



鱼类分子生物学物种鉴定技术

主 编◎ 陈双雅 陈伟玲 徐敦明 张 津 周 昱



厦门大学出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

鱼类分子生物学物种鉴定技术

主 编◎ 陈双雅 陈伟玲 徐敦明 张 津 周 昱

编写组成员 (按姓氏笔画):

王群力	王嘉鹤	刘 棠	刘圆圆
齐 欣	陶平平	许秋贝	李晓燕
张 津	张永祥	陈双雅	陈伟玲
陈苏鸿	陈灿祥	周 昱	徐敦明
黄大亮	彭小莉	谢明星	



厦门大学出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

鱼类分子生物学物种鉴定技术/陈双雅等主编. —厦门:厦门大学出版社, 2012. 9
ISBN 978-7-5615-4346-7

I. ①鱼… II. ①陈… III. ①鱼种-鉴定 IV. ①S962

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 232085 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门市软件园二期望海路 39 号 邮编:361008)

<http://www.xmupress.com>

xmup@xmupress.com

厦门集大印刷厂印刷

2012 年 9 月第 1 版 2012 年 9 月第 1 次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:12

插页:6 字数:203 千字

定价:28.00 元

本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换

序

物种鉴定是关系食品安全、质量、品质和营养等诸多方面的重要问题。物种来源不明的食品有可能因为含有过敏原成分和有毒成分而带给消费者巨大的食品安全风险；另外，由于不同鱼种的价值差异，错误标签和以次充好的现象也时有发生，因此，需要一些快速、可靠、重复性高的物种鉴定方法来保障市场的监管行为。欧洲委员会第 104/2000 条例和我国《预包装食品标签通则》都要求产品标识真实属性的专用名称，FDA《水产品危害及控制指南》第四版（2011）要求水产品标签必须使用 FDA 可接受销售鱼种名录中的名称。因此，准确、快速地鉴别鱼类物种问题显得尤为重要。

本书介绍的鱼类物种鉴定技术，是以不同物种的遗传密码的多态性为基础的分子生物学新技术，这些技术具有灵敏、准确、操作简便的特点，在鱼类物种鉴定方面有广泛的应用前景。

《鱼类分子生物学物种鉴定技术》系统地探讨了鱼类物种鉴定的分子生物学技术理论和实践操作，为鱼类的物种鉴定提供了有效的技术方法参考。本书的出版，将成为我国水产品检测中难得的指导文献，对我国食品进出口贸易的健康发展起到积极的作用。



中国科学院院士

2012 年 5 月

前 言

随着水产品贸易的快速发展,某些贸易商为了追求经济利益,将一些价值低廉的海产品掺杂在价值高昂的海产品中,以次充好、鱼目混珠,严重影响了国内外贸易的正常秩序。针对这一现象,美国、加拿大和欧盟成员国等国家已陆续开始对鱼类和甲壳类水产品实施物种 DNA 检验,以此最大限度地预防和消除商业中的掺假和欺骗行为,打击水产品标识不实现象,保护消费者的健康和利益。因此,水产品物种鉴定技术水平已成为水产品产业的重要保障。

本书旨在为鱼类物种鉴定的技术人员提供先进的分子生物学技术理论指导和实用的检测方法,主要内容和材料来源于国内外文献资料和国家、省部级课题研究成果等。

本书系统地反映了目前鱼类物种鉴定中常用的分子生物学鉴定技术。全书共分八章。第一章概述鱼类物种鉴定的分子生物学技术及网络信息资源;第二章介绍了鱼类物种鉴定的样品处理技术;第三章是 DNA 条形码技术在鱼类物种鉴定中的应用研究;第四章是指纹图谱技术在鱼类物种鉴定中的研究成果;第五章是物种特异性 PCR 技术在鱼类物种鉴定中的应用;第六章和第七章分别介绍了鱼类物种鉴定的蛋白质技术和芯片技术;第八章介绍了美国和欧盟关于鱼类产品标识管理相关的政策法规和措施。本书不仅有方法的概述,还提供了一些实例作为参考,具有较强的实用



性,适合作为水产种质资源管理人员、科研人员及相关专业学生的参考书。

由于时间仓促和水平有限,本书中恐有不当和错误之处,恳请广大读者批评指正。

编者

2012年5月

目 录

CONTENTS

第一章 鱼类物种鉴定的分子生物学技术概况	1
第一节 鱼类物种鉴定的分子生物学技术	1
一、蛋白质检测技术	1
二、DNA 检测技术	2
第二节 鱼类物种鉴定的遗传物质选择	2
一、线粒体 DNA	2
二、核 DNA	3
三、卫星 DNA	4
第三节 PCR 引物	4
一、通用引物	5
二、物种特异性引物	5
第四节 网络信息资源在鱼类物种鉴定中的应用	5
第二章 鱼类物种鉴定的样品处理技术	8
第一节 DNA 的提取和纯化	8
一、DNA 的提取	8
二、DNA 的纯化	10
第二节 蛋白质的提取和纯化	10
一、细胞的破碎	11
二、蛋白质的提取	12
三、蛋白质的分离纯化	13
四、鱼肌肉蛋白的提取实例	15
第三章 鱼类物种鉴定的 DNA 条形码技术	17
第一节 DNA 条形码技术的基本原理	17
一、DNA 条形码	17



二、DNA 条形码技术的靶基因	18
三、DNA 条形码技术的基本原理	19
第二节 DNA 条形码技术的基本操作流程	20
一、试剂和设备	20
二、基本操作流程	21
第三节 DNA 条形码在鱼类物种鉴定中的应用	22
一、DNA 条形码在鱼类研究中的应用概况	23
二、DNA 条形码对于鱼类分类学的意义及可行性	24
三、DNA 条形码在中国鱼类分类学研究中的应用实例	25
四、DNA 条形码技术的问题与展望	26
五、16S rRNA 基因和 COI 基因序列分析在石斑鱼物种鉴定中 的应用	26
第四章 鱼类物种鉴定的 DNA 指纹图谱技术	35
第一节 基于 PCR 的 DNA 指纹图谱技术概述	35
一、DNA 指纹图谱技术的发展	35
二、DNA 指纹图谱技术的特点	36
第二节 PCR-RFLP 技术	36
一、PCR-RFLP 技术鉴定鱼种的基本原理	37
二、PCR-RFLP 技术的基本操作流程	37
三、Lab-on-a-chip 毛细管电泳 (Lab-on-a-chip capillary electrophoresis, Lab-on-a-chip CE)	39
四、PCR-RFLP 技术在主要经济鱼类物种鉴定中的应用	42
五、PCR-RFLP 商业化鱼种鉴定试剂盒	43
六、台湾海峡常见石斑鱼的 PCR-RFLP 鉴定方法	45
七、渤海地区常见经济鱼类的 PCR-RFLP 鉴定方法	48
第三节 PCR-SSCP 技术	49
一、PCR-SSCP 技术的基本原理	49
二、PCR-SSCP 技术的基本操作流程	50
三、PCR-SSCP 技术的注意事项	51
四、PCR-SSCP 技术在鱼种鉴定中的应用	52
第四节 PCR-RAPD 技术	53
一、PCR-RAPD 技术的基本原理	53

二、PCR-RAPD 技术的基本操作流程	55
三、PCR-RAPD 技术的注意事项	56
四、PCR-RAPD 技术在鱼种鉴定中的应用	57
第五节 PCR-AFLP 技术	58
一、PCR-AFLP 技术的基本原理	58
二、AFLP 分子标记的特点	59
三、PCR-AFLP 技术的基本操作流程	60
四、PCR-AFLP 在鱼种鉴定中的应用	61
第五章 鱼种鉴定的定性 PCR 检测技术	63
第一节 PCR 检测技术概述	63
一、PCR 技术的基本原理	63
二、PCR 技术的特点	64
三、鱼类物种鉴定的主要 PCR 技术类型	64
四、PCR 技术鉴定鱼种的注意事项	65
五、PCR 技术在鱼种鉴定中的应用	71
第二节 鱼类物种鉴定的普通 PCR 检测流程	73
一、基本操作流程	73
二、试剂和设备	74
三、DNA 的提取	74
四、PCR 反应	74
五、结果分析	75
第三节 鱼种鉴定的实时荧光 PCR 检测流程	76
一、基本操作流程	76
二、试剂和设备	76
三、DNA 的提取	77
四、实时荧光 PCR 反应	77
五、结果分析	78
六、台湾海峡 10 种石斑鱼的荧光 PCR 检测方法	79
第四节 鱼类物种鉴定的 DNA 检测方法比较	83
第六章 鱼种鉴定的蛋白质检测技术	85
第一节 样品种类与蛋白质检测方法的选择	85
一、生加工鱼产品	85



二、混合粗加工鱼产品	86
三、加工鱼制品	87
四、罐装灭菌鱼制品	87
第二节 同工酶电泳技术	88
一、同工酶电泳技术的研究历史及现状	88
二、同工酶电泳技术在鱼种鉴定中的应用	88
三、同工酶电泳的实验方法	89
第三节 蛋白质组学技术	90
一、蛋白质组学技术概述	90
二、蛋白质组学的基本实验技术	91
第四节 蛋白质毛细管电泳技术	94
一、毛细管电泳的基本原理	94
二、毛细管电泳类型	94
三、毛细管电泳的基本操作流程	96
四、毛细管电泳技术的优缺点	97
第五节 酶联免疫技术	97
一、ELISA 方法的基本原理	98
二、ELISA 中用于标记的酶	98
三、抗体的酶标记方法及标记效果测定	99
四、ELISA 方法的基本步骤及类型	100
五、ELISA 方法在鱼种鉴定中的应用	101
第七章 鱼种鉴定的生物芯片技术	102
一、基因芯片技术	102
二、蛋白质芯片技术	105
三、液相芯片技术	109
四、生物芯片技术发展趋势与展望	112
第八章 水产品标签的管理和措施	113
第一节 美国关于水产品标签的法规和措施	113
一、FDA 法规要求	113
二、FDA 鱼种鉴定的 DNA 条形码标准操作程序简介	113
第二节 欧盟关于水产品标签的法规和措施	116
一、欧盟法规要求	116

二、欧盟鱼种鉴定的技术方法和关键因素	117
三、欧盟鱼种鉴定方法的适用性	118
四、欧盟经确认的鱼种鉴定方法	118
五、鱼种鉴定的参考物质和试剂盒	118
附 I 鱼类分类系统	119
附 II FDA 海产品名录(2011)	121
参考文献	170



第一章

鱼类物种鉴定的分子生物学技术概况

第一节 鱼类物种鉴定的分子生物学技术

随着经济的发展和人们生活水平的进步,食品安全问题成为人们关注的重中之重。其中,物种的鉴定是关系食品安全、质量、品质和营养等诸多方面的重要问题。物种来源不明的食品有可能因为含有过敏原成分和有毒成分而带给消费者巨大的食品安全风险;另外,由于不同鱼种的价值差异巨大,错误标签和以次充好的现象也时有发生,因此,需要一些快速、可靠、重复性高的物种鉴定方法来保障市场的监管行为。欧洲委员会第 104/2000 条例和我国《预包装食品标签通则》都要求产品标识真实属性的专用名称,FDA《水产品危害及控制指南》第四版(2011)要求水产品标签必须使用 FDA 可接受销售鱼种名录中的名称。因此,准确、快速地鉴别鱼类物种问题显得尤为重要。

鱼类的物种鉴定,已从形态学方法发展到目前广泛应用的分子生物学方法。形态学鉴定适合整条鱼的物种鉴定,但是,一旦进行了切片、鱼肉绞碎等加工,原本的形态学特征缺失以后,鉴定将变得很困难。

目前鱼类物种鉴定中广泛应用的分子生物学方法主要是 DNA 检测方法和蛋白质检测方法。

一、蛋白质检测技术

蛋白质检测方法主要采用等电聚焦电泳、毛细管电泳、酶联免疫吸附和高效液相色谱等技术。蛋白质检测方法通常适用于新鲜的或冰冻的组织,而通过加热、高压和辐射加工过的鱼组织,由于蛋白质的生化特性及结构完整性被破坏,因此通常不使用蛋白检测方法进行鉴定。酶联免疫吸附法可以分析经过高温处理的样品,但该方法的不足是需要开发更多特异性高的抗体用于区



分亲缘关系较近鱼类,而且检测灵敏度较低。

二、DNA 检测技术

DNA 检测方法由于其特异性好、灵敏度高、操作简便等原因已成为物种鉴定的主要检测方法。首先,DNA 在细胞中含量相对稳定,比蛋白质耐热,在产品的加工过程中也相对不容易被破坏,从加工产品中仍能提取出足够可供分析的小片段 DNA;其次,DNA 信息量大,物种的差异直接反映在 DNA 序列的差异上。可以根据 DNA 上不同区域、基因、片段的进化特点选择适合的靶基因进行检测;第三,DNA 的序列稳定,不同组织类型、年龄和状态影响不大;第四,由于基因技术的发展,目前的 DNA 检测技术可以发现含量低至几个拷贝的基因,使分析水平从常量水平发展到痕量水平;第五,各类高精尖仪器的研发使得检测时间大大缩短,操作也更为便捷。自动化检测更是有助于提高操作的精确度,防止交叉污染和有害有毒物质的损害。

鱼种鉴定常用的 DNA 检测方法主要包括两类,一类是直接通过物种特异性聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)或实时荧光 PCR 技术进行物种鉴定;另一类则是先用通用引物进行 PCR 扩增,然后对 PCR 产物进行 DNA 序列分析及指纹分析以鉴定物种。

具体的检测步骤是首先提取 DNA,利用 PCR 扩增目标 DNA 片段,然后分析 PCR 扩增产物。

第二节 鱼类物种鉴定的遗传物质选择

目前所使用的大多数基因检测技术是使用 PCR 扩增目标 DNA。DNA 的完整性和来源等性质是选择目标 DNA 片段的重要决定因素,此外还受 DNA 变异率和序列长度的影响。鉴定鱼种可以使用核 DNA(nuclear DNA, nDNA)或线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)。

一、线粒体 DNA

动物 mtDNA 包括一个主要非编码区、13 个蛋白质编码基因、22 个转移核糖核酸编码基因(tRNA)和 2 个核糖体核糖核酸编码基因(rRNA)。

mtDNA 与 nDNA 比较有下列主要优点:

1. 与 nDNA 相比, mtDNA 相对简单而且长度小, 没有大的非编码序列(内含子)、假基因、重复序列和转位因子;

2. mtDNA 相对容易被提取;

3. mtDNA 不进行基因重组;

4. 避免了杂合子的产生。

此外, 母体遗传的 mtDNA 拷贝数更多, 变异率更快, 更适用于研究遗传分化和种间种内的差异。由于 mtDNA 在遗传研究中被广泛使用, 研究人员已经设计了许多鱼类的通用引物, 为鱼种鉴定的 PCR 扩增提供了资料。

采用 mtDNA 还是 nDNA 要取决于目的 DNA 片段的完整性。对于罐头样品而言, DNA 经过热处理会断裂成约 100 bp 至 500 bp 的片段, 由于 mtDNA 含量更丰富, 且环状结构比 nDNA 更加耐热, 不易降解, 在这种情况下, mtDNA 更适宜用于鱼种鉴定。

最常见用于物种鉴定研究的 mtDNA 基因是线粒体细胞色素 b 基因(mt cyt b)。mt cyt b 具有相对高的种间差异和较低的种内差异, 能够鉴别亲缘关系较近的物种。

其他用于物种鉴定的常见 mtDNA 基因还有有 12S rRNA 基因和较大的 16S rRNA 基因, 都有用于鉴定鳊鱼、鳙鱼、天竺鲷、鲭鱼、带鱼等鱼种的报道。由于具有适当的长度和变异率, 在数据库中也有相应的序列信息, 线粒体 12S rRNA 基因被认为是鱼种鉴定中较好的目的基因。虽然该基因比蛋白质编码基因保守, 但仍含有足够的信息用于种内物种鉴定。

除了 mt cyt b 和 rRNA 基因以外, 还有少量文献报道了几个被用于鱼种鉴定的其他 mtDNA 基因, 例如细胞色素氧化酶活性基因编码 III 和 ATPase 基因等。

二、核 DNA

虽然 mtDNA 在物种鉴定研究中较有优势, 但许多 nDNA 基因也被证明可以成功鉴定鱼种, 如核 5S rRNA 基因已经被用来识别鲭鱼、鳕鱼、大马哈鱼、鲨鱼等。该基因由一个 120 bp 的 5S rRNA 编码区、一个非编码基因可变区和一个非转录间隔区(NTS)组成。由于核 5S rRNA 变异率高, 可以通过分析 5S rRNA 基因 PCR 扩增产物的电泳片段长度来鉴定物种, 而不需要进行进一步序列分析或 RFLP 分析。

此外, 用于物种鉴定的其他 nDNA 标记包括 p53 基因、核糖体内转录间



隔区 2(ITS2)、18S rRNA 基因、 α -actin 编码基因、主要组织相容性复合体 class II 基因(MHC)等。这些基因用于物种鉴定的报道主要基于 DNA 水平上种特异性的序列差异,如 p53 基因被用于鉴别大西洋鲑鱼和虹鳟,位于 5.8S 和 28S rRNA 之间的 ITS2 基因被用来区分 6 种常见鲨鱼,MHC II 被用来鉴定鲑鱼品种等。

三、卫星 DNA

除了上述基因,nDNA 还包含一些串联重复 DNA 片段,这些 DNA 片段遍布整个基因组,表现出高度的多态性。这些 DNA 片段或者富含 A 和 T(腺嘌呤和胸腺嘧啶),或者富含 G 和 C(鸟嘌呤和胞嘧啶),根据片段的长度和重复序列的位置可分为 3 类:

1. 卫星 DNA(satellite DNA),由长的几百个核苷酸的单元重复组成,在着丝粒上成簇分布;

2. 小卫星 DNA(minisatellite DNA),由较小的重复序列(9~65 nt)组成,分散在整个核 DNA 中;

3. 微卫星 DNA(microsatellite DNA),又称简单重复序列(simple sequence repeats,SSRs),由 2 至 8 个核苷酸对的序列重复组成,分散在整个基因组中。

微卫星 DNA 是继 RFLP(限制性片段长度多态性)之后的新一代遗传标记。特定位点重复片段(100 bp)的多态性可以用于鉴定不同个体。具体方法是,设计出扩增特异片段的引物,进行 PCR 扩增,使用凝胶电泳分离,揭示个体间的差异。

小卫星 DNA 和微卫星 DNA 由于变异率高,又称为数目可变串联重复序列(variable number of tandem repeats,VNTR),已被证明可以用于群体遗传学研究。VNTR 方法具有较高的灵敏度和操作时间短的优点,用于鱼种鉴定很有优势。已有文献报道应用 VNTR 区分鳊鱼物种、鉴定鱼子酱中的鲟鱼、区分野生和养殖的美国红鱼、鉴别太平洋大马哈鱼。

第三节 PCR 引物

PCR 引物可分为通用引物和物种特异性引物,选择合适的引物是成功进

行鱼种鉴定的关键。

一、通用引物

通用引物一般根据种群普遍保守的 DNA 区域设计,可与这部分 DNA 序列在退火时结合,扩增的产物可显示种间的差异。

通用引物扩增的 PCR 产物可进行序列测定或进行指纹分析如 RFLP 等以鉴定物种。如:引物对 H15149AD/L14735 可扩增出 40 多种鱼的线粒体 cyt b 基因序列,随后用限制性酶酶切扩增产物便可鉴定鱼类物种。再如,可使用引物对的混合物进行细胞色素 C 氧化酶亚基 I(COI)基因片段的 PCR 扩增,再对扩增产物进行 DNA 条形码分析。

二、物种特异性引物

物种特异性引物一般是根据数据库中获得的目标物种的 DNA 序列设计,经 PCR 扩增出目的物种的相应的 DNA 片段,从而进行鱼种鉴定。该方法需要详细了解目标物种的 DNA 序列,直接用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物大小,无需其他的分析程序如 DNA 序列分析、RFLP 等,检测结果为目的物种“是”“否”存在。

实时荧光 PCR 则应用物种特异性引物和探针,如 TaqMan 探针,可以不需要使用凝胶电泳便能进行快速分析。

第四节 网络信息资源在鱼类物种鉴定中的应用

目前,大多数生物物种的检测分析依赖于 Genbank 数据库。Genbank 面向公众收集了大量物种基因的 DNA 序列,该数据库由生物技术信息中心(NCBI)建立,可由 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索。Genbank 资料库可自由访问、免费提供序列信息,但该数据库仍存在着物种信息错误、术语不一致和错误鉴定等问题。近年来,已经开发了多个鱼种鉴定的 DNA 检测网上资源。下面(表 1-1)将对这些数据库进行说明。

生命条形码联盟(the consortium for the barcoding of life,CBOL)(<http://www.barcoding.si.edu>)是致力于用 DNA 条形码进行生物物种鉴定的国际性组织,着重于提供所有生物物种的线粒体 COI 序列。该联盟为鱼类物



种鉴定设立了 FISH-BOL 数据库,目前提供了超过 4500 个鱼种条形码。

表 1-1 鱼类物种鉴定网络资源

数据库名称	网址
鱼类生命条形码数据库(FISH-BOL)	http://www.fishbol.org/
海洋生命条形码数据库(MarBOL)	http://www.marinebarcoding.org/
鱼类百科全书(RFE)	http://www.cfsan.fda.gov/frf/rfe.html
	http://active.inspection.gc.ca/scripts/fis-spoi/fplist
生命条形码系统(BOLD)	http://www.barcodinglife.org
鱼类溯源数据库(Fishtrace)	http://www.fishtrace.org
AZTI-TECNALIA 数据库(AZTI-TECNALIA)	http://www.azti.es/dna database
鱼类起源遗传学鉴定数据库 (genetics for identification of fish origin)	http://www.fishgen.jrc.it/welcome.php3

鱼百科全书(the regulatory fish encyclopedia, RFE)是 FDA 食品安全和应用营养中心(CFSAN)为了帮助政府官员和采购商提供正确的鉴定海产品的方法以及检测物种替代、防止经济欺诈而建立的。该数据库包括了美国多种重要经济鱼类详细的信息。每种鱼的具体数据特征在网上可随时查询,包括鱼的图像、地理分布、分类学特征、学名等。该组织目前正把这些鱼特有的蛋白质、DNA 信息发布到网上。RFE 项目有助于提供一个集中性数据库,为物种鉴定的形态学方法、蛋白检测方法和 DNA 检测方法提供技术资料,促进标签法的执行。

鱼类溯源数据库(fishtrace database)由来自欧洲不同机构的 53 名成员参与构建。FishTrace 数据库提供了许多欧洲常见鱼种的详细信息,并将位于不同染色体位置 and 不同进化速率的基因联合,如将 *cyt b* 基因和 *rhodopsin* (视紫红质基因)联合,信息量更大,物种鉴定的准确度更高。该数据库提供的在线工具,可以预测限制性内切酶切割位点,进行 BLAST 搜索,并构建系统发育树。

AZTI-TECNALIA 数据库(<http://www.azti.es/dna>)由欧洲、中东和非洲食品与饮料技术中心建立,主要是欧洲重要商业鱼类(鳀、鲭、无须鲹科、鲭科和鲷)的序列(如 *cyt b*、12S rRNA、16S rRNA、mt *cyt b*、D-loop 区和 tRNA-Val 等)信息。