

# 鳕鱼及其制品中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分检测

BJS 201907

## 1 范围

本方法规定了鳕鱼及其制品中裸盖鱼（*Anoplopoma fimbria*）、油鱼（*Lepidocybium flavobrunneum*, *Ruvettus pretiosus*）和南极犬牙鱼（*Dissostichus eleginoides*, *Dissostichus mawsoni*）源性成分的实时荧光PCR检测方法。

本方法适用于鳕鱼、鳕鱼片、鳕鱼扒等生鲜或速冻鳕鱼产品（不包含鱼丸、鱼糕、鱼饼、鱼肠、鱼豆腐、鱼肝油等加工产品）中裸盖鱼、油鱼和南极犬牙鱼源性成分的定性检测。

## 2 原理

使用商业化DNA提取试剂盒，获得适用于实时荧光PCR检测的DNA。分别使用裸盖鱼、油鱼或南极犬牙鱼特异性引物探针，通过实时荧光PCR反应，获得Ct值，根据Ct值判断样品是否检出裸盖鱼、油鱼或南极犬牙鱼源性成分。

## 3 试剂和材料

除另有规定外，本方法中所用试剂均为分析纯，水应符合GB/T 6682的一级水要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

### 3.1 引物探针序列

#### 3.1.1 裸盖鱼源性成分 *NADH<sub>2</sub>* 基因

裸盖鱼源成分5'端引物：5'-AGGGACCACCCTAACATTCG-3'

裸盖鱼源性成分3'端引物：5'-GTGGGTGGTGATGCTGTGCT-3'

裸盖鱼源性成分探针：5'-FAM-CAGCTCTCACTGACTACTCGCATGA-BHQ1-3'

#### 3.1.2 油鱼源性成分 *Cytb* 基因

油鱼源性成分5'端引物：5'-TAACTTCGGATGACTCATCCG-3'

油鱼源性成分3'端引物：5'-AGTAAAGGCCTCGTCCAATGT-3'

油鱼源性成分探针：5'-FAM-CATCCGAAACCTTCATGCAAACGGC-BHQ1-3'

#### 3.1.3 南极犬牙鱼源性成分 *CK* 基因

南极犬牙鱼源性成分5'端引物：5'-CTGAATATGTAGGTGCATACG-3'

南极犬牙鱼源性成分3'端引物：5'-TTGCTCTTTGTGTTTCGGTT-3'

南极犬牙鱼源性成分探针：5'-FAM-TCCATTAGGTAAGCGAGCGGGAAGA-BHQ1-3'

#### 3.1.4 内参照基因真核生物 18SrRNA

内参照5'端引物：5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'

内参照3'端引物：5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'

内参照探针：5'-FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-BHQ1-3'

3.2 商业化 DNA 提取试剂盒。

3.3 商业化 PCR 反应预混液。

## 4 仪器和设备

4.1 实时荧光 PCR 仪。

4.2 微量紫外分光光度计。

4.3 恒温水浴锅。

4.4 高速冷冻离心机：离心力 18,000 g 以上。

4.5 微量移液器 (0.5  $\mu$ L– 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ L– 100  $\mu$ L, 20  $\mu$ L– 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L– 1000  $\mu$ L)。

4.6 涡旋振荡器。

4.7 天平：感量 0.001 g。

## 5 分析步骤

### 5.1 样品前处理

(1) 样品只有单块鱼肉组成：使用灭菌剪刀适量剪取中心部位鱼肉。

(2) 样品有五块以下鱼肉组成：使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。

(3) 样品有五块以上鱼肉组成：随机挑选5块鱼肉，使用灭菌剪刀适量剪取每个组成部分的中心部位鱼肉。

将所取得的鱼肉使用灭菌去离子水洗涤，离心去除上清液，尽可能剪碎并混匀。

注：速冻鳕鱼产品应在完全解冻后再取样。

### 5.2 DNA 提取

按照商业化DNA提取试剂盒说明书中要求的取样量称取样品，每个样品设置两个平行，按照商业化DNA提取试剂盒说明书操作。

### 5.3 DNA 浓度测定

取 1  $\mu$ L DNA 溶液，使用微量紫外分光光度计按照 dsDNA (双链 DNA) 计算方式检测其浓度。

### 5.4 实时荧光 PCR 扩增

实时荧光 PCR 反应体系见表 1。

表1 实时荧光PCR反应体系

PCR 预混液 (2 $\times$ )	10 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 上游引物	0.4 $\mu$ L

10 μmol/L 下游引物	0.4 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μL
DNA	20-50 ng
灭菌去离子水	补充至总体积 20 μL

PCR反应程序：95 °C 15 s； 95 °C 5 s， 60 °C 34 s（读取荧光），40个循环。

### 5.5 实验对照

分别设置阳性对照、阴性对照、PCR空白对照、空白提取对照各一个。

阳性对照：含相应物种的DNA。

阴性对照：不含相应物种的DNA。

PCR空白对照：以灭菌去离子水替代DNA加入实时荧光PCR反应体系。

空白提取对照：以灭菌去离子水替代样品进行DNA提取。

## 6 结果判断与表述

### 6.1 质量控制

若以下条件的其中一条不满足要求时，结果视为无效：

阳性对照：荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值<30.0；

阴性对照：Ct值≥35.0；

PCR空白对照：Ct值≥35.0；

空白提取对照：Ct值≥35.0；

内参照反应：荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值<30.0；

样品平行反应：Ct值经6.2结果判定后应一致。

### 6.2 结果判定

（1）如Ct值<30.0，且质量控制符合要求，则判定为检出相应物种源性成分。

（2）如Ct值≥30.0，且质量控制符合要求，则判定为未检出相应物种源性成分。

### 6.3 结果表述

检出 XXX 源性成分。

未检出 XXX 源性成分。

## 7 防污染措施

检测过程中放置交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

## 8 方法检出限

裸盖鱼引物探针检出限范围为0.1%~5%，油鱼引物探针检出限范围为1%~10%，南极犬牙鱼引物探针检出限范围为1%~2%。

注：因使用的设备、试剂盒不同，其检出限有所差异。

本方法负责起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

验证单位：河南省产品质量监督检验院、天津市食品安全检测技术研究院、重庆市食品药品检验检测研究院、福建省食品药品质量检验研究院、广东省食品检验所。

主要起草人：林霖、张世伟、吴佳辉、王坤、杨国武、杨俊。