

应用 PCR-RFLP 技术鉴别区分中国沿海 四种主要养殖扇贝

王 师¹, 包振民¹, 张玲玲¹, 李 宁¹, 战爱斌¹, 郭文波², 汪小龙¹, 胡景杰^{1,*}
(1. 中国海洋大学海洋遗传与育种实验室, 山东 青岛 266003;
2. 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘 要: 扇贝的物种鉴定, 通常主要是依据形态学标准来进行。然而, 当用于形态辨别的部分被去除时, 对扇贝的物种鉴定工作则显得十分困难。本研究利用对扇贝核糖体 ITS 的 PCR-RFLP 分析, 首次从分子水平上鉴定区分了中国沿海四种主要的养殖扇贝(栉孔扇贝、华贵栉孔扇贝、虾夷扇贝及海湾扇贝)。根据四种扇贝 ITS 的测序结果, 选取三种内切酶(SmaI、MseI 及 TaqI)应用于 PCR-RFLP 分析。根据三种内切酶产生的酶切图谱, 四种扇贝可被有效鉴别区分。酶切结果在四种扇贝各群体间的稳定性, 证明了利用该技术对四种扇贝进行物种鉴定的可行性。本研究同时成功地对扇贝加工品 - 干贝进行了物种鉴定, 证明了该技术在实践中应用的可行性。

关键词: 扇贝; 物种鉴定; 干贝; PCR-RFLP; ITS

Species Identification of Four Scallop Species mainly Cultured in China with Application of PCR-RFLP Technique

WANG Shi¹, BAO Zhen-min¹, ZHANG Ling-ling¹, LI Ning¹, ZHAN Ai-bin¹, GUO Wen-bo²,
WANG Xiao-long¹, HU Jing-jie^{1,*}

(1. Laboratory of Marine Genetics and Breeding (MGB), Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Key Laboratory of Mariculture (KLM), Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: Species identification for scallop is mostly based on morphological characters. However, when morphological characters are being removed, species identification is difficult to carry out. In this study, with PCR-RFLP analysis of ITS region, four scallop species (*C. farreri*, *C. nobilis*, *P. yessoensis*, *A. irradians*) mainly cultured in China at the molecular level were first identified based on the sequencing result, three restriction enzymes were selected for PCR-RFLP analysis. Four scallop species can be well distinguished based on the three restriction maps assayed. The stability of PCR-RFLP in this study suggested that this technique is feasible for identification of four scallop species. As an applied example, dried scallop are successfully identified, which suggests that this technique is highly applicable in practice.

Key words: scallop; species identification; dried scallop; PCR-RFLP; ITS

中图分类号: TS207.3; Q173

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)07-0210-05

扇贝科 (*Pectinidae*) 动物隶属于软体动物门 (*Mollusca*), 瓣鳃纲 (*Lamellibranchia*), 翼形亚纲 (*Pterimorphia*), 珍珠贝目 (*Pterioidea*)。为我国重要的经济养殖贝类之一。其闭壳肌加工后的干制品, 俗称“干贝”, 富含氨基酸、脂肪、糖、微量矿物质、核黄

素和尼克酸等, 属海产八珍之一。世界上扇贝的近缘种约 300 种, 在我国约有 30 种。目前在中国沿海主要养殖四种扇贝分别是山东、辽宁的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*), 广东、海南和福建的华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*), 从日本和朝鲜引进的虾夷扇贝 (*Patinopekten*

收稿日期: 2005-07-29

*通讯作者

基金项目: 国家“863”计划项目(2003AA603022; 2005AA603220); 国家自然科学基金项目(30300268);

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(01BS10)

作者简介: 王师(1979-), 男, 博士研究生, 主要从事贝类分子标记辅助育种的研究。

yessoensis)和美国引进的海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[1]。

扇贝的物种鉴定通常主要依据形态学标准(大小、壳色、放射肋、棘等)来进行。然而,当用于形态辨别的部分被去除时或还未形成可辨别形态时,对扇贝的物种鉴定则显得十分困难。为此,一系列分子生物学手段被引入以解决这一问题。2000年Paugam^[2]等利用免疫学方法鉴别浮游生物样品中的双壳类幼虫。利用同工酶技术,1991年McDonald^[3]等鉴别了三种贻贝;1993年Kennington^[4]等鉴别了两种扇贝;1999年Andre^[5]等利用RAPD技术鉴别了两种鸟蛤。PCR-RFLP技术,由于其简单、快速、成本低等优点,近些年在实际应用中被广泛采用。1998年Toro^[6]鉴别了四种贻贝;2001年Fernandez^[7]等鉴别了三种蛤;2002年Lopez-Pi non^[8]等鉴别了欧洲沿海的四种扇贝。

欧盟于1999年12月出台了104/2000号新法规,特别规定各成员国的水产品(包括双壳类)必须注明种名,加工方法及捕捞区域,才能允许进入欧盟共同体市场销售^[9]。该法规于2002年1月开始实施。围绕着解决海产品中经常出现的以次充好及食品标签混乱等问题,国外已经开展了一些关于海产品物种鉴定的工作^[10,11]。随着我国国内市场的对外开放,出口水产品能否满足国际市场的标准成为制约我国水产品加工业发展的重要因素之一。然而在扇贝食品加工的过程中,通常仅留下闭壳肌,其它用于形态辨别的部分被去除。当加工后的商品进入市场并要求进行物种鉴定时,此时则不能再依据形态学标准进行区分。利用分子生物学进行物种鉴定由于其良好的稳定性和准确性而成为解决这一问题的首选手段。

真核生物的rDNA基因以串联重复的方式存在,这一基因家族通过不等交换和基因转变而经历快速的协同进化,导致了重复单位在基因组中的一致性^[12]。真核生物的rDNA基因同时包含相对快速和缓慢的进化区域,编码18s、28s和5.8srRNA基因的区域相当保守,进化缓慢;而ETS和ITS区域相对进化较快,尤其ITS1和ITS2区域相比其它区域进化最快,因而适用于物种鉴定分析。其中ITS1位于18s和5.8srRNA之间,ITS2位于5.8s和28s rRNA之间。由于18s和28srDNA的高度保守性,能方便的设计出通用引物,达到用同一对引物对不同物种的ITS区域进行PCR扩增的目的。

本研究中,利用对扇贝核糖体ITS的PCR-RFLP分析技术,首次从分子水平上鉴定区分了中国沿海四种主要的养殖扇贝。同时利用该技术,我们也对常见扇贝加工食品-干贝进行了物种鉴定,证明了该技术在实践中应用的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料

本实验栉孔扇贝部分取自青岛南山水产品市场(简记Qz),部分取自烟台蓬莱长飞海珍品有限公司(简记Pz),其中包括部分俄罗斯地区栉孔扇贝个体(简记Pez);华贵栉孔扇贝部分取自福建省(简记Fh),部分取自广东省(简记Gh);虾夷扇贝部分取自青岛南山水产品市场(简记Qx),部分取自文登水产综合育苗实验基地(简记Wx),其中包括部分俄罗斯地区虾夷扇贝个体(简记Wex);海湾扇贝部分取自青岛南山水产品市场(简记Qw),部分取自文登水产综合育苗实验基地(简记Ww)。四种扇贝各共15个体,取其闭壳肌于-20℃冷冻保存,用于PCR-RFLP分析。干贝材料购自青岛家乐福超市(商品标签为新鲜扇贝,未注明种名)。

1.2 DNA的提取

1.2.1 对四种扇贝冷冻闭壳肌样品DNA提取

取闭壳肌约0.1g,加入500μl STE裂解缓冲液(NaCl:100mmol/L;Tris-HCl:10mmol/L,pH8.0;EDTA:1mmol/L,pH8.0),剪碎,加入50μl 10% SDS,及3μl 20ml蛋白酶K,56℃处理2h至裂解液澄清,其余步骤按照经典酚/氯仿抽提法进行。

1.2.2 对干贝材料DNA的提取

与上述冷冻样品不同的是,在400μl STE裂解缓冲液中加入100μl 5% Chelex-100树脂(Bio-Rad,分子生物纯)溶液,同时减少酚/氯仿抽提次数,其余步骤同上述冷冻样品提取步骤。

1.3 PCR扩增

PCR扩增在20μl总体积中进行,包括:100ng基因组DNA,各4pmol正反引物,1.5mmol/L MgCl₂,0.2mmol/L dNTP,1×PCR Buffer及1U Taq酶(promega,上海)。正向引物序列:5'-GTTTCTGTAGGTGAACCTG-3',反向引物序列:5'-CTCGTCTGATCTGAGGTCGGA-3'。

PCR反应在PTC-100型(MJ research, USA)PCR仪中按如下程序进行:94℃ 5min,94℃ 30s,54℃ 30s,72℃ 1min,30循环,72℃ 10min。取1μl PCR产物在1.5%琼脂糖电泳分离,EB染色,紫外检测拍照。

1.4 限制性内切酶的选择及酶切条件

取四种扇贝各一个体ITS PCR产物,连接到pMD18-T载体上,转化到*E. coli* DH5感受态菌株中,重组克隆经检查插入片断大小及酶切鉴定后,采用3730型测序仪(上海博亚生物有限公司)进行测序。根据测序结果,应用BioEdit软件(Hall, 1999)进行模拟酶切。通过比较四种扇贝的限制性酶切图谱,选择SmaI、MseI及TaqI进行酶切。

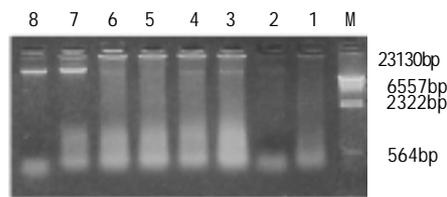
酶切反应在20μl总体积中进行:4μl PCR产物,

3U限制性内切酶, 1 × RE Buffer。30 (SmaI)或65 (MseI和TaqI)孵育5h后, 80 20min 灭活内切酶。酶切产物在3%琼脂糖电泳分离, EB染色, 紫外检测拍照。

2 结果与分析

2.1 扇贝基因组DNA的提取

扇贝基因组DNA提取结果见图1。对干贝样品, 其总DNA有不同程度的降解, 其中样品1和2降解最严重, 而对冷冻样品, 则能提出很完整总DNA, 如样品7和8。



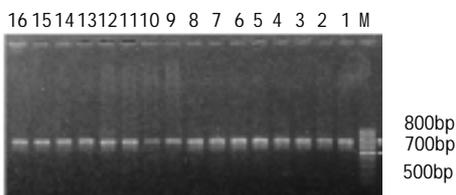
1~6: 干贝样品; 7~8: 冷冻样品。

图1 扇贝基因组DNA提取结果

Fig.1 DNA extraction of scallop genome

2.2 四种扇贝ITS区的PCR扩增

四种扇贝ITS的PCR扩增结果见图2, 四种扇贝ITS长度基本一致, 因此长度不能作为它们的区分标准。



1~4: 栉孔扇贝; 5~8: 华贵栉孔扇贝; 9~12: 虾夷扇贝; 13~16: 海湾扇贝。

图2 四种扇贝ITS的PCR扩增结果

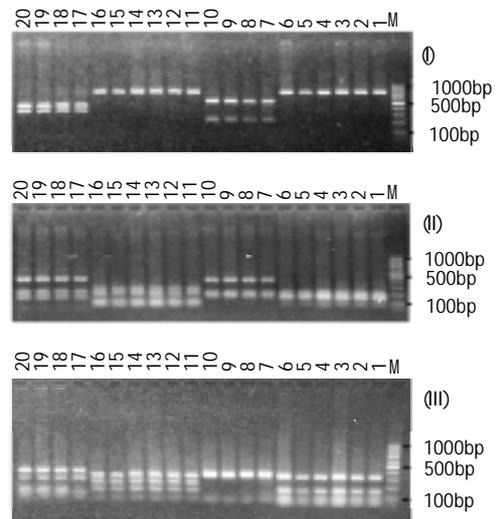
Fig.2 PCR amplification of ITS in four scallop species

2.3 PCR-RFLP分析

对四种扇贝各一个体PCR产物克隆测序后, 其ITS长度及所选三种内切酶的酶切图谱见表1。从酶切图谱中可看出, SmaI仅能区分华贵栉孔扇贝和海湾扇贝, 而MseI和TaqI均能对四种扇贝进行有效区分。

四种扇贝PCR产物经SmaI、MseI及TaqI酶切后结

果见图3(I)、(II)、(III), 与预期酶切结果相一致, 同时酶切结果在各群体间表现为稳定一致。据此, 我们对干贝材料进行了物种鉴定。干贝PCR产物经SmaI、MseI及TaqI酶切后结果见图4(I)、(II)、(III), 由图中可清楚地看出本实验所选干贝材料与海湾扇贝的三种酶切结果均一致, 于是可判定所选干贝材料为海湾扇贝。



1~2: Oz; 3~4: Pz; 5~6: Pez; 7~8: Fh; 9~10: Gh; 11~12: Qx; 13~14: Wx; 15~16: Wex; 17~18: Qw; 19~20: Ww.

图3 四种扇贝ITS PCR产物经SmaI (I)、MseI (II)和TaqI (III)酶切后结果

Fig.3 PCR-RFLP analysis in four scallop species by SmaI (I), MseI (II) and TaqI (III)

3 讨论

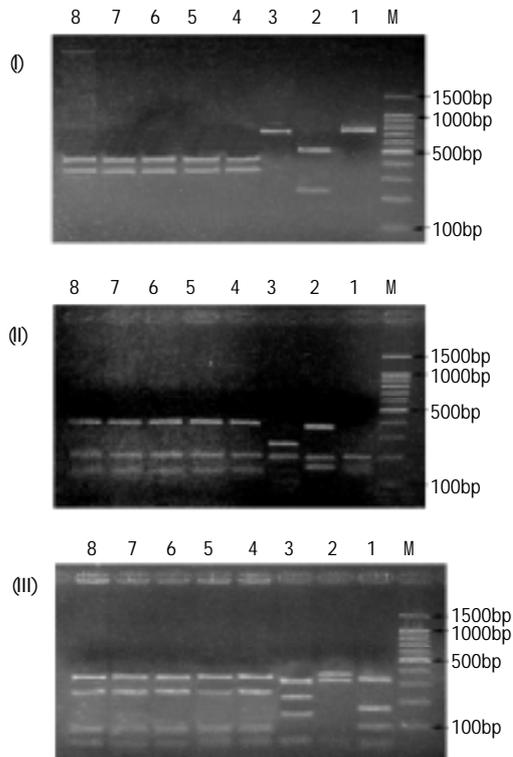
3.1 干贝基因组DNA的提取

对干贝基因组DNA提取的主要困难有两点:(1)基因组DNA已部分降解,(2)样品中可能含有重金属离子。针对第一点, 我们减少了酚/氯仿的抽提次数, 以尽量减少抽提过程中对DNA的物理损伤。针对第二点, 我们尝试了在裂解缓冲液中加入Chelex-100树脂, 以去除样品中可能含有的重金属离子, 抑制DNA酶对DNA的水解作用。Chelex-100(200~400目)分子生物纯树脂由成对的亚氨基乙酸离子结合在苯乙烯二乙烯苯基质上形成, 对多价阳离子具有很强的选择度, 因而适用于从

表1 四种扇贝ITS长度及预期的三种限制性内切酶酶切图谱
Table 1 ITS lengths and expected three restriction maps in four scallop species

	ITS(bp)	SmaI	MseI	TaqI
栉孔扇贝(<i>C. farreri</i>)	741	741	203, 168, 151, 143, 76	325, 164, 95, 58, 52, 47
华贵栉孔扇贝(<i>C. nobiliss</i>)	731	509, 222	380, 193, 158	351, 322, 58
虾夷扇贝(<i>P. yessoensis</i>)	734	734	234, 193, 98, 82, 66, 61	312, 221, 143, 58
海湾扇贝(<i>A. irradians</i>)	769	430, 339	395, 204, 143, 27	345, 250, 93, 58, 23

多种粗样品(如血液、细菌、组织和头发)中抽提 DNA。经反复实验,证明上述两优化步骤确能减少样品 DNA 的降解,增加后续 PCR 反应的成功率。本实验中,虽然部分干贝样品 DNA 降解严重,但仍能获得较好的 PCR 扩增,推测可能与其在基因组内为多拷贝序列有关。



1: 栉孔扇贝; 2: 华贵栉孔扇贝; 3: 虾夷扇贝; 4: 海湾扇贝; 5-8: 干贝

图4 干贝ITS PCR产物经Smal (I)、MseI (II)和TaqI (III) 酶切后结果

Fig. 4 PCR-RFLP analysis in dried scallop by Smal (I), MseI (II) and TaqI (III)

3.2 四种扇贝样品的取材及其酶切结果的稳定性

在样品取材上,考虑到扇贝科动物为体外受精,排精排卵量巨大,有可能导致同一地区扇贝群体亲缘关系很近。所以若仅取一地理群体,则有可能由于群体内亲缘关系很近,从而造成对酶切结果稳定性的错误判断。本实验中,每种扇贝 15 个个体分别取自不同地理群体,有的还包括相距甚远的俄罗斯地理群体(栉孔扇贝和虾夷扇贝),以保证它们之间的亲缘关系足够远,确保实验结论的可靠性。

本实验中,对于每种扇贝,三种内切酶的酶切结果在所取 15 个个体间均表现一致,未发现酶切位点突变个体,因而所获得的限制性酶切图谱比较稳定,但仍需在下一步实验中增加个体数,以进一步验证。

3.3 利用对 ITS 序列的 PCR-RFLP 分析进行物种鉴定的

可行性

利用对 ITS 序列的 PCR-RFLP 分析进行物种鉴定,在海洋贝类方面已有报道。2001 年 Fernandez 等鉴别了三种蛤,2002 年 Lopez-Pi non 等鉴别了欧洲沿海的四种扇贝。本实验中,三种内切酶酶切结果的稳定性为利用该技术对四种扇贝进行物种鉴定的可行性提供了重要依据。尽管不能排除酶切位点突变个体的存在,但根据目前结果,可推断酶切位点突变率很低,所以即便发现这样的个体存在,我们仍可通过综合三种内切酶的酶切结果,做出正确的判断。若需要极为准确的鉴定结果,除通过酶切结果进行初步判定外,还需将样品 PCR 产物进行测序,序列比对的结果将最终确定样品所属物种。

值得注意的是,利用对 ITS 序列的 PCR-RFLP 分析进行物种鉴定未必对所有海洋贝类都适合。2000 年 Yu [13] 等对大砗磲(*Tridacna crocea*)的 ITS 序列进行了研究,发现其 ITS-1 序列具有非常高的多态性,从而导致在种内不同群体间限制性内切酶图谱的变化。所以,在能否利用该技术对其它物种进行物种鉴定这一问题上,须持谨慎态度,必须预先调查其 ITS 序列在各地群体间的变异情况,以做出正确判断。本实验中,四种扇贝不同地理群体酶切结果的稳定性,验证了利用该技术对四种扇贝进行物种鉴定的可行性。

3.4 利用对 ITS 序列的 PCR-RFLP 分析进行物种鉴定的优越性

目前,可应用于物种鉴定的分子生物学技术手段有很多,如 RFLP、分子标记技术(AFLP、RAPD、SSR 等)、基因组原位杂交技术等。但这些技术往往由于操作复杂、成本高或其它一些因素,限制了它们的应用范围。而 PCR-RFLP 技术由于其简单易行、周期短、费用低,成为实际应用中常选用的物种鉴定分子生物学手段。

应用于 PCR-RFLP 物种鉴定的基因序列主要有两种来源:线粒体和核基因组。利用线粒体基因片断进行物种鉴定的主要缺点是它只能提供母本的遗传信息,无法提供父本的遗传信息。而对于利用核基因片断,由于它能够同时提供父母本的遗传信息,因而还可应用于对杂种子代的物种鉴定。

3.5 四种扇贝与其它双壳类物种区分的可能性

考虑到在未来的应用中,可能会提出对四种扇贝与其它双壳类进行物种区分的要求,我们对 NCBI 核酸数据库中现存的其它双壳类物种 ITS 序列进行了比较分析,发现仅通过 ITS 长度的比较,就可方便地将四种扇贝与其它双壳类区分开。当然,也可根据本实验通过 PCR-RFLP 技术将二者更为准确地分开。

参考文献:

[1] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学

白酒中己酸乙酯测定的不确定度评估

杨秀培^{1,2}, 肖丹², 山桂云¹, 周在德²

(1. 西华师范大学化学化工学院 四川 南充 637002; 2. 四川大学化学学院 四川 成都 610045)

摘要: 参照国家标准 GB/T10781-89, 采用气相色谱法测定白酒中己酸乙酯含量。通过对己酸乙酯的测定进行测量不确定度的评估实验, 介绍了一种内标定量法的测量不确定度评估方法, 表达出了合成标准不确定度和扩展不确定度, 为白酒质量控制提供有效、可靠、可溯源的测量数据。

关键词: 白酒; 己酸乙酯; 不确定度; 气相色谱法; 计量学

The Evaluation of Uncertainty in Determination of Ethyl Caproate in Chinese Spirits

YANG Xi u-pei^{1,2}, XIAO Dan², SHAN Gui -yun¹, ZHOU Zai -de²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, China West Normal University, Nanchong 637002, China;
2. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: To base on GB/T10781.8-89, the content of ethyl caproate can be determined with gas chromatography. By the experiment of the uncertainty measurement of the ethyl caproate in Chinese spirits this paper expounded a method to evaluate the uncertainty measurement for inner standard method. At last the combined standard uncertainty and the expanded uncertainty are expressed, which provide the effective and credible equality data to the quality control.

Key words: Chinese spirits; ethyl caproate; uncertainty; gas chromatography; metrology

中图分类号: 0657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)07-0214-05

收稿日期: 2005-08-16

作者简介: 杨秀培(1970-), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事食品分析技术研究。

- 出版社, 1993.
- [2] A Paugam, M L Pennec, et al. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples[J]. J Shellfish Res, 2000, 19: 325-331.
- [3] J H McDonald, R Seed, et al. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres[J]. Mar Biol, 1991, 111: 323-333.
- [4] E Kenchington, K S Naidu, et al. Use of biochemical genetic markers to discriminate between adductor muscles of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) and the ice and scallop (*Chlamys islandica*) [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1993, 50: 1222-1228.
- [5] C Andre, M Lindgarth, et al. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki* [J]. J Mar Biol Ass UK, 1999, 79: 563-565.
- [6] J E Toro. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys[J]. J Shellfish Res, 1998, 17: 1203-1205.
- [7] A Fernandez, T Garcia, et al. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species [J]. J Food Sci, 2001, 66: 657-661.
- [8] M J Lopez-Piñon, A Insua, et al. Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region [J]. Mar Biotechnol, 2002, (4): 495-502.
- [9] Council regulation (EC) No 104/2000 of 17 December 1999 on the common organization of the markets in fishery and aquaculture products [J]. Official Journal of the European Communities, 2000, L17: 22-52.
- [10] M J Chapel a, C G Sotelo, et al. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment [J]. Eur Food Res Technol, 2003, 217: 524-529.
- [11] G L Hold, V J Russell, et al. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 212: 385-389.
- [12] 唐伯平, 周开亚, 庆大祥, 等. 核rDNA ITS序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用 [J]. 动物学杂志, 2002, 37: 67-73.
- [13] E T Yu, M A Juiño-Menez, et al. Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Triacna crocea* [J]. Mar Biotechnol, 2000, (2): 511-516.