对于 FROZEN 样品, BP 法和 TP 法提取的 DNA 平均浓度分别为 494.27 ± 45.19 ng/ μ L 和 614.68 ± 73.29 ng/ μ L。其中,对于 FS2 和 FS10-12, BP 法和 TP 法提取的 DNA 浓度无显著差异 ($p > 0.05$),而对于 FS5 和 FS7, BP 法提取的 DNA 显著高于 TP 法 ($p < 0.05$)。对于其余 10 个样品, BP 法提取的 DNA 浓度均显著低于 TP 法 ($p < 0.05$)。(图 1B)。两种方法提取的 DNA 平均浓度差异较小,是因为鱼肉在冷冻过程中,肌肉纤维内的水冻结形成冰晶,细胞受到不同程度的破坏^[20]。BP 法和 TP 法均可充分裂解细胞,使 DNA 溶于缓冲液。但 BP 法裂解时间较短,可加快 DNA 获取的效率。

对于 ROASTED 样品, BP 法和 TP 法提取的 DNA 平均浓度分别为 540.08 ± 65.07 ng/ μ L 和 1190.77 ± 106.35 ng/ μ L。其中,对于 FS5, BP 法和 TP 法提取的 DNA 浓度无显著差异 ($p > 0.05$)。对于 FS4, BP 法提取的 DNA 显著高于 TP 法 ($p < 0.05$)。而其他 14 个品种, BP 法提取的 DNA 浓度均显著低于 TP 法 ($p > 0.05$) (图 1C)。肌肉在加热中会出现失水和肌肉收缩等现象^[21],当取相同质量的样品时, ROASTED 样品中所含细胞个数和 DNA 更多, BP 法和 TP 法均可获取较高浓度的 DNA,但由于 TP 法能更充分降解蛋白质释放 DNA,故 TP 法获得的 DNA 浓度更高。

2.1.2 DNA 的纯度

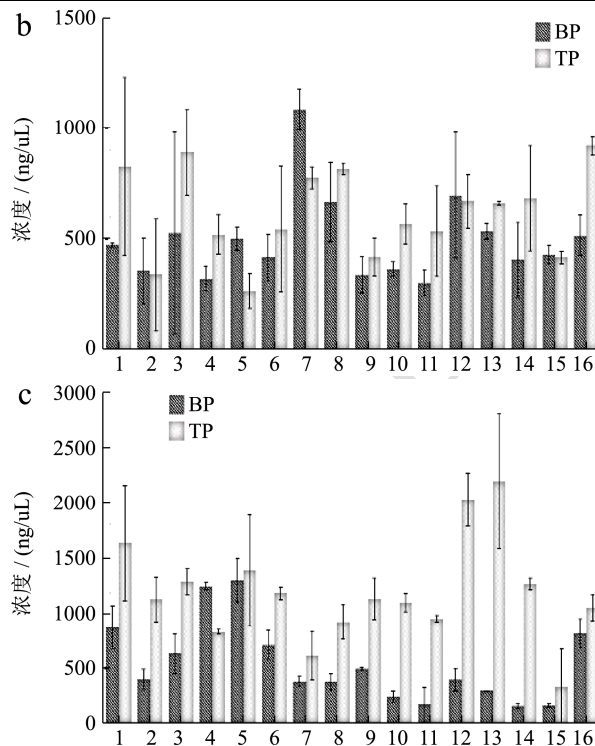
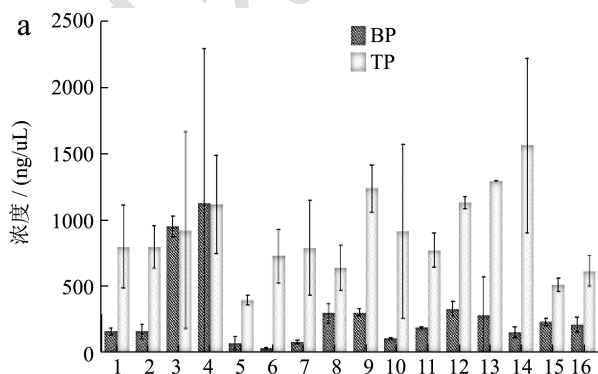


图 1 BP 法和 TP 法提取的 DNA 浓度

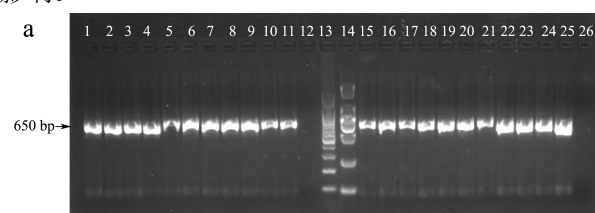
Fig.1 Concentration of DNA extracted with BP and TP methods

注: 1~16 分别为: FS1~16。a 为 FRESH 样品; b 为 FROZEN 样品; c 为 ROASTED 样品。

纯度较高的 DNA A_{260}/A_{280} 值应在 1.8~2.0。对于所有鱼类品种,在三种不同处理方式 (FRESH、FROZEN 和 ROASTED) 下, BP 法和 TP 法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 均在 1.7~2.1 范围内,无显著差异 ($p > 0.05$),说明两种方法均可有效去除蛋白质和酚类等杂质,获得纯度较高的 DNA。

2.2 普通 PCR

PCR 扩增对模板 DNA 的质量要求较高,因此, PCR 扩增成功率成为判定 DNA 质量的重要依据之一。以 BP 法和 TP 法分别从 FRESH、FROZEN 和 ROASTED 样品中提取的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。结果表明,所有 DNA 模板均可扩增出约 650 bp 大小的目的条带,说明 BP 法和 TP 法提取的 DNA 都能满足 PCR 反应的要求,且不同 DNA 浓度未对 PCR 扩增效率产生明显影响。



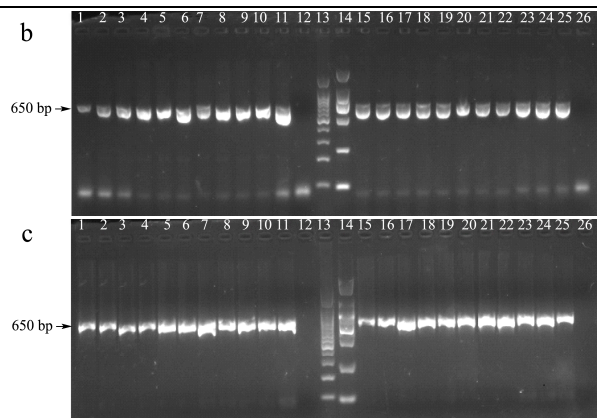


图2 BP法和TP法提取DNA的PCR电泳图

Fig.2 PCR amplification results using DNA extracted with BP and TP methods

注: 1~10 (BP法) 与 15~24 (TP法) 样品相对应, 分别为: FS7、FS15、FS16、FS8、FS9、FS10、FS1、FS12、FS13、FS14。11和25为阳性对照, 12和26为阴性对照, 13: BioS50, 14: BioDL100。a为FRESH样品; b为FROZEN样品; c为ROASTED样品。

2.3 荧光PCR

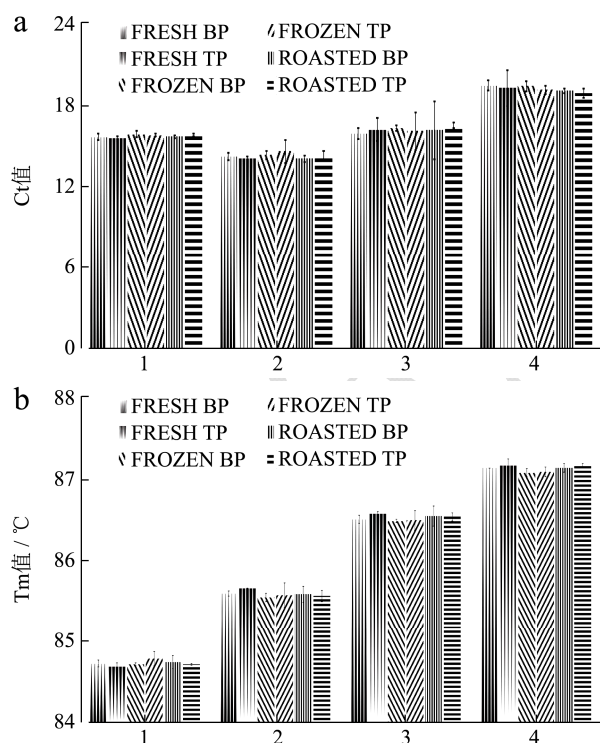


图3 用BP法和TP法提取不同鱼类品种DNA的Ct值和Tm值

Fig.3 Comparison of Tm values of DNA extracted from different fish species by BP method and TP method

注: 1~4分别为FS11、FS3、FS7、FS12。

为避免传统PCR在操作过程中易受污染, 而使得扩增结果出现假阳性等缺点。本研究选择灵敏度更高的荧光PCR, 对亲缘关系较近且同属鲈形目鲤科的四

个品种 (FS11、FS3、FS7和FS12) 进行检测。结果表明, 所有样品的Ct值均 <35 , 且同一品种在不同处理方式和提取方法下, 其Ct值无明显区别, 说明两种方法提取的DNA适用于荧光PCR扩增 (图3a)。另外, 可通过Tm值的大小区分不同物种, 且具有良好的通用性和重现性 (图3b)。

2.4 市售鱼肉产品物种鉴定

市售鱼肉产品中含有丰富的多糖、多酚等物质, 这些物质将影响Taq酶的活性从而抑制PCR反应^[22]。BP法采用较高浓度CTAB去污剂, 不仅有效裂解细胞, 分离蛋白与核酸的复合物, 还能够去除多糖类物质, 避免食品中多糖多酚类物质对PCR扩增造成影响^[23]。另外, 鱼肉产品在保存过程中, 易发生腐败变质和DNA降解等变化^[24], 提取DNA的时间成本是必须考虑的因素之一。BP法利用沸水浴将裂解时间缩短为10 min, 可加快获取模板DNA的效率, 利于大批量样品快速鉴定。

采用BP法可从所有市售产品中成功提取DNA。BP法提取的DNA浓度范围为 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 新鲜鱼产品DNA浓度为 $388.16 \pm 60.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.80 ± 0.01 。冷冻鱼肉产品DNA浓度为 $333.80 \pm 51.45 \text{ ng}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.85 ± 0.14 。烤鱼片产品DNA浓度为 $577.71 \pm 71.78 \text{ ng}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.85 ± 0.18 。所有产品可成功扩增出约650 bp的CO1条形码片段, 且测序原始峰图均为单峰。

2.4.1 鉴定结果及分析

BOLD数据库中比对发现, 市售新鲜鱼产品 (N=2) 均获得相似度大于98%的物种, 且可在物种水平鉴定。

所有市售冷冻鱼产品 (N=21), 均获得相似度大于98%的物种。有9个产品可在物种水平鉴定, 包括: FR2-4、FR6-7、FR9、FR13、FR16和FR21, 物种水平鉴定的成功率为42.86% (9/21)。剩余的12个冷冻鱼产品均无法在物种水平鉴定, 但有8个产品可被鉴定至属水平, 包括: FR1、FR5、FR8、FR10、FR12、FR14、FR19和FR20。而FR11、FR15、FR17和FR18则均与来自不同属的多个物种相似度大于98%。

在所有市售烤鱼片样品中 (N=47), 有34个产品获得相似度大于98%的物种 (72.3%, 34/47)。相似度小于98%的物种为TQ6-8、TQ11、TQ14、TQ16、TQ19、TQ21、TQ24-25、TQ30、TQ40和TQ45-46。在34个样品中, 有23个样品可在物种水平鉴定, 分别为: TQ1-5、TQ10、TQ12-13、TQ23、TQ26-28、TQ32-37、TQ39、TQ41、

TQ43-44、TQ47。物种水平鉴定的成功率为 67.65% (23/34)。在剩余的 11 个样品中, 9 个可鉴定到属水平, 分别是 TQ9、TQ15、TQ17、TQ19、TQ28-31、TQ38。

综上, 在 70 个市售鱼肉产品中, 有 57 个可获得相似度大于 98% 的物种, 占总数的 81.43%; 34 个产品能鉴定到种水平, 种水平鉴定成功率为 48.57%; 另外, 有 18 个产品能鉴定到属水平, 属水平鉴定成

功率为 72.86%。

由上述研究可知, BP 法提取的 DNA 可用于 DNA 条形码鉴定, 但在种水平鉴定成功率较低, 可能的原因有: (1) 数据库中现有的序列数太少, 无法准确匹配所有物种; (2) 挑选的 CO1 条形码片段较保守, 无法区分一些亲缘关系较近的物种。因此, 对于 18 个鉴定到属水平的样品可以筛选出该属的特异性基因片段, 再进行下一步鉴定工作。

表 4 市售鱼肉产品信息及分子鉴定结果

Table 4 Sample information and molecular analysis of commercial fish products

样品信息		DNA 提取	PCR 扩增	物种鉴定/%	获得相似度 ≥98%的物种	物种鉴定水平	
编号	中文名					属	种
FS17	鲈鱼	√	√	<i>Micropterus salmoides</i> (99.35~100)	√	√	√
FS18	多宝鱼	√	√	<i>Scophthalmus maximus</i> (99.58)	√	√	√
FR1	金鲳鱼	√	√	<i>Trachinotus ovatus</i> (99.84~100), <i>T. anak</i> (99.78)	√	√	
FR2	红鼓鱼	√	√	<i>Sciaenops ocellatus</i> (99.12~100)	√	√	√
FR3	金线鱼	√	√	<i>Nemipterus japonicus</i> (99.46~100)	√	√	√
FR4	秋刀鱼	√	√	<i>Cololabis saira</i> (99.78~100)	√	√	√
FR5	青占鱼	√	√	<i>Scomber australasicus</i> (99.88~100), <i>S. japonicus</i> (99.35), <i>S. colias</i> (98.49)	√	√	
FR6	刀鲳	√	√	<i>Mene maculate</i> (99.87~100)	√	√	√
FR7	虎头沙	√	√	<i>Odontobutis potamophila</i> (98.56~99.15)	√	√	√
FR8	白鲳鱼	√	√	<i>Pampus argenteus</i> (99.53~100), <i>Pechinogaster</i> (99.33~100)	√	√	
FR9	黄瓜鱼	√	√	<i>Larimichthys crocea</i> (99.89~100)	√	√	√
FR10	石斑鱼	√	√	<i>Epinephelus coioides</i> (99.69~100), <i>E. tauvina</i> (99.69~100), <i>E. awoara</i> (99.84)	√	√	
FR11	青鳉	√	√	<i>Conger japonicus</i> (99.53~99.84), <i>Muraenesox cinereus</i> (99.53~99.84)	√		
FR12	带鱼	√	√	<i>Trichiurus lepturus</i> (99.11~99.84), <i>T. gangeticus</i> (99.67~99.83), <i>T. japonicus</i> (99.69), <i>Trichiurus</i> sp. (98.13~98.14)	√	√	
FR13	海鲈鱼	√	√	<i>Lateolabrax japonicus</i> (99.35~100)	√	√	√
FR14	鲷鱼	√	√	<i>Scomberaustrolasicus</i> (98.9~100), <i>S. japonicus</i> (98.89~99.69), <i>S. colias</i> (98.88~99.06)	√	√	
FR15	金枪鱼	√	√	<i>Katsuwonus pelamis</i> (99.84~100), <i>Thunnus thynnus</i> (99.84)	√		
FR16	南极犬牙鱼	√	√	<i>Dissostichus mawsoni</i> (99.84~100)	√	√	√

转下页

接上页

FR17	巴沙鱼	√	√	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (99), <i>Pangasius bocourti</i> (99.84), <i>Pangasius krempfi</i> (99.84)	√		
FR18	鳕鱼	√	√	<i>Coryphaenoides acrolepis</i> (100), <i>Albatrossia pectoralis</i> (100), <i>Austroglossus pectoralis</i> (100), <i>C. longifilis</i> (99.21)	√		
FR19	南极冰鱼	√	√	<i>Patagonotothen ramsayi</i> (99.56), <i>P.guntheri</i> (99.24), <i>P.tessellata</i> (99.33), <i>P.wiltoni</i> (99.37)	√	√	
FR20	红石斑鱼	√	√	<i>Helicolenus avius</i> (99.12), <i>H.barathri</i> (99.39), <i>H.percoides</i> (99.58), <i>H.hilgendorfi</i> (99.25), <i>H.dactylopterus</i> (99.29)	√	√	
FR21	鲜鸡蛋鱼	√	√	<i>Planiliza haematocheila</i> (99.89~100)	√	√	√
TQ1	小黄鱼	√	√	<i>Larimichthys polyactis</i> (100)	√	√	√
TQ2		√	√		√	√	√
TQ3		√	√		√	√	√
TQ4	鮫鰈鱼	√	√	<i>Lophius litulon</i> (100)	√	√	√
TQ5		√	√		√	√	√
TQ6		√	√				
TQ7		√	√	<i>Liparis</i> sp. (97)			
TQ8	沙丁鱼	√	√				
TQ9		√	√	<i>Lepidotrigla microptera</i> (100), <i>L. grandis</i> (100), <i>L. spinose</i> (100), <i>L. papilio</i> (100)	√	√	
TQ10		√	√	<i>Polydactylus sextarius</i> (100)	√	√	√
TQ11	白姑鱼	√	√	<i>Johnius borneensis</i> (94)			
TQ12		√	√	<i>Pennahia argentata</i> (100)	√	√	√
TQ13		√	√	<i>Harpadonnehereus</i> (100)	√	√	√
TQ14		√	√	<i>Liparis</i> sp. (97)			
TQ15	马面鱼	√	√	<i>Theragra chalcogramma</i> (100), <i>T. finnmarkica</i> (100)	√	√	
TQ16		√	√	<i>Liparis</i> sp. (97)			
TQ17		√	√	<i>Theragra chalcogramma</i> (100), <i>T. finnmarkica</i> (100)	√	√	
TQ18		√	√	<i>Thamnaconus hypargyreus</i> (100), <i>T. tessellates</i> (100)	√		
TQ19		√	√	<i>Sillago</i> sp. (99)	√	√	
TQ20	马鲛	√	√	<i>Pampus</i> sp. (84)			
TQ21		√	√	<i>Sillago</i> sp. (99)	√	√	
TQ22		√	√	<i>Theragra chalcogramma</i> (100), <i>T. finnmarkica</i> (100)	√	√	

转下页

接上页

TQ23	√	√	<i>Harpadon nehereus</i> (100)	√	√	√
TQ24	√	√	<i>Rhynchoconger flavus</i> (95)			
TQ25	鳗鱼	√	<i>Ariosomashiroanago</i> (96)			
TQ26	√	√	<i>Muraenesox cinereus</i> (100)	√	√	√
TQ27	√	√	<i>Rhynchocongerectenurus</i> (100)	√	√	√
TQ28	√	√	<i>Harpadon nehereus</i> (100)	√	√	√
TQ29	金梭鱼	√		√	√	
TQ30	√	√	<i>Sillago sp.</i> (99)	√	√	
TQ31	√	√	<i>Liparis sp.</i> (97)			
TQ32	√	√		√	√	√
TQ33	√	√	<i>Okamejei hollandi</i> (100)	√	√	√
TQ34	鲷鱼	√		√	√	√
TQ35	√	√		√	√	√
TQ36	√	√	<i>Lophius litulon</i> (100)	√	√	√
TQ37	√	√		√	√	√
TQ38	√	√	<i>Theragra chalcogramma</i> (100), <i>T. finnmarchica</i> (100)	√	√	
TQ39	√	√	<i>Saurida wanieso</i> (100)	√	√	√
TQ40	NM*	√	<i>Liparis sp.</i> (97)			
TQ41	√	√	<i>Micropogonias furnieri</i> (100)	√	√	√
TQ42	√	√	<i>Takifugu oblongus</i> (100), <i>Lagocephalus gloveri</i> (100)	√		
TQ43	√	√	<i>Lophiomussetigerus</i> (100)	√	√	√
TQ44	√	√	<i>Larimichthys polyactis</i> (100)	√	√	√
TQ45	海水鱼	√				
TQ46	√	√	<i>Liparis sp.</i> (97)			
TQ47	√	√	<i>Lophius litulon</i> (100)	√	√	√

注: 编号 FS 均为新鲜鱼产品; 编号 FR 均为冷冻鱼产品; 编号 TQ 均为烤鱼片产品。NM*: 产品包装袋上未明确标注鱼类物种。

3 结论

3.1 本研究结果表明, BP 法和 TP 法均可获得高纯度的 DNA 模板, 用于普通 PCR 和荧光 PCR 扩增。相比较而言, TP 法通过长时间温浴, 获得的 DNA 浓度更高, 而 BP 法可在短时间裂解细胞, 加快 DNA 获取效率。针对鱼肉产品易腐败变质和 DNA 降解的特点, 加快 DNA 获取效率用于物种鉴定有一定应用价值。

3.2 采用 BP 法从 70 个市售鱼肉产品中提取 DNA 模板, 并扩增出 650 bp 的 *CO1* 基因条形码片段。通过鉴定发现, 81.43% 的产品可获得相似度 ≥ 98% 的物种, 在种水平和属水平的鉴定成功率分别为 48.57% 和 74.29%。

参考文献

- [1] Cline E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington state detected by DNA barcoding [J]. Food Research International, 2012, 45(1): 388-393
- [2] Xiong X, Lisa G, Alice G, et al. DNA barcoding reveals chaotic labeling and misrepresentation of cod (鳕, Xue) products sold on the Chinese market [J]. Food Control, 2016, 60: 519-532
- [3] Cocolin L, Apos D, Agaro E, et al. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (*Seabass*, *Seabream*, *Umbrine*, and *Dentex*) [J]. Journal of Food Science, 2010, 65(8): 1315-1317
- [4] Rocco L, Valentino I V, Scapigliati G, et al. RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax* [J]. Cytotechnology, 2013, 66(3): 383-393
- [5] Li L W, Peatman E, Kelly L, et al. Catfish species identification using lab-on-chip PCR-RFLP [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2014, 23(1): 2-13
- [6] Ward R, Zemlak T, Innes B, et al. DNA barcoding Australia's

- fish species [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857
- [7] De Walt, Edward R. DNA barcoding: A taxonomic point of view [J]. Journal of the North American Benthological Society, 2011, 30(1): 174-181
- [8] Yancy H F, Zemlak T S, Mason J A, et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(1): 210-217
- [9] Armani A, Castigliego L, Tinacci L, et al. Molecular characterization of icefish, (*Salangidae family*), using direct sequencing of mitochondrial *cytochrome b* gene [J]. Food Control, 2011, 22(6): 888-895
- [10] Druml B, Mayer W, Cichna-Markl M, et al. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration [J]. Food Chemistry, 2015, 178: 319-326
- [11] Loperabarrero N M, Povh J A, Ribeiro R P, et al. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: Modified salt (NaCl) extraction [J]. Ciencia E Investigación Agraria, 2008, 35(1): 77-86
- [12] 刘杨柳,武小芳,胡树样,等.蛋白酶K的性质及其在核酸提取中的应用[J].食品研究与开发,2017,38(10):196-199
- LIU Yang-liu, WU Xiao-fang, HU Shu-yang, et al. Properties of proteinase K and its application in nucleic acid extraction [J]. Food Research and Development, 2017, 38(10): 196-199
- [13] Andrea A, Lara T, Xiong X, et al. Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles [J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(4): 946-955
- [14] 张志敏,刘南君,牛静,等.煮沸裂解法快速提取大鲵 DNA[J].遵义医学院学报,2010,33(5):424-425
- ZHANG Zhi-min, LIU Nan-jun, NIU Jing, et al. Boiling lysis quickly separation of *Giant Salamander* DNA [J]. Acta Academiae Medicinae Zunyi, 2010, 33(5): 424-425
- [15] 刘甦苏,左琴,周舒雅,等.模式小鼠总 DNA 三种提取方法比较[J].中国比较医学杂志,2014,24(7):45-50
- LIU Su-su, ZUO Qin, ZHOU Shu-ya, et al. Comparison of three methods for total DNA extraction from mouse models [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2014, 24(7): 45-50
- [16] 张婀娜,魏政立,刘佳,等.不同方法提取基因组 DNA 的比较[J].解剖学研究,2017,39(6):479-482
- ZHANG E-nuo, WEI Zheng-li, LIU Jia, et al. Comparison of different methods for genomic DNA extraction [J]. Anatomy Research, 2017, 39(6): 479-482
- [17] Handy S M, Deeds J R, Ivanova N V, et al. A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance [J]. Journal of Aoac International, 2011, 94(1): 201-210
- [18] Leonardo R, Nunes R S C, Monteiro M L G, et al. Molecular testing on sardines and rulings on the authenticity and nutritional value of marketed fishes: An experience report in the state of Rio de Janeiro, Brazil [J]. Food Control, 2016, 60: 394-400
- [19] 童宇茹,蒋超,黄璐琦,等.基于 DNA 熔解曲线分析技术的三七粉分子鉴定[J].药物分析杂志,2014,34(8):1384-1390
- TONG Yu-ru, JIANG Chao, HUANG Lu-qi, et al. Molecular identification of *Radix notoginseng* powder by DNA melt curve analysis [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(8): 1384-1390
- [20] 张艳,王圣开.鱼肉蛋白质冷冻变性及抗冻剂的研究进展[J].肉类研究,2008,12:11-14
- ZHANG Yan, WANG Sheng-kai. Research progress of the fish protein frozen denaturation and cryoprotectants [J]. Meat Research, 2008, 12: 11-14
- [21] 吴燕燕,邱澄宇,李来好,等.草鱼加热过程中肌肉蛋白质的热变性[J].水产学报,2005,29(1):133-136
- WU Yan-yan, QIU Cheng-yu, LI Lai-hao, Denaturation of muscle protein in *Ctenopharyngodon idelhus* during heat processing [J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 133-136
- [22] Sahu S K, Thangaraj M, Kathiresan K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol [J]. Isrn Mol Biol, 2012: 1-6
- [23] Crowley T M, Muralitharan M S, Stevenson T W. Isolating conifer DNA: A superior polysaccharide elimination method [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(1): 97-97
- [24] Sampels, Sabine. The effects of storage and preservation technologies on the quality of fish products: A review [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2014, 39(6): 1206-1215