

# PCR 检测食品中致敏原虾源性成分

曹际娟\*, 赵彤彤, 刘冉, 孙铭英, 刘洋

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

**摘要:** **目的** 建立食品中致敏原虾源性成分的 PCR 检测方法。**方法** 选择虾的 16S rRNA 基因作为物种鉴定的特异性标记基因, 设计适合于 PCR 扩增的引物, 进行虾的 16S rRNA 基因特异性和灵敏性检测。**结果** 通过对 14 种虾、5 种蟹、24 种鱼、12 种贝类以及章鱼等 56 种样品进行 PCR 检测, 结果表明, 可以很好地鉴别虾源性成分。为研究食品加工过程对检测灵敏度的影响, 以虾肉和鱼肉为代表, 进行 133 °C 热处理 30 min 的过程, 检测灵敏度可达到在鱼肉粉中检出 0.05% 含量的虾源性成分。**结论** 该方法特异、灵敏、准确, 适于食品中致敏原虾源性成分的检测。

**关键词:** PCR; 致敏原; 虾源性成分; 检测

## Detection of shrimp-derived components of allergen in food by PCR

CAO Ji-Juan\*, ZHAO Tong-Tong, LIU Ran, SUN Ming-Ying, LIU Yang

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method for the detection of shrimp-derived components of allergen in food by PCR. **Methods** The primers for PCR were designed based on 16S rRNA genes through comparing a large number of nucleic acid sequences published by National Center for Biotechnology Information (NCBI) among different shrimp species. **Results** Totally 56 kinds of samples including shrimps, crabs, fish, shellfish and octopus were subjected to the detection by PCR. The results indicated that PCR could successfully identify the shrimp-derived components. In order to explore the effect of food processing on detection sensitivity, fish powder containing shrimp powder were treated by heating at 133 °C for 30 min. The detection sensitivity of shrimp-derived components in fish powder reached up to 0.05%. **Conclusion** The new established method is highly specific, sensitive and accurate, and can be applied for the detection of allergen shrimp-derived components in foods.

**KEY WORDS:** PCR; allergen; shrimp-derived components; detection

食品过敏是人们对食品产生的一种变态反应。临床表现皮疹、腹痛、呕吐、腹泻、支气管痉挛、血压低等症状, 严重时甚至休克。虾是一种蛋白质非常丰富、营养价值很高的食物, 深受人们的喜爱。然而, 在联合国粮农组织提出的八大类引起过敏的食物中, 虾与蟹等甲壳类动物及其制品是重要的一类食物性

致敏原<sup>[1-3]</sup>。在中国, 虽然还没有类似的调查, 但有关食用虾、蟹等引起过敏的报道屡见不鲜<sup>[4-5]</sup>。1981年 Hoffman<sup>[6]</sup>等首先从虾中提取到一种过敏性糖蛋白 Antigen II, 分子量约 38 kDa, 经鉴定具强致敏性。Jeoung 等<sup>[7]</sup>证实从虾中分离出的原肌球蛋白是虾的主要过敏原(Pen a I), 分子量为 36 kDa。1990年

基金项目: 国家公益性行业科研专项课题“常见食品过敏原的定量检测方法研究”(2007GYJ036)

\*通讯作者: 曹际娟, 女, 研究员, 主要从事食品安全检测与研究。E-mail: cjj0909@163.com

Morgan 等<sup>[8]</sup>研究证明, 虾中至少存在 13 种过敏原蛋白质, 分子量范围在 16~166 kDa。目前虾过敏原蛋白质 Pen a I 性质的研究较为清楚, 而虾中其它过敏原人们知之尚少<sup>[9]</sup>。

美国、欧盟、英国、中国香港等国家和地区都陆续实行了食品过敏源标识管理制度。虾的种类繁多, 不同品种的虾的蛋白质组成存在一定的差异<sup>[10-12]</sup>。虾的致敏原蛋白质种类复杂, 势必对检测过敏原蛋白质带来局限性。因而, 建立食品中虾源性成分的 PCR 检测方法具有很重要的意义。本研究利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)上公布的虾的核酸序列, 比较其中足够多的虾的种间数据, 选择了 16S rRNA 基因片段进行设计引物, 可以特异性检测虾源性成分, 首次建立了食品中致敏原虾源性成分的 PCR 检测方法。

## 1 料与方法

### 1.1 样品和 DNA 提取

对虾、海沙虾、小青虾、夹板虾、北极虾、基围虾、海虾、青虾、龙虾、小龙虾、竹节虾、虾米、虾皮、虾爬等 14 种虾样品, 虎头蟹、赤甲蟹、河蟹、海蟹、鳊蟹等 5 种蟹样品, 鲮鱼、银鱼、三文鱼、比目鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、青鱼、红鱼、鳝鱼、冻黑线鳕鱼、冻狭鳕鱼、冻南蓝鳕鱼、冻真鳕鱼、鲑鳟鱼、鲱鱼、柳叶鱼、金枪鱼、鲑鱼、鳀鱼、多春鱼、沙丁鱼、马哈鱼、黄花鱼等 24 种鱼样品, 杂色蛤、紫石房蛤、江瑶贝、玉螺、牡蛎、扇贝、赤贝、贻贝、文蛤、海螺、青柳蛤、虾夷贝等 12 种贝类样品, 此外, 还有软体动物章鱼样品。采用这 56 种样品用于特异性实验。这些样品分别来源于辽宁大连海鲜市场、辽宁丹东海鲜市场和辽宁出入境检验检疫局食品检测中心实验室留存样品。虾肉和鱼肉用于 PCR 方法的检测灵敏度实验。

按 Universal Genomic DNA Extraction Kit TaKaRa, Ver.3.0)的方法抽提样品 DNA。用于灵敏度实验的虾肉和鱼肉, 分别于 133 °C 处理 30 min, 再加液氮研磨成粉状。将虾肉粉和鱼肉粉样品按比例进行混合, 得到系列百分比(10%, 5%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0%)的虾肉粉样品, 提取 DNA 用作 PCR 反应的模板, 进行检测灵敏度分析。

### 1.2 引物设计和合成

根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)上公布

的虾的核酸序列, 比对其中足够多的虾的核酸序列, 根据虾 16S rRNA 基因之间的差异, 选取不同基因位点, 采用 DNAMAN 8.0 软件, 分别设计两对扩增虾 16S rRNA 基因的特异性引物, 序列如下: Shrimp1 F 5'-GATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCG-3'和 Shrimp1 R 5'-TAAAGGTCGAACAGACCTTCTCACT-3', 扩增片段长度为 135 bp。Shrimp2 F 5'-AAGTCTAGC TGCCCACTG-3'和 Shrimp2 R 5'-GTCAACCATCAT CAAGCC-3', 扩增片段长度为 119 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成和纯化(使用 PAGE 制备方法), -20 °C 保存。

### 1.3 PCR 扩增和电泳检测

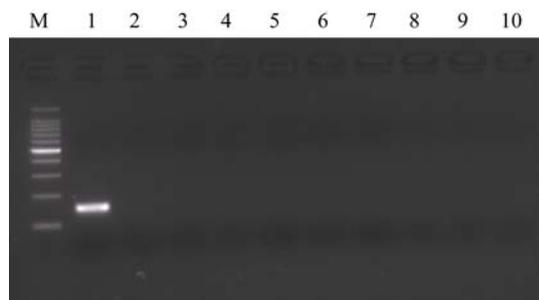
PCR 反应采用 25 μL 体系, 按下列组分配置 PCR 反应液: 10×PCR 缓冲液 2 μL, 10 μmol/L 的正向和反向引物各 1 μL, dNTP(10 mmol/L) 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA(含 50 ± 10 ng DNA) 1 μL, 加 dH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。

PCR 反应条件如下: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 66 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min 结束反应; 4 °C 保存反应产物。之后, PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行观察。

## 2 实验结果

### 2.1 虾源性成分特异性基因 DNA 片段的扩增

取对虾等 56 种样品的 DNA, 使用 Shrimp1 引物进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果发现, 对虾、海沙虾、小青虾、夹板虾、基围虾、海虾、青虾、龙虾、小龙虾、竹节虾、海蟹等 11 种样品可以扩增出 135 bp 的 DNA 片段。其中, 海蟹是非特异性扩增。北极虾、虾米、虾皮、虾爬没有观察到扩增条带, 其他的 4 种蟹、24 种鱼、12 种贝类和章鱼等非虾源性样品都没有观察到扩增条带。图 1 是 Shrimp1 引物 PCR 扩增的部分样品电泳图谱。使用 Shrimp2 引物进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果发现, 对虾、海沙虾、小青虾、夹板虾、北极虾、基围虾、海虾、青虾、龙虾、小龙虾、竹节虾、虾米、虾皮、虾爬、虎头蟹、赤甲蟹等 16 种样品可以扩增出 DNA 片段, 其中, 虎头蟹、赤甲蟹有稍弱的非特异性扩增条带, 而其他样品则没有观察到扩增条带, 图 2 是 Shrimp2 引物 PCR 扩增的部分样品电泳图谱。



M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 对虾; 2: 北极虾; 3: 虾米; 4: 虾皮; 5: 虾爬; 6: 虎头蟹; 7: 三文鱼; 8: 牡蛎; 9: 章鱼; 10: 扇贝  
M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: Prawn; 2: *Pandalus borealis*; 3: Dried peeled shrimp; 4: *Acetes chinensis* Hansen; 5: *Oratosquilla oratorical*; 6: *Orithya sinica*; 7: Salmon; 8: Oysters; 9: Octopus; 10: Scallops

图1 Shrimp1引物检测虾源性成分的PCR扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of shrimp-derived components using Shrimp 1 primers



M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 对虾; 2: 海蟹; 3: 河蟹; 4: 鳊蟹; 5: 三文鱼; 6: 红鱼; 7: 鲈鱼; 8: 牡蛎; 9: 章鱼; 10: 扇贝  
M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: Prawn; 2: Sea crabs; 3: *Eriocheir sinensis*; 4: *Chionoectes bairdi*; 5: Salmon; 6: Redfish; 7: *Microstomuskitt*; 8: Oysters; 9: Octopus; 10: Scallops

图2 Shrimp2引物检测虾源性成分的PCR扩增产物的电泳图谱

Fig. 2 PCR amplification of shrimp-derived components using Shrimp 2 primers

Shrimp1、Shrimp2引物PCR检测结果汇总见表1。对于未知样本,同时使用这两对引物进行PCR检测,可以检测出所有的虾源性成分,具有互相补充的作用。使用Shrimp1和Shrimp2这两对引物进行PCR检测时,虎头蟹、赤甲蟹、海蟹也会有扩增,蟹与虾的亲缘关系比较近,同属于节肢动物门甲壳纲的十足目,也是重要的一类甲壳类食物过敏原<sup>[1-2]</sup>。采用上述两对引物检测样品时,若同时出现两个阳性结果,就可以直接判定为检出虾源性成分。若仅Shrimp1引物出现一个阳性结果,则可以直接判定样品为海蟹成分。若仅Shrimp2引物出现一个阳性结果,

则需进一步对PCR产物进行测序,经Blast比对分析就可以排除假性结果。

## 2.2 检测方法的灵敏度

以对虾为例,采用Shrimp1引物对本方法的检测下限进行研究。以虾为原料的食品都经过了加工处理过程,这个过程可以造成DNA的断裂和损失,显然也会影响检测的灵敏度。为了研究加工过程对检测灵敏度的影响,本实验参照Tartaglia M等的方法<sup>[13]</sup>,将虾肉和鱼肉进行了133℃热处理30min的过程。在含有10%、5%、0.5%、0.1%和0.05%的虾肉粉样品中可以扩增条带,在含有0.01%和0%的虾肉粉样品中没有观察到扩增条带。从样品经133℃热处理30min过程,到DNA提取和PCR扩增,所有灵敏度实验都进行了6次重复,结果都表明PCR方法检测虾肉粉的检测限可以达到0.05%。

## 2.3 不同食品样品的检测情况

为验证本研究所建立的虾源性成分PCR检测方法的实用性,我们取虾饺、方便面中的虾味调料、虾酱、虾油、虾汤等食品样品,采用Shrimp1引物进行PCR检测。结果发现,虾饺、虾味调料、虾酱、虾汤中的虾肉均可以检测出虾源性成分,而虾油、虾汤汁则无法检测出虾源性成分,这说明本方法不适合于对虾油、虾汤汁的检测,这可能是由于很难提取虾油、虾汤汁DNA的原因造成的。

此外,本研究将虾肉按0.05%的比例分别添加到鸡肉、蔬菜、面粉中,采用Shrimp1引物进行PCR检测,均可以检测出虾源性成分。结果表明,本研究所建立的方法适合于对食品(虾油、虾汤汁除外)中虾源性成分的检测。

## 3 讨论

目前,国际上开展的食物过敏原检测方法很多<sup>[14-15]</sup>。利用人血清特异性IgE检测食物过敏原,对人血清具有依赖性,而人血清是很难保证一致的,该方法难以实现标准化。用单克隆或多克隆抗体检测食物过敏原,其优点在于灵敏度高、操作简单、便于普及,但是选择的特异性蛋白不同,检测结果就会有所不同,要依赖于质量稳定的动物抗体,前期研发过程较长。以检测DNA为基础的PCR方法可以识别特定的DNA片段,得到高精度的检测结果。但是,PCR

表 1 两对引物检测虾源性成分的试验结果

Table 1 Detection results of shrimp-derived components using two pairs of primers

| 序号 | 样品名称 |                                 | 两对引物的检测结果 |         | 序号 | 样品名称           |                                 | 两对引物的检测结果 |         |
|----|------|---------------------------------|-----------|---------|----|----------------|---------------------------------|-----------|---------|
|    | 中文名  | 拉丁名<br>(或英文名)                   | Shrimp1   | Shrimp2 |    | 中文名            | 拉丁名<br>(或英文名)                   | Shrimp1   | Shrimp2 |
| 1  | 对虾   | Prawn                           | +         | +       | 12 | 虾米             | Dired peeled shrimp             | —         | +       |
| 2  | 海沙虾  | <i>Crangon septemspinosus</i>   | +         | +       | 13 | 虾皮             | <i>Acetes chinensis Hansen</i>  | —         | +       |
| 3  | 小青虾  | <i>Macrobrachium nipponense</i> | +         | +       | 14 | 虾爬             | <i>Oratosquilla oratoria</i>    | —         | +       |
| 4  | 夹板虾  | <i>Alpheus japonicus</i>        | +         | +       | 15 | 虎头蟹            | <i>Orithyia sinica</i>          | —         | +       |
| 5  | 北极虾  | <i>Pandalus borealis</i>        | —         | +       | 16 | 赤甲蟹            | <i>Charybdis japonica</i>       | —         | +       |
| 6  | 基围虾  | <i>Metapenaeus ensis</i>        | +         | +       | 17 | 海蟹             | <i>Portunus trituberculatus</i> | +         | —       |
| 7  | 海虾   | Sea shrimp                      | +         | +       | 18 | 河蟹             | <i>Eriocheir Sinensis</i>       | —         | —       |
| 8  | 青虾   | <i>Brachium nipponense</i>      | +         | +       | 19 | 鳊蟹             | <i>Chinoecetes bairdi</i>       | —         | —       |
| 9  | 龙虾   | Lobster                         | +         | +       | 20 | 章鱼             | Octopus                         | —         | —       |
| 10 | 小龙虾  | <i>Procambarus clarkii</i>      | +         | +       | 21 | 银鱼等 24<br>种鱼类  | Whitebait                       | —         | —       |
| 11 | 竹节虾  | <i>Penaeus japonicus</i>        | +         | +       | 22 | 杂色蛤等<br>12 种贝类 | Short necked clam               | —         | —       |

注: “+”表示有特异性扩增片段, “—”表示无特异性扩增片段

分析技术有可能在相关蛋白不存在的情况下检测其 DNA 的存在。对于致敏原蛋白质种类繁多而且复杂的虾而言, 采用 PCR 技术检测虾源性成分, 具有很好的优势。

建立可靠的鉴定虾源性成分的 PCR 检测方法, 需要选择合适的基因片段。所选的基因必需种属特异性强, 但在物种内变异性比较小。为了选择合适的鉴定虾的基因片段, 我们使用了 NCBI 上公布的核酸序列, 比对其中足够多的虾的核酸序列。在一些候选基因片段中, 选择了虾的 16S rRNA 基因片段。在 NCBI 中比对引物核酸序列, Tax BLAST 给出的结果表明, 这些引物对在所有虾的数据中吻合率接近 100%。以虾为原料的食品可能都经过了加工处理过程, 可造成 DNA 的断裂和损失, 显然也会影响检测的灵敏度。为了研究加工过程对检测灵敏度的影响, 本实验采用加工烘烤过的虾肉粉、鱼肉粉进行灵敏度检测, 可达到在鱼肉粉中检出 0.05% 含量的虾源性成分。本研究首次报道了食品中致敏原虾源性成分的 PCR 检测方法, 具有高特异性和灵敏性的特点, 为食物致敏原的虾源性成分鉴定提供了快速、有效的检测方法。

#### 参考文献

[1] Dean DM, Hugh AS, Ronald AS. Food Allergy: Adverse reactions to foods and food additives(Second Edition) [M]. USA

Blackwell science inc, 1997.

- [2] Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, *et al.* Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy [J]. *Allergy*, 2001, 56(12): 1172-1179.
- [3] Daul CB, Morgan JE, Lehrer SB. The natural history of shrimp hypersensitivity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 86: 88-93.
- [4] 许岩, 许红. 食用虾爬子引起过敏性休克 1 例[J]. *沈阳医学院学报*, 2000, 2(2): 106.
- [5] 安爱芝, 孙月芹. 食坑虾引起过敏性休克 1 例[J]. *医学理论与实践*, 2003, 16(8): 877.
- [6] Hoffman DR, Day Jr, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp [J]. *Ann Allergy*, 1981, 47:17-22.
- [7] Jeoung BJ, Reese G, Hauck P, *et al.* Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1(tropomyosin)by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 100(2): 229-234.
- [8] Morgan JE, Daul CB, Lehrer SB. The relationships among shrimp-specific IgG subclass antibodies and immediate adverse reactions to shrimp challenge [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 86: 387.
- [9] Reese G, Ayuso R, Carle T, *et al.* IgE-Binding Epitopes of Shrimp Tropomyosin, the Major Allergen Pen a 1 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118: 300-301.
- [10] 顾可飞, 高美须, 李春红, 等. 虾过敏及虾过敏原[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(4): 239-240.
- [11] 李振兴, 林洪, 李明华, 等. 不同虾类的过敏原及其过敏原性

- [J]. 水产学报, 2005, 30(2): 281-284.
- [12] Naqpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, *et al.* Isolation and characterization of heat stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*) [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 83: 26-36.
- [13] Tartaglia M, Saulle E, Pestalozza S, *et al.* Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. *J Food Prot*, 1998, 61(5): 513-518.
- [14] Byun MW, Kim JH. Effects of Gamma Radiation on the Conformational and Antigenic Properties of a Heat-Stable Major Allergen in Brown Shrimp [J]. *J Food Prot*, 2000, (7): 940-944.
- [15] 赖荷, 赵绮华, 刘永平, 等. 采用 Western blotting 的方法分析罗氏虾致敏原成分[J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 2004, 24(9): 747.

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



曹际娟, 女, 研究员, 主要从事食品安全检测与研究。

E-mail: cjj0909@163.com

---

## “食品农药残留检测”专题约稿

食品中农药超标、违规使用, 正在成为农产品质量安全的源头之祸。近来出现的有毒豇豆、毒韭菜事件都与之相关。与此同时, 食品中农药残留检测技术发展也越来越快。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品农药残留检测”专题, 由国家食品安全风险评估中心赵云峰教授担任专题主编, 围绕食品中农药残留的**检测方法(检测新技术、快速检测技术、多残留检测技术等)**、**残留分布与消除规律、风险评估、检测机理**等多方面展开讨论, 计划在**2013年初**出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在**10月31日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

### 投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部