

DNA条形码技术鉴别市售鱼肉制品真伪

石蕊寒^{1,2}, 南汇珠¹, 丁红田³, 王建昌^{1,2}, 付琦¹, 孙晓霞^{1,2}, 王金凤¹, 丁丽丽⁴, 崔景芳³, 刘洋³, 郭春海^{1,2,*}
(1.河北出入境检验检疫局技术中心, 河北 石家庄 050051; 2.河北省检验检疫科学技术研究院, 河北 石家庄 050051;
3.河北省动物卫生监督所, 河北 石家庄 050081; 4.河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要:以 COI 基因和16S rRNA基因作为鱼类制品通用的DNA条形码,对超市中采集的91份冷冻鱼肉样品及经过深加工的预包装鱼肉样品进行物种鉴定。结果表明: COI 基因和16S rRNA基因均可用于鱼类制品物种真假的鉴别;冷冻鱼肉样品和预包装鱼肉样品与其商标的符合率分别为83.54%和58.33%;市场中存在鱼类制品商品标签标示错误、配料标注不明确等问题,为相关部门对鱼类制品的监管提供了有力的技术支持。

关键词: DNA条形码; COI 基因; 16S rRNA基因; 鱼肉制品; 真伪鉴别

The Authentication of Commercial Fish Products using DNA Barcoding Technique

SHI Ruihan^{1,2}, NAN Huizhu¹, DING Hongtian³, WANG Jianchang^{1,2}, FU Qi¹, SUN Xiaoxia^{1,2}, WANG Jinfeng¹,
DING Lili⁴, CUI Jingfang³, LIU Yang³, GUO Chunhai^{1,2,*}

(1.Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China;
2.Hebei Academy of Inspection and Quarantine, Shijiazhuang 050051, China;
3.Institute of Hebei Animal Health Supervision, Shijiazhuang 050081, China;
4.Institute of Genetic Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: This study was conducted to identify the species origin of 91 samples of frozen fish products and highly processed, pre-packaged fish products collected from supermarkets using DNA barcoding technique based on homologous sequence analysis of the COI and 16S rRNA genes. The results confirmed that both COI and 16S rRNA gene sequencing were useful for species authentication of fish products. The species origin of 66 of 79 (83.54%) frozen fish products and 7 of 12 (58.33%) highly processed, pre-packaged fish products was consistent with the product claims, which indicated that some problems such as mislabeling and ambiguous ingredient designation of fish products existed in the fish market. This research can provide technical support for the supervisory authorities concerned.

Keywords: DNA barcoding; COI gene; 16S rRNA gene; fish products; authentication

DOI:10.7506/rlyj1001-8123-201802007

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2018) 02-0040-06

引文格式:

石蕊寒, 南汇珠, 丁红田, 等. DNA条形码技术鉴别市售鱼肉制品真伪[J]. 肉类研究, 2018, 32(2): 40-45. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-201802007. <http://www.rlyj.pub>

SHI Ruihan, NAN Huizhu, DING Hongtian, et al. The authentication of commercial fish products using DNA barcoding technique[J]. Meat Research, 2018, 32(2): 40-45. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-201802007. <http://www.rlyj.pub>

随着我国鱼肉制品贸易的飞速发展和人民生活水平的日益提高,一些不法商家见利忘义,大肆地掺假造假,影响了国内外贸易的正常秩序,也损害了消费者的身体健康和经济利益。超市作为零售终端,以其产品种类繁多、价格实惠及选择性强等优势已成为消费者采购鱼肉制品的主要渠道。超市中的鱼肉制品通常分为鲜活

类、冰鲜类、冷冻类及以鱼肉为原料的深加工品等,由于受到保鲜、保活条件的限制,鲜活类、冰鲜类鱼肉制品的种类与后2种鱼肉制品相比相对较少。冷冻鱼肉制品多以分段、切片等形式销售,以鱼肉为原料的深加工品多指烤鱼片、鱼罐头等,均难以通过外观鉴定鱼肉种类,给部分水产商创造了可乘之机,以“低价鱼冒充高

收稿日期: 2017-12-13

基金项目: 河北省科技计划项目 (17275507D)

第一作者简介: 石蕊寒 (1987—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品检验检疫。E-mail: ruihan6005@163.com

*通信作者简介: 郭春海 (1963—), 男, 研究员, 学士, 研究方向为食品检验学。E-mail: gch-ab@163.com



价鱼”、深加工品“原材料掺假”等手段欺骗消费者。近年来,油鱼冒充鳕鱼^[1]、巴沙鱼冒充龙利鱼等报道屡见不鲜,对于这类掺假造假的判定不能依赖于传统的形态学观察,必须建立在准确、可靠的食物物种鉴定基础上^[2]。

DNA条形码(DNA barcoding)于2003年由Hebert等^[3]首次提出,即利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段,根据物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的身份识别系统,能够实现对物种进行快速、准确识别和鉴定。该技术已经广泛应用于动植物制品真伪鉴别、濒危动植物保护以及生物多样性研究等多个领域^[4-6]。一般认为线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(cytochrome oxidase subunit I, *COI*)基因是鱼类制品DNA条形码研究较为理想的目的基因。刘守海等^[7]发现通过对*COI*基因的分析鉴定并结合形态特征可以对仔稚鱼的种类进行鉴定。在肉类掺假等食品检测领域,以*COI*基因为目的基因的DNA条形码技术凭借良好的检测效果得到广泛的研究与应用,其首先被应用于鱼类制品检测中^[8]。Wong等^[9]对北美部分超市及餐馆采集的海产品样品进行鉴定,发现25%的样品存在错贴标签的问题。邱德义等^[2]对16份抽检的鱼肉、鱼丸等水产制品进行鉴定,结果表明,除1份样品未能成功进行扩增外,其余15份顺利完成种类来源鉴定的样品合格率仅为68.75%。李新光等^[10]对不同鱼肉制品进行鉴定,发现20种冷冻鱼的鉴定结果与形态学鉴定结果一致,但是烤鱼片样品与其标签上所标示的原料多数不符,部分烤鱼片样品中还可检出月尾鱼头鲢。王敏等^[11]研究发现,购于深圳批发市场和超市中的77份零售鱼肉制品的标签错贴率高达36.36%,其中标为“龙利鱼”的商品均为低价的淡水鱼。

除了*COI*基因,以核糖体基因为代表的部分核基因和线粒体基因亦可作为DNA条形码使用,且已受到越来越多的关注^[12]。韦健红等^[13]的研究表明,*COI*基因和16S rRNA基因均能将广地龙与其他地龙或蚯蚓物种鉴别开来。陈文炳等^[14]通过对16S rRNA基因的部分序列进行分析和对比,筛选出可用于精确鉴定日本鳗、美洲鳗和欧洲鳗3个物种的标准DNA条形码。张永等^[15]通过16S rRNA部分序列从分子水平对13种石首鱼科鱼类的系统发育关系进行研究,为其分类和系统进化提供了科学依据。陈信忠等^[16]测定了12种观赏鱼的*COI*基因和16S rRNA基因,发现通过这2种基因可以对亚洲龙鱼、神仙鱼等观赏鱼进行鉴别,但无法鉴别慈鲷等形态相似的观赏鱼或青龙鱼、黄尾龙鱼等同一品种、不同品系的观赏鱼。目前,16S rRNA基因的应用多集中在分类学方面^[17-19],但在食品检测领域,特别是鱼肉制品掺假方面的报道相对较少。

本研究选取*COI*基因和16S rRNA基因作为鱼类制品

通用的DNA条形码,对从超市中采集的冷冻鱼肉和预包装鱼肉样品进行鉴别,旨在考察利用这2种基因鉴别鱼肉制品的可行性,为保障鱼类食品的质量安全以及政府部门监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2016年5月—2017年9月期间从石家庄16个超市中购买鱼肉样品,共计104份,其中鳕鱼、龙利鱼、巴沙鱼、黄花鱼等冷冻鱼肉样品83份,烤鱼片、鱼罐头等经过深加工的预包装鱼肉样品21份。冷冻鱼肉样品置于-20℃冰箱保存备用,预包装鱼肉样品置于常温条件下保存备用。

Wizard® Genomic DNA Purification Kit、Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food试剂盒 美国Promega公司; 2×Taq PCR Mastermix、DNA Marker、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、GelRed染料 天根生化科技(北京)有限公司; DNA Ligation Kit、T-Vector pMD™19(Simple) 宝生物工程(大连)有限公司; Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

NanoDrop 2000C超微量分光光度计 美国Thermo Scientific公司; T-Gradient梯度PCR仪 德国Biometra公司; Fusion Fx5凝胶成像系统 法国Viber Lourmat公司; DYY-7C电泳仪 北京六一生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

1.3.1.1 去油

对于鱼罐头、烤鱼片等含油量较大的鱼肉样品,采用氯仿-甲醇法进行去油前处理^[20]。取适量样品放入50 mL离心管中,超纯水冲洗1~2次,加入氯仿-甲醇水溶液(氯仿:甲醇:水=5:10:4, V/V), 56℃孵育30 min, 7 800 r/min条件下离心5 min,弃含油脂的液体。重复上述步骤清洗3~4次后将样品自然晾干,-20℃保存备用。冷冻鱼肉样品直接进行研磨,不需要去油处理。

1.3.1.2 研磨

取适量已解冻鱼肉样品或已去油的预包装鱼肉样品放入已灭菌的研钵内,剪碎,加入液氮后用研磨杵研磨,将研磨后的样品-20℃保存备用。

1.3.2 DNA提取和浓度测定

取100~200 mg研磨后的样品,按照Wizard® Genomic DNA Purification Kit或Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food试剂盒所述方法提取DNA,立即使用

或-20℃保存备用。同时使用NanoDrop 2000C超微量分光光度计测定DNA质量浓度,根据测定所得质量浓度,将其稀释为质量浓度50~100 ng/μL。

1.3.3 PCR扩增

*COI*和16S rRNA通用引物参照文献[21-22]中的相关序列,如表1所示,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称	引物名称	序列(5'-3')
<i>COI</i>	VF2_t1	TGTAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
	FishF2_t1	TGTAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGATATCGGCAC
	FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
	FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGTCGGAARAAYCARAA
16S rRNA	16Sbr	CCGGTCTGAAGTCAGATCACGT
	16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT

*COI*基因PCR扩增反应体系:2×*Taq* PCR Mastermix 12.5 μL、引物终浓度0.05 μmol/L、DNA 2 μL, ddH₂O补足至25 μL。反应条件:95℃,2 min;94℃,30 s;52℃,40 s;72℃,1 min;35个循环;72℃,10 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,挑选扩增条带明显且单一的产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序;或将扩增阳性的PCR产物按照琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒说明进行纯化,回收片段连接pMD19-T载体,转入Trans1-T1感受态细胞中,经37℃过夜培养,挑取单个菌落于500 μL含有氨苄青霉素(终质量浓度100 μg/mL)的LB液体培养基中,37℃、200 r/min摇床培养4~6 h,经PCR检测,挑选阳性克隆菌液200 μL进行测序。

在使用*COI*基因进行PCR扩增没有出现扩增条带或扩增条带不理想时,使用16S rRNA基因进行扩增。反应体系:2×*Taq* PCR Mastermix 12.5 μL、引物终浓度0.2 μmol/L、DNA 2 μL, ddH₂O补足至25 μL。反应条件:94℃,2 min;94℃,45 s;55℃,50 s;72℃,1 min;35个循环;72℃,5 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,挑选扩增条带明显且单一的产物进行测序。

1.3.4 序列比对

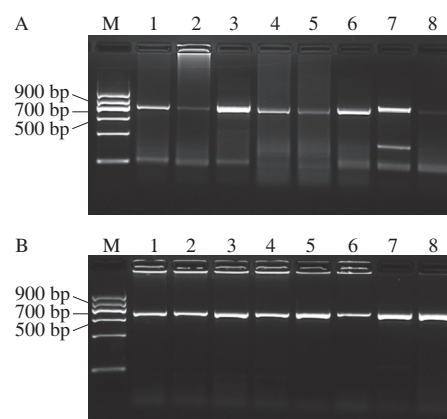
将测序成功的序列进行拼接比对,在BOLD SYSTEMS (<http://www.boldsystems.org>)或NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中对样品的*COI*序列或16S rRNA序列进行鉴定和相似度分析。

2 结果与分析

2.1 *COI*基因和16S rRNA基因的扩增

由图1可知,*COI*基因与16S rRNA基因引物2%琼脂

糖凝胶电泳的扩增片段约为703 bp和615 bp,PCR产物的分子质量与预期相符。



A. *COI*基因扩增结果; B. 16S rRNA基因扩增结果。M. DNA Marker; 1. 鳕鱼块; 2. 狭鳕鱼柳; 3. 巴沙鱼; 4. 大黄鱼; 5. 冻小黄花鱼; 6. 烤鱼片; 7. 鲜烤鲱鱼; 8. 黄花鱼罐头。

图1 不同鱼肉样品的PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *COI* and 16S rRNA genes from different fish samples

表2 鱼肉样品鉴定结果

Table 2 Reliability of PCR amplified *COI* and 16S rRNA genes for identifying frozen fish and highly processed, pre-packaged fish samples

鉴定结果	冷冻鱼肉/份	预包装鱼肉/份	总计/份
成功	79	12	91
未成功	4	9	13

由表2可知,104份鱼肉样品中共有91份获得测序结果。应用*COI*或16S rRNA任一基因引物扩增的样品序列与BOLD SYSTEMS或NCBI数据库进行比对发现,序列相似度均在97%以上,匹配度高,表明*COI*和16S rRNA基因片段的扩增和测序鉴定结果准确可靠,这2种基因均可有效鉴定鱼肉样品的种类。

2.2 冷冻鱼样品鉴定结果

2.2.1 冷冻鳕鱼鉴定结果

由表3可知,20份独立包装样品中,1份样品名为“深海鳕鱼片”,配料标示为“鳕鱼”,经鉴定为*Coryphaenoides acrolepis*/*Albatrossia pectoralis*(粗鳞突吻鳕/细鳞壮鳕);1份样品名为“格陵兰扁鳕鱼”,配料标示为*Reinhardtius hippoglossoides*(马舌鲽),与鉴定结果一致;其余18份样品鉴定结果均与配料中描述的种类相符,学名一致。30份以散装称重形式出售的样品,其鉴定结果多为*Coryphaenoides acrolepis*/*Albatrossia pectoralis*(粗鳞突吻鳕/细鳞壮鳕)或*Gadus chalcogrammus*(狭鳕),但1份名为“鳕鱼块”和1份名为“狭鳕鱼柳”的样品鉴定结果与其商标不符,二者的鉴定结果分别为*Decapterus maruadsi*(蓝圆鲹)和*Lophius litulon*(安康鱼)。



表3 冷冻鲑鱼样品鉴定结果

Table 3 Identification of frozen cod products

商标名称	样品数量/份	鉴定结果	相似度/%	鉴定用基因
水鲑鱼块(散装)	5	<i>Coryphaenoides acrolepis</i> / <i>Albatrossia pectoralis</i> (粗鳞突吻鲑/细鳞壮鲑)	100	COI/16S rRNA
鲑鱼块(散装)	12	<i>Coryphaenoides acrolepis</i> / <i>Albatrossia pectoralis</i> (粗鳞突吻鲑/细鳞壮鲑)	99~100	COI/16S rRNA
细鳞鲑	1	<i>Coryphaenoides acrolepis</i> / <i>Albatrossia pectoralis</i> (粗鳞突吻鲑/细鳞壮鲑)	99	16S rRNA
深海鲑鱼片	1	<i>Coryphaenoides acrolepis</i> / <i>Albatrossia pectoralis</i> (粗鳞突吻鲑/细鳞壮鲑)	99	16S rRNA
无头鲑鱼(散装)	7	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	99	16S rRNA
鲑鱼(散装)	2	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	99	16S rRNA
狭鳕鱼柳(散装)	1	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	100	16S rRNA
阿拉斯加狭鳕鱼排/堡	2	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	99	16S rRNA
阿拉斯加真鲑鱼扒/柳	2	<i>Gadus macrocephalus</i> (太平洋鲑)	100	COI/16S rRNA
挪威鲑鱼	1	<i>Gadus morhua</i> (大西洋鲑)	99	16S rRNA
挪威北鳕鱼	6	<i>Gadus morhua</i> (大西洋鲑)	99~100	COI/16S rRNA
无头鲑鱼(散装)	1	<i>Gadus morhua</i> (大西洋鲑)	99	16S rRNA
银鲑鱼	6	<i>Dissostichus eleginoides</i> (小鳞犬牙南极鱼)	100	COI/16S rRNA
格陵兰扁鲑鱼	1	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i> (马舌鲽)	99	16S rRNA
鲑鱼块(散装)	1	<i>Decapterus maruadii</i> (蓝圆鲹)	99	16S rRNA
狭鳕鱼柳(散装)	1	<i>Lophius litulon</i> (安康鱼)	100	COI/16S rRNA

2.2.2 冷冻龙利鱼、巴沙鱼鉴定结果

表4 冷冻龙利鱼、巴沙鱼样品鉴定结果

Table 4 Identification of frozen sole fish and basa fish products

商标名称	样品数量/份	鉴定结果	相似度/%	与商标是否相符	鉴定用基因
龙利鱼块(散装)	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	否	COI/16S rRNA
龙利鱼(散装)	4	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	否	COI/16S rRNA
龙利鱼柳(散装)	2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	否	COI/16S rRNA
龙利鱼片(散装)	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	否	COI/16S rRNA
鲜巴沙鱼肉(散装)	2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼肉(散装)	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼块(散装)	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼(散装)	2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼柳(散装)	2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼涮肉片(散装)	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	99.85	是	COI/16S rRNA
巴沙鱼柳	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	100.00	是	COI/16S rRNA
冷冻巴沙鱼柳	1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (低眼巨鲈)	99.00	是	16S rRNA

由表4可知, 8 份龙利鱼样品和11 份巴沙鱼样品经鉴定均为*Pangasianodon hypophthalmus* (低眼巨鲈), 且相似度均大于99.00%。

2.2.3 冷冻黄花鱼鉴定结果

表5 冷冻黄花鱼样品鉴定结果

Table 5 Identification of frozen yellow croaker products

商标名称	鉴定结果	相似度/%	与商标是否相符	鉴定用基因
去头黄花鱼(散装)	<i>Chrysochir aureus</i> (尖头黄鳍牙鲷)	100.00	否	COI/16S rRNA
鲜爆大黄花鱼	<i>Larimichthys crocea</i> (大黄花鱼)	99.54	是	COI/16S rRNA
黄花鱼(散装)	<i>Larimichthys crocea</i> (大黄花鱼)	100.00	是	COI/16S rRNA
三去黄花鱼	<i>Larimichthys crocea</i> (大黄花鱼)	99.00	是	16S rRNA
大黄花鱼(散装)	<i>Larimichthys crocea</i> (大黄花鱼)	99.00	是	16S rRNA
去头黄花鱼(散装)	<i>Larimichthys polyactis</i> (小黄鱼)	100.00	是	COI/16S rRNA
东海小黄鱼	<i>Larimichthys polyactis</i> (小黄鱼)	99.85	是	COI/16S rRNA
冻小黄鱼(散装)	<i>Chrysochir aureus</i> (尖头黄鳍牙鲷)	100.00	否	COI/16S rRNA
冻小黄鱼(散装)	<i>Larimichthys polyactis</i> (小黄鱼)	99.00	是	16S rRNA

由表5可知, 9 份黄花鱼样品中, 7 份样品的商标标识与鉴定结果相符, 2 份散装称质量销售的样品鉴定结果与商标不符, 实为*Chrysochir aureus* (尖头黄鳍牙鲷)。

2.2.4 其他冷冻鱼鉴定结果

1 份商标名为“二去北极冰鱼”散装称质量销售的冷冻鱼肉样品经16S rRNA基因鉴定为*Patagonotothen ramsayi* (拉氏南美南极鱼), 相似度为99%。

2.3 预包装鱼肉样品鉴定结果

表6 预包装鱼肉样品鉴定结果

Table 6 Identification of prepackaged fish samples

序号	商标名称	鉴定结果	相似度/%	与商标是否相符	鉴定用基因
1	烤鳕鱼	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	99.00	是	16S rRNA
2	烤鳕鱼	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	100.00	是	COI/16S rRNA
3	烤鳕鱼片	<i>Gadus chalcogrammus</i> (狭鳕)	99.00	是	16S rRNA
4	珍珠鳕鱼片	<i>Liparis mucosus</i> (纵带狮子鱼)	97.00	否	16S rRNA
5	珍珠烤鱼片(鳕鱼)	<i>Liparis agassizii</i> (阿氏狮子鱼)	99.71	否	COI/16S rRNA
6	烤鱼片(鳕鱼)	<i>Liparis tanakae</i> (细纹狮子鱼)	99.85	否	COI/16S rRNA
7	烤鱼片(冻海狮子鱼)	<i>Liparis mucosus</i> (纵带狮子鱼)	97.00	是	16S rRNA
8	马面鱼	<i>Liparis mucosus</i> (纵带狮子鱼)	97.00	否	16S rRNA
9	鲜烤鳕鱼	<i>Lophius litulon</i> (安康鱼)	100.00	否	COI/16S rRNA
10	烤鱼片(安康鱼)	<i>Lophius litulon</i> (安康鱼)	100.00	是	COI/16S rRNA
11	花雕醉小黄鱼罐头	<i>Larimichthys polyactis</i> (小黄鱼)	99.00	是	16S rRNA
12	五香黄花鱼罐头	<i>Larimichthys polyactis</i> (小黄鱼)	99.00	是	16S rRNA

由表6可知, 12 份预包装鱼肉样品中, 5 份样品的商标名称与鉴定结果不符, 其中3 份商标名称为“鳕鱼片”的样品经鉴定为*Liparis* (狮子鱼属), 1 份商标名称为“马面鱼”的样品和1 份商标名称为“鳕鱼”的样品经鉴定分别为*Liparis mucosus* (纵带狮子鱼) 和*Lophius litulon* (安康鱼)。

3 讨论

鱼肉制品是人民日常饮食中不可或缺的组成部分, 其肉质细嫩鲜美、低脂肪、高蛋白、维生素及矿物质含量丰富, 易于消化, 颇受消费者喜爱。但是鱼肉制品“掺假”“冒充”等问题会严重侵害消费者的利益。本研究选取COI基因和16S rRNA基因作为DNA条形码对冷冻鱼肉样品和经过深加工的预包装鱼肉样品进行鉴定, 共有91 份样品获得相应序列, 结果准确可靠, 为上述2 种基因在鱼类制品真伪鉴别中的应用提供了科学依据和研究基础。

本研究中鉴定冷冻鱼肉样品79 份, 预包装鱼肉样品12 份, 鉴定结果与商标的符合率分别为83.54%和58.33%。由上述鉴定结果可知, 目前鱼肉制品市场存在如下问题: 1) 散装冷冻样品商品名错标现象严重, 多以低价鱼冒充高价鱼。本研究中购买独立包装冷冻样品25 份, 此种样品包装良好, 配料标注详细, 与鉴定结果相符。但散装冷冻样品包装简易, 掺假率可达

24.07% (13/54)。散装鱼肉多以鱼块或去头形式销售,不易从外观判定鱼肉种类,例如头尖牙大的*Chrysichthys aureus* (尖头黄鳍牙鲷) 去头后与*Larimichthys polyactis* (小黄鱼) 鱼体相似,较难区分。此外,散装鱼肉类商品多数无相应的产品介绍,仅简易标记商品的俗名,无明确学名,甚至只标明“鱼块”等名称来混淆消费者。本研究中“龙利鱼”和“巴沙鱼”样品经鉴定均为*Pangasianodon hypophthalmus* (低眼巨鲈)。“龙利鱼”属鲈形目、舌鳎科、舌鳎属,是优质的海洋鱼类^[2,11],而“巴沙鱼”一般认为属于巨鲈属,包括低眼巨鲈(茶鱼)和博氏巨鲈(巴沙鱼),是越南湄公河流域的淡水鱼^[23-25]。部分商家有意将低价的“巴沙鱼”贴上“龙利鱼”的标签,以获得更大的利润。2) 鳕鱼市场命名混乱。香港食物安全中心发布的《有关识别及标签:油鱼/鳕鱼的指引》中阐明:根据科学分类,“鳕鱼”泛指鳕科的鱼类及属于鳕形目的相关品种,其中就包括市面上常见的“太平洋鳕”、“大西洋鳕”、“狭鳕”及“粗鳞突吻鳕/细鳞壮鳕”^[26]等。然而市场中的“鳕鱼”常被用作多种非鳕形目鱼类的俗称,例如“银鳕鱼”和“白鳕鱼”多指属于裸盖鱼科鲈形目的*Anoplopoma fimbria* (裸盖鱼)及属于南极鱼科鲈形目的*Dissostichus eleginoides* (小鳞犬牙南极鱼)和*Dissostichus mawsoni* (鳞犬牙南极鱼)。针对上述情况,香港食物安全中心建议只有鳕形目鱼类才可使用含有“鳕”字的俗名,就*Anoplopoma fimbria*、*Dissostichus eleginoides*、*Dissostichus mawsoni* 3种鱼类而言,在商标、食物牌上同时标明鱼类学名和科学文献或农业组织建议的俗名时,才可继续使用市场上“银鳕鱼”和“白鳕鱼”的俗名。本研究中购买的6份“银鳕鱼”实为*Dissostichus eleginoides* (小鳞犬牙南极鱼)，“扁鳕鱼”经鉴定为*Reinhardtius hippoglossoides* (马舌鲈),鉴定结果与其配料中标注的学名相符,但是与商标中的俗名“鳕鱼”不符。这种命名混乱的现象近几年多有报道,但目前我国尚未出台针对鳕鱼命名的标准或相应的市场规范准则^[27],此乱象并未得到改善。3) 预包装鱼肉产品配料不明或不符合。我国国家标准GB 7718—2011《预包装食品标签通则》中规定,在食品标签中应清晰地标示反映食品真实属性的专用名称,不得使用易使消费者误解或混淆的常用名称或通俗名称^[28]。但是市场上仍有许多烤鱼片、鱼罐头产品配料上只标明“深海鱼”、“新鲜鱼肉”、“鳕鱼”等名称,使消费者难以判断。李楠等^[29]选取27份烤鱼片、鱼干样品进行品种鉴定,发现13份配料标注为“鳕鱼”“鳕鱼”或“鱼片”的样品中可检出河豚鱼成分,部分河豚鱼种含有剧毒物质河豚毒素,对消费者的身体健康有严重威胁。本研究中虽未检出含有毒性的鱼种,但是以*Liparis* (狮子鱼属)冒充鳕鱼或马面鱼、

以*Lophius litulon* (安康鱼)冒充鳕鱼等原材料造假、配料中标注与商品名称不符现象较为严重。

在关于肉类样品鉴定的报道中多使用*COI*基因,16S rRNA基因的应用较少。本研究的鉴定结果表明,这2种基因均可用于冷冻鱼肉和预包装鱼肉样品的鉴定。对比*COI*基因和16S rRNA基因的鉴定结果发现,前者在BOLD SYSTEMS数据库中的鉴定结果常为明确的单一物种,相似度可达100% (个别物种相似度为99.5%以上),而16S rRNA基因在NCBI数据库中对结果的相似度最高仅为99%,且提供的同源物种信息常不止一种。因此,在BOLD SYSTEMS数据库中对*COI*基因更易于进行物种的鉴定与分析。但本研究对同样样品进行鉴定时发现,扩增*COI*基因时易出现无目的条带或目的条带亮度很弱等问题,回收扩增产物连接载体也无法完成测序,而16S rRNA基因扩增效果稳定,目的条带明显,扩增产物可直接进行测序,有效节省了时间。综上所述,在进行鱼肉制品物种鉴定时可以考虑*COI*基因和16S rRNA基因的联合使用,既能够保证鉴定结果的准确性,又可以提高鉴定效率。

本研究中冷冻鱼肉样品和预包装鱼肉样品的鉴定成功率分别为95.18%和57.14%,共有13份样品未能成功进行物种鉴定,其中4份冷冻鱼肉样品和4份预包装鱼肉样品的*COI*基因或16S rRNA基因可扩增出明显的目的条带,但可能由于测序人员的操作或送样过程中PCR产物保存不当等原因导致其未能测序成功,5份预包装鱼肉样品未能扩增出目的条带,可能与DNA被破坏有关。鱼罐头、烤鱼片等鱼肉制品经过复杂的前处理和高温加工,细胞结构被破坏,导致DNA降解,此外,食品中的脂类、酚类等添加剂会在DNA提取过程中起到抑制作用^[30-32],这些因素均会影响后续的鉴定结果。因此,深加工鱼肉样品的核酸提取、物种鉴定方法还需要进一步的探索和优化。

4 结 论

本研究以*COI*基因和16S rRNA基因作为鱼类样品的DNA条形码,实现了对91份冷冻鱼肉及预包装鱼肉样品物种来源的准确鉴定,进一步表明这2种基因用于鱼类制品真伪鉴定的可行性,说明市场中存在“散装制品商品名错标现象严重,多以低价鱼冒充高价鱼”、“鳕鱼市场命名混乱现象依旧存在”以及“预包装鱼肉制品原材料造假、配料标注不明确”等问题,为有关部门打击掺杂等违法违规行为提供了技术支撑,对维护食品安全、促进动物源性食品行业健康发展具有重要意义。



参考文献:

- [1] 谭珊珊. 超市“鲑鱼”真假难辨[J]. 科学养生, 2012(7): 12-13.
- [2] 邱德义, 胡佳, 刘德星, 等. DNA条形码技术在肉品防欺诈鉴别中的应用[J]. 肉类研究, 2013, 27(4): 40-43.
- [3] HEBERT P D, CYWUNSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270: 313-321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218.
- [4] SEMBIRING A, PERTIWI N P D, MAHARDINI A, et al. DNA barcoding reveals targeted fisheries for endangered sharks in Indonesia[J]. Fisheries Research, 2015, 164: 130-134. DOI:10.1016/j.fishres.2014.11.003.
- [5] VARTAK V R, NARASIMMALU R, ANNAM P K, et al. DNA barcoding detected improper labelling and supersession of crab food served by restaurants in India[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(2): 359-366. DOI:10.1002/jsfa.6728.
- [6] TRIVEDI S, ALOUFI A A, ANSARI A A, et al. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: an update[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016, 23(2): 161-171. DOI:10.1016/j.sjbs.2015.01.001.
- [7] 刘守海, 秦玉涛, 刘材材, 等. DNA条形码技术在仔稚鱼鉴定中的实践[J]. 海洋开发与管理, 2017, 34(2): 92-95. DOI:10.3969/j.issn.1005-9857.2017.02.016.
- [8] 蒋炜丽, 谢文佳, 张平, 等. DNA条形码在肉品防欺诈鉴别中的作用[J]. 现代食品, 2016(15): 99-100. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2016.15.041.
- [9] WONG E, HANNER R. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood[J]. Food Research International, 2008, 41(8): 828-837. DOI:10.1016/j.foodres.2008.07.005.
- [10] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201318069.
- [11] 王敏, 刘荭, 黄海, 等. DNA条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 247-251. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201520048.
- [12] 李琪, 邹山梅, 郑小东, 等. DNA条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(8): 43-47. DOI:10.3969/j.issn.1672-5174.2010.08.006.
- [13] 韦健红, 李薇, 吴文如, 等. 基于COI与16S rRNA基因对广地龙的DNA分子鉴定研究[J]. 中国药房, 2012(35): 3274-3278.
- [14] 陈文炳, 缪婷玉, 彭娟, 等. 基于16S rRNA基因DNA条形码鉴定美洲鳗、欧洲鳗、日本鳗[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 283-289. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201704046.
- [15] 张永, 马春艳, 马凌波, 等. 基于16S rRNA部分序列探讨中国近海十三种石首鱼类的分子系统进化关系[J]. 海洋渔业, 2010, 32(3): 276-282. DOI:10.3969/j.issn.1004-2490.2010.03.007.
- [16] 陈信忠, 郭书林, 龚艳清, 等. 16S rRNA和COI基因条形码在12种观赏鱼种类鉴定中的应用[J]. 福建农业学报, 2016, 31(12): 1267-1272. DOI:10.19303/j.issn.1008-0384.2016.12.003.
- [17] 杨玲, 巩俊霞, 李娴, 等. 泰山螭霖鱼线粒体16S rRNA基因片段序列及分子系统发育分析[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2016, 13(33): 37-42. DOI:10.3969/j.issn.1673-1409(s).2016.33.009.
- [18] 陈健, 岳巧云, 邱德义. DNA条形码技术检测调理肉制品掺杂[J]. 肉类研究, 2016, 30(6): 35-39. DOI:10.15922/j.cnki.rlyj.2016.05.008.
- [19] 高峰, 于伯华, 王丽娟, 等. 基因条形码技术在鱼类物种识别与鉴定中的应用[J]. 中国动物检疫, 2015(6): 44-47. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2015.06.013.
- [20] 姚琳, 李青娇, 江艳华, 等. 水产加工品DNA提取方法的比较[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(2): 80-88.
- [21] IVANOVA N V, ZEMLAK T S, HANNER R H, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 544-548. DOI:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x.
- [22] TANG R W, YAU C, NG W C. Identification of stomatopod larvae (Crustacea Stomatopoda) from Hong Kong waters using DNA barcodes[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 439-448. DOI:10.1111/j.1755-0998.2009.02794.x.
- [23] 李颖聪. 巴沙鱼年出口110万吨或逆袭罗非鱼[J]. 海洋与渔业·(水产前沿), 2016(9): 55. DOI:10.3969/j.issn.1672-4046.2016.09.023.
- [24] 王蕾. 龙利鱼里的“潜伏者”: 巴沙鱼[J]. 食品与健康, 2016(12): 46. DOI:10.3969/j.issn.1004-0137.2016.12.032.
- [25] 王广军. 养殖新秀: 巴沙鱼[J]. 江西水产科技, 2007(5): 16-17.
- [26] 林霖, 陈国培, 何永盛, 等. 鲑鱼产品属性鉴别及细鳞壮鲑检测方法建立[J]. 食品工业, 2017(4): 208-212.
- [27] 李栋. 鲑鱼市场乱象全景揭秘[J]. 农村·农业·农民, 2016(7): 27-28.
- [28] 姚琳, 江艳华, 李青娇, 等. 基于DNA检测技术鉴定水产加工品原料的研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(1): 33-39.
- [29] 李楠, 江涛, 沈青, 等. 应用DNA条形码技术鉴定烤鱼片、鱼干中河鲢鱼鱼种[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 111-114. DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.002.
- [30] 杨彤晖, 孟镇, 钟其顶, 等. 猪肉类罐头食品中总DNA提取方法的比较[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 62-67. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201504012.
- [31] 李进波, 盛婧, 李想, 等. 五种DNA提取方法对鱼加工制品DNA提取效果的比较[J]. 生物技术通报, 2014(4): 43-49.
- [32] 程月花, 卜菁, 陆利霞, 等. 不同食品加工方式对提取鲢鱼肌肉DNA的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2509-2515.