

Taqman 探针荧光 PCR 检测鲨鱼源性成分

陈 轩, 廖秀云, 陶 旻, 罗宝正*, 薄清如,
沙才华, 黄海超, 徐海聂, 杨 素

(珠海出入境检验检疫局 国家外来病检测重点实验室, 广东 珠海 519015)

摘要: 针对鲨鱼产品掺杂造假增多而缺乏有效鉴定技术的情况, 作者根据 GenBank 中鲨鱼基因的线粒体 DNA(mtDNA) 序列, 使用分子生物学软件 Primer Express 2.0 设计了一套特异性引物和探针, 用来建立 Taqman 探针荧光 PCR 检测鲨鱼源性成分的方法。结果表明, 对 13 份已鉴定为鲨鱼鱼翅的样品进行检测, 全部出现特异性扩增曲线, 阴性对照没有荧光增长。方法特异性强, 对市场购买的 12 份鲨鱼源性样品及 9 份其他鱼类样品进行检测, 12 份鲨鱼样品均出现荧光扩增曲线, 而非鲨鱼样品均未出现荧光增长; 方法灵敏度较高, 可检测到的最低质粒拷贝数量级为 10 拷贝/ μL ; 方法快速准确, 操作简便, 重复性好, 稳定可靠, 可应用于市场上鱼翅等常见鲨鱼源性产品的真假鉴定。

关键词: 鲨鱼源性成分; Taqman 探针; 荧光 PCR; 检测

中图分类号: TS 254.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)10—1083—06

Detection of Shark Derived Materials by Taqman Probe Fluorescent PCR

CHEN Xuan, LIAO Xiuyun, TAO Min, LUO Baozheng*, BO Qingru,
SHA Caihua, HUANG Haichao, XU Hainie, YANG Su

(State Key Quarantine Laboratory of Exotic Animal Disease, Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: As the problem of adulteration of shark products worsens and the effective detection method lacks, this study designed a set of primers and probe based on the mitochondria DNA sequences of shark published in GenBank using the software of Primer Express 2.0, so as to establish a method of Taqman probe fluorescent PCR for the detection of shark derived materials. Results showed that 13 samples that had been identified as shark fins all displayed the amplified curves. The specificity of this method was good with all of 12 shark derived samples indicating the existence of shark DNA and with no amplification curves for the other 9 samples not derived from shark species. The detection is sensitive and the minimum detectable plasmid copy number was 10 copies/ μL . It is

收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 珠海出入境检验检疫局资助项目(ZH2013-2)。

作者简介: 陈 轩(1983—), 男, 广东梅州人, 理学硕士, 高级兽医师, 主要从事动物检验检疫与分子生物学检测研究。

E-mail: 65561977@qq.com

* 通信作者: 罗宝正(1975—), 男, 山东莱西人, 理学博士, 研究员, 主要从事动物传染病分子诊断研究。E-mail: bzluo@163.com

also rapid and simple and the results have good repeatability and stability. Therefore, the method can be applied to the identification of shark derived products in marketplaces, such as fins.

Keywords: shark derived material, Taqman probe, fluorescent PCR, detection

鲨鱼隶属于软骨鱼纲、板鳃亚纲、鲨总目, 大约包括 8 目 35 科 465 多种^[1], 是位于海洋食物链顶层的重要鱼类。以鲨鱼为原料的加工产品包括鱼翅、鲨鱼硫酸软骨素、鲨鱼肝油、鲨鱼肉等, 均具备一定的药用、保健或营养价值^[2,5]。近年来, 由于鲨鱼产品消费趋热, 鲨鱼的捕杀量常年在较高水平 ($73 \sim 80 \times 10^4$ t/year, 数据来源: FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics, 2012)。在巨额经济利益的驱使下, 鲨鱼产品掺杂造假的情况时有发生, 尤其是鱼翅类产品造假更是屡见不鲜。目前对鲨鱼产品的研究主要集中在鲨鱼产品功能成分的提纯和生物活性研究^[2-4]、鲨鱼产品对疾病的治疗和保健机理^[5-10]、鲨鱼种属鉴定^[11-12]等方面, 而对鲨鱼产品市场所急需的鲨鱼总类成分检测与鉴定技术 (非鉴定到种) 的研究还较为少见, 仅见郭云霞等报道了针对鲨鱼源性成分建立了 PCR 鉴别方法和 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法^[13-14]。为维护正常市场秩序和消费者合法权益, 迫切需要开发出特异性强、灵敏度高、快速准确的鲨鱼源性成分检测鉴定方法。作者利用荧光 PCR 特异性强、快速灵敏、简便而不易污染等特点建立了基于 Taqman 探针的荧光 PCR 检测鲨鱼源性成分的方法。

1 材料与方法

1.1 样品

13 份鱼翅样品为本实验室留存样品, 另外 12 份鲨鱼源性样品 (包括 4 份新鲜鲨鱼和 8 份鱼翅样

品) 及 9 份其他鱼类样品 (包括美洲鳗 2 份、日本鳗 2 份、龙头鱼 1 份、罗非鱼 1 份、池鱼 1 份、马鲛鱼 1 份、鲮鱼 1 份) 均购自珠海海鲜及干货市场。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒: E.Z.N.A.™ Tissue DNA Kit, 美国 OMEGA 公司产品; TIANGEN Taq PCR Mastermix: 天根生化科技 (北京) 有限公司产品; DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pMD 18-T、DNA Marker DL 2000: 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 主要仪器

Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System: 美国 ABI 公司产品; Alpha Imager HP 凝胶成像分析系统: 美国 Alpha Innotech 公司产品; Sigma 3 - 18 K 小型高速冰冻台式离心机: 德国 Sartorius 公司产品; NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer 紫外分光光度计: 美国 NanoDrop Technologies 公司产品。

1.4 普通 PCR 引物及荧光 PCR 引物、探针的设计和合成

根据 GenBank 中公布的鲨鱼线粒体 DNA (mtDNA) 序列, 利用生物学软件 Clustal X 比对后在高度保守区域用 Primer Express 2.0 分别设计了一对普通 PCR 引物和一套荧光 PCR 引物、探针, 由上海辉睿生物科技有限公司合成。引物、探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and probe

引物/探针		序列	产物片段大小
PCR	F-primer	5'-GTGGCAATTAAYCGTTGACTATTTTCTAC-3'	310 bp
	R-primer	5'-AGTCARAARCTTATRTTATTTATTCG-3'	
荧光 PCR	F-primer	5'-ACCTGTGGCAATTAAYCGTTGA-3'	84 bp
	R-primer	5'-CTATWCCTGCTCATGCACCAAA-3'	
	probe	5'-FAM-TTTTCTACHAACCACAAAGA TATYGGCACCCT-BHQ1-3'	

1.5 鱼翅样品的普通 PCR 扩增及种属鉴定

按照 DNA 提取试剂盒说明书提取样品 DNA。以 13 份鱼翅样品 DNA 为模板进行普通 PCR,并对 PCR 产物进行克隆测序。PCR 反应体系为 25 μL : 2 $\times$ Taq PCR Master mix 12.5 μL , 100 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1.0 μL , DNA 模版 2.0 μL , 补水至 25 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。扩增结束后于质量浓度 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,并将 PCR 产物测序比对,确定其种属来源。

1.6 荧光 PCR 检测鲨鱼源性成分方法的建立

以 13 份鱼翅样品 DNA 为模板进行荧光 PCR 扩增。反应体系为 25 μL : 2 $\times$ Taq PCR Master mix 12.5 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ Taqman 探针 1.0 μL , DNA 模版 5.0 μL , 补水至 25 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s (收集荧光信号), 40 个循环。

1.7 荧光 PCR 方法特异性试验

以市场购买的 12 份鲨鱼源性样品和 9 份其他鱼类样品中提取的 DNA 为模板,使用上述反应体系和条件进行荧光 PCR 扩增,验证所建立的荧光 PCR 方法的特异性。

1.8 荧光 PCR 方法灵敏度试验

将荧光 PCR 产物电泳检测后的目的条带割胶回收,进行克隆、测序鉴定,并以此重组质粒作为阳性标准品。将重组质粒用紫外分光光度计测定质粒浓度,根据阿伏伽德罗常数换算成目的基因的拷贝数。提取阳性克隆质粒,测定浓度后,以 10 倍梯度稀释到 10^{-10} ,对梯度稀释的样本进行荧光 PCR 检测。

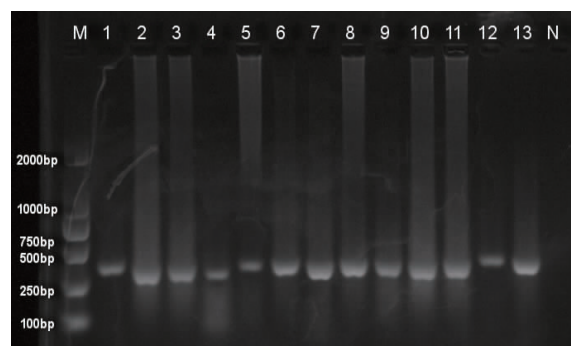
1.9 稳定性试验

以鲨鱼阳性对照为模板,使用本试验建立的方法在两个时间段各做 20 次重复,通过计算 C_t 值的变异系数验证批内及批间稳定性。

2 结果与分析

2.1 鱼翅样品的普通 PCR 扩增及种属鉴定结果

13 份鱼翅样品均被成功进行 PCR 扩增,产物大小约为 310 bp,与预期符合(见图 1)。PCR 产物经克隆测序,在 GenBank 中比对,确认此 13 份鱼翅样品均为鲨鱼源性,分别来自大青鲨(4 份)、犁鳍柠檬鲨(2 份)、黑吻真鲨、太平洋鼠鲨、锤头双髻鲨、浅海长尾鲨、澳洲斜锯牙鲨、白边真鲨和镰状真鲨。



M: DNA Marker DL2000, 1~13 为鱼翅样品, N 为阴性对照。

图 1 13 份鱼翅样品 PCR 结果

Fig. 1 PCR Results for 13 samples of shark's fin

2.2 荧光 PCR 检测鲨鱼源性成分方法的建立

对已确认为鲨鱼翅的 13 份样品均成功进行了扩增,出现了典型的 S 型扩增曲线,阴性对照未见荧光增长(见图 2)。反应时间较普通 PCR 大大缩短。

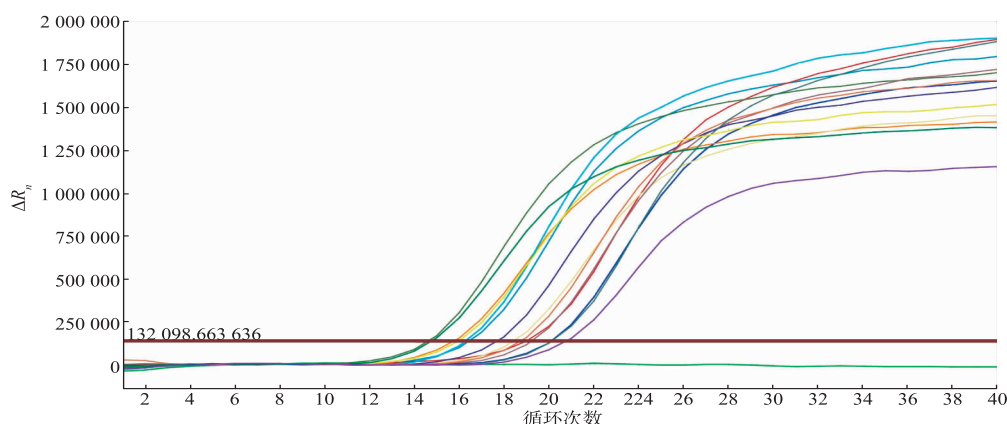


图 2 13 份鱼翅样品的荧光 PCR 结果

Fig. 2 Fluorescent PCR results for 13 samples of shark's fin

2.3 荧光 PCR 方法特异性试验

所建立的方法对市场购买的 12 份鲨鱼源性样品(4 份新鲜鲨鱼和 8 份鱼翅样品)可以进行特异性扩增,而属于其他种属鱼类的 9 份样品均未见荧光增长(见图 3)。

2.4 荧光 PCR 方法灵敏度试验

将 8 个浓度梯度的阳性对照进行荧光 PCR 反应,可检测到的最低质粒拷贝数为 10 拷贝/ μL 的数量级(见图 4),即为该检测方法的灵敏度。

2.5 稳定性试验

对两次试验所获得的 Ct 值用统计学软件 SPSS

13.0 分析,批内变异系数分别为 1.10%和 1.22%,批间变异系数为 1.32%,说明 20 次批内重复和 2 次批间重复试验结果符合性较好,方法稳定(图 5)。

3 结 语

在现有检测鲨鱼源性成分的方法中,PCR 方法具有较高的特异性和灵敏性^[3],但需要电泳检测,结果判读不如实时荧光 PCR 方便快捷,并且开盖检测存在污染的风险。SYBR Green 实时荧光 PCR 方法与普通 PCR 方法相比具有更高的灵敏度^[4],但是由于 SYBR Green 荧光染料不仅能与靶基因的扩增产

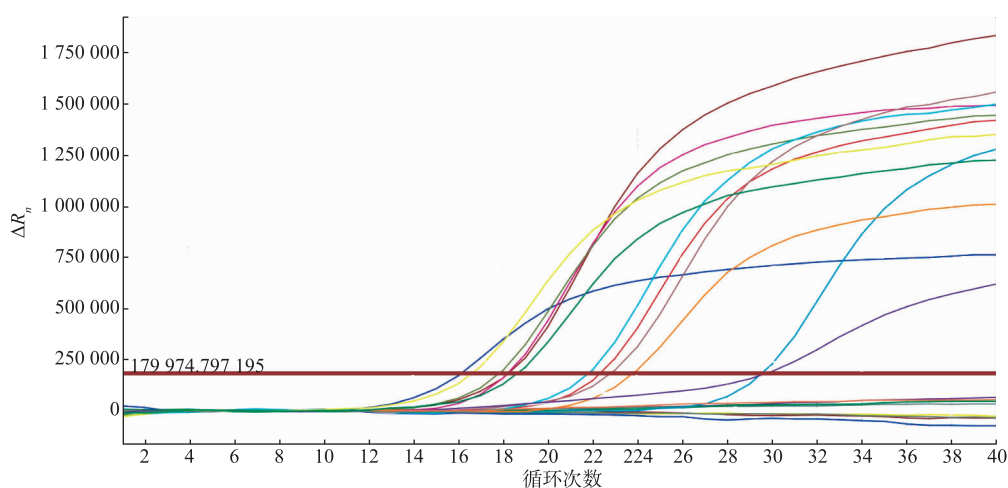
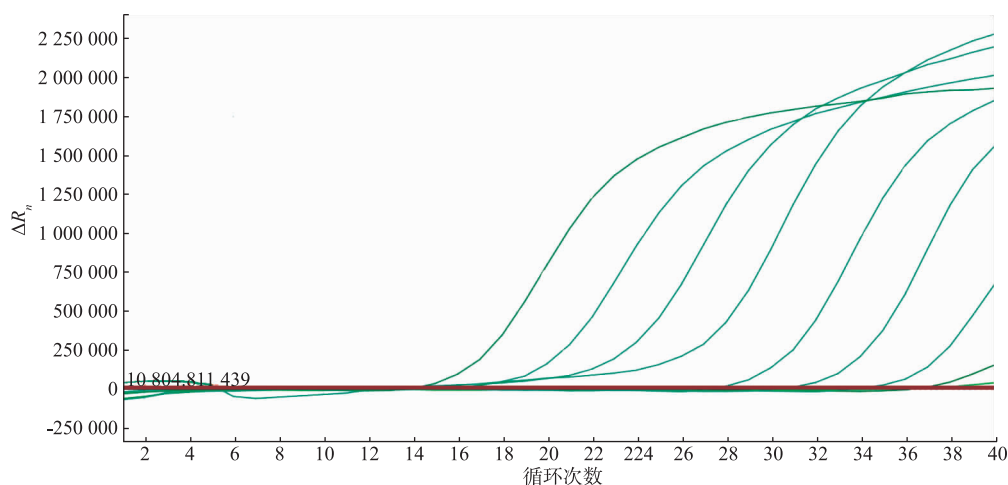


图 3 荧光 PCR 方法特异性试验

Fig. 3 Specificity test for the method of fluorescent PCR



自左向右扩增曲线分别为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝/ μL 浓度质粒的扩增结果。

图 4 荧光 PCR 方法灵敏度试验

Fig. 4 Sensibility test for the method of fluorescent PCR

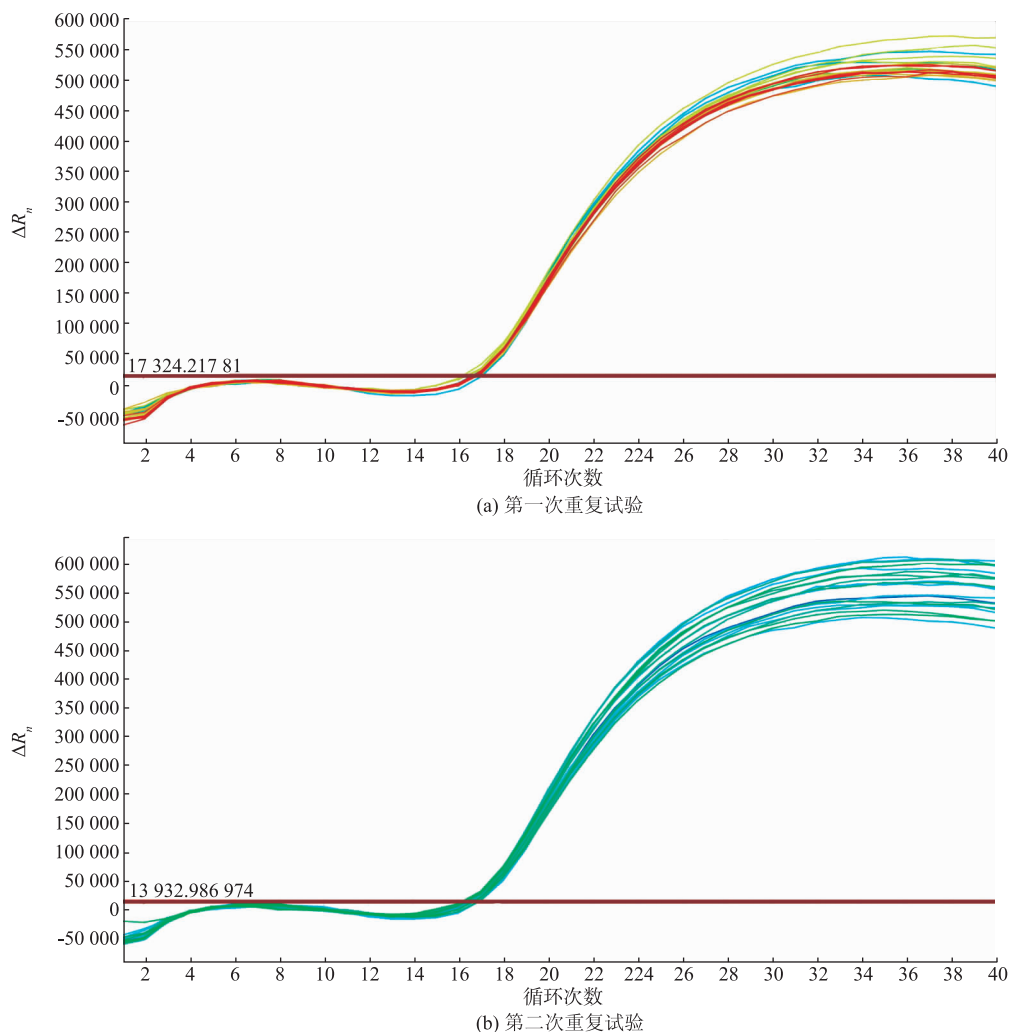


图 5 荧光 RT-PCR 重复性和稳定性试验

Fig. 5 Repeatability and stability test for the method of fluorescent PCR

物结合,也可以与非特异性 PCR 产物结合,理论上存在假阳性的可能。TaqMan 探针荧光 PCR 方法除了需一对特异性引物,还增加了一条与模版互补的特异性探针,探针上 5' 端和 3' 端分别标记了报告荧光基团和淬灭荧光基团,每进行一个特异性扩增循环释放一个分子的荧光染料,非特异性产物对检测信号没有影响。因此,与 SYBR Green 荧光 PCR 方法相比,Taqman 探针荧光 PCR 方法具有更高的特异性^[15],但其对探针的设计要求较高,需要由试验验证。作者根据 GenBank 中公布的鲨鱼线粒体 DNA

(mtDNA) 序列,在其高度保守区域设计了一对特异性引物和探针,实验结果表明该引物和探针的特异性较好,对鲨鱼样品均能进行特异性扩增,并且灵敏度较高,能检测到的最低质粒拷贝数量级为 10 拷贝/ μL 。

本方法可应用于市场上常见的鲨鱼产品的真假鉴定,如干鱼翅、泡发鱼翅、鲨鱼肉、鲨鱼硫酸软骨素初级加工品等。但对于部分深加工产品,如鲨鱼肝油等,由于经过较为复杂的加工过程,其 DNA 有可能被破坏或降解,应用可能受到一定的限制。

参考文献:

- [1] Compagno, L. J. V. FAO species catalogue. Vol.4. Sharks of the world. Annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. FAO Fisheries Synopsis. (125)4, Pt. 1984, 2:251-655.

- [2] 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 Fengxiang,GAO Xin,LI Zhaoyong,et al. Extraction and analysis of nutrient components of shark fin [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2007,28(1):225-227.(in Chinese)
- [3] 杨伟兴. 鲨鱼软骨中血管生成抑制因子的活性检测[J]. 中山大学研究生学刊:自然科学版,2001,22(1):18-21.
YANG Weixing. Using chicken chorioallantoic membrane to test the activity of angiogenesis inhibitor derived from shark cartilage[J]. **Journal of the Graduates Sun YAT-SEN University:Natural Sciences**,2001,22(1):18-21.(in Chinese)
- [4] 沈先荣,吉冬梅,贾福星,等. 鲨鱼软骨血管生成抑制因子的纯化和功能[J]. 生物化学与生物物理学报,2000,32(1):43-48.
SHEN Xianrong,JI Dongmei,JIA Fuxing,et al. Purification and functional characterization of a shark cartilage factor inhibitory to angiogenesis[J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**,2000,32(1):43-48.(in Chinese)
- [5] 陆焰,刘冰冰,杨文鸽. 鲨鱼肉酶解物的抗氧化作用及其稳定性研究[J]. 食品科技,2001,36(12):135-139.
LU Yan,LIU Bingbing,YANG Wenge,et al. The anti-oxidant ability and its stability of hydrolysates obtained from shark meat [J]. **Food Science and Technology**,2011,36(12):135-139.(in Chinese)
- [6] Bradley M Wetherbee et al. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise New Zealand [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**,2000,125:511-521.
- [7] Joon-Son Sim,et al. Evaluation of chondroitin sulfate in shark cartilage powder as a dietary supplement:Raw materials and finished products[J]. **Food Chemistry**,2007,101:532-539.
- [8] 蒋哲,孟凡国,陈琼华,等. 鲨鱼皮胶原蛋白肽的成分分析及对血管紧张素转化酶活力的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,47(6):879-882.
JIANG Zhe,MENG Fanguo,CHEN Qionghua,et al. The effects of shark skin peptides on ACE and the analysis of peptides[J]. **Journal of Xiamen University:Natural Science**,2008,47(6):879-882.(in Chinese)
- [9] 谢果凰. 鲨鱼硫酸软骨素的分离提纯及其抗氧化功能的研究[D]. 宁波:宁波大学,2010.
- [10] 范秋领,黄才国,金艳,等. 鲨鱼肝蛋白粗提物对大鼠肝线粒体抗氧化功能的影响 [J]. 华东理工大学学报:自然科学版,2005,31(5):598-634.
FAN Qiuling,HUANG Caiguo,JIN Yan,et al. Effects of shark protein crude extract administration on liver mitochondrial antioxidant defenses in rats [J]. **Journal of East China University of Science and Technology:Natural Science Edition**,2005,31(5):598-634.(in Chinese)
- [11] Danillo P et al. Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats [J]. **Genetics and Molecular Biology**,2008,311:361-365.
- [12] Blanco M et al. Identification of shark species in seafood products by forensically information nucleotide sequencing[J]. **Chemical Society**,2008,56:9868-9874.
- [13] 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 Yunxia,BAO Jianqiang,ZHANG Shuya,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.(in Chinese)
- [14] 郭云霞,张舒亚,谌鸿超,等. SYBR Green 实时荧光 PCR 检测食品中鲨鱼源性成分真实性方法的建立[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(12):1300-1306.
GUO Yunxia,ZHANG Shuya,et al. Authentication of shark derived material in food using SYBR green fluorescence real-time PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(12):1300-1306.(in Chinese)
- [15] 张舒亚,谌鸿超,宋青,等. 食品和饲料中火鸡源性成分的实时荧光 PCR 检测方法[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(2):207-211.
ZHANG Shuya,CHEN Hongchao,SONG Qing,et al. Identification of turkey derived material in food and feed using real-time PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(2):207-211.(in Chinese)