



# 中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3060—2023

## 鳕鱼品种的鉴定 实时荧光PCR法

Identification of cod fish species—Real-time PCR method

2023-04-11 发布

中华人民共和国农业农村部

发布





## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会(SAC/TC 156/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、日照健安检测技术服务有限公司、荣成泰祥食品股份有限公司、山东时进检测服务有限公司。

本文件主要起草人：姚琳、王联珠、曲梦、江艳华、郭莹莹、朱文嘉、柳淑芳、谭志军、张廷翠、杨青、李娜、蒋昕、毕迎斌。





## 鳕鱼品种的鉴定 实时荧光 PCR 法

### 1 范围

本文件描述了以实时荧光 PCR 法测定鳕鱼源性成分的原理、仪器设备、试剂和材料、样品制备、DNA 提取、DNA 纯度和浓度测定、测定方法、结果判定与表达、防污染措施。

本文件适用于鳕鱼及易混鱼产品的定性检测。包括太平洋鳕鱼(*Gadus macrocephalus*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)、绿青鳕(*Pollachius virens*)、蓝鳕(*Micromesistius poutassou*)、细鳞壮鳕(*Albatrossia pectoralis*)、狭鳕(*Theragra chalcogramma*)、阿根廷无须鳕(*Merluccius hubbsi*)等鳕鱼,以及棘鳞蛇鲭(*Ruvettus pretiosus*)、异鳞蛇鲭(*Lepidocybium flavobrunneum*)、小鳞南极犬牙鱼(*Dissostichus eleginoides*)、莫氏南极犬牙鱼(*Dissostichus mawsoni*)、裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)等鳕鱼易混品种。本文件不适用于混合样品。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.4 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

### 3 术语和定义

GB/T 19495.4 界定的术语和定义适用于本文件。

### 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清蛋白(bull serum albumin)

CO I:细胞色素氧化酶 I 亚基(cytochrome oxidase subunit I)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

Cyt b:细胞色素 b(cytochrome b)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DNase:脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease)

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

FAM:羧基荧光素(carboxy fluorescein)

IU:酶活国际单位(international unit)

MGB:小沟结合物(minor groove binder)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

ROX:羧基-X-罗丹明(carboxy-X-rhodamine)

SNP:单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism)

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

16SrRNA:16S 核糖体 RNA(16S ribosomal RNA)

18SrRNA:18S 核糖体 RNA(18S ribosomal RNA)

## 5 鳕鱼及其易混品种

### 5.1 鳕鱼

本文件中指鳕形目(Gadiformes)鱼类,主要指商业化捕捞、加工与贸易中常见的鳕科(Gadidae)、长尾鳕科(Macrouridae)、无须鳕科(Merlucciidae)的主要品种。

### 5.2 油鱼

本文件中指鲈形目带鲈科棘鳞蛇鲭属的棘鳞蛇鲭(*Ruvettus pretiosus*)及异鳞蛇鲭属的异鳞蛇鲭(*Lepidocybium flavobrunneum*)。切片后商品形态与鳕鱼类似,市场俗称油鱼。

### 5.3 银鳕鱼

本文件中指商业化捕捞、加工与贸易中常见的鲈形目南极鱼科犬牙南极鱼属的小鳞南极犬牙鱼(*Dissostichus eleginoides*)、莫氏南极犬牙鱼(*Dissostichus mawsoni*)、鲉形目黑鲉科裸盖鱼属的裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*),市场俗称银鳕鱼。裸盖鱼也俗称黑鳕鱼。

## 6 原理

针对鳕鱼及其易混品种的特异性基因片段设计引物与探针,通过分析实时荧光 PCR 扩增曲线与 Ct 值,对鳕鱼及其易混品种进行定性判定。

## 7 仪器设备

7.1 实时荧光 PCR 仪。

7.2 离心机:转速不小于 12 000 r/min。

7.3 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

7.4 天平:感量 0.001 g。

7.5 恒温水浴锅。

7.6 高压灭菌锅。

7.7 涡旋振荡器。

7.8 微量移液器。

## 8 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯;实验用水为 GB/T 6682 中规定的一级水;所用试剂、材料均不应含 DNA 和 DNase。

### 8.1 试剂

8.1.1 苯酚。

8.1.2 浓盐酸。

8.1.3 氯仿。

8.1.4 异戊醇。

8.1.5 异丙醇。

8.1.6 无水乙醇。

- 8.1.7 CTAB。
- 8.1.8 氯化钠。
- 8.1.9 Tris-base。
- 8.1.10  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 。
- 8.1.11 蛋白酶 K:40 IU/mg。
- 8.1.12 热启动 *Taq* DNA 聚合酶:5 IU/ $\mu\text{L}$ 。
- 8.1.13 氯化钾。
- 8.1.14 硫酸铵。
- 8.1.15 七水硫酸镁。
- 8.1.16 Triton X-100。
- 8.1.17 BSA。
- 8.1.18 dNTP。
- 8.1.19 dATP。
- 8.1.20 dCTP。
- 8.1.21 dGTP。
- 8.1.22 dTTP。
- 8.1.23 ROX。

## 8.2 溶液

- 8.2.1 200.0 mmol/L 氯化钾溶液:用 80 mL 水溶解 1.49 g 氯化钾(8.1.13)并定容至 100 mL,高压灭菌。
- 8.2.2 200.0 mmol/L 硫酸铵溶液:用 80 mL 水溶解 2.64 g 硫酸铵(8.1.14)并定容至 100 mL。
- 8.2.3 200.0 mmol/L 硫酸镁溶液:用 80 mL 水溶解 4.93 g 七水硫酸镁(8.1.15)并定容至 100 mL,高压灭菌。
- 8.2.4 200.0 mmol/L Tris-HCl 溶液:用 80 mL 水溶解 12.11 g Tris-base(8.1.9),用浓盐酸(8.1.2)调 pH 至 8.8,用水定容至 100 mL,高压灭菌。
- 8.2.5 2.0 mmol/L dATP 溶液:取 0.01 g dATP(8.1.19),用水溶解并定容至 10 mL。
- 8.2.6 2.0 mmol/L dCTP 溶液:取 0.01 g dCTP(8.1.20),用水溶解并定容至 10 mL。
- 8.2.7 2.0 mmol/L dGTP 溶液:取 0.01 g dGTP(8.1.21),用水溶解并定容至 10 mL。
- 8.2.8 2.0 mmol/L dTTP 溶液:取 0.01 g dTTP(8.1.22),用水溶解并定容至 10 mL。
- 8.2.9 2.0 mmol/L dNTP 溶液:取 2.5 mL 2.0 mmol/L dATP 溶液(8.2.5)、2.5 mL 2.0 mmol/L dCTP 溶液(8.2.6)、2.5 mL 2.0 mmol/L dGTP 溶液(8.2.7)与 2.5 mL 2.0 mmol/L dTTP 溶液(8.2.8)混匀。
- 8.2.10 70%乙醇:量取 70 mL 无水乙醇(8.1.6)与 30 mL 水混匀。
- 8.2.11 苯酚:氯仿:异戊醇混合液:量取 25 mL 苯酚(8.1.1)、24 mL 氯仿(8.1.3)与 1 mL 异戊醇(8.1.4)混匀,静置 12 h。
- 8.2.12 1% Triton X-100 溶液:取 100  $\mu\text{L}$  Triton X-100(8.1.16)与 9.9 mL 水混匀。
- 8.2.13 20 mg/mL BSA 溶液:取 0.2 g BSA(8.1.17)用水溶解并定容至 10 mL。
- 8.2.14 CTAB 裂解液:用 800 mL 水溶解 20.0 g CTAB(8.1.7)、81.8 g 氯化钠(8.1.8)、12.1 g Tris-base(8.1.9)、7.5 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ (8.1.10),调节 pH 至 8.0,用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。
- 8.2.15 CTAB 沉淀液:用 800 mL 水溶解 5.0 g CTAB(8.1.7)、2.34 g 氯化钠(8.1.8),用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。
- 8.2.16 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:用 4 mL 水溶解 0.1 g 蛋白酶 K(8.1.11),用水定容至 5 mL,分装后

保存于 $-18^{\circ}\text{C}$ ，避免反复冻融。

8.2.17 1.2 mol/L 氯化钠溶液：用 80 mL 水溶解 7.02 g 氯化钠(8.1.8)并定容至 100 mL，高压灭菌。

8.2.18 反应预混液(2×)：取 0.2  $\mu\text{L}$  热启动 *Taq* DNA 聚合酶(8.1.12)、1.4  $\mu\text{L}$  氯化钾溶液(8.2.1)、2.0  $\mu\text{L}$  硫酸铵溶液(8.2.2)、2.2  $\mu\text{L}$  硫酸镁溶液(8.2.3)、2.2  $\mu\text{L}$  Tris-HCl(8.2.4)、1.5  $\mu\text{L}$  Triton X-100(8.2.12)、1.2  $\mu\text{L}$  BSA 溶液(8.2.13)、1.2  $\mu\text{L}$  dNTP 溶液(8.2.9)，加水补足至 12.5  $\mu\text{L}$ 。部分实时荧光 PCR 仪需 ROX 校正，可按仪器生产厂家要求在反应预混液中添加。可使用等效的 SNP 分型商品化试剂盒。

### 8.3 引物与探针

引物与探针名称、序列等信息见附录 A。

## 9 样品制备

用灭菌手术刀(剪)，剖开整鱼或鱼块等样品，挖取未被污染的肌肉组织 1 g~2 g。用无菌研钵充分研磨试样至糜状。

## 10 DNA 提取

取 100 mg~200 mg 糜状样品至 2 mL 离心管中，加入 1 mL CTAB 裂解液(8.2.14)及 10  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 溶液(8.2.16)， $65^{\circ}\text{C}$  消化 2 h，每隔 30 min 振荡混匀一次。加入 700  $\mu\text{L}$  苯酚：氯仿：异戊醇混合液(8.2.11)，振荡混匀 30 s，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 650  $\mu\text{L}$  至另一 2 mL 离心管。加入 1 300  $\mu\text{L}$  CTAB 沉淀液(8.2.15)，混匀后于室温沉淀 1 h，12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。在沉淀物中加入 350  $\mu\text{L}$  氯化钠溶液(8.2.17)，溶解后加入 350  $\mu\text{L}$  氯仿(8.1.3)，振荡混匀 30 s，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 300  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管。加入 240  $\mu\text{L}$   $4^{\circ}\text{C}$  异丙醇(8.1.5)，混匀静置 1 h，12 000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，加入 500  $\mu\text{L}$   $4^{\circ}\text{C}$  70%乙醇(8.2.10)振荡洗涤沉淀物，12 000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，将沉淀物于室温晾干。加入 50  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$  水溶解沉淀物，得到样品 DNA 模板溶液。可用于实验，或保存于 $-18^{\circ}\text{C}$ 备用。

也可采用经验证可靠的商业化 DNA 提取纯化方法或试剂盒提取 DNA，具体参照说明书使用。

## 11 DNA 纯度和浓度测定

11.1 取 5  $\mu\text{L}$  DNA 模板溶液加水稀释至 1 mL，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计(0.5 mL 或 1 mL 石英比色皿)，在 260 nm 和 280 nm 波长处测定吸光值。

11.2 DNA 纯度按公式(1)计算。

$$P = \frac{A_{260}}{A_{280}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$P$  ——DNA 纯度；

$A_{260}$  ——260 nm 处的吸光值；

$A_{280}$  ——280 nm 处的吸光值。

11.3 DNA 浓度按公式(2)计算。

$$C = \frac{A_{260} \times N \times 50}{1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$C$  ——DNA 浓度的数值，单位为微克每微升( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )；

$A_{260}$  ——260 nm 处的吸光值；

$N$  ——DNA 稀释倍数。

11.4 提取的模板中 DNA 纯度在 1.7~1.9、浓度在 10 ng/ $\mu\text{L}$ ~100 ng/ $\mu\text{L}$  时，适宜于实时荧光 PCR



检测。

## 12 测定方法

### 12.1 检测与对照设置

将样品提取的 DNA 模板按相应的反应体系与反应程序进行扩增,同时设置如下对照试验:

- a) 阴性对照:以非目标鱼类提取的 DNA 为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增;
- b) 阳性对照:以目标鱼类提取的 DNA 为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增;
- c) 空白对照:以等体积水代替模板 DNA,按相应的反应体系与反应程序扩增;
- d) 内参对照:以样品提取的 DNA 为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增。

### 12.2 鳕鱼源性成分检测

#### 12.2.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 XXMF/XXMR(10.0 μmol/L)各 0.5 μL、探针 XXMP(10.0 μmol/L)0.6 μL、样品 DNA 模板 5.0 μL,并用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.2.2 反应程序

95℃预变性 10 min 后进入循环:95℃变性 15 s,62℃退火延伸 1 min,至少 40 个循环,在每个循环退火延伸时收集荧光。可根据实时荧光 PCR 仪、试剂盒的要求,对反应体系、反应程序进行适当调整。

#### 12.2.3 内参基因检测

反应体系:在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 18SF/18SR(10.0 μmol/L)各 0.5 μL、探针 18SP(10.0 μmol/L)0.6 μL、样品 DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

反应程序:按照 12.2.2 设置。

### 12.3 异鳞蛇鲭源性成分检测

#### 12.3.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 LFCOF/LFCOR(10.0 μmol/L)各 0.55 μL、探针 LFCOP(10.0 μmol/L)0.3 μL、DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.3.2 反应程序

95℃预变性 10 min 后进入循环:95℃变性 15 s,60℃退火延伸 1 min,至少 40 个循环,在每个循环退火延伸时收集荧光。可根据实时荧光 PCR 仪、试剂盒的要求,对反应体系、反应程序进行适当调整。

#### 12.3.3 内参基因检测

按照 12.2.3 配制反应体系、设置反应程序,其中退火延伸温度降为 60℃。

### 12.4 棘鳞蛇鲭源性成分检测

#### 12.4.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 RPCOF/RPCOR(10.0 μmol/L)各 0.55 μL、探针 RPCOP(10.0 μmol/L)0.3 μL、DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.4.2 反应程序

按照 12.3.2。

#### 12.4.3 内参基因检测

按照 12.3.3。

### 12.5 裸盖鱼源性成分检测

#### 12.5.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 AFCYF/AFCYR(10.0 μmol/L)各 0.55 μL、探针 AFCYP(10.0 μmol/L)0.3 μL、DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.5.2 反应程序

按照 12.3.2。

#### 12.5.3 内参基因检测

按照 12.3.3。

### 12.6 小鳞南极犬牙鱼源性成分检测

#### 12.6.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 DECOF/DECOR(10.0 μmol/L)各 0.45 μL、探针 DECOP(10.0 μmol/L)0.2 μL、DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.6.2 反应程序

按照 12.3.2。

#### 12.6.3 内参基因检测

按照 12.3.3。

### 12.7 莫氏南极犬牙鱼源性成分检测

#### 12.7.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入反应预混液(2×)(8.2.18)12.5 μL、上下游引物 DMCOF/DMCOR(10.0 μmol/L)各 0.55 μL、探针 DMCOP(10.0 μmol/L)0.3 μL、DNA 模板 5.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

#### 12.7.2 反应程序

按照 12.3.2。

#### 12.7.3 内参基因检测

按照 12.3.3。

## 13 结果判定与表述

### 13.1 过程质量控制

当对照试验符合以下结果时,实验有效;有任一条不符合时,需重新进行提取、扩增。

- a) 空白对照:无荧光对数增长,相应的  $C_t$  值 $>40.0$ ;
- b) 阴性对照:无荧光对数增长,相应的  $C_t$  值 $>40.0$ ;
- c) 阳性对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的  $C_t$  值 $<30.0$ ;
- d) 内参对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的  $C_t$  值 $<30.0$ 。

### 13.2 结果判定

当过程质量控制符合要求时,可对样品检测结果进行判定:

- a) 如果样品  $C_t$  值 $\leq 35.0$ ,则判定被检样品阳性;
- b) 如果样品  $C_t$  值 $\geq 40.0$ ,则判定为被检样品阴性;
- c) 如样品  $35.0 < C_t$  值 $< 40.0$ ,则需重复检测一次。再次扩增后  $C_t$  值仍 $< 40.0$ ,则判定被检样品阳性;如再次扩增后  $C_t$  值 $\geq 40.0$ ,则判定被检样品阴性。

## 14 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A  
(规范性)  
引物、探针信息表

引物、探针信息表见表 A.1。

表 A.1 引物、探针信息表

| 名称                            | 序列(5'→3')                                  | 目的基因片段                   |
|-------------------------------|--|--------------------------|
| 鳕鱼上游引物 XXMF                   | TAATCACTTGTCTTTTAAATGAA                    | 鳕鱼 16S rRNA<br>基因特异性片段   |
| 鳕鱼下游引物 XXMR                   | TTTARGTCTAAAGCTCCA                         |                          |
| 鳕鱼探针 XXMP                     | FAM-CCAGTCAATGAAATTGAC-MGB                 |                          |
| 异鳞蛇鲭上游引物 LFCOF                | GACTTCTGCCTCCATCCTTCCTCC                   | 异鳞蛇鲭 CO I<br>基因特异性片段     |
| 异鳞蛇鲭下游引物 LFCOR                | AGGAGATCCCTGCTAAGTGCAGG                    |                          |
| 异鳞蛇鲭探针 LFCOP                  | FAM-CCGGAGCTGGAACCGGGTGGACAG-MGB           |                          |
| 棘鳞蛇鲭上游引物 RPCOF                | TGAAGCCGGAGCCGGAACC                        | 棘鳞蛇鲭 CO I<br>基因特异性片段     |
| 棘鳞蛇鲭下游引物 RPCOR                | GTATTGGGAGATGGCTGCGGG                      |                          |
| 棘鳞蛇鲭探针 RPCOP                  | FAM-CCTCTCGCCGAAACCTAGCCCATGC-MGB          |                          |
| 裸盖鱼上游引物 AFCYF                 | CCTTACGGGACTTTTCCTCGC                      | 裸盖鱼 Cyt b<br>基因特异性片段     |
| 裸盖鱼下游引物 AFCYR                 | ACCTCGGCCGATGTGCATAT                       |                          |
| 裸盖鱼探针 AFCYP                   | FAM-TTGCGACCGCCTTCTCTTCCGTC-MGB            |                          |
| 小鳞南极犬牙鱼上游引物 DECOF             | CCCTTAGCCTGCTCATCCGG                       | 小鳞南极犬牙鱼 COI<br>基因特异性片段   |
| 小鳞南极犬牙鱼下游引物 DECOR             | GGATGAGTCAGTTTCCGAAGCCT                    |                          |
| 小鳞南极犬牙鱼探针 DECOP               | FAM-AACCTGGCGCCCTATTGGGAGACGAC-MGB         |                          |
| 莫氏南极犬牙鱼上游引物 DMCOF             | CATGGCTTTCCCTCGAATAAAT                     | 莫氏南极犬牙鱼 COI<br>基因特异性片段   |
| 莫氏南极犬牙鱼下游引物 DMCOR             | CCGGCTTCTACACCTGAAGAA                      |                          |
| 莫氏南极犬牙鱼探针 DMCOP               | FAM-CCTCCTTCCCTACTCTTACT-MGB               |                          |
| 真核生物 18S rRNA 基因<br>上游引物 18SF | TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA                  | 真核生物 18S rRNA<br>基因特异性片段 |
| 真核生物 18S rRNA 基因<br>下游引物 18SR | AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT                  |                          |
| 真核生物 18S rRNA 基因<br>探针 18SP   | FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGAATCGAACC-TAMRA |                          |
| 注:R 为简并碱基,代表 A 或 G。           |  |                          |