海产品品种识别

Distinguish the Species of the Marine Products

芦晶[1] 沈慧星[2] 罗永康[1]
(1.中国农业大学 食品科学与营养工程学院 100083 2.中国农业大学 理学院)

摘 要：随着捕捞工业发展，捕捞量增加，消费市场中鱼类品种增加。出现低质量海产品冒充高品质产品现象，所以需要找出有效的品种鉴定方法。本文介绍了目前应用于品种鉴定的几种方法，包括蛋白质分子标记技术及DNA分子标记技术。

关键词：品种鉴定；蛋白质分子标记；DNA分子标记

Abstract: The development of fishing industry led to an increase in the number of fish species. And the substitution of highly priced species by other less commercial value ones became a problem. So it is necessary to provide efficient methods of species identification. In this paper, we described several methods used in species identification in processed seafoods, including protein molecular makers and DNA molecular makers technology.

Key words: specie distingushing; protein molecular maker; DNA molecular makers technology

中图分类号：TS254.1 文献标志码：A
文章编号：1001-8123 (2007)12-0024-04

前言

目前，由于渔船捕捞范围扩大，加工和贮藏技术的改进及发展中国家（如亚洲和非洲）捕鱼工业的建立，使捕鱼工业及鱼类市场向全球化方向发展，捕捞量大大增加。随着捕捞量的增长，鱼类品种也随之增加，进而给鱼类工业及消费带来新问题。过去，由于捕捞量少，捕捞能力差，捕捞范围小，鱼类品种往往通过形态学特征进行鉴定，如皮肤种类，身体形状、大小，眼睛或者内部组织。随着捕捞业及加工贮藏技术的发展，我们发现，种属相近的鱼类很难通过形态学特征辨认。特别是在加工过程中，产品的特征已经破坏，无法鉴定品种。

由于鉴定技术的不完善，生产者常以低品质鱼类代替高品质产品。例如，大西洋鳕鱼（Gadus morhua）是一种名贵鱼种，深受消费者喜欢，但由于捕捞过量，其面临严重的资源问题，所以生产商以其他低品质鳕鱼品种代替大西洋鳕鱼欺骗消费者。

面对当前海产品加工及消费情况，需要有效的鉴定海产品品种的方法。随着科学技术的发展，分子标记技术被用于海产品的种类鉴别。

分子标记技术在种类鉴别上的应用

蛋白质分子标记技术

蛋白质已经作为种类标记物广泛应用于品种鉴定。其原理是通过淀粉或琼脂糖凝胶电泳将水溶性蛋白质分离从而达到鉴定目的。随着等电点聚焦技术的发展，电泳方法得到改进，形成等电聚焦电泳技术（IEF），其原理是具有不同等电点的良性电解质载体在电场中自动形成pH梯度，使被分离物移至各自等电点的pH处聚集成很窄的区带[1]。1990年，AOAC将此方法列为鱼类品种鉴定的参考方法。尽管此种方法被广泛应用于加工产品，如烟熏海产品，但其鉴定辨析率较低，且鉴定种属关系

作者简介：芦晶（1983-），女，硕士研究生，从事畜产品加工方面的研究
通讯作者：罗永康，男，教授，博士，博导，从事畜产品、水产品加工的研究。中国农业大学东校区291#。

万方数据

相近的鱼类较困难。另外毛细管区带电泳也被应用于种类鉴定，其优点是试剂、样品用量少，分辨率高，耗时短，无毒。但是和其他蛋白质技术一样，这种方法只能应用于新鲜或冷冻的海产品。

除蛋白质技术外，还有很多其他技术应用于种类鉴别。如近红外及中红外技术，免疫技术(ELISA)，但这些技术的共同问题是不能辨别种属相近的产品种类。脂肪酸分析也被应用于种类鉴定，此种方法应用于罐装金枪鱼分析。水溶性肌浆蛋白经过反相高效液相色谱分离后的图谱也被应用于品种鉴定，但其只能鉴定新鲜及冷冻海产品。

DNA分子标记技术

DNA分子标记技术是根据基因组DNA存在丰富的多态性而发展起来的可直接反映生物个体在DNA水平上差异的一类新型的遗传标记技术[2]。其本质是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的DNA片段，由于DNA分子中碱基的缺失、插入、易位、倒位、重排或由于长短与排列不一的重复序列等而产生多态性，DNA分子标记就是检测这种多态性的技术[3]。目前DNA分子标记技术广泛应用于遗传育种、基因组作图、基因定位、种类鉴定、基因库构建等方面[4]。

DNA分子标记与种类鉴定

通过对比DNA序列的差异，可以鉴定品种种类。近年来，随着聚合酶链式反应（PCR）技术的出现，使对DNA片段的扩增和分析时间大大缩短，且对扩增产物序列的测定方法很多。来自于细胞核和线粒体中的DNA均可应用于种类鉴定。但线粒体中DNA测定应用更广泛，因为其具有单倍体性质，大小（15~20Kb）合适，高基因突变率，不含基因内区，加工条件下更稳定等特点。与蛋白质分子标记技术相比，DNA分子标记有以下两个优点：

1 根据不同的分辨精度要求，分析者可以选择不同的DNA区域

2 DNA在加工过程中比蛋白质更稳定

聚合酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction,PCR)

PCR,即聚合酶链反应,是20世纪80年代中期由Mullis等人[6-7]发展起来的在生物体外扩增核酸的技术。它可以在短时间内倍增极微量DNA(理论上说仅有一个DNA就足够了)至十万或百万倍。目前被应用于各种领域。PCR由模版DNA的变性，模版DNA与引物的退火（复性）和引物的延伸三个基本反应步骤构成。通过三个反应步骤的不断循环，会将一条DNA序列不断复制，其数量以2^n倍的形式增加(n为循环次数)。引物的选择是PCR成功的关键，如果引物3'末端和模板匹配DNA不匹配会引起PCR失败。它具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点。在实际应用中，细胞色素b被广泛应用于种类鉴定，同时其他基因片段如核糖体RNA的DNA编码，细胞色素氧化酶和ATP酶也被应用于种类鉴定。

随机扩增DNA多态性 (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD)

RAPD技术由Williams等于1990[8]年建立，其原理是利用随机合成的10个碱基的寡聚核苷酸片段为引物，分别与DNA两条链中的一条链结合，对基因组的特定区域进行PCR扩增。扩增的多态性DNA片段通过电泳分离后，经溴化乙锭染色，就可在紫外灯下进行检测。RAPD无需专门设计已知序列的引物，退火温度较PCR低，寡聚核苷酸引物与模板结合的稳固，允许引物与模板适当误配。RAPD标记具有快速、简便、通用性好、成本低、只需少量DNA样品等特点。但这种方法也有一些缺点，其对DNA质量和数量，扩增热循环仪，循环条件，聚合酶，分离检测条件，种内变异等因素敏感。所以RAPD需要制定标准以得到可重复性模型[9]。目前已经有学者报道将RAPD应用于海产品及肉类品种鉴定[10]。2000年，姚纪花等[11]对于方正、彭泽和淇河3个地区的银鲫进行了RAPD分析，结果显示三种银鲫的指纹图谱差异显著，可用于银鲫种群鉴定。

单链构象多态性 (Single Strand Conformation Polymorphisms,SSCPs)

SSCP是一种可以快速检测特定基因片段突变的电泳方法。其原理是利用PCR技术定点扩增出基因组DNA分子上的某一目的序列，然后将扩增产物进行变性处理，得到单链DNA用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。如果DNA链发生变异，则可能会由于这种变异而影响其构象和电泳迁移率，使其带纹出现在电泳图谱的不同位置，从而显示不同生物个体的DNA特异性，达到了指纹分析的

万方数据

目的[12]。SSCP简单，易操作，但灵敏度相对较低，对环境温度敏感。在特定区段内，DNA片段越短，这种技术的分辨率越高。研究表明最佳分子片段大小为100-200bp。有研究显示此种方法可以应用于日常种类鉴定[13]。

扩增片段长度多态性（Amplification Fragment Length Polymorphisms，AFLP）

AFLP基于PCR技术扩增基因组DNA限制性片段，其基本原理是先利用限制性内切酶水解基因组DNA产生不同大小的DNA片段，再使双链人工接头的酶切片段相边接，作为扩增反应的模板DNA，然后以人工接头的互补链为引物进行预扩增，最后在接头互补链的基础上添加1-3个选择性核苷酸作引物对模板DNA基因再进行选择性扩增，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测获得的DNA扩增片段，根据扩增片段长度的不同检测出多态性[4]。AFLP具有分辨率高、稳定性好、效率高的优点。它的技术费用昂贵，与RAPD一样，其对DNA的纯度、数量、质量和内切酶的质量要求高。这种技术已经应用于鲟鱼种类的区分，可以辨认杂交鱼种[14]。Wang Z.Y.等[15]在2004年应用ALFP技术对6种对虾进行了种类鉴别和种系发生分析。

聚合酶链式反应连接的限制性片段长度多态性（Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR fragments，PCR-RFLP）

PCR-RFLP是对RFLP的改进，这种技术用于含有部分序列信息的特殊PCR片段中。原理是将目的基因片段PCR扩增后，将扩增产物用一种或数种限制性内切酶消化，不同的基因序列会产生不同的消化产物，然后将消化产物－限制性片段用琼脂糖凝胶电泳分析，经溴化乙锭染色后在紫外光下进行检测。PCR-RFLP快速而简便，费用相对较低。

这项技术已经应用于一些加工海产品的鉴别[16]。这项技术在种类鉴定应用中的最大问题是不能确定未研究的种类具有特异的RFLP图谱，也就是说新品种的图谱可能与以前研究的种类图谱相同。

寡核苷酸链接检测法（Oligonucleotide Ligation Assay，OLA）

本技术用连接酶将两个DNA探针链接到DNA链上。一个探针用荧光染色剂标记。DNA探针必须可以使含有特殊位点或序列的DNA退火。如果探针和DNA链匹配度差则不会产生连接产物。此技术应用于检测和识别市场中的鲸鱼种类。研究显示在冷冻和罐装产品中，这种技术的准确率是86.9%[17]。尽管此种方法快速准确，但其设备昂贵。

DNA探针

DNA探针是最常用的核酸探针，指长度在几百碱基对以上的双链DNA或单链DNA探针。在已知的DNA或RNA片段上加可识别的标记，与未知种类DNA杂交（如32P同位素标记、生物素标记），用以检测未知样品与已知序列的同源程度。但这种方法并不能很好的作用于关系相近的种类。

发展趋势

目前，没有用于鉴定鱼类品种的商业方法。因为鱼类品种复杂且种源关系相近。我们遇到的问题是如何辨别具有相同基因及相同科的鱼类。在其他产品方面，如肉品种类鉴定中，快速DNA方法的应用推进了快速试剂盒的产生。基于DNA鉴别动物品种的试剂盒已经出现在市场上，如“DNAnimal BOS Ident”“SureFood ID-Animal”。这些试剂盒原理包括DNA探针杂交和ELISA检测方法。另外寡核苷酸探针阵列技术也应用于种类鉴定。但仍没有发现用于鱼类品种鉴定的试剂盒产生。

所以研究者要致力于建立一种可以广泛应用于工业、试验研究甚至是可以被消费者应用的检测方法。

参考文献

[1] 李建武，余瑞元，袁明秀等.(2000).生物化学试验原理和方法[M].北京：北京大学出版社，74～75.

[2] 高泽霞，王卫民，周小云.(2007).DNA分子标记技术及其在水产动物遗传上的应用研究[J].生物技术通报，2：108～113.

[3] 王晓辉，刘桂林.(2003).DNA分子标记技术[J].畜禽业，6：50～51.

[4] 王凯，韦善忠，罗江等.(2003).DNA分子标记及其进展[J].黑龙江八一农垦大学学报，15(1)：39～43.

万方数据

[6] Mullis K.B.(1990).The origin of the polymerase chain reaction.Scient.Am.262:56～65.

[7] Mullis K.B,Fallona F.A.(1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Meth.Enzymol.155:335～50.

[8] Williams JCK.,Kuberlik AR.,Livak K J.(1990).DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers [J].Nucleic Acids Res,18:6531～6537.

[9] Mart í neze I.,Dan í elsd ó ttir A.K.2000.Identification of marine mammal species in food products.J. Sci.Food Agric.80:527～33.

[10] Mart í neze I.(1997).DNA typing of fish products for species identification. In Seafood from producer to consumer,integrated approach to quality.Luten J.B., Brrensen T.and Oehlenshlger J.(eds),pp.497～506. Developments in Food Science,38,Elsevier,Amsterdam.

[11] 姚纪花,楼允东.(2000)三种群银鲫的RAPD分析初报[J].上海水产大学学报,9(1):11～14.

[12] 齐向辉,史进文,贾志斌.(2003).DNA分子标记简介[J].河北林业科技,2:46～48.

[13] Rehbein H.,Mackie I.M.,Pryde S.,et al (1998). Comparison of different methods to produce single—stand DNA for identification of canned tuna by single stand. conformation polymorphism analysis.Electrophoresis 19: 1381～4.

[14] Congiu L.,Dupanloup I.,Patarnello T.(2001).Identification of interspecific hybrids by AFLP:the case of sturgeons[J].Mol,Ecol,10(9):2355～2359.

[15] Wang,Z.Y.,Tsoi K.H.,Chu K.H.(2004)Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp[J].Biochemical System atics and Ecology,32(4):399～407.

[16] Quinteiro J.,Sotelo C,G.,Rehbein H.(1998).Use of mtDNA direct polymerase chain reaction(PCR) sequencing and PCR—restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna[J].J. Agric.Food Chem,46:1662～1669.

[17] Cipriano F.,Palumbi S.R.(1999).Rapid genotyping techniques for identification of species and stock identity in fresh,frozen,cooked and canned whale products. Report to the Science Committee,International Whaling Commission SC/51/09.

冷却肉专题研究——征稿启事

《肉类研究》计划于2008年初编辑出版一期冷却肉专题研究专号，现诚邀国内冷却肉研究专家、学者执笔赐稿。

近十年随着国民经济的飞速发展，肉类行业尤其是冷却肉的加工技术与产品消费已发生了翻天覆地的变化。从1997年河南双汇在市场推出冷却肉肇始，有关的技术研究成果与发表的论文层出不穷。

拟出版的冷却肉专号目的在于梳理既有的研究成果；指引今后的发展方向；厘清重要的概念，如“成熟”、“酸化”、“冷却”、“二次冷却工艺”等；解读新技术的应用状况，如“气调包装”、“高静压杀菌”、“高压脉冲电场处理”、“终端营销技巧”等。注意事项如下：

1 论文内容　冷却肉的质量、安全、冷却工艺、流通技术、保藏技术、微生物控制、营销……

2 体裁字数　综述与实验研究均可，6000～8000字为宜

3 论文格式　本刊现行标准

4 进度安排　自定题目，于2008年1月15日前提交论文

5 投稿信箱　meat_research@126.com

《肉类研究》编辑部

2007年12月

万方数据