

基于线粒体 *cyt b* 基因序列差异的组合 PCR 技术快速鉴定五种鳗鲡养殖种类的方法研究*

赖晓健^{1,2} 林祥日³ 罗碧莲^{1,2} 江兴龙^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心 厦门 361021;
3. 厦门海洋职业技术学院 厦门 361100)

摘要 在自然或人为因素下容易出现鳗苗种质混杂的现象, 由于鳗鲡苗种在形态上十分相似, 难以区分。为了保障鳗农的合法利益和提高养殖效益, 急需建立一种能够在现场快速、高效使用的鳗鲡种质鉴定方法。本研究通过比对找出 5 种常见鳗鲡养殖种类: 日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、美洲鳗鲡(*A. rostrata*)、花鳗鲡(*A. marmorata*)、太平洋双色鳗鲡(*A. bicolor pacifica*)、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*) 线粒体细胞色素 B (cytochrome *b*, *cyt b*) 基因的差异序列, 基于 5 个 *cyt b* 基因序列差异较大的片段, 设计多对引物, 分别经过 PCR 验证和条件优化, 挑选出 4 对引物: aj S1/A1、r-a S1/A2、bp-m S5/A3 和 m-a S4/A4。将这 4 对引物组合在同一个反应体系中进行 PCR 扩增, 进行条件优化, 筛选出组合 PCR 的最优条件: 退火温度为 58°C; 退火时间为 45s; 循环数为 27。结果表明, 通过扩增产物凝胶电泳中条带的有无及大小可快速准确的鉴定出五个鳗鲡种类。本研究建立的组合 PCR 方法在 3 小时内可完成整个种类鉴定过程, 同时可使用便携式小型仪器完成操作, 可满足现场快速、高效鉴定的要求。此外, 通过 MEGA5.0 软件构建 5 种鳗鲡线粒体 *cyt b* 基因序列 NJ 进化树, 发现花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡先聚为一支, 再与日本鳗鲡聚在一起, 而欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡聚在一起, 进化树图显示的遗传距离和它们的地理分布的远近相似。

关键词 组合 PCR; 种质鉴定; 鳗鲡; 细胞色素 B

中图分类号 S931 doi: 10.11693/hyhz20180400097

鳗鲡在分类学中隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鳗鲡目(Anguilliformes), 鳗鲡科(Anguillidae), 鳗鲡属(*Anguilla*)。近二十多年来, 鳗鲡养殖业在我国占有很大的市场。目前, 鳗鲡养殖苗种完全依赖天然捕捞, 由于自然或人为因素, 容易导致不同种鳗苗混杂的现象。比如, 花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)主要分布于西太平洋和印度洋的热带和亚热带地区, 在中国的东南省份和台湾地区以及太平洋中部诸岛等地均有发现(Wade *et al*, 2007)。太平洋双色鳗鲡(*A. bicolor pacifica*)属热带鳗鲡, 主要分布于西太平洋的赤道地区, 包括菲律宾的吕宋岛等

地, 与花鳗鲡分布范围部分重叠, 在河口地区其鳗苗与前者往往被一同捕捞(Han *et al*, 2001), 导致鳗苗的自然混杂。另外, 由于不同种鳗苗的市场价格差异较大, 有商家将低价鳗苗参入高价鳗苗中, 从而获取更大的利益。而白仔鳗苗在形态上十分相似, 很难通过形态学进行辨别, 造成我国鳗鲡养殖业苗种资源比较混乱的局面, 而不同的鳗鲡种类具有不同的生物学特征和养殖环境要求(吴宁, 2010), 盲目养殖会增加风险。同时, 自然保护国际联盟组织已将欧洲鳗列为极度濒危物种, 将对其实施新的监管措施, 我国鳗鱼产品(如烤鳗)出口日本, 要提供检验检疫部门出具

* 福建省科技厅高校产学研合作项目, 2016N5009 号; 福建省科技厅区域发展项目, 2016N3002 号; 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金, RE201804 号。赖晓健, 博士, 助理研究员, E-mail: laixj@jmu.edu.cn

通讯作者: 江兴龙, 博士, 教授, E-mail: xinlongjiang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-17, 收修改稿日期: 2018-05-14

的鳗鱼物种鉴定报告(陈文炳等, 2017)。

目前用于鉴定鱼类的分子生物学技术还有许多, 有限制性片段长度多态性(RFLP) (Ludwig *et al.*, 2002)、单链构象多态性分析(SSCP) (Rehbein *et al.*, 1995)和特异性 PCR (DeSalle *et al.*, 1996; Birstein *et al.*, 1998)等。但 RFLP 这种方法操作繁琐, 相对费时, 要求 DNA 的量, 并且可能因为碱基突变而导致限制性酶切位点的改变。SSCP 的结果易受多种因素影响, 并且当单链 DNA 碱基序列自身的差异或者突变对单链立体构象无影响时, 可能会因此产生假阴性结果而导致漏检(贾秀双, 2014)。特异性 PCR 的方法需要测序, 耗时长, 无法满足现场检测的要求。以上的几种方法不是操作繁琐, 耗时长, 成本高, 就是对技术人员、设备要求高等, 都不适用于生产应用, 所以急需一种能够在现场就快速、高效使用的鉴定方法。本研究通过比对日本鳗鲡(*A. japonica*)、花鳗鲡(*A. mamorata*)、美洲鳗鲡(*A. rostrata*)、太平洋双色鳗鲡(*A. bicolor pacific*)、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*)线粒体细胞

色素 B (cytochrome *b*, *cyt b*)序列, 针对差异的片段设计 4 套特异性引物, 通过组合 PCR 扩增特定的片段, 以此鉴定鳗鲡的种类, 从而达到在现场快速鉴定这 5 种鳗鲡的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本鳗鲡、花鳗鲡、美洲鳗鲡(南美和北美种群)、太平洋双色鳗鲡和欧洲鳗鲡取自于集美大学水产学院海水试验场或购于鳗鲡养殖场。

1.2 提取 DNA

分别取 3 尾日本鳗鲡、花鳗鲡、美洲鳗鲡、太平洋双色鳗鲡和欧洲鳗鲡, 麻醉后, 测量全长与体重(表 1)。酒精消毒后减去表皮取肌肉, -80°C 冰箱保存。根据 DNA 快速提取试剂盒(Tiangen)说明书步骤分别提取各种鳗鲡 DNA, 用 NanoDrop 2000 系统和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度、纯度和质量。用灭菌超纯水稀释至 $10\text{ng}/\mu\text{L}$, -20°C 保存备用。

表 1 鳗鲡全长与体重($n=3$)
Tab.1 Length and weight of eels ($n=3$)

鳗鲡种类	日本鳗鲡	美洲鳗鲡(南)	美洲鳗鲡(北)	太平洋双色鳗鲡	花鳗鲡	欧洲鳗鲡
全长(cm)	58.23±1.67	11.8±0.96	31.23±5.06	45.95±2.89	46.44±1.27	31.6±4.40
体重(g)	214.55±16.90	0.08±0.003	79.01±44.96	201.53±18.44	184.95±3.85	66.52±41.07

注: 美洲鳗鲡(南)指南美洲鳗鲡; 美洲鳗鲡(北)指北美洲鳗鲡; 它们属于美洲鳗鲡的不同地理种群

1.3 设计引物和 PCR 条件优化

从 NCBI 上获取日本鳗鲡等五种鳗鲡的线粒体 *cyt b* 基因序列, 进行序列比对, 在差异片段用 Primer Premier 5 软件进行引物设计, 引物由上海生工生物技术有限公司合成。配置 PCR 反应体系($20\mu\text{L}$): $2\times\text{Taq PCR Master Mix}$ (Tiangen) $10\mu\text{L}$, Primer ($10\mu\text{mol/L}$) $1\mu\text{L}$, 鳗鲡 DNA ($10\text{ng}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, H_2O $7\mu\text{L}$ 。温度梯度 PCR 扩增, PCR 扩增程序为: 预变性 94°C 5min, 94°C 30s, $54\text{--}62^{\circ}\text{C}$ 30s, 72°C 45s, 设置 25、27、29 和 31 共 4 个 PCR 扩增循环数, 总延伸 72°C 7min。根据 PCR 产物的琼脂糖胶电泳条带确定每对引物适合的退火温度和 PCR 扩增循环数。将每对引物的 PCR 产物测序, 得到的序列在 NCBI Blast 进行序列同源性比对分析, 确定 PCR 产物为目的基因片段。

1.4 组合 PCR

将经过 PCR 条件优化后选定的引物混合在同一个 PCR 体系中使用, 优化组合 PCR 温度和循环数, 筛选出最优的引物组合。

2 结果

2.1 *cyt b* 序列分析和比对

通过比对已有的 5 种鳗鲡 *cyt b* 基因序列可以发现 5 种鳗鲡 *cyt b* 基因核苷酸序列共有 180 个变异位点, 其中欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡的 *cyt b* 基因核苷酸序列差异最小仅为 47 个, 同源率为 95.88%, 而欧洲鳗鲡和太平洋双色鳗鲡 *cyt b* 基因核苷酸序列的差异最大为 106bp, 同源率为 90.70% (图 1)。选择其中 5 个核苷酸序列差异较大的片段, 分别为 322—344bp, 451—472bp, 663—688bp, 768—789bp, 1086—1110bp (图 1), 根据这些片段设计 PCR 上下游引物。通过 MEGA5.0 软件构建 5 种鳗鲡 *cyt b* 基因序列 NJ 进化树, 发现花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡先聚为一支, 再与日本鳗鲡聚在一起, 欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡聚在一起 (图 2), 进化树图显示的遗传距离和它们的地理分布的远近相似。

2.2 引物序列及 PCR 反应条件

设计的每对引物经过 PCR 反应后, 选择能够特

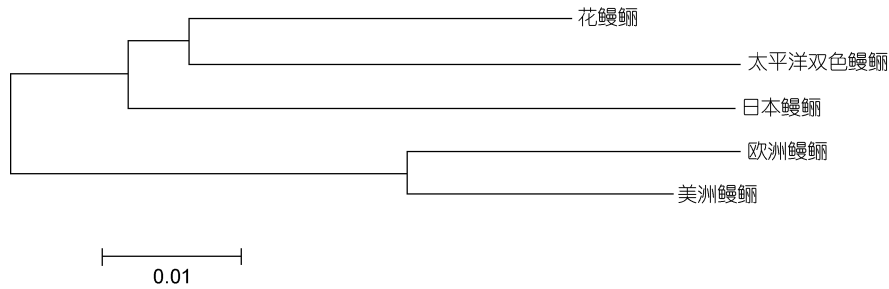
图 2 5 种鳗鲡 *cyt b* 基因序列 NJ 进化树Fig.2 NJ clustering of five *Anguilla* species by *cyt b* gene sequence

表 2 筛选出的引物序列及 PCR 反应优化条件

Tab.2 The primers sequences and PCR conditions

引物	引物序列 5'→3'	目的基因片段大小(bp)	退火温度(°C)	循环数
aj S1	TTATGGCTGATTCATCCGAAATT	889	60.4	25
aj A1	CCTGCTAATGGGTTGAGTACTAAA			
r-a S1	TCTGCCGTTTCATACGTAGGA	341	60.4	25
r-a A2	AACTATTGGGTTTGCAGGGGTA			
bp-m S5	TCCATACTCTCATACAAAGACCAAT	457	58	27
bp-m A3	CTAGTCAACCTACTAATGGGTTTAAAT			
m-a S4	CCGCCGTCCCATACGTAGGAG	678	58	27
m-a A4	TATTTTGTCTTAGTCAACCTACTAAT			

表 3 4 对引物的 PCR 结果

Tab.3 PCR results of the 4 pairs of primers

引物	日本鳗鲡	美洲鳗鲡	花鳗鲡	太平洋双色鳗鲡	欧洲鳗鲡
aj S1/A1	+	—	—	—	—
r-a S1/A2	—	+	—	—	—
bp-m S5/A3	—	—	—	+	—
m-a S4/A4	—	—	+	+	—

注: +表示阳性, —表示阴性

异性扩增得到相应物种 *cyt b* 基因序列片段的引物, 再进行梯度退火温度和梯度循环数进行条件优化后筛选出 4 对引物, 并确定了最优的 PCR 反应条件(表 2)。筛选出 4 对引物中, aj S1/A1 特异性扩增日本鳗鲡 *cyt b* 基因序列, r-a S1/A2 特异性扩增美洲鳗鲡 *cyt b* 基因序列, 由于花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡亲缘关系较近, m-a S4/A4 可以扩增花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡 *cyt b* 基因序列, bp-m S5/A3 能够特异性扩增太平洋双色鳗鲡 *cyt b* 基因序列, 因此可以将花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡区分开。将 5 种鳗鲡 DNA 作为模板分别和这 4 对引物进行 PCR 反应, 通过 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果的阳性或阴性以及阳性条带的大小可以区分出这 5 种鳗鲡(表 3)。

2.3 组合 PCR

在同时加入 4 对引物的组合 PCR 反应体系中, 以

某一种鳗鲡 DNA 作为模板进行组合 PCR 反应。经过梯度退火温度和梯度循环数的条件优化, 确定组合 PCR 的最优条件: 退火温度为 58°C; 退火时间为 45s; 循环数为 27。

组合 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图可见欧洲鳗鲡无条带呈阴性, 其余均匀阳性条带; 日本鳗鲡为 889bp, 南美洲鳗鲡与北美洲鳗鲡均为 341bp, 吕宋鳗鲡(*A. luzonensis*)与花鳗鲡均为 678bp, 太平洋双色鳗鲡扩增出两个条带, 一条大小为 678bp, 另一条为 457bp(表 4, 图 3)。组合 PCR 的结果和利用 4 对引物分别进行单个 PCR 的结果(表 3)一致。组合 PCR 产物各条带的测序结果显示各对引物扩增出相应种类的鳗鲡 *cyt b* 基因片段, 没有出现引物错配。通过组合 4 对引物的 PCR 反应和 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图可以清楚地鉴别这 5 种常见鳗鲡种类。

表 4 组合 PCR 结果
Tab.4 Results of the combined PCR

DNA 模板	引物	结果	
		阳性(+)、阴性(-)	条带大小(bp)
日本鳊	aj S1/A1	+	889
南美洲鳊	r-a S1/A2	+	341
北美洲鳊	bp-m S5/A3	+	341
花鳊(吕宋鳊)		+	678
太平洋双色鳊	m-a S4/A4	+	678 和 457
欧洲鳊		-	无

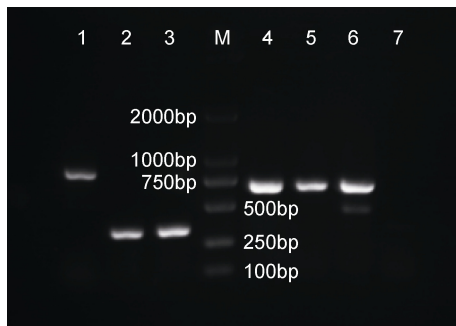


图 3 组合 PCR 产物琼脂糖胶片图

Fig.3 Electrophoresis pattern of the combined PCR

注: 1. 日本鳊; 2. 南美洲鳊; 3. 北美洲鳊; 4. 吕宋鳊; 5. 花鳊; 6. 太平洋双色鳊; 7. 欧洲鳊; M. Marker

3 讨论

本研究采样的 3 尾花鳊有 2 尾 PCR 产物的测序结果显示属于吕宋鳊的概率高于花鳊。有研究者认为吕宋鳊也是一种新鳊种(Kuroki *et al.*, 2012), 但是其仍存在很大的争议, 目前公认的鳊种只有 19 种, 不包括吕宋鳊的(Ege, 1939), 且有研究证明吕宋鳊与花鳊的亲缘关系较近(孙鹏, 2013)。而本次研究主要是鉴定日本鳊、花鳊、美洲鳊、太平洋双色鳊、欧洲鳊, 吕宋鳊可作为花鳊的不同地理种群, 对本研究结果没有影响。

鳊的种质鉴定研究已有报道。陈茂辉(2008)利用肉眼观察、镜检等技术观察鳊的形态学特征, 并结合药检对美洲鳊、花鳊、日本鳊、欧洲鳊等进行种质鉴定。但由于形态学标记技术不够准确、稳定, 易受环境因素的影响, 因此这种方法用来对鳊的种质鉴定并不可靠, 所以要结合分子生物学技术来进行更深入的研究。吴宁(2010)利用 AFLP 技术和线粒体 DNA *CO* 和 *CO* 分子标记技术成功地将美洲鳊、日本鳊、欧洲鳊、非洲鳊(*A. mossambica*)、花鳊和太平洋双色鳊进行鉴定区

分, 陈文炳等(2017)利用 16SrRNA 基因序列 PCR 扩增和测序的方法鉴定了日本鳊, 欧洲鳊和美洲鳊。但上述两种方法都有不足之处, AFLP 技术的操作过程比较复杂, 对 DNA 的质量以及操作人员技术水平要求较高, 一般实验室开展此技术尚存在困难(刘云国, 2009), 而后者序列需要测序, 步骤繁琐, 耗时较长, 成本高。本研究将单独的 4 个 PCR 反应体系的引物通过优化组合建立一个组合 PCR 反应, 通过实验探索出其合适的组合反应条件, 组合 PCR 得出的结果与单个 PCR 反应所得结果相同, 通过单个 PCR 反应产物的琼脂糖胶图即可鉴定鳊的种类, 并且还能够省时、节约试剂和减少操作。本研究中 DNA 的提取通过使用快速 DNA 提取检测试剂盒, 提高了 DNA 提取速度, 通常只要 5-10 分钟。整个鉴定过程在 2 至 3 小时即可完成。同时所使用到的仪器也都是些小型仪器(PCR 仪、电泳仪和可见光透射仪等), 方便携带。所以本研究提供的组合 PCR 技术是一种能够在现场就快速、高效的检测, 适用于生产应用的鉴定方法。

线粒体 DNA 具有严格的母性遗传, 重组率低, 进化速度快, 并且线粒体 DNA 不同基因区域的进化速率不同, 因此不同的片段可进行不同水平的种类鉴定(齐兴柱等, 2007; 陈姝君等, 2008)。 *cyt b* 是线粒体自身编码的为数不多的蛋白质之一, 而且还是线粒体 DNA 上惟一结构和功能被了解得较为清楚的蛋白质编码基因, 具有适中的进化速度, 被认为是分析系统发育问题最可信的线粒体 DNA 标记之一, 因而广泛地运用于脊椎动物系统进化的研究(Zardoya *et al.*, 1996)。本研究利用常见的 5 种养殖鳊 *cyt b* 基因做进化树分析, 结果表明和利用线粒体 DNA *CO* (吴宁, 2010), 12S rRNA 和 *cyt b* (Lin *et al.*, 2001), 16S rRNA 和 *cyt b* (Aoyama *et al.*, 2001)的进行进化树分析的结果一致。马亚等(2012)和张殿昌等(2006)多位研

研究者曾使用 PCR 方法分析线粒体中的 *cyt b* 基因的部分片段, 成功区分了不同科、不同种的鱼类。

4 结论

本实验针对日本鳗鲡、美洲鳗鲡、花鳗鲡、太平洋双色鳗鲡、欧洲鳗鲡这 5 种常见养殖鳗鲡线粒体 *cyt b* 序列的差异, 设计引物并通过 PCR 条件优化获得 aj S1/A1、r-a S1/A2、bp-m S5/A3、m-a S4/A4 这 4 对引物, 通过组合 PCR 方法可快速、有效的现场鉴定这 5 种鳗鲡。下一步实验可继续深入研究以区分出更多的鳗鲡种类, 完善组合 PCR 方法。本研究结果可提高养殖效益保障鳗农的合法利益, 促进鳗鲡养殖业的健康发展, 对鳗鲡加工与出口外贸也有重要的现实意义。

参 考 文 献

- 马 亚, 岳志芹, 赵玉然等, 2012. 松江鲈鱼 *cyt b* 基因序列分析及种质鉴定. 生物技术通报, (8): 119—124
- 刘云国, 2009. 水产生物 DNA 分子标记技术. 北京: 科学出版社
- 齐兴柱, 尹绍武, 娄甜甜等, 2007. 海南产花鳗鲡细胞色素 *b* 基因的克隆及序列分析. 海南大学学报(自然科学版), 25(4): 397—401
- 孙 鹏, 2013. *COI* 条形码在鳗鲡种质鉴定和系统发育研究中的应用. 福州: 福建农林大学硕士学位论文
- 吴 宁, 2010. 几种鳗鲡苗种的种质鉴定及其遗传多样性研究. 厦门: 集美大学硕士学位论文
- 张殿昌, 江世贵, 邵艳卿等, 2006. 3 种野鲮亚科鱼类线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及种质鉴定. 农业生物技术学报, 14(3): 446—447
- 陈文炳, 缪婷玉, 彭 娟等, 2017. 基于 16S rRNA 基因 DNA 条形码鉴定美洲鳗、欧洲鳗、日本鳗. 食品科学, 38(4): 283—289
- 陈茂辉, 2008. 浅谈常见几种鳗鲡苗的鉴定. 科学养鱼, (6): 7
- 陈姝君, 赫崇波, 木云雷等, 2008. 硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析. 中国水产科学, 15(1): 12—21
- 贾秀双, 2014. 基于组合 PCR 的近缘物种鉴定方法的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- Aoyama J, Nishida M, Tsukamoto K, 2001. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 20(3): 450—459
- Birstein V J, Doukakis P, Sorkin B *et al*, 1998. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar. Conservation Biology, 12(4): 766—775
- DeSalle R, Birstein V J, 1996. PCR identification of black caviar. Nature, 381(6579): 197—198
- Ege V, 1939. A revision of the genus *Anguilla* Shaw: a systematic, phylogenetic, and geographical study. Oxford: Oxford University Press, 16: 1—256
- Han Y S, Chang C W, He J T *et al*, 2001. Validation of the occurrence of short-finned eel *Anguilla bicolor pacifica* in natural waters of Taiwan. Acta Zoologica Taiwanica, 12(1): 9—19
- Kuroki M, Miller M J, Aoyama J *et al*, 2012. Offshore spawning for the newly discovered anguillid species *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) in the Western North Pacific. Pacific Science, 66(4): 497—507
- Lin Y S, Poh Y P, Tzeng C S, 2001. A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 20(2): 252—261
- Ludwig A, Debus L, Jenneckens I, 2002. A molecular approach to control the international trade in black caviar. International Review of Hydrobiology, 87(5—6): 661—674
- Rehbein H, Makie I M, Pryde S *et al*, 1995. Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung, 42(4): 209—212
- Wade B, Jamandre B W D, Shen K N *et al*, 2007. Molecular phylogeny of Philippine freshwater eels *Anguilla* spp. (Actinopterygii: Anguilliformes: Anguillidae) inferred from mitochondrial DNA. The Raffles Bulletin of Zoology, 14: 51—59
- Zardoya R, Meyer A, 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. Molecular Biology and Evolution, 13(7): 933—942

IDENTIFICATION OF FIVE CULTURAL *ANGUILLA* SPECIES BY COMBINED PCR TECHNIQUE BASED ON DIFFERENT SEQUENCES OF MITOCHONDRIA CYTOCHROME *b* GENE

LAI Xiao-Jian^{1,2}, LIN Xiang-Ri³, LUO Bi-Lian^{1,2}, JIANG Xing-Long^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Industrial Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China; 3. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China)

Abstract Different *Anguilla* spp. species were easily mixed naturally or artificially. Due to *Anguilla* spp. species are very similar in shape, it is very difficult to separate *Anguilla* spp. by naked eye. In order to protect the legitimate interests of eel farmers and improve aquaculture efficiency, a rapid and efficient identification method of *Anguilla* spp. was needed urgently. In the study, the combined PCR technique was used. Firstly, the cytochrome *b* gene of 5 common cultural species (*Anguilla japonica*, *A. rostrata*, *A. marmorata*, *A. bicolor Pacifica* and *A. anguilla*) were aligned, and then over ten pairs of primers were designed from the differential sequences. Secondly, annealing temperature and cycles of PCR were optimized and 4 pairs of primers: aj S1/A1, r-a S1/A2, bp-m S5/A3 and m-a S4/A4 were selected. Finally, the 4 pairs of primers were combined into one PCR, and the conditions of the combined PCR were optimized and validated. The results showed that the 5 *Anguilla* spp. species were identified through the combined PCR amplification and the result of gel electrophoresis. A rapid, efficient identification method of *Anguilla* spp., which met the demands of eel culture industry, was established in the study. For phylogenetic analysis, mitochondrial *cyt b* gene sequences of the 5 *Anguilla* spp. were used to construct neighbor-joining phylogenetic tree by MEGA5.0 software. The results found that *A. marmorata* and *A. bicolor pacifica* were gathered into one clade and then gathered with *A. japonica*, while *A. anguilla* and *A. rastrata* were clustered into another clade. The phylogenetic tree showed that the genetic distance was similar to their geographical distribution.

Key words combined PCR; idioplasm identification; *Anguilla* spp.; cytochrome *b*