

大西洋三文鱼和虹鳟鱼 双重 PCR 检测方法的建立及应用

黄曼虹¹, 熊雄¹, 许文杰¹, 李壹¹, 操敏¹, 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: 为了实现大西洋三文鱼和虹鳟鱼的物种掺假快速检测, 本研究建立了一种基于双重 PCR (普通和荧光) 的物种鉴定方法。通过序列分析, 分别基于线粒体 CO I 和 Cyt b 基因设计大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性引物, 验证引物的特异性并对双重 PCR 反应体系进行优化, 建立大西洋三文鱼和虹鳟鱼的双重 PCR 快速鉴定方法。利用本研究设计的引物, 仅大西洋三文鱼和虹鳟鱼可以分别扩增出 108 bp 和 207 bp 的特异性条带, 而其他 23 种非目标物种均未有扩增条带。经验证, 在双重 PCR 反应体系中, 大西洋三文鱼和虹鳟鱼引物的最佳添加量分别为 0.1 和 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 溶解温度分别约为 81.5 $^{\circ}\text{C}$ 和 85 $^{\circ}\text{C}$ 。利用该方法从 29 份市售“三文鱼”样品中检测到 6 份大西洋三文鱼和 3 份虹鳟鱼, 且与 DNA 条形码比对结果一致。本研究建立的大西洋三文鱼和虹鳟鱼双重 PCR (普通和荧光) 鉴定方法具有良好的特异性和适用性, 为大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种鉴定提供了可靠的技术手段。

关键词: 大西洋三文鱼; 虹鳟鱼; 双重 PCR; 掺假; 物种鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)12-274-282

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0580

Development and Validation of a Duplex PCR for the Simultaneous Detection of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Processed Fish Products

HUANG Man-hong¹, XIONG Xiong¹, XU Wen-jie¹, LI Yi¹, CAO Min¹, 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: Anovel method for rapid identification of *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss* based on duplex PCR assay (conventional and fluorescent assays) was developed. Specifically, after sequence alignment, specific primers for *S. salar* and *O. mykiss* based on the CO I and Cyt b genes were designed and verified. The duplex PCR was optimized, and finally established. Only *S. salar* and *O. mykiss* amplified specific bands of 108 bp and 207 bp, while the other 23 non-target species were not successfully amplified. The optimal amount of primers for *S. salar* and *O. mykiss* were 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 0.4 $\mu\text{mol/L}$, and the melting temperature was 81.5 $^{\circ}\text{C}$ and 85 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Among the 29 commercial products, six products were identified as *S. salar* and three were identified as *O. mykiss*. Finally, theremaining 17 commercial samples were all tested as negative in the duplex PCR assay, and the results were consistent with DNA barcoding method. The results showed that the duplex PCR method for *S. salar* and *O. mykiss* was specific and feasible. This study provided reliable technical method and theoretical basis for the

引文格式:

黄曼虹,熊雄,许文杰,等.大西洋三文鱼和虹鳟鱼双重 PCR 检测方法的建立及应用[J].现代食品科技,2020,36(12):274-282

HUANG Man-hong, XIONG Xiong, XU Wen-jie, et al. Development and validation of a duplex PCR for the simultaneous detection of atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in processed fish products [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 274-282

收稿日期: 2020-06-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31701688)

作者简介: 黄曼虹 (1995-), 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

adulteration identification of *S. salar* and *O. mykiss* species.

Key words: *Salmo salar*; *Oncorhynchus mykiss*; duplex PCR; adulteration; species identification

鲑科 (Salmonidae), 隶属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲑形目 (Salmoniformes), 是世界上最主要的经济型鱼类之一。常见的鲑科鱼类品种有大西洋三文鱼 (*Salmo salar*)、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)、帝王鲑 (*O. tshawytscha*)、红鲑 (*O. nerka*)、狗鲑 (*O. keta*)、粉鲑 (*O. gorbuscha*) 和马苏鱼 (*O. masou*)。2018 年, 全球鲑科鱼类的总产量为 372 万吨, 其中海水养殖的大西洋三文鱼产量 243.9 万 t, 淡水养殖的虹鳟鱼产量 66.6 万 t^[1]。

大西洋三文鱼肉色橙红, 体内不饱和脂肪酸含量丰富, 肉质鲜美营养价值较高, 是最受消费者欢迎的鲑科鱼类品种之一。然而, 大西洋三文鱼较少以鲜活的形式进行出售, 比较多的是加工制成各种鱼肉制品, 包括切片后的生鲜冷冻生鱼片、罐头制品 (油浸和水浸)、肉松、肉干和烟熏制品等^[2]。由于加工破坏了其外形特征, 使得通过形态学的方法对大西洋三文鱼制品进行物种鉴别就变的比较困难。在这种情况下, 一些不良商家故意用价格低廉的物种冒充大西洋三文鱼, 以获取非法收益。其中最常见的一种行为就是通过向虹鳟鱼饲料中添加色素, 使原本为白色、青色的虹鳟鱼肉呈现出类似大西洋三文鱼肉的橘红色, 并以大西洋三文鱼的名义进行售卖^[3]。此外, 一些商家也利用目前我国关于三文鱼命名管理制度的漏洞, 将虹鳟鱼直接以“三文鱼”或“淡水三文鱼”的名义进入市场, 以代替大西洋三文鱼^[4]。

事实上, 大西洋三文鱼和虹鳟鱼在价格和食品安全等方面均存在较大差异。在我国, 虹鳟鱼的市场价大约为 30~50 元/斤, 而大西洋三文鱼的市场价大约为 80~100 元/斤。在美国, 由于大西洋三文鱼和虹鳟鱼巨大的价格差异, 物种替代所产生的非法收益一年可达 700 万美元^[5]。除了价格方面的差异, 由虹鳟鱼替代大西洋三文鱼而引起的食品安全风险, 也引起了人们的担忧, 包括生食假大西洋三文鱼 (实际为虹鳟鱼) 导致的寄生虫感染^[6]以及重金属中毒^[7]。为了保护消费者的权益并确保公众健康, 迫切需要建立一种快速可靠的方法实现对大西洋三文鱼和虹鳟鱼的准确鉴定。

基于 DNA 的检测技术具有灵敏度高、特异性好等优点, 已经被广泛运用于食品掺假检测^[3]。常见的方法有限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[8]、DNA 条形码 (DNA barcoding)^[9]、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[10]、数字 PCR (digital

PCR)^[11]等。其中, 多重 PCR 技术 (multiplex PCR) 可以在一个反应中实现对多个物种的同时鉴定, 不但保留了灵敏高效的优点, 而且可提高检测效率与检测通量, 已经在食品中动物源性成分鉴定、转基因检测和食源性致病菌检测中获得广泛运用^[12,13]。而且多重 PCR 技术还可以与 SYBR Green I 荧光 PCR 联用, 并通过熔解曲线实现多个品种的快速鉴定^[14]。

本研究基于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 和细胞色素 b (cytochrome b, Cyt b) 基因, 分别设计大西洋三文鱼和虹鳟鱼两个物种的特异性引物。通过体系优化, 建立了一种新的双重 PCR 技术 (普通和荧光) 鉴定大西洋三文鱼和虹鳟鱼。本研究的实施可以为大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种掺假检测提供可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品采集

24 种水产品标准品来自本课题组前期研究^[15,16], 包括 7 种鲑科品种: 大西洋三文鱼 *S. salar* (MN850430)、虹鳟鱼 *O. mykiss* (MN850431)、狗鲑 *O. keta* (MN850432)、马苏鱼 *O. masou* (MN850433)、红鲑 *O. nerka* (MN850434)、粉鲑 *O. gorbuscha* (MN850435)、帝王鲑 *O. tshawytscha* (MN850436) 和 17 种非鲑科品种: 狭鳕 *Gadus chalcogrammus* (MN850428)、黑线鳕 *Melanogrammus aeglefinus*、大眼金枪鱼 *Thunnus obesus*、鲈鱼 *Scomber scombrus* (MK843721)、地中海石斑鱼 *Epinephelus costae*、宝石石斑鱼 *E. areolatus*、日本绯鲤 *Upeneus japonicus*、红鲷鱼 *Mullus barbatus*、尼罗尖吻鲈 *Lates niloticus*、剑鱼 *Xiphias gladius*、鲚属 *Coilia* spp. (MK843666)、多指马鲛 *Polydactylus sextarius* (MN879570)、裸盖鱼 *Anoplopoma fimbria*、马舌鲷 *Reinhardtius hippoglossoides*、长鳍金枪鱼 *Thunnus alalunga*、虾蛄 *Squilla mantis*、黄鳍金枪鱼 *Thunnus albacares*。部分标准品的 CO I 条形码序列已提交至 GenBank, 并获得登录号 (已备注在对应物种的括号内)。

此外, 2019 年 4 月至 11 月从南京市本地超市、农贸市场和网上商城共采集 29 份以“三文鱼”命名的

鱼肉加工产品（干制品、冷冻制品，香肠制品，罐头制品）。所有样品抵达实验室后置于-20℃贮藏。

1.1.2 试剂

细胞/血液/组织基因组 DNA 提取试剂盒、100 bp DNA Ladder，天根生化科技有限公司；6×Loading Buffer，宝日医生物技术有限公司；琼脂糖凝胶，西班牙 Biowest 公司；引物合成、4S GelRed 核酸染料（10000×）、SGExcel Ultra SYBR 混合液（with low ROX）、2×Taq PCR Master Mix，生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪，艾本德国际贸易有限公司；1-14 小型台式离心机，上海希格玛高技术有限公司；LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪，

罗氏诊断产品有限公司；培清 JS-350 二用紫外仪，上海培清科技有限公司；JY300C 凝胶电泳仪、JY-SPFT 电泳槽，北京君意东方电泳设备有限公司；GWA-UNI-F40 纯水/超纯水器，北京普析通用仪器有限责任公司；MS-100 恒温混匀仪，杭州奥盛仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用细胞/血液/组织基因组 DNA 提取试剂盒，操作步骤按照试剂盒的说明书进行。采用 BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度，并稀释至 50 ng/μL，置于-20℃保存备用。

1.3.2 引物设计

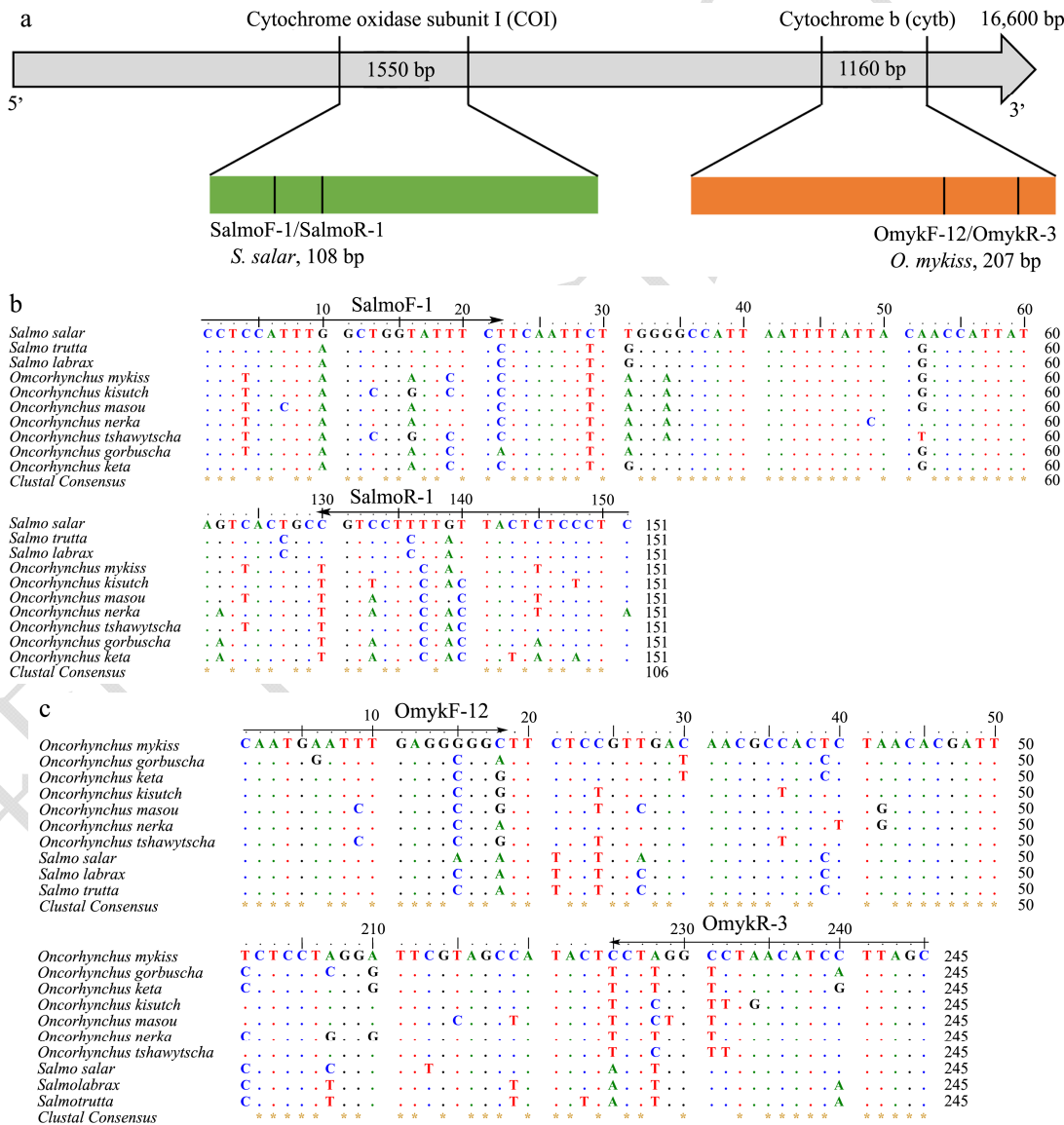


图1 线粒体 COI 和 Cyt b 基因中双重 PCR 引物的相对位置

Fig.1 Target regions of duplex PCR primers on mitochondrial CO I and Cyt b genes

表1 引物信息

Table 1 Information of the primer sets used in the present study

目标物种	基因	引物名称	序列 (5'-3')	Tm	片段长度	参考文献
<i>S. salar</i>	CO I	SalmoF-1	CCTCCATTTGGCTGGTATTTCT	55.0	108 bp	-
		SalmoR-1	GAGGGAGAGTAACAAAAGGACG	55.1		
<i>O. mykiss</i>	Cyt b	OmykF-12	CAATAAATTTGAGGGGGC	52.9	207 bp	-
		OmykR-3	GCTAAGGATGTTAGGCCTAGG	54.8		
通用引物	CO I	mlCOIntF	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	63.2~68.6	330 bp	[17]
		jgHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRARAAYCA	38~48		
-	-	M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT	-	-	[18]
		M13-R puc	CAGGAAACAGCTATGAC	-		

从 GenBank 下载鲑科鱼类的线粒体基因序列 (登录号为 AF133701, LC050735, DQ288270, KU872713, KR778842, KU761857, FJ435612, KJ769167, KU761863, KF985737)。通过序列比对分析, 采用 BioEdit 7.0.9 软件分别设计大西洋三文鱼 (*S. salar*) 和虹鳟鱼 (*O. mykiss*) 物种特异性引物。引物名称、序列、Tm 值与扩增片段大小见表 1。引物相对位置和多序列比对结果见图 1。

按照 1.3.4 的反应体系及优化的反应条件, 分别使用 1.1.1 采集的品种标准品的 DNA 对两套引物的特异性进行验证与比较。

1.3.3 单重 PCR 反应体系的建立

单重 PCR 扩增采用 20 μ L 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ M) 各 1 μ L, DNA 模板 50 ng, 加 ddH₂O 补足至 20 μ L。

对于大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性引物 (表 1), 其 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

对于 DNA 条形码通用引物 (表 1), 其 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 43 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

PCR 扩增完成后, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 挑选 DNA 条形码扩增成功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/index.php/IDS_OpenIdEngine) 比对分析, 根据序列相似度比较的结果 (相似度 $\geq 98\%$ ^[19]), 确认各样品的物种类别。

1.3.4 双重 PCR 反应体系的建立

以 *S. salar*, *O. mykiss*, *O. keta*, *O. masou*, *O. nerka*, *O. gorbuscha* 和 *O. tshawytscha* 提取的 DNA 为

模板, 进行双重 PCR 反应, 对引物终浓度配比进行优化, 以建立最佳的双重 PCR 方法。

双重普通 PCR 扩增采用 20 μ L 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L, 大西洋三文鱼上、下游引物 (10 μ mol/L) 与虹鳟鱼上、下游引物 (10 μ mol/L) 反应体系终浓度配比按照 2.2 双重 PCR 反应体系建立的结果, DNA 模板 50 ng, 加 dd H₂O 补足至 20 μ L。双重普通 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增完成后, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

双重荧光 PCR 扩增采用 20 μ L 反应体系: SGExcel Ultra SYBR 混合液 (with low ROX) 10 μ L, 大西洋三文鱼上、下游引物 (10 μ mol/L) 和虹鳟鱼上、下游引物 (10 μ mol/L) 反应体系终浓度配比按照 2.2 双重 PCR 反应体系建立的结果, DNA 模板 50 ng, 加 dd H₂O 补足至 20 μ L。双重荧光 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 40 个循环。在上述扩增结束后, 进行熔解曲线分析, 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。

2 结果与分析

2.1 引物设计与验证

一般而言, 线粒体基因组和核基因组均可以作为物种鉴定的目的基因。然而, 与核基因组相比, 线粒体基因组具有结构简单、序列和组成比较保守、母系遗传、无重组、单拷贝等特点^[20], 已经被广泛用于水产类物种鉴定, 包括鲑形目^[15]、鳕形目^[16]等多个不同族群的鱼类品种。本研究通过大量的序列比对分析, 分别基于 CO I 和 Cyt b 基因设计了大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种特异性引物 (表 1)。

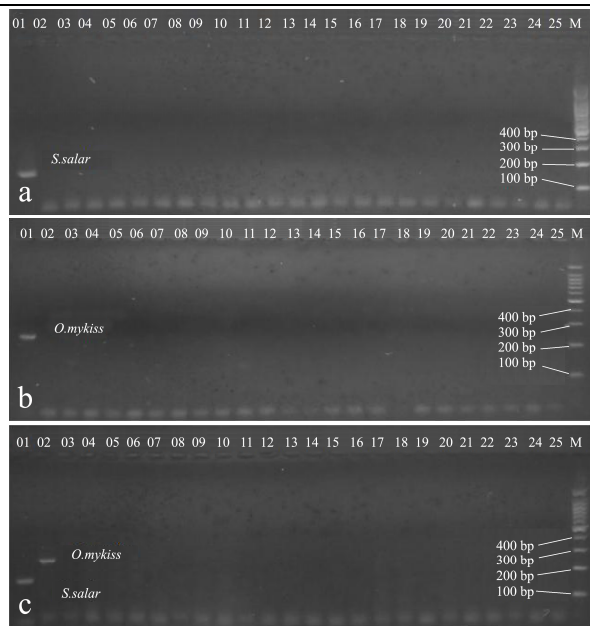


图2 引物的特异性试验

Fig.2 The specificity results of duplex PCR using two sets of primers

注: (a): 大西洋三文鱼引物特异性验证, (b): 虹鳟鱼引物特异性验证, (c): 双重PCR特异性验证; 1、2: *S. salar*、*O. mykiss*; (样本1均为每个图的阳性); 3: *O. keta*; 4: *O. masou*; 5: *O. nerka*; 6: *O. gorbuscha*; 7: *O. tshawytscha*; 8: *G. chalcogrammus*; 9: *M. aeglefinus*; 10: *T. obesus*; 11: *S. scombrus*; 12: *E. costae*; 13: *E. areolatus*; 14: *U. japonicas*; 15: *M. barbatus*; 16: *L. niloticus*; 17: *X. gladius*; 18: *Coilia* spp.; 19: *P. sextarius*; 20: *A. fimbria*; 21: *R. hippoglossoides*; 22: *T. alalunga*; 23: *S. mantis*; 24: *T. albacores*; 25: 空白对照; M: 100 bp DNA Ladder.

引物配对和熔解温度 (T_m) 是多重PCR体系建立的关键^[21]。特异性引物需与目标物种的碱基位点充分配对, 而非目标物种存在一定数量的碱基位点错配, 以减少非特异性扩增^[22]。各组引物 T_m 值相近则有利于多对引物在同一个反应体系下扩增对应的目标序列^[23]。本研究设计的2对引物, 均与目标物种序列完全配对。并且, 大西洋三文鱼特异性引物 SalmoF-1 和 SalmoR-1 与虹鳟鱼分别有5个和4个错配碱基; 虹鳟鱼特异性引物 OmykF-12 和 OmykR-3 与大西洋三文鱼均有2个错配碱基 (图1)。两对引物 T_m 值均约为 55.0 °C (表1), 表明两对引物在双重PCR体系中的最适退火温度相同, 有助于引物仅与目标物种DNA结合, 不与非目标物种DNA进行退火^[24]。

而且深加工过程中的高温、高压、反复冻融和酸碱变化均会导致DNA发生不同程度的降解^[25,26]。有研究发现, 在罐装沙丁鱼^[27]和鱼糜制品^[28]中, 由于DNA降解, 甚至检测不到长于250 bp的CO I和16S rRNA

基因片段。而本研究设计的大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性引物, 其扩增片段分别为108 bp和207 bp, 满足深加工食品中大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种鉴定要求。

为验证引物特异性, 本研究以7种鲑科鱼类以及17种非鲑科水产物种的DNA为模板, 分别利用大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性引物进行PCR扩增。结果表明, 只有大西洋三文鱼和虹鳟鱼DNA能分别扩增出108 bp (图2a) 和207 bp (图2b) 的特异性条带, 且均无非特异性杂带出现。而其他非目标物种及空白对照均未出现扩增, 说明本研究设计的引物分别对大西洋三文鱼和虹鳟鱼具有良好的特异性。

2.2 双重PCR反应体系建立

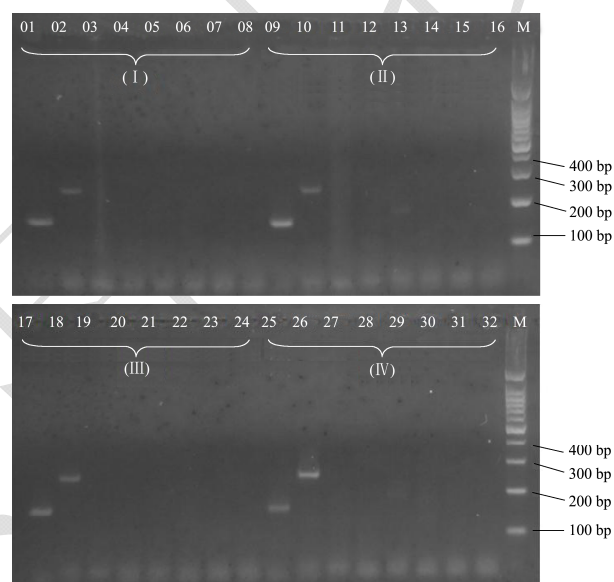


图3 双重普通PCR体系优化

Fig.3 Optimization of duplex conventional PCR assay

注: (I): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.5 μ L、0.5 μ L; (II): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.4 μ L、0.6 μ L; (III): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.3 μ L、0.7 μ L; (IV): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.2 μ L、0.8 μ L。01、09、17、25: *S. salar*; 02、10、18、26: *O. mykiss*; 03、11、19、27: *O. keta*; 04、12、20、28: *O. masou*; 05、13、21、29: *O. nerka*; 06、14、22、30: *O. gorbuscha*; 07、15、23、31: *O. tshawytscha*; 08、16、24、32: 空白对照; M: 100 bp DNA Ladder.

为建立最佳双重PCR反应体系, 对引物反应体系终浓度配比进行优化。设置(I)、(II)、(III)、(IV)四组实验进行优化对比。其中(I)组大西洋三文鱼引物(10 μ mol/L)和虹鳟鱼引物(10 μ mol/L)各加0.5 μ L; (II)组各加0.4 μ L和0.6 μ L; (III)组各加0.3 μ L和0.7 μ L; (IV)各加0.2 μ L和0.8 μ L。在普通PCR中, (I)、(II)和(III)扩增的虹鳟鱼特异性条带均较浅,

而(IV)扩增的大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性条带均较清晰(图3)。在荧光PCR中,由(I)、(II)和(III)中虹鳟鱼的熔解曲线可知,虹鳟鱼的扩增效率较低,而(IV)中大西洋三文鱼和虹鳟鱼的扩增效率均较高(图4)。因此本研究确定(IV)为最佳引物浓度配比。

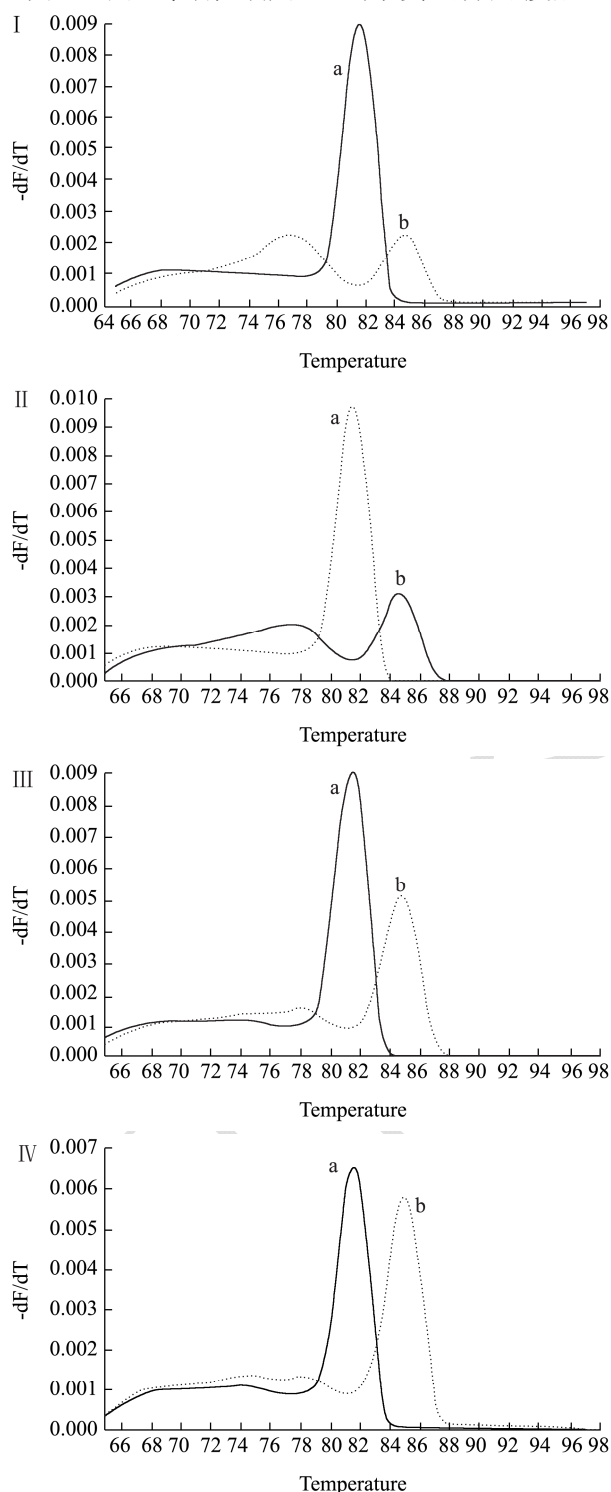


图4 双重荧光PCR体系优化

Fig.4 Optimization of duplex real-time PCR assay

注: (I): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别

为0.5 μ L、0.5 μ L; (II): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.4 μ L、0.6 μ L; (III): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.3 μ L、0.7 μ L; (IV): 大西洋三文鱼引物和虹鳟鱼引物的添加量分别为0.2 μ L、0.8 μ L。a: 大西洋三文鱼溶解曲线; b: 虹鳟鱼溶解曲线。

优化后的双重普通PCR扩增反应体系如下: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L, 大西洋三文鱼上、下游引物(10 μ mol/L)各0.2 μ L, 虹鳟鱼上、下游引物(10 μ mol/L) 0.8 μ L, DNA模板50 ng, 加dd H₂O补足至20 μ L。优化后的双重荧光PCR扩增反应体系如下: SGExcel Ultra SYBR 混合液(with low ROX) 10 μ L, 大西洋三文鱼上、下游引物(10 μ mol/L)各0.2 μ L, 虹鳟鱼上、下游引物(10 μ mol/L) 0.8 μ L, DNA模板50 ng, 加dd H₂O补足至20 μ L。

由图2c可见, 优化后的双重PCR可同时扩增出大西洋三文鱼和虹鳟鱼特异性条带, 且两个目标条带清晰, 位置和相应的大西洋三文鱼阳性对照组以及虹鳟鱼阳性对照组一致。其余泳道均未产生条带, 表明优化后的双重PCR体系具有良好的特异性。

2.3 市售样品验证

利用本研究建立的双重PCR方法对采集到的29份以“三文鱼”命名的鱼肉加工产品(干制品、冷冻制品、香肠制品和罐头制品)进行物种鉴定(表2)。结果表明, 6个样品(编号S1、S2、S3、S4、S5和S28)可以扩增出108 bp目标片段, 鉴定结果为大西洋三文鱼; 3个样品(编号S15、S16和S29)可以扩增出207 bp目标片段, 鉴定结果为虹鳟鱼(图5)。

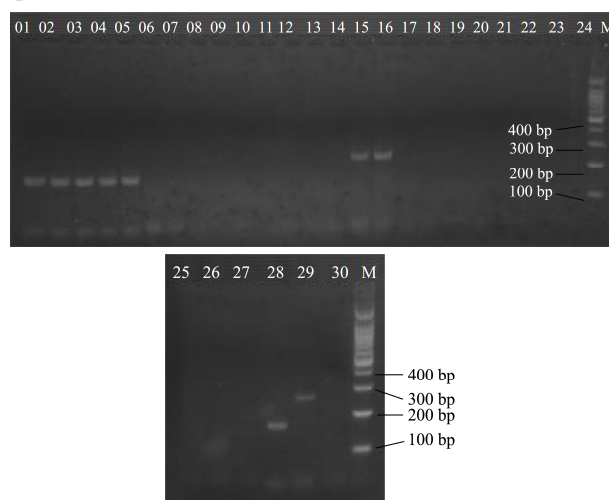


图5 双重PCR鉴定市售样品

Fig.5 Application on commercial samples

注: 1~29: 对应为S1~S29号样品; 30: 空白对照; M: 100 bp DNA Ladder。

表2 市售样品的采集与鉴定结果

Table 2 Commercial samples information and molecular identification

样品编号	价格/(元/kg)	加工方式	产地	双重 PCR	DNA 条形码, BOLD (相似度≥98%)
S1	45	干制品	中国	<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S2	45			<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S3	45			<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S4	45			<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S5	45			<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S6	80	香肠制品	中国	-	<i>O. gorbuscha</i>
S7	80			-	<i>O. gorbuscha</i>
S8	80			-	<i>O. gorbuscha</i>
S9	470	干制品	中国	-	<i>M. cephalus</i>
S10	470			-	<i>M. cephalus</i>
S11	470			-	<i>M. cephalus</i>
S12	360			-	<i>O. keta</i>
S13	360			-	<i>O. keta</i>
S14	69	冷冻制品	中国	-	<i>O. masou</i>
S15	66			<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>
S16	66			<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>
S17	39	冷冻制品	中国	-	<i>O. gorbuscha</i>
S18	39			-	<i>O. gorbuscha</i>
S19	82	罐头制品	俄罗斯	-	<i>O. gorbuscha</i>
S20	82			-	<i>O. gorbuscha</i>
S21	82			-	<i>O. keta</i>
S22	82			-	<i>O. keta</i>
S23	282			-	<i>O. tshawytscha</i>
S24	282	冷冻制品	新西兰	-	<i>O. tshawytscha</i>
S25	282			-	<i>O. tshawytscha</i>
S26	282			-	<i>O. tshawytscha</i>
S27	1909	干制品	日本	-	<i>O. nerka</i>
S28	370	冷冻制品	挪威	<i>S. salar</i>	<i>S. salar</i>
S29	96	冷冻制品	中国	<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>

双重荧光 PCR 鉴定结果如图 6。S1、S2、S3、S4、S5 和 S28 的 T_m 值约为 81.5 °C，与大西洋三文鱼阳性对照的 T_m 值相近。S15、S16 和 S29 的 T_m 值约为 85 °C，与虹鳟鱼阳性对照的 T_m 值相近。且大西洋三文鱼和虹鳟鱼 T_m 值相差较大，可以根据 T_m 值准确区分大西洋三文鱼和虹鳟鱼。而其他 20 个非目标物种的市售样品无 T_m 值，表明均未成功扩增。综上所述，双重荧光 PCR 与双重普通 PCR 鉴定市售样品结果一致。

为确保结果的准确性，参照 Günther 等^[17]的方法对采集的 29 种市售样品进行 DNA 条形码鉴定，所用通用引物序列见表 1。DNA 条形码技术鉴定市售样品结果如表 2 所示，6 个样本（编号 S1、S2、S3、S4、

S5 和 S28）的物种鉴定结果为大西洋三文鱼，3 个样本（编号 S15、S16 和 S29）的物种鉴定结果为虹鳟鱼，3 个样本（编号 S9、S10 和 S11）的物种鉴定结果为鲢鱼（*Mugil cephalus*），其余 17 个样本均为非目标物种的鲑科其他鱼类。DNA 条形码技术鉴定结果与双重 PCR 鉴定结果一致（表 2）。

本研究以“三文鱼”命名的鱼肉加工产品为标准进行市售样品采样，鉴定结果显示有 3 份样本（S9、S10 和 S11）为非鲑科鱼类。这些样本鉴定结果为鲢鱼（*Mugil cephalus*），属于鲢形目（Mugiliformes）鲢科（Mugilidae）鲢属（*Mugil*）。鲢鱼主要分布在温带和热带水域，是我国南方沿海咸淡水养殖的最主要经济鱼类之一，也是世界上分布最广的重要经济鱼类之一。

[29]。其鱼卵在许多国家都非常受欢迎,而其鱼肉因为肉质粗糙、有土腥味,在市场上并不受欢迎[30]。2018年的数据显示,新鲜鲱鱼价格为5元/斤,远低于鲑科鱼类。因此可推测,不良商贩为获得非法利润将鲱鱼掺假为鲑科鱼类,这不仅损害消费者的经济利益[31],也给食品安全带来巨大的风险隐患[7]。因此,建立大西洋三文鱼和虹鳟鱼的鉴定技术显得尤为重要。

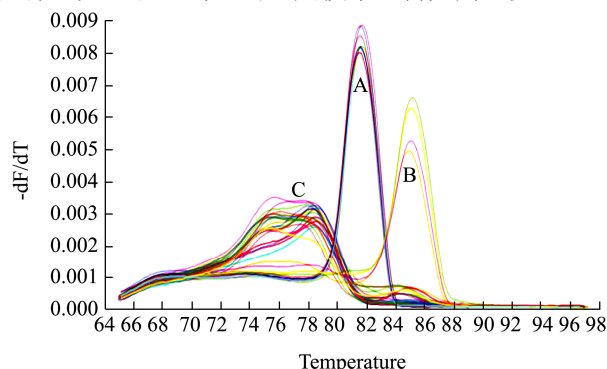


图6 双重荧光PCR鉴定大西洋三文鱼和虹鳟鱼

Fig.6 Duplex real-time PCR detection of *S. salar* and *O. mykiss*

注: A: S1、S2、S3、S4、S5、S28、大西洋三文鱼阳性对照; B: S15、S16、S29、虹鳟鱼阳性对照; C: S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13、S14、S17、S18、S19、S20、S21、S22、S23、S24、S25、S26、S27。

3 结论

本研究分别基于CO I和Cyt b基因设计大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种特异性引物,验证结果显示,只有大西洋三文鱼和虹鳟鱼DNA能分别扩增出108 bp和207 bp的特异性条带,说明本研究设计的引物对大西洋三文鱼和虹鳟鱼具有良好的特异性。为建立最佳双重PCR反应体系,本研究对引物反应体系终浓度配比进行优化,通过对目标条带清晰度的对比,得出大西洋三文鱼和虹鳟鱼引物的最佳浓度分别为0.1 μmol/L和0.4 μmol/L。通过DNA条形码鉴定方法和本研究建立的鉴定方法,对采集的29种市售样品进行方法比对。结果显示DNA条形码技术鉴定结果与本研究建立的方法鉴定结果一致。表明本研究建立的大西洋三文鱼和虹鳟鱼双重PCR(普通和荧光)方法具有较高的准确性,为大西洋三文鱼和虹鳟鱼物种鉴别、掺假检测提供可靠的技术手段。

参考文献

[1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture [EB/OL]. Food and Agriculture Organization, 2018. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>

[2] Ortiz J, Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, et al. Influence of

air-drying temperature on drying kinetics, colour, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 162-169

[3] 赵紫霞,徐桂彩,李炯棠,等.用于鉴别大西洋鲑和虹鳟的生物传感检测方法[J].生物技术通报,2017,33(6):54-61

ZHAO Zi-xia, XU Gui-cai, LI Jiong-tang, et al. Electrochemical bio-sensing method for identification of Atlantic salmon and rainbow trout [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(6): 54-61

[4] 丁清龙,曾晓琼,周露,等.三文鱼水产品掺假情况调查[J].食品安全质量检测学报,2019,10(13):4080-4085

DING Qing-long, ZENG Xiao-cong, ZHOU Lu, et al. Investigation of salmon adulteration [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(13): 4080-4085

[5] 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

[6] Skov J, Mehrdana F, Marana M H, et al. Parasite infections of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Danish mariculture [J]. Aquaculture, 2014, 434: 486-492

[7] Jiang H, Qin D, Mou Z, et al. Trace elements in farmed fish (*Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Oncorhynchus mykiss*) from Beijing: implication from feed [J]. Food Addit Contam Part B Surveill, 2016, 9(2): 132-141

[8] 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

[9] Horreo J L, Fitze P S, Jiménez-Valverde A, et al. Amplification of 16S rDNA reveals important fish mislabeling in Madrid restaurants [J]. Food Control, 2019, 96: 146-150

[10] Ma C, Wang Y, Zhang P, et al. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction [J]. Analytical Biochemistry, 2017, 530: 1-4

[11] Ren J, Deng T, Huang W, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. Plos one, 2017, 12(3): e173567

[12] Chen F, Knutson T P, Braun E, et al. Semi-quantitative duplex RT-PCR reveals the low occurrence of porcine pegivirus and atypical porcine pestivirus in diagnostic samples from the United States [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(3): 1420-1425

[13] 杜利强,章晶晶,张涛,等.狐狸和貉子动物源性成分双重PCR鉴别[J].食品科学,2017,38(8):303-307

- DU Li-qiang, ZHANG Jing-jing, ZHANG Tao, et al. Duplex PCR distinction of food ingredients derived from *Alopex lagopus* and *Nyctereutes procyonoides* [J]. Food Science, 2017, 38(8): 303-307
- [14] Armani A, Castiglio L, Tinacci L, et al. Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products [J]. Food Chemistry, 2012, 133(1): 184-192
- [15] Xiong X, Huang M, Yuan F, et al. Development and validation of a fast DNA extraction protocol for fish products [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(9): 1998-2008
- [16] Xiong X, Yao L, Ying X, et al. Multiple fish species identified from China's roasted "Xue Yu" fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability [J]. Food Control, 2018, 88: 123-130
- [17] Günther B, Raupach M J, Kneibelsberger T. Full-length and mini-length DNA barcoding for the identification of seafood commercially traded in Germany [J]. Food Control, 2017, 73: 922-929
- [18] Messing J. Life cycle of M13 and Use in cloning [J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 20-78
- [19] Barbuto M, Galimberti A, Ferri E, et al. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of "palombo" (*Mustelus* spp.) [J]. Food Research International, 2010, 43(1): 376-381
- [20] Cf S, Frati F, Beckenbach A T, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651-701
- [21] Hossain M A M, Ali M E, Hamid S B A, et al. Tetraplex PCR assay involving double gene-sites discriminates beef and buffalo in Malaysian meat curry and burger products [J]. Food Chemistry, 2017, 224: 97-104
- [22] Wu J, Hong P, Liu W. Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(3): 267-275
- [23] Parchami Nejad F, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M, et al. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages [J]. European Food Research & Technology, 2014, 239(3): 533-541
- [24] Ali M E, Razzak M A, Hamid S B A, et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [J]. Food Chemistry, 2015, 177(jun.15): 214-224
- [25] Kharazmi M, Bauer T, Hammes W P, et al. Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis* [J]. Syst Appl Microbiol, 2003, 26(4): 495-501
- [26] Gryson N, Messens K, Dewettinck K. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits, extraction of DNA as a first step in GMO analysis [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(11): 1357-1363
- [27] Xiong X, Yuan F, Huang M, et al. Exploring the possible reasons for fish fraud in China based on results from monitoring sardine products sold on Chinese markets using DNA barcoding and real time PCR [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020, 37(2): 193-204
- [28] Armani A, Tinacci L, Xiong X, et al. Fish species identification in canned pet food by BLAST and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) [J]. Food Control, 2015, 50: 821-830
- [29] 李来好,陈培基,杨贤庆,等. 鲮鱼营养成分的研究[J]. 营养学报, 2001(1): 91-93
- LI Lai-hao, CHEN Pei-ji, YANG Xian-qing, et al. Studies on nutritional components of *Mugil cephalus* [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2001(1): 91-93
- [30] Caredda M, Addis M, Pes M, et al. Physico-chemical, colorimetric, rheological parameters and chemometric discrimination of the origin of *Mugil cephalus* roes during the manufacturing process of Bottarga [J]. Food Research International, 2018, 108: 128-135
- [31] Cawthorn D, Steinman H A, Witthuhn R C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market [J]. Food Research International, 2012, 46(1): 30-40