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。

1. 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。

1. 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*NADH2*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。

1. 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 μL- 10 μL，10 μL- 100 μL，20 μL- 200 μL，100 μL- 1000 μL）。

4.6 涡旋振荡器。

4.7 天平：感量0.001 g。

1. 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 μL 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 ×） | 10 μL |
| 10 μmol/L上游引物 | 0.4 μL |
| 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 ℃ 15 s； 95 ℃ 5 s， 60 ℃ 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。

1. 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。

1. 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。

1. 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。