

应用微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法 鉴别大西洋鲑与虹鳟

MultiNA-024

摘要： 本文利用动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取大西洋鲑和虹鳟的基因组 DNA，设计品种特异性引物进行 PCR 扩增，应用微芯片电泳仪 MultiNA 检测扩增产物，结果显示大西洋鲑和虹鳟的引物分别只对本品种的基因组有响应，电泳凝胶图上显示出与理论尺寸相符的特异性条带，而对另外一个品种则无响应。本实验表明基于微芯片电泳仪 MultiNA 开发的方法可以快速实现大西洋鲑和虹鳟的鉴别。

关键词： MultiNA PCR 品种鉴定 大西洋鲑 虹鳟

三文鱼是“Salmon”的音译，原本指鲑属的大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) (见表 1)，为海水鱼。随着养殖业的发展，部分商家也将太平洋鲑等鱼类当作“三文鱼”进行出售，如虹鳟。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)，是鲑科太平洋鲑属 (又称大麻哈鱼属) 的一种 (见表 1)，多为淡水养殖，直接生食可能为人体健康带来潜在风险。大西洋鲑和虹鳟的鱼肉组

织外观相似，难以通过感官识别准确区分，需要开发更加特异可靠的方法进行品种鉴别。

为此，这里应用 PCR 方法，结合岛津自动化高分辨率的微芯片电泳仪 MultiNA 对大西洋鲑和虹鳟进行了鉴定。此方法操作简单，特异性高，可快速实现食品品种的鉴定。

表 1 大西洋鲑与虹鳟的科属种生物分类

名称	科	属	种
大西洋鲑	<i>Salmonidae</i> (鲑科)	<i>Salmo</i> (鲑属)	<i>Salmo salar</i> (大西洋鲑)
虹鳟	<i>Salmonidae</i> (鲑科)	<i>Oncorhynchus</i> (太平洋鲑属)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (虹鳟)

实验部分

1.1 仪器

微芯片电泳仪 MultiNA

1.2 试剂

动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (碧云天, D0065S)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程(大连)有限公司, RR820A)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (Shimadzu, 292-27910-91)

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

样品: 大西洋鲑鱼、虹鳟鱼的鱼肉组织

引物: 根据线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (COI) 分别设计大西洋鲑鱼与虹鳟鱼的特异性引物, 理论产物大小分别为 243 bp 和 314 bp。

1.3 分析条件

DNA-500 on-chip。

1.4 实验方法

取少量鱼肉组织，剪碎后采用动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA，利用两种品种特异性引物分别进行 PCR 扩增反应，PCR 反应体系及反应条件分别见表 2 及表 3。PCR 产物进入微芯片电泳仪 MultiNA 进行测定。根据理论产物片段大小，扩增产物选用 DNA-500 的试剂盒进行测定。

表 2 PCR 反应体系

反应试剂	使用量 (μL)
SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)	10
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8
模板 (消化产物)	0.2
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	8.2
总体积	20

表 3 PCR 反应条件

作用	温度 / °C	时间
预变性	95	30 s
扩增 (30 个循环)		
变性	94	30 s
退火	59	30 s
延伸	72	45 s
循环后延伸	72	5 min

结果讨论

使用品种特异性引物进行 PCR 扩增后，应用微芯片电泳 MultiNA 对扩增产物进行检测，检测结果见图 1。由图可知，使用大西洋鲑特异性引物对样品进行 PCR 扩增和电泳检测后，大西洋鲑检测到明显条带，尺寸为 244 bp，与理论值 243 bp 相符（方法误差为 ±5%），而虹鳟无扩增条带，验证了引物的特异性；同样，使用虹鳟特异性引物对样品进行检测，虹鳟样品在凝胶图上有显著条带，电泳图显示出 319 bp 的信号峰，与理论值 314 bp 相符，而大西洋鲑对虹鳟引物则无响应。以上说明利用两种品种特异性引物，成功鉴别大西洋鲑与虹鳟。

将大西洋鲑与虹鳟样品进行人为掺混，使用两种引物的混合引物进行检测，同时检测到了大西洋鲑与虹鳟的信号峰，说明该方法可以同时实现大西洋鲑与虹鳟的鉴别。

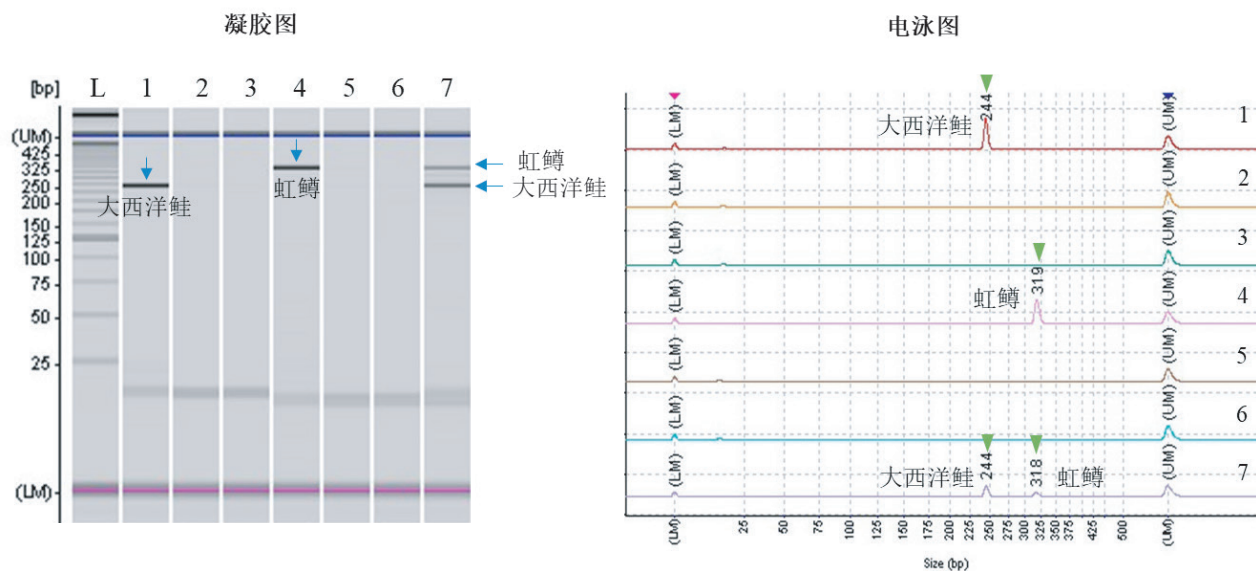


图1 微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物的结果

注: L: ladder; 1: 大西洋鲑引物 + 大西洋鲑样品; 2: 大西洋鲑引物 + 虹鳟样品; 3: 大西洋鲑引物 + 水;
4: 虹鳟引物 + 虹鳟样品; 5: 虹鳟引物 + 大西洋鲑样品; 6: 虹鳟引物 + 水; 7: 大西洋鲑、虹鳟的混合引物扩增大西洋鲑、虹鳟的混合样品。

■ 结论

本文基于分子生物学技术, 采用岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 成功建立了鉴别大西洋鲑和虹鳟的方法。此方法高效、灵敏、检测特异性高、操作简便, 是市场上易混淆三文鱼品种的鉴别利器。