

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00451

16 种商品海参 16S rRNA 的 PCR-RFLP 鉴定方法

文菁^{1,2}, 胡超群², 张吕平², 范嗣刚²

1. 湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048;
2. 中国科学院 南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301

摘要: 基于 570 bp 左右的线粒体 16S rRNA 基因片段, 利用 3 种核酸内切酶(*Dde* I, *Hae* III 和 *Sty* I)对 16 种海参 PCR 产物进行酶切, 分别产生 10 种、5 种和 5 种单倍型, 通过单倍型的组合, 即能有效区分 16 种海参的种类。运用此方法对 19 种商品海参(包括冻品和干品)进行鉴定, 结果表明, 9 种产品属于错误贴标。本研究建立的 PCR-RFLP 方法方便、有效、可靠, 可为海参产品评估、进出口种类鉴定提供实用高效的方法。本研究旨在为市场海参产品贴标情况的评估提供技术支撑。[中国水产科学, 2011, 18(2): 451–457]

关键词: 海参; 16S rRNA 基因; PCR-RFLP; 鉴定方法

中图分类号: Q178.53

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2011)02–0451–07

海参属于棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)。全世界海参约有 1 400 种, 均属海洋种类^[1], 可供食用的有 50 余种, 其中绝大多数属于热带海参^[2]。海参在中国海域分布的有 134 种, 可食用而有增养殖意义的有 20 余种, 中国北方的辽宁、河北和山东仅有一种海参可供食用, 即仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 属温带种; 而南方的台湾、海南、福建、广东、广西、西沙群岛和南沙群岛却产有约 20 种食用海参, 属热带种^[3]。

作为名贵的海产品, 市场上海参通常加工为干品或冻品出售, 方便储存和运输。不同种类的海参, 其经济价值不同, 一般分为高、中、低 3 个档位^[2]。传统的, 海参的鉴定方法主要是根据形态学特征, 如触手、石灰环、管足和骨片等。而海参在商品加工过程中, 一些形态学特征丢失或损伤, 使得种类鉴定变得困难。Arndt 等^[4]认为,

在海参“种”的分类鉴定上, 形态学特征的区分比较模糊。此外, 目前在市面上销售的海参产品, 大多根据其颜色和产地来命名贴标, 如“红海参”、“美国海参”等。这使得人们对于海参种类具体、明确的信息都不了解, 甚至受到欺骗。因此, 针对海参市场贴标混乱的现状, 非常有必要开发出准确区分和鉴定海参种类的方法。

本研究基于海参线粒体 16S rRNA 基因开发了鉴定 16 种经济海参的分子生物学方法, 并运用此方法对市场商品的贴标情况进行了调查。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜活热带海参分别于 2007 年 8 月、2008 年 5 月、2009 年 5 月和 8 月采自广西涠洲岛、海南岛三亚和西沙群岛, 鲜活仿刺参由大连仿刺参养殖

收稿日期: 2010–06–17; 修订日期: 2010–07–29.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BAB44B02); 广东省海洋渔业科技项目(A200899E02, A200901E01); 广东省科技计划项目(2007A020300007-15); 广东省省院合作计划项目(2009B091300155); 广西壮族自治区重点科技项目(桂科攻 08150 06-2).

作者简介: 文菁(1982–), 男, 讲师, 主要从事海参种质资源及水产养殖研究. E-mail: jw82123@yahoo.com.cn

通讯作者: 胡超群, 研究员, 博士生导师. E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

基地提供, 每个品种各取 10 个样品, 完整的海参个体用无水乙醇固定后运回实验室, 物种鉴定参照廖玉麟^[3]和 Massin^[5]的描述, 19 种商品海参, 包括 6 种冻品和 13 种干品, 分别购买于广州的各大超市和水产批发市场, 每个品种各取 15 个样品, 样品鉴定参照 2.2 部分 (BLAST 工具鉴定海参品种), 16 种海参基本信息见表 1。

1.2 DNA 提取、PCR、测序

参照 Wen^[6]的方法: 剪取海参样品体壁组织约 30 mg, 用双蒸水洗净, 灭菌吸水纸吸干水分, 按照 TIANamp 海洋动物 DNA 提取试剂盒操作(北京天根生物技术有限公司), 经 2 h 消化, 去蛋白、核酸沉淀、溶解等步骤, 提取样品 DNA(鲜品、冻

品和干品的 DNA 提取方法一致), 溶解于 50 μ L TE, -20°C 保存。参照 Kerr^[7]的引物(16Sar: 5'-CGCC-TGTTTATCAAAAACAT-3', 16Sbr: 5'-CTCCGGT-TTGA ACTCA GATCA-3'), 以基因组 DNA 为模板, 扩增海参样品线粒体 16S rRNA 基因片段。反应体系: 总反应体积 50 μ L, 包括 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L(内含 Mg^{2+} 50 mmol/L), 1 μ L dNTPs(10 mmol/L)、2 μ L 每种引物(10 μ mol/L), 40 ng DNA 模板、0.5 μ L *Taq* 酶(2 U/ μ L), 灭菌的双蒸水补充至 50 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 经 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min。取 5 μ L PCR 产物, 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳成像检测。其余 PCR 产物送上海英维捷基生物有限公司进行双向测序。

表 1 16 种海参基本信息
Tab. 1 Reference sea cucumber species included in this work

编号 code	学名 scientific name	商品名 commercial name	经济价值 commercial value	来源 origin	16S rRNA 序列号 16S rRNA accession number
1	子安辐肛参 <i>Actinopyga lecanora</i>	石参	中 medium	鲜品(西沙群岛)、干品(澳大利亚)	FJ971382/ FJ589208/ GQ240835
2	棘辐肛参 <i>Actinopyga echinites</i>	红靴参	中 medium	鲜品(海南岛三亚、西沙群岛)	FJ971383/ FJ589209/ GQ240836
3	辐肛参 <i>Actinopyga caerulea</i>	-	中 medium	干品(非洲)	FJ971375/ GQ240828
4	蛇目白尼参 <i>Bohadschia argus</i>	虎皮参	低 low	鲜品(海南岛三亚、西沙群岛)、干品(非洲)	FJ971384/ FJ589210/ GQ240837
5	玉足海参 <i>Holothuria leucospilota</i>	黑狗参	低 low	鲜品(广西涠洲岛、西沙群岛)、冻品(美国)	FJ971389/ FJ589211/ GQ240842
6	糙海参 <i>Holothuria scabra</i>	沙参	高 high	鲜品(广西涠洲岛)、干品(非洲)	FJ971376/ GQ240829
7	黄乳海参 <i>Holothuria fuscogilva</i>	猪婆参	高 high	鲜品(西沙群岛)、干品(非洲)	FJ971377/ GQ240830
8	墨西哥海参 <i>Holothuria mexicana</i>	驴粪参	中 medium	干品(南美洲)	FJ971378/ GQ240831
9	象牙海参 <i>Holothuria fuscopunctata</i>	象牙参	中 medium	鲜品(西沙群岛)、干品(非洲)	FJ971379/ GQ240832
10	仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	刺参	高 high	鲜品(大连)、干品(中国)	FJ589207/ FJ971381/ GQ240834
11	等刺参 <i>Isostichopus</i> sp.	-	-	冻品(南美洲)、干品(南美洲)	FJ794474
12	花刺参 <i>Stichopus herrmanni</i>	黄肉参	中 medium	鲜品(广西涠洲岛)、冻品(非洲)、干品(非洲)	FJ589203/ FJ971385 /GQ240838
13	绿刺参 <i>Stichopus chloronotus</i>	方刺参	中 medium	鲜品(海南岛三亚)、干品(非洲)	FJ589204/ FJ971386/ GQ240839
14	梅花参 <i>Thelenota ananas</i>	梅花参	高 high	鲜品(西沙群岛)、干品(澳大利亚)	FJ589205/ FJ971387/ GQ240840
15	巨梅花参 <i>Thelenota anax</i>	巨梅花参	中 medium	鲜品(西沙群岛)、干品(澳大利亚)	FJ589206/ FJ971388 / GQ240841
16	海地瓜 <i>Acaudina molpadioides</i>	海地瓜	低 low	冻品(中国)	FJ971380/ GQ240833

注: “-”表示未知。
Note: “-” indicates not known.

1.3 数据处理

序列用 DNASTAR 和 Clustal X 软件进行拼接和比对, 运用 NCBI 的 MEGABLAST 程序, 把所有海参样品的 PCR 产物序列与特定的海参种类进行一一对应, 要求相似率达到 99% 以上。16S rRNA 基因序列的种间遗传距离用软件 MEGA 4.1(Kumar, 2008)进行运算得出。

1.4 PCR-RFLP 分析

序列用软件 Jellyfish 3.3(Labvelocity, CA, 美国)进行酶切位点的分析, 获得预期酶切片段大小, 内切酶 *Dde* I、*Hae* III 和 *Sty* I(New England Biolabs, USA)被用来区分本研究中的所有海参品种。16S rRNA 基因的 PCR 产物分别用这 3 种酶进行酶切。酶切体系为 20 μ L, 包括 100~200 ng PCR 产物, 10 $\times$ 酶切缓冲液, BSA 和 10 U 内切酶。酶切产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳成像检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增与测序结果

图 1 显示了从样品中扩增的 PCR 产物。用引物对 16Sar 和 16Sbr 能够容易的从所有样品中扩增出 570 bp 大小的线粒体 16S rRNA 基因片段, 包括鲜活样品、冷冻商品和干制商品。产物经测序后, 得到 16 种海参的 16S rRNA 基因序列, 这些序列简单而明晰, 被递交到 NCBI 的 GenBank 数据库, 序列号为 FJ589203–FJ589207, FJ971375–FJ971415, FJ794474 和 GQ240829–GQ240842(表 1)。

2.2 BLAST 工具鉴定海参品种

用 BLAST 程序把本研究得到的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中搜索到的前人研究结果相比对可以发现, 除了等刺参(*Isostichopus* sp.)外, 其他 15 种海参均能一一对应相应的种类。在种内水平上, 16S rRNA 基因显示了很高的同源相似性(相似率 99.8%~100%)。差异往往只有一个碱基的转换(A $\leftrightarrow$ G 或 C $\leftrightarrow$ T)。在种间水平上, 16S rRNA 基因的保守性并没那么高, 遗传距离为 8.1%~31.8%。比较等刺参和其他海参种类的同源相似性, 结果表明, 等刺参和 *Isostichopus fuscus* 16S rRNA 基因(序列号 AY153499)的相似性高达

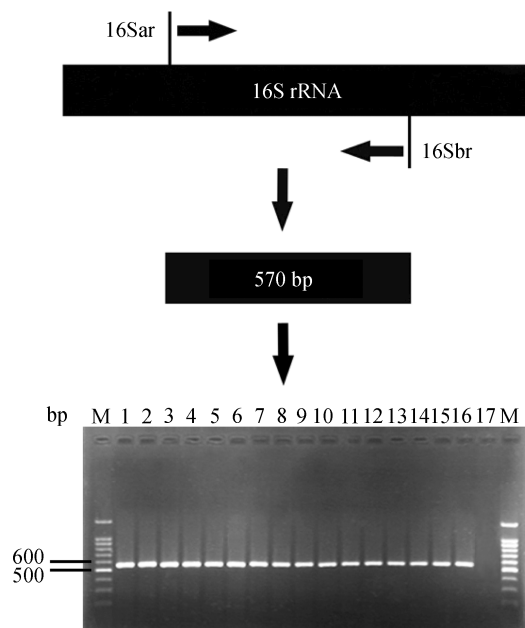


图 1 海参引物的扩增位置和 PCR 扩增产物

M, marker (Ladder 100 bp); 1, 子安辐肛参; 2, 棘辐肛参; 3, 辐肛参; 4, 蛇目白尼参; 5, 玉足海参; 6, 糙海参; 7, 黄乳海参; 8, 墨西哥海参; 9, 象牙海参; 10, 仿刺参; 11, 等刺参; 12, 花刺参; 13, 绿刺参; 14, 梅花参; 15, 巨梅花参; 16, 海地瓜; 17, 阴性对照。

Fig. 1 Position of primer set used and PCR-amplification of the 16S rRNA fragments in different commercial sea cucumber species

M, marker (Ladder 100 bp); 1, *A. lecanora*; 2, *A. echinites*; 3, *A. caerulea*; 4, *B. argus*; 5, *H. leucospilota*; 6, *H. scabra*; 7, *H. fuscogilva*; 8, *H. mexicana*; 9, *H. fuscopunctata*; 10, *A. japonicus*; 11, *I. sp.*; 12, *S. herrmanni*; 13, *S. chloronotus*; 14, *T. ananas*; 15, *T. anax*; 16, *A. molpadioides*. 17, negative control.

94.4%, 和 *Isostichopus badionotus*(序列号 EU822 435)的相似性也很高, 16S rRNA 基因达到 92.7%。因此, 有理由相信它属于等刺参属(*Isostichopus*), 此属在中国境内目前还没有发现^[3]。

2.3 PCR-RFLP 方法鉴别海参品种

图 2、图 3、图 4 分别显示了核酸内切酶 *Dde* I、*Hae* III 和 *Sty* I 对 16 种海参进行酶切产生的酶切图谱。因为小片段 DNA 条带可能是引物二聚体, 而且会受到溴酚蓝荧光染色区域的影响而在紫外光照射下不那么容易显色, 因此在本研究中片段小于 50 bp 的条带不作为鉴定指标。酶切结果显示, 内切酶 *Dde* I 产生 10 种酶切图谱单倍型(haplotype), 单用内切酶 *Dde* I 就能有效地区分棘辐肛参、辐肛参、玉足海参、黄乳海参、象牙海参、等刺参和梅花参; 内切酶 *Hae* III 产生 5 种

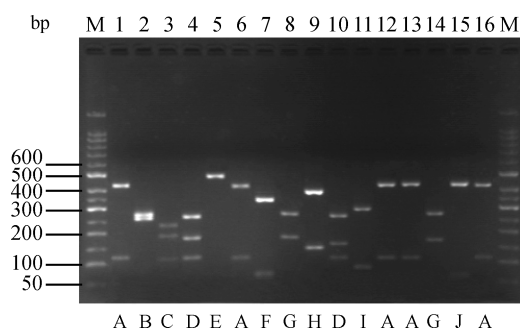


图 2 16 种海参 16S rRNA 基因 PCR 产物 *Dde* I 酶切图谱
M, marker(Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, 子安辐肛参; 2, 棘辐肛参; 3, 辐肛参; 4, 蛇目白尼参; 5, 玉足海参; 6, 糙海参; 7, 黄乳海参; 8, 墨西哥海参; 9, 象牙海参; 10, 仿刺参; 11, 等刺参; 12, 花刺参; 13, 绿刺参; 14, 梅花参; 15, 巨梅花参; 16, 海地瓜。

图下大写字母表示酶切单倍型

Fig. 2 Restriction fragments generated by endonucleases *Dde* I on 570 bp amplicons of 16S rRNA gene obtained from different commercial sea cucumber species

M, marker (Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, *A. lecanora*; 2, *A. echinites*; 3, *A. caerulea*; 4, *B. argus*; 5, *H. leucospilota*; 6, *H. scabra*; 7, *H. fuscogilva*; 8, *H. mexicana*; 9, *H. fuscopunctata*; 10, *A. japonicus*; 11, *I. sp.*; 12, *S. herrmanni*; 13, *S. chloronotus*; 14, *T. ananas*; 15, *T. anax*; 16, *A. molpadioides*.

Capital letters below the image indicate single restriction haplotype.

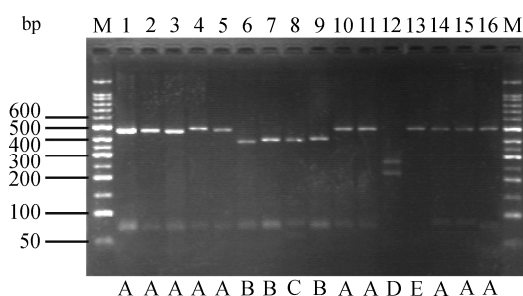


图 3 16 种海参 16S rRNA 基因 PCR 产物 *Hae* III 酶切图谱
M, marker(Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, 子安辐肛参; 2, 棘辐肛参; 3, 辐肛参; 4, 蛇目白尼参; 5, 玉足海参; 6, 糙海参; 7, 黄乳海参; 8, 墨西哥海参; 9, 象牙海参; 10, 仿刺参; 11, 等刺参; 12, 花刺参; 13, 绿刺参; 14, 梅花参; 15, 巨梅花参; 16, 海地瓜。图下大写字母表示酶切单倍型。

Fig. 3 Restriction fragments generated by endonucleases *Hae* III on 570 bp amplicons of 16S rRNA gene obtained from different commercial sea cucumber species

M, marker (Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, *A. lecanora*; 2, *A. echinites*; 3, *A. caerulea*; 4, *B. argus*; 5, *H. leucospilota*; 6, *H. scabra*; 7, *H. fuscogilva*; 8, *H. mexicana*; 9, *H. fuscopunctata*; 10, *A. japonicus*; 11, *I. sp.*; 12, *S. herrmanni*; 13, *S. chloronotus*; 14, *T. ananas*; 15, *T. anax*; 16, *A. molpadioides*.

Capital letters below the image indicate single restriction haplotype.

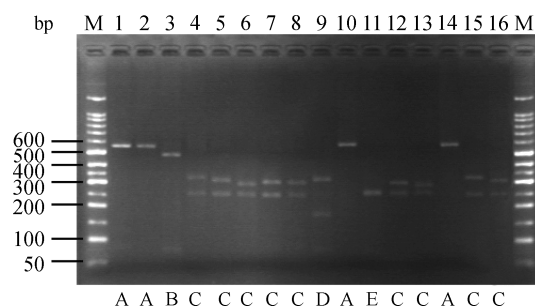


图 4 16 种海参 16S rRNA 基因 PCR 产物 *Sty* I 酶切图谱
M, marker(Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, 子安辐肛参; 2, 棘辐肛参; 3, 辐肛参; 4, 蛇目白尼参; 5, 玉足海参; 6, 糙海参; 7, 黄乳海参; 8, 墨西哥海参; 9, 象牙海参; 10, 仿刺参; 11, 等刺参; 12, 花刺参; 13, 绿刺参; 14, 梅花参; 15, 巨梅花参; 16, 海地瓜。图下大写字母表示酶切单倍型。

Fig. 4 Restriction fragments generated by endonucleases *Sty* I on 570 bp amplicons of 16S rRNA gene obtained from different commercial sea cucumber species

M, marker (Ladder 100 bp+ Ladder 50 bp); 1, *A. lecanora*; 2, *A. echinites*; 3, *A. caerulea*; 4, *B. argus*; 5, *H. leucospilota*; 6, *H. scabra*; 7, *H. fuscogilva*; 8, *H. mexicana*; 9, *H. fuscopunctata*; 10, *A. japonicus*; 11, *I. sp.*; 12, *S. herrmanni*; 13, *S. chloronotus*; 14, *T. ananas*; 15, *T. anax*; 16, *A. molpadioides*.

Capital letters below the image indicate single restriction haplotype.

酶切图谱单倍型, 单用内切酶 *Hae* III 能有效地区分墨西哥海参、花刺参和绿刺参; 内切酶 *Sty* I 产生 5 种酶切图谱单倍型, 单用内切酶 *Sty* I 能有效地区分辐肛参、象牙海参和等刺参。然后, 组合这 3 种酶切单倍型, 即构成各种海参的酶切单倍型组合(pattern), PCR-RFLP 酶切结果和 Jellyfish 软件预测的结果一致, 片段数量、大小吻合。根据单倍型组合的不同, 即能有效区分所有 16 种海参(表 2)。

2.4 海参产品市场调查

运用 PCR-RFLP 方法对市场上购买的 19 种海参产品进行鉴定。有 3 种商品(15%)属于假冒产品, 即用经济价值较低的海参品种冒充替代价值较高的品种。它们分别是: 用等刺参替代仿刺参冻品和干品, 用玉足海参替代棘辐肛参冻品。有 6 种商品(31%)贴标不明确, 它们的标签和实际品种分别是: 乌元海参(玉足海参)、美国海参(玉足海参)、红海参(海地瓜)、北极参(墨西哥海参)、乌枣参(辐肛参)和明秃参(糙海参)。也就是说, 有

47%的检测商品属于错误贴标, 市场海参的正确贴标率仅为 53%。此外, 在花刺参、绿刺参、梅花参、巨梅花参、子安辐肛参、蛇目白尼参、黄乳海参和象牙海参中没有检测出错误贴标(表 3)。

表 2 16 种海参的酶切单倍型和单倍型组合
Tab. 2 Restriction haplotypes and composite haplotype patterns of the sea cucumber species included

种类 species	Dde I		Hae III		Sty I		单倍型组合 pattern
	片段大小/bp	单倍型	片段大小/bp	单倍型	片段大小/bp	单倍型	
	fragment size	haplotypes	fragment size	haplotypes	fragment size	haplotypes	
子安辐肛参 <i>A. lecanora</i>	422, 113, 16	A	477, 74	A	551	A	AAA
棘辐肛参 <i>A. echinites</i>	277, 259, 16	B	478, 74	A	552	A	BAA
辐肛参 <i>A. caerulea</i>	231, 189, 113, 16	C	475, 74	A	475, 74	B	CAB
蛇目白尼参 <i>B. argus</i>	266, 178, 113, 16	D	496, 77	A	322, 251	C	DAC
玉足海参 <i>H. leucospilota</i>	484, 58, 16	E	482, 76	A	309, 249	C	EAC
糙海参 <i>H. scabra</i>	412, 113, 16	A	390, 79, 72	B	292, 249	C	ABC
黄乳海参 <i>H. fuscogilva</i>	361, 62, 58, 55, 16	F	399, 79, 74	B	304, 248	C	FBC
墨西哥海参 <i>H. mexicana</i>	288, 188, 61, 16	G	400, 79, 59, 15	C	303, 250	C	GCC
象牙海参 <i>H. fuscopunctata</i>	396, 154, 16	H	412, 79, 75	B	319, 173, 74	D	HBD
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	279, 164, 113, 16	D	493, 78	A	571	A	DAA
等刺参 <i>I. sp.</i>	298, 74, 72, 68, 41, 16	I	493, 76	A	253, 251, 65	E	IAE
花刺参 <i>S. herrmanni</i>	444, 113, 16	A	272, 222, 48, 31	D	297, 251, 25	C	ADC
绿刺参 <i>S. chloronotus</i>	447, 113, 16	A	494, 51, 31	E	281, 251, 44	C	AEC
梅花参 <i>T. ananas</i>	278, 170, 58, 55, 16	G	494, 83	A	577	A	GAA
巨梅花参 <i>T. anax</i>	443, 58, 55, 16	J	489, 83	A	323, 249	C	JAC
海地瓜 <i>A. molpadioides</i>	435, 113, 16	A	491, 73	A	311, 253	C	AAC

表 3 海参商品种类鉴定
Tab. 3 Commercial samples of cucanmbers analyzed with the methods developed

海参商品 product	代号 codes	标签名称 species labeled	鉴定结果 identified species	样品数量 <i>n</i>
替代产品 substituted	冻品 frozen	S1 红靴参	玉足海参 <i>H. leucospilota</i>	15
		S2 刺参	等刺参 <i>I. sp.</i>	15
	干品 dried	S3 刺参	等刺参 <i>I. sp.</i>	15
贴标不明确 ambiguously labeled	冻品 frozen	S4 乌元海参	玉足海参 <i>H. leucospilota</i>	15
		S5 美国海参	玉足海参 <i>H. leucospilota</i>	15
		S6 红海参	海地瓜 <i>A. molpadioides</i>	15
	干品 dried	S7 北极参	墨西哥海参 <i>H. mexicana</i>	15
		S8 乌枣参	辐肛参 <i>A. caerulea</i>	15
		S9 明秃参	糙海参 <i>H. scabra</i>	15
正确贴标 correctly labeled	冻品 frozen	S10 黄肉参	花刺参 <i>S. herrmanni</i>	15
	干品 dried	S11 刺参	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	15
		S12 石参	子安辐肛参 <i>A. lecanora</i>	15
		S13 虎皮参	蛇目白尼参 <i>B. argus</i>	15
		S14 猪婆参	黄乳海参 <i>H. fuscogilva</i>	15
		S15 象牙参	象牙海参 <i>H. fuscopunctata</i>	15
		S16 黄肉参	花刺参 <i>S. herrmanni</i>	15
		S17 方刺参	绿刺参 <i>S. chloronotus</i>	15
		S18 梅花参	梅花参 <i>T. ananas</i>	15
		S19 巨梅花参	巨梅花参 <i>T. anax</i>	15

3 讨论

本研究充分考虑到线粒体 16S rRNA 基因作为分子标记用于开发海参物种鉴定方法的适合性。线粒体基因比核基因进化速度快, 16S rRNA 基因相对于其他线粒体基因来说更加保守, 能够被用来区分亲缘关系较近的物种^[4]。而且, 线粒体 DNA 作为独立的核外遗传物质, 在细胞内具有很高的拷贝数, 闭合双环的结构使得线粒体 DNA 更加稳定, 研究表明, 剧烈的加热条件能使细胞核 DNA 产生严重的降解^[8]。本研究中发现冻品和干品中提取的 DNA 降解严重, 但作为用于 PCR 扩增的模板, 微量的 DNA 已经足够。因此, 相对于核基因组 DNA 来说, 对于经过深度加工的产品(海参冻品和干品), 线粒体 DNA 序列能够更加容易的扩增获得, 这在海参中也得到了证实^[9]。

Arndt 等^[4]研究东太平洋 15 种海参的系统发育和亲缘关系时指出, 16S rRNA 基因相对于 COI 基因, 在种内更加保守, 非常适合种间关系的研究。本研究结果也表明, 种内扩增 16S rRNA 基因所得到的单倍体序列相似度非常高(99.8%), 基本只有 1 个碱基的转换, 这一结果与前人研究仿刺参 16S rRNA 基因的结果相似^[10]。在种间水平上, 16S rRNA 基因的保守性并没那么高, 遗传距离为 8.1%~31.8%。这些结果表明, 由于种内的高度保守性和种间一定的差异性, 16S rRNA 基因适合作为分子标记用于海参物种鉴定方法的开发。

即使不考虑小于 50 bp 的小片段, 本研究开发的 PCR-RFLP 方法也能很好的鉴别 16 种海参。值得注意的是, 由于 16S rRNA 基因在种内的高度保守性, 极低的种内核苷酸多态性对 PCR-RFLP 方法的结果不产生任何影响, 在用此方法对每种海参的 15 个样品个体进行酶切过程中, 在种内均产生相同、稳定的酶切结果, 这大大增加了 PCR-RFLP 方法的稳定性和可靠性。

相比 PCR 产物测序的序列对比鉴定方法, PCR-RFLP 方法更加简单、快捷、成本较低, 此方法不需要测序, 因此省去了 PCR 产物纯化、测序时间, 并节约了成本。在保证可靠性的情况下,

PCR-RFLP 方法更加方便。

商品替代的主要原因是品种经济价值的不同引起的市场价格的高低。另外一个原因就是海参资源的过度开采。全球大规模的海参捕捞, 导致经济价值较高的海参品种资源匮乏, 使得人们不得不展开对新品种的开发, 目前国际海参渔业已经从单一品种的开采发展到多品种的开采^[2], 在日趋增加的市场需求和利益驱使下, 不法商贩利用人们目前对海参品种的认识较少和海参市场规范化的不完善, 以未知品种取代先前已知的经济价值较高的品种。至于那些贴标不明确的情况, 没有标明商品物种的名称, 反映出海参交易者对海参品种信息的缺乏。其主要原因是很难凭借外部形态来准确鉴定海参品种。从这一角度来说, 本研究中的方法对克服以上这些困难和解决海参品种鉴定问题提供了有力帮助。

本研究中的 PCR-RFLP 方法可对海参品种进行鉴定, 即使是冷冻和干制产品, 本研究对市场上海参贴标状况进行评估, 起到规范海参市场和保护消费者利益的作用, 并且对海参的进出口检测, 生物多样性保护、自然资源可持续性发展和对濒临灭绝海参品种进行捕捞控制提供科学依据。

参考文献:

- [1] Smiley S, Harrison F W, Chia F S. Microscopic anatomy of invertebrates: Echinodermata [M]. New York: Wiley-Liss Press, 1994: 401–471.
- [2] FAO. Sea cucumbers: A global review of fisheries and trade [A]. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper [C], No. 516, Rome, 2008, 1–317.
- [3] 廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [4] Arndt A, Marquez C, Lambert P, et al. Molecular phylogeny of eastern pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence [J]. Mol Phylogen Evol, 1996, 6(3): 425–437.
- [5] Massin C. Reef-dwelling Holothuroidea (Echinodermata) of the Spermonde Archipelago (South-West Sulawesi, Indonesia) [J]. Zoologische Verhandelingen, 1999, 329: 1–144.
- [6] Wen J, Hu C Q, Zhang L P, et al. The application of PCR-RFLP and FINS for species identification used in sea cucumbers (Aspidochirotida: Stichopodidae) products from the market [J]. Food Cont, 2010, 21: 403–407.

- [7] Kerr A M, Janies D A, Clouse R M, et al. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotrida) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7: 53–56.
- [8] Bellagamba F, Moretti V M, Comincini S, et al. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA [J]. J Agric Food Chem, 2001, 39: 3775–3781.
- [9] 单懿, 薛长湖, 李兆杰. 干海参线粒体的提取与纯化研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(10): 111–112.
- [10] 李颖, 刘萍, 孙慧玲, 等. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*) mtDNA 三个基因片段的序列分析 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2): 143–153.

PCR-RFLP identification of 16 commercial sea cucumber species on the basis of 16S rRNA gene

WEN Jing^{1,2}, HU Chaoqun², ZHANG Lüping², FAN Sigang²

1. Department of Biology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China;

2. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

Abstract: PCR-RFLP methodology was developed as a tool to assess the incidence of incorrect labeling of sea cucumbers in commercial food products. The technique allows the genetic identification of 16 species of sea cucumber based on PCR amplification of a common 570 bp fragment of the 16S rRNA gene and follows digestion with 3 restriction enzymes (*Dde* I, *Hae* III and *Sty* I), which generated 10, 5 and 5 haplotypes, respectively. The method was applied to authenticate the exact species of 19 commercial samples, including frozen and dried products. The results showed that 9 samples were incorrectly labeled (47%). Therefore, PCR-RFLP tool really provides convenient, useful and academic approach to identify commercial sea cucumber and makes the traceability to be possible. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 451–457]

Key words: sea cucumber; 16S rRNA gene; PCR-RFLP; identification

Corresponding author: HU Chaoqun. E-mail: cqhu@scsio.ac.cn