《水产品及其制品中大西洋鲑DNA成分实时荧光PCR检测法》

编制说明

目 录

[1. 标准立项的背景及意义 3](#_Toc128747487)

[1.1. 方法起草单位与主要起草人 3](#_Toc128747488)

[1.2. 目的和意义 3](#_Toc128747489)

[1.3. 起草过程 4](#_Toc128747490)

[2. 第一阶段 项目团体标准正式立项 5](#_Toc128747491)

[3. 与国内外有关法律法规和其它标准的关系 5](#_Toc128747492)

[4. 标准的制定与起草原则 6](#_Toc128747493)

[5. 实验结果 6](#_Toc128747494)

[5.1 材料与仪器 6](#_Toc128747495)

[5.2 方法 6](#_Toc128747496)

[5.3 大西洋鲑鱼DNA成分检测方法建立 7](#_Toc128747497)

[5.4 实际样品检测 8](#_Toc128747498)

[6. 起草过程中主要分歧意见的处理情况 9](#_Toc128747499)

# 标准立项的背景及意义

* 1. 方法起草单位与主要起草人

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院

本方法主要起草人：王坤，朱成杰，吴佳辉，余灏，叶秀玲，张世伟，赖心田，杨国武。

* 1. 目的和意义

我国是渔业大国，占有世界水产品生产总量的三分之一，同时，水产品掺假的现象也时有发生。

三文鱼蛋白质含量高、富含不饱和脂肪酸，是一种高价值经济鱼类，但是它不是一个严格的生物学名称，而是一个商品化销售的统称。在欧美市场，三文鱼包括鲑科鱼类大麻哈鱼属的大麻哈鱼（Oncorhynchus keta）、大磷大麻哈鱼（Oncorhynchus tshawytscha）、驼背大麻哈鱼（Oncorhynchus gorbuscha）、红大麻哈鱼（Oncorhynchus nerka）、银大麻哈鱼（Oncorhynchus kisutch）以及鲑属的大西洋鲑鱼（Salmo salar）。我国市售的三文鱼主要是进口的大西洋鲑鱼以及国内人工养殖、称为“淡水三文鱼”的虹鳟（Oncorhynchus mykiss）。为避免这类“一名多物”的现象，欧盟变更了所有鱼类和水产养殖产品的标签规则，自2014年12月13日起，商品标签必须标示产品名称和鱼种学名，同时还要标注捕捞区域/国家、生产区域/国家。

由于存在这类“一名多物”的现象，而且大西洋鲑鱼和其他种类的三文鱼以及虹鳟鱼在加工后外观基本一致，普通消费者无法区分，一些不法商家用较低商业价值的物种来代替较高价值的大西洋鲑鱼，以获取高额的利润。消费者在不知情或者不能辨别的情况下，以较高的价格购买相对廉价的假冒食品。这种以假充好、名不副实的现象扰乱了市场秩序，更极大地损害了消费者的利益甚至健康。因此，建立准确、灵敏、快速的大西洋鲑鱼掺假鉴别方法，对保障、维护消费者权益都具有重要的现实意义。

目前尚未有大西洋鲑鱼的检测标准出台，研制充检验方法，弥补了检测方法的空白，方便了监管人员对生食三文鱼产品的监管。

* 1. 起草过程

为更好发挥市场在标准化资源配置中的决定性作用，增加标准有效供给，根据国务院《深化标准化工作改革方案》、国家质检总局和国家标委会《关于培育和发展团体标准的指导意见》、《深圳市团体标准管理暂行办法》等文件精神，深圳市分析测试协会发布征集2020年深圳市分析测试协会团体标准的通知，现我院根据该通知的要求开展了此项工作的研究。具体编制过程及所需材料详见表1。

表1 团体标准制修定过程档案资料清单

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **标准起草阶段** | **归档资料名称** | **归档资料提交单位** |
| 1 | 团体标准的提案 | 1、团体标准征集通知 | 协会秘书处 |
| 2、附件1《深圳市分析测试协会团体标准制修订提案建议书》 | 起草单位 |
| 2 | 团体标准的立项 | 1、标准立项通知 | 协会秘书处 |
| 2、立项会议专家评审意见 | 协会秘书处 |
| 3 | 团体标准的起草 | 1、关于团体标准公开征求意见的通知 | 协会秘书处 |
| 2、团体标准草案（征求意见稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（征求意见稿） | 起草单位 |
| 4 | 团体标准的征求意见 | 1、2019年深圳市地方标准制修订计划项目汇总表 | 协会秘书处 |
| 2、标准文本（送审稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（送审稿） | 起草单位。 |
| 5 | 团体标准的技术审查 | 1、团体标准的技术审查通知 | 协会秘书处 |
| 2、验证报告（三家以上机构验证） | 协会秘书处 |
| 3、标准查新情况说明 | 起草单位 |
| 4、标准文本（报批稿） | 起草单位 |
| 5、编制说明（报批稿） | 起草单位 |
| 6 | 团体标准的审批 | 1、投票结果（附件7《深圳市分析测试协会团体标准发布验收投票表决票》汇总扫描） | 协会秘书处 |
| 2、团体标准正式发布通知 | 协会秘书处 |
| 3、标准正式发布挂网的文本版本 | 起草单位 |

# 第一阶段 项目团体标准正式立项

深圳市分析测试协会于2020年6月面向会员单位征集团体标准，项目组及时提出了团体标准制订立项申请。协会在2020年9月24日组织专家召开了立项评审会议，最后《水产品及其制品中大西洋鲑DNA成分实时荧光PCR检测法》项目通过专家组评审并获立项。

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

本方法主要起草人：王坤，朱成杰，吴佳辉，余灏，叶秀玲，张世伟，赖心田，杨国武。

第二阶段 形成《水产品及其制品中大西洋鲑DNA成分实时荧光PCR检测法》团体标准（征求意见稿）

根据第一阶段调研课题研讨会的各方意见，项目组对《水产品及其制品中大西洋鲑DNA成分实时荧光PCR检测法》进行了修改，并制定了团体标准（征求意见稿）。

# 与国内外有关法律法规和其它标准的关系

目前国内三文鱼的检测标准SN/T3589.3-2013《出口食品中常见鱼类及其制品的鉴伪方法第3部分：鲑鱼成分检测实时荧光PCR法》不能将大西洋鲑鱼和其他鲑科鱼类区分，广东省食品检测所周露等[5]建立了双重实时荧光PCR法鉴别大西洋鲑鱼和虹鳟鱼，但是该方法只是简单的将两种引物探针混合到一个反应体系中，并且特异性不好，扩增曲线不典型，对大磷大麻哈鱼（即王鲑）有非特异性扩增，不能将大磷大麻哈鱼和大西洋鲑鱼较好的区分，国外研究报道基于ITS1基因建立实时荧光PCR方法鉴别大西洋鲑鱼，该方法实际是将鲑属与其他鲑科鱼类区分，不是真正意思上的鉴别大西洋鲑鱼

国内外暂无相同标准。

# 标准的制定与起草原则

本方法通过全球公认的NCBI数据库中下载大西洋鲑鱼DNA序列，使用Clustal X2进行序列比对，寻找特征序列，设计引物探针，并对其特异性和灵敏度进行检测。建立基于特征序列的大西洋鲑鱼DNA成分实时荧光PCR检测方法。本方法经过多家检验机构进行了实验室间验证，表现出了良好结果。本标准是按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第 1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写，技术内容是参照GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分:试验方法标准》确定。

# 实验结果

5.1 材料与仪器

QIAGEN DNeasy mericon Food Kit（69514），实时荧光PCR反应试剂Premix ExTaq（2×），引物、探针（生工生物工程上海有限公司）。

7500实时荧光PCR仪（美国ABI公司）；SHP-250恒温培养箱、DK-8D水浴锅（上海精宏公司）；纯水机（美国Millipore 公司）；Allegra 64R离心机（美国Bekman公司）；Qubit核酸蛋白检测仪：美国ABI公司。

5.2 方法

**5.2.1 DNA提取**

按照QIAGEN DNeasy mericon Food Kit（69514）说明书操作。

**5.2.2实时荧光PCR反应**

反应体系（20 μL）：实时荧光PCR反应试剂（2X）10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，探针（10 μmol/L）0.2 μL，DNA模板1-10 ng（Qubit荧光法），灭菌超纯水补至20μL。

反应程序： 95 ℃ 30 s；95℃ 5 s，60 ℃ 34 s，40个循环。

结果判定：Ct值≤30时，可以判定检测结果为阳性；Ct值>30时，可以判定检测结果为阴性。

5.3 大西洋鲑鱼DNA成分检测方法建立

（1）引物探针设计

在NCBI数据库下载大西洋鲑鱼线粒体DNA序列，选取特异性序列，设计引物探针（如表2）。

表2 引物探针列表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 引物探针 | 序列 |
| 大西洋鲑鱼 | 上游引物 | 5，-AGCAGAACTCAGCCAGCCT-3’ | |
| 下游引物 | 5，-AGGAGGGAGGGAGAAGTCAA-3’ |
| 探针 | 5，FAM-CGCCCTTCTGGGAGATGACCAA-BHQ3’ | |

（2）特异性测试

以大西洋鲑鱼常见掺假鱼类大麻哈鱼、大磷大麻哈鱼、银大马哈鱼、红大麻哈鱼、虹鳟鱼及其他28中常见鱼类为样品检测方法的特异性。检测的结果显示仅检出虹鳟鱼的样品（如表3）。

表3 引物探针特异性实验结果

|  |  |
| --- | --- |
| 物种 | Ct值 |
| 大西洋鲑鱼 | 20 |
| 大麻哈鱼 | >30 |
| 大磷大麻哈鱼 | >30 |
| 银大麻哈鱼 | >30 |
| 红大麻哈鱼 | >30 |
| 虹鳟鱼 | >30 |
| 细鳞壮鳕鱼 | >30 |
| 银鳕鱼 | >30 |
| 银鲳鱼 | >30 |
| 秋刀鱼 | >30 |
| 鲈鱼 | >30 |
| 鳗鱼 | >30 |
| 鲟鱼 | >30 |
| 鳊鱼 | >30 |
| 草鱼 | >30 |
| 鲫鱼 | >30 |
| 青鱼 | >30 |
| 大闸蟹 | >30 |
| 红三鱼 | >30 |
| 沙尖鱼 | >30 |
| 马鲈鱼 | >30 |
| 大头鱼 | >30 |
| 鲶鱼 | >30 |
| 鲩鱼 | >30 |
| 金昌鱼 | >30 |
| 池鱼 | >30 |
| 基围虾 | >30 |
| 多宝鱼 | >30 |
| 多春鱼 | >30 |
| 银鱼 | >30 |
| 带鱼 | >30 |
| 水鳕鱼 | >30 |
| 舟山鳕鱼 | >30 |
| 黑鳕鱼 | >30 |

（3）灵敏度测试

将虹鳟鱼肉与大西洋鲑鱼肉混合制成大西洋鲑鱼肉含量分别为1 %的混合样品，使用DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）按说明书操作提取DNA。

表4检出限验证实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 引物探针名称 | 平行样 | | | | | | 统计学参数 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 均值 | 方差 | RSD |
| 18 SrRNA引物探针 | 16.7 | 16.9 | 16.8 | 16.8 | 16.7 | 16.6 | 16.8 | 0.10 | 0.6% |
| 鲑科引物探针 | 25.8 | 25.7 | 25.7 | 25.9 | 25.7 | 25.7 | 25.8 | 0.08 | 0.3% |
| 大西洋鲑引物探针 | 28.3 | 28.2 | 28.5 | 28.5 | 28.2 | 28.5 | 28.4 | 0.15 | 0.5% |

5.4 实际样品检测

购买11批次生食三文鱼样品，分别按照SN/T 3589.3-2013《出口食品中常见鱼类及其制品的鉴伪方法第3部分：鲑鱼成分检测实时荧光PCR法》检测鲑鱼源性成分，并使用本方法检测大西洋鲑鱼DNA成分。结果显示11份样品中均检出了鲑鱼源性成分，但均未检出虹鳟源性成分。

表5实际样品检测结果汇总

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **样品名称** | **18SrRNA** | **鲑鱼源性成分** | **虹鳟鱼源性成分** |
| 1 | 三文鱼 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 2 | 三文鱼 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 3 | 三文鱼 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 4 | 三文鱼 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 5 | 三文鱼片 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 6 | 三文鱼片 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 7 | 三文鱼块 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 8 | 三文鱼7W | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 9 | 烟熏三文鱼 | 检出 | 检出 | 未检出 |
| 10 | 三文鱼刺身 | 检出 | 检出 | 未检出 |

# 起草过程中主要分歧意见的处理情况

本标准制定过程中无重大分歧意见