

# 食品中牛奶过敏原成分 LAMP 检测方法的建立

程晋霞<sup>1,2</sup>, 曾静<sup>1</sup>, 马丹<sup>1</sup>, 魏海燕<sup>1</sup>, 张海予<sup>2\*</sup>

(1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 北京农学院, 北京 102206)

**摘要: 目的** 建立食品过敏原牛奶成分 LAMP(loop-mediated isothermal amplification)检测方法, 并与实时荧光 PCR(real-time PCR)检测方法比对。**方法** 针对牛线粒体细胞色素 b(cyt-b)基因设计 LAMP 引物并建立反应体系, 在特异性和灵敏度方面与 real-time PCR 检测方法比对。**结果** 本研究建立的 LAMP 方法检测 9 份不同品牌的牛奶和羊奶及其加工制品, 没有出现交叉反应, 具有良好的特异性。该方法的检测灵敏度为 0.5%, 与 real-time PCR 方法检测灵敏度相当。检测了 69 份实际样品, 检测结果与 real-time PCR 检测结果一致。**结论** 本研究建立的食品过敏原牛奶成分 LAMP 检测方法简单经济, 检测结果可靠, 可有效缩短检测时间, 适用于过敏原牛奶成分的检测, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 牛奶; 过敏原; 环介导等温扩增(LAMP); 实时荧光 PCR

## Establishment of loop-mediated isothermal amplification method for detection of milk allergen in foods

CHENG Jin-Xia<sup>1,2</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>, MA Dan<sup>1</sup>, WEI Hai-Yan<sup>1</sup>, ZHANG Hai-Yu<sup>2\*</sup>

(1. *Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China;*  
2. *Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China*)

**ABSTRACT: Objective** The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method was established for milk allergen testing and compared with the real-time PCR detection methods. **Methods** The cyt-b gene of bovine was used to design LAMP primers and then establish reaction system. The specificity and sensitivity of LAMP were compared with real-time PCR detection method. **Results** The specificity of LAMP method was tested by 9 different milk and goat milk products. The results showed that the LAMP method was highly specific to milk. No cross-reaction was founded. The detection limit of LAMP reached 0.5% in base-material addition test which was consistent with the real-time PCR method. Through 69 practical food samples testing, the LAMP results were consistent with real-time PCR results. **Conclusion** The LAMP detection method of milk allergen established in this study is simple, economical and reliable, which can effectively reduce the detection time and apply to the detection of milk allergen with good application prospects.

**KEY WORDS:** milk; allergen; loop-mediated isothermal amplification; real-time PCR

基金项目: 十二五科技支撑计划“食品安全高新检测技术研究与产品开发”(2011BAK10B03)

**Fund:** Supported by the Twelfth Five Year Science and Technology Support Program of Food Safety and Advanced Test Technology and Product Development(2011BAK10B03)

\*通讯作者: 张海予, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为农产品的贮藏与加工。E-mail: zhysph@sina.com

\*Corresponding author: ZHANG Hai-Yu, Associate Professor, Beijing University of Agriculture, No.7, Huilongguan, Changping District, Beijing 102206, China. E-mail: zhysph@sina.com

## 1 引言

食物过敏已成为重要的食品安全问题。过敏性疾病发病率呈逐年上升趋势。发达国家超过 20% 的人受过敏性疾病的困扰<sup>[1-2]</sup>。乳及乳制品是 FAO/WHO 认定的导致人类食物过敏的八大类食品之一<sup>[3-4]</sup>, 因此牛奶也是美国及欧盟新食品标签法中规定必须标示的过敏原成分之一<sup>[5]</sup>。作为婴儿和儿童的主要食品及成人餐饮主要构成部分的牛奶与奶制品的质量和安备受关注。由于婴儿和儿童的耐受力有限, 过敏一旦发生结果往往比较严重。调查发现牛奶及其制品引发的儿童过敏发生率高达 7.5%<sup>[6]</sup>。因此, 近年来欧、美、日等发达国家通过严密的科学调查和立法认证, 相继出台了规范食品中过敏物质标识的法律法案, 对食品标签上过敏成分的标注作出了严格的规定并开始对部分进口食品进行过敏原成分检测<sup>[7]</sup>。中国对食品过敏原的研究和关注刚刚起步, 与国外发达国家相比有着较大的差距。在 GB7718-1994《食品标签通用标准》法规中没有提及食品过敏原的内容, 更没有强制各食品生产厂家对食品过敏原予以标注。国内消费者对食物过敏原标签更是知之甚少。由于国内对食品过敏成分检测技术落后, 致使中国食品出口企业经常因为食品过敏原标注不正确而遭遇退货<sup>[8]</sup>。因此, 在力求尽快与国际标准接轨的要求下, 建立拥有自主知识产权的快速、标准化、高灵敏度的食品过敏原成分检验技术显得十分重要。

近年来, 随着核酸快速检测技术的研究发展, 普通 PCR 及 real-time PCR 等快速、特异方法被引入食品过敏原成分的检验, 但这类方法均需要特殊仪器, 不适于在广大基层实验室实施开展, 使其应用受到了极大的限制。近年来出现的 LAMP 方法, 具有简单、特异、快速、灵敏等优点, 尤其适合在基层实验室应用与开展。本实验采用通过荧光信号判断 LAMP 反应的技术和设备, 建立牛奶过敏原成分 LAMP 检测方法, 并与 real-time PCR 方法比对, 旨在建立切实可行的牛奶过敏原成分 LAMP 检测技术, 检测时间只需 45~60 min 即可。通过 LAMP 技术检测牛奶过敏源, 未发现国内外相关报道, 具有一定的创新意义, 这一检测方法的建立, 有助于解决我国食品安全中的过敏问题, 有助于为预防牛奶食品过敏的发生提供预警技术手段, 保障人民群众的身体健

康, 并为我国食品过敏原标签管理奠定了一定的技术基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 样品

实验样品包括不同种类、不同品牌的牛奶和羊奶及其加工制品。主要包括纯牛奶类、酸牛奶类、奶粉类、牛奶饮品类、饼干类、山羊奶制品类及其他类(包括咖啡、果冻、巧克力等)。样品均购于超市。

#### 2.1.2 试剂

甜菜碱(5 mol/L, 美国 Sigma 公司), dNTP(10 mmol/L, 生工生物工程(上海)股份有限公司), MgSO<sub>4</sub>(50 mmol/L, 北京索莱宝科技有限公司), *Bst* DNA 聚合酶(8 U/μL, 美国 NEB 公司), 10 × ThermoPol 缓冲液(1 × ThermoPol 缓冲液含 0.1 % TritonX-100, 10 mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 美国 NEB 公司), 钙黄绿素荧光染料(广州迪澳生物技术有限公司), TaqMan Gene Expression Master Mix(2 ×, 美国 Life), CTAB 提取液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 20 g/L CTAB; CTAB 沉淀液: 5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl; TE 缓冲液(1 ×, 生工生物工程(上海)股份有限公司); 三氯甲烷(北京国药集团化学试剂有限公司); 蛋白酶 K(20 mg/mL, 北京天根生化科技有限公司); 10 × PBS 缓冲溶液: NaCl 80 g, NaHPO<sub>4</sub> × 12H<sub>2</sub>O 29 g, KCl 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, 先溶于 900 mL 去离子水, 待充分溶解后再加去离子水至 1 L, 室温保存, 使用时进行 1:10 稀释; DL 2,000 DNA Marker(日本 TakaRa)。

#### 2.1.3 仪器

LAMP 扩增仪(德国 QIAGEN 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 7900(美国 Life); 凝胶电泳成像仪(美国 Bio-Rad 公司); 恒温加热块(德国 Eppendorf 公司); 微量移液器(10、100、200、1000 μL, 德国 Eppendorf)。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 DNA 的提取

牛奶 DNA 提取方法主要参考王玮等<sup>[9]</sup>及 Scaravelli 等<sup>[10]</sup>的方法, 即 CTAB 法, 稍作修改, 具体步骤如下: 取 35 mL 牛奶置于 50 mL 洁净的离心管中, 4 °C, 10000 g 离心 15 min, 弃去上清液, 在超净

台中用脱脂棉球小心拭去管壁上的脂类物质;加 10 mL PBS 溶液,溶解沉淀,4 °C,10000 g 离心 15 min,弃去上清液,在超净台中用脱脂棉球小心拭去管壁上的脂类物质;加入 1.5 mL CTAB 提取缓冲液和 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液,混匀后转入无菌的 2 mL 离心管中,60 °C 振荡孵育过夜。将上述裂解物于 12000 g 离心 10 min,小心转移上清液至另一支 2 mL 离心管中;加入 750 μL 三氯甲烷后用力振荡,12000 g 离心 15 min,将上清液转移到新的 2 mL 离心管中;加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀液,室温静置 1 h 后,12000 g 离心 15 min,弃去上清液;加入 350 μL 1.2 mol/L NaCl 溶液将沉淀充分悬浮,再加入 350 μL 三氯甲烷,涡旋振荡混匀,12000 g 离心 10 min;小心转移上清液至 1.5 mL 离心管中后加入 0.8 倍体积异丙醇,-20 °C 静置 1 h,12000 g 离心 10 min,弃去上清液;用 70%乙醇溶液洗涤沉淀 2~3 次后,12000 g 离心 10 min,小心倾倒乙醇,沉淀挥发干燥,加 50 μL TE 溶液溶解沉淀 DNA,立即使用或 -20 °C 保存备用。

#### 2.2.2 LAMP 方法

LAMP 引物:引物设计靶基因选择牛线粒体细胞色素 b 基因<sup>[11-13]</sup>(cyt-b 基因)序列作为目标基因(NCBI 收录号 NC\_006853.1)。应用引物设计软件 PrimerExplorer 4.0 设计的引物序列包括:外侧上游引物 F3(5'-GACAAC TAGCATCTGTCCTA-3')、外侧下游引物 B3(5'-CAGCTTTGGGGTTGATG-3')、内侧上游引物 FIP(5'-GATGTACTACAAAGACCTG TCTTCATTTCTCCTCATCCTAGTGC-3')、内侧下游引物 BIP(5'-TACTGGTCTTGTAACACAGAGAAGGT GCAGTTTCTCCTTGAGTC-3')、环状下游引物 LB(5'-TTGTGCCGCGCGTTGGT-3')。

LAMP 检测体系初步建立:配制反应体系 25 μL,包括: MgSO<sub>4</sub>、dNTPs、甜菜碱(betaine)、内引物、外引物、环引物、*Bst* DNA 聚合酶、1×ThermoPol buffer 以及适量的 DNA 模板;混匀,于 63 °C 温育 60 min。

反应体系的优化:选择 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 和 betaine 这几个参数,进行反应体系的优化。Mg<sup>2+</sup>浓度选择 0、2、4、6、8、10 mmol/L, dNTPs 浓度选择 0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 mmol/L,甜菜碱浓度选择 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L,进行 LAMP 反应,于 63 °C 温育 60 min,反应结束后电泳观察扩增效果,确定最佳反应体系。

结果判定:a 实时荧光曲线变化:若有“S”型扩

增曲线且扩增值超过设定的阈值为阳性(有核酸扩增),若扩增曲线的扩增值未超过设定的阈值为阴性(无核酸扩增);b 电泳检测:LAMP 法的扩增产物是各种不同长度的茎-环状结构 DNA,因此阳性反应通过 2%琼脂糖电泳检测呈梯形条带,而阴性反应则没有梯形扩增条带出现。一般情况下优先采用 a 法进行结果判定,b 法可作为辅助检测方法。

#### 2.2.3 real-time PCR 方法

real-time PCR 引物:同样选择靶基因 cyt-b 基因,应用引物设计软件 Primer Express 3.0 设计引物序列包括:上游引物 P1(5'-CCTATACTTTCTCCTCATCCT AGTGCTAAT-3')、下游引物 P2(5'-CCTGTCTTCATT TTAGTAATTTGTTTTTCG-3')、探针 P(5'-FAM-CCAAC GGCCGGCAC-TAMRA-3')。

real-time PCR 反应体系:25 μL 反应体系中包括 2×TaqMan Gene Expression Master Mix 12.5 μL;其他成分终浓度依次为上游引物 P1、下游引物 P2 各 0.4 μmol/L、探针 P 为 0.2 μmol/L;DNA 模板 3 μL;其余体系用蒸馏水补足。反应程序为:95 °C 10 min;95 °C 15 s;60 °C 1 min;40 个循环,设 DEPC 水为阴性对照。

#### 2.2.4 LAMP 扩增产物的电泳检测

取 2 μL 扩增产物和 0.4 μL 上样缓冲液混匀点样于含 0.8 μg/L 溴化乙锭的 2%~3%琼脂糖凝胶中,电压 150 V,约 20~30 min 后置于凝胶成像系统中成像,电泳图片显示 LAMP 特征性梯状条带为阳性,无任何条带为阴性。

#### 2.2.5 特异性试验

采用本试验所建立的 LAMP 和 real-time PCR 检测方法对欧德堡纯牛奶、伊利纯牛奶、蒙牛纯牛奶、康维多奶粉、伊利酸奶、乐之奶酪、康维多羊奶粉、卡布兰卡山羊奶酪、弗若山羊奶酪共 9 种奶制品进行检测,重复 2 次,并对结果进行判断,比较两种检测方法的特异性。特异性试验中样品的取样量为 200 μL(200 mg)。

#### 2.2.6 灵敏度试验

取一份经检测不含牛奶成分的奶茶饮品作为基质样品,进行人工添加试验,添加水平分别为 0.1%、0.5%、1%和 2%。取 35 mL 各个添加浓度的样品按 2.2.1 所述方法提取核酸,用 35 mL 欧德堡纯牛奶提取的核酸作为阳性对照模板,DEPC 水作为阴性对照模板,然后分别用 LAMP 方法和 real-time PCR 方法

进行检测。实验重复两次。

### 2.2.7 实际食品样品的检测

采购7类市售样品包括纯牛奶类、酸牛奶类、奶粉类、牛奶饮品类、饼干类、山羊奶制品类、其他类(包括咖啡、果冻、巧克力等), 总共69份样品。采用本试验所建立的LAMP和real-time PCR检测方法对其进行检测, 并对结果进行判断。

## 3 结果与分析

### 3.1 反应体系的优化

通过对LAMP反应体系中的 $Mg^{2+}$ 、dNTPs和betaine进行优化, 结果发现 $Mg^{2+}$ 浓度在4~8 mmol/L的范围内对检测效果没有明显影响, 可以获得较强的扩增效率, 最终选用4 mmol/L(图1); dNTPs浓度在1.4~2.2 mmol/L范围内所得的检测效果没有明显差异, 最终选用1.4 mmol/L(图2); betaine浓度对反应体系影响不大(图3), 当betaine浓度为0.8 mol/L

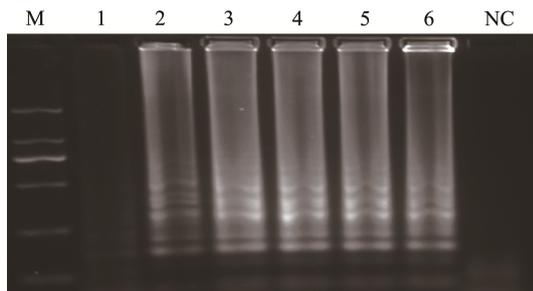


图1  $Mg^{2+}$ 浓度对LAMP反应的影响

Fig. 1 Effect of  $Mg^{2+}$  concentrations on the LAMP reaction  
M: 2000 bp marker; 1: 0 mmol/L; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L; NC: 阴性对照

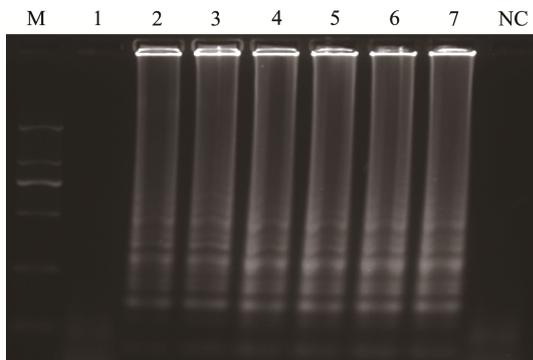


图2 dNTPs浓度对LAMP反应的影响

Fig. 2 Effect of dNTPs concentrations on the LAMP reaction  
M: 2000 bp marker; 1: 0 mmol/L; 2: 1.2 mmol/L; 3: 1.4 mmol/L; 4: 1.6 mmol/L; 5: 1.8 mmol/L; 6: 2.0 mmol/L; 7: 2.2 mmol/L; NC: 阴性对照

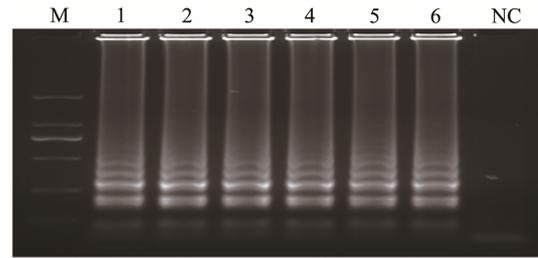


图3 甜菜碱浓度对LAMP反应的影响

Fig. 3 Effect of betaine concentrations on the LAMP reaction

M: 2000 bp marker; 1: 0.2 mol/L; 2: 0.4 mol/L; 3: 0.6 mol/L; 4: 0.8 mol/L; 5: 1.0 mol/L; 6: 1.2 mol/L; NC: 阴性对照

时, 反应体系更稳定, 于63 °C反应60 min时所得效果最佳, 故此作为本研究所推荐的反应体系。

### 3.2 检测特异性

采用本试验所建立的LAMP和real-time PCR检测方法对欧德堡纯牛奶、伊利纯牛奶、蒙牛纯牛奶、康维多奶粉、伊利酸奶、乐之奶酪、康维多羊奶粉、卡布兰卡山羊奶酪、弗若山羊奶酪共9种奶制品进行检测, 结果见表1。结果表明本研究所建立的LAMP检测方法具有良好的特异性, 该结果与real-time PCR结果相同。LAMP检测图谱见图4 A, real-time PCR检测图谱见图4 B。

表1 LAMP与real-time PCR检测特异性

Table 1 The detection specificity of LAMP and real-time PCR

样品编号	样品名称	LAMP	real-time PCR
1	欧德堡纯牛奶	+	+
2	伊利纯牛奶	+	+
3	蒙牛纯牛奶	+	+
4	康维多奶粉	+	+
5	伊利酸奶	+	+
6	乐之奶酪	+	+
7	康维多羊奶粉	-	-
8	卡布兰卡山羊奶酪	-	-
9	弗若山羊奶酪	-	-

注: “+”表示阳性;“-”表示阴性。

### 3.3 检测灵敏度

取经检测不含牛奶成分的奶茶饮品作为基质样品, 进行人工添加实验, 添加水平分别为0.1%、

0.5%、1%和 2%。分别用 LAMP 方法和 real-time PCR 方法进行灵敏度检测, 检测结果见图 5 和图 6。该结果表明, LAMP 检测方法与 real-time PCR 检测方法具有相同的检测灵敏度, 均达到 0.5%。

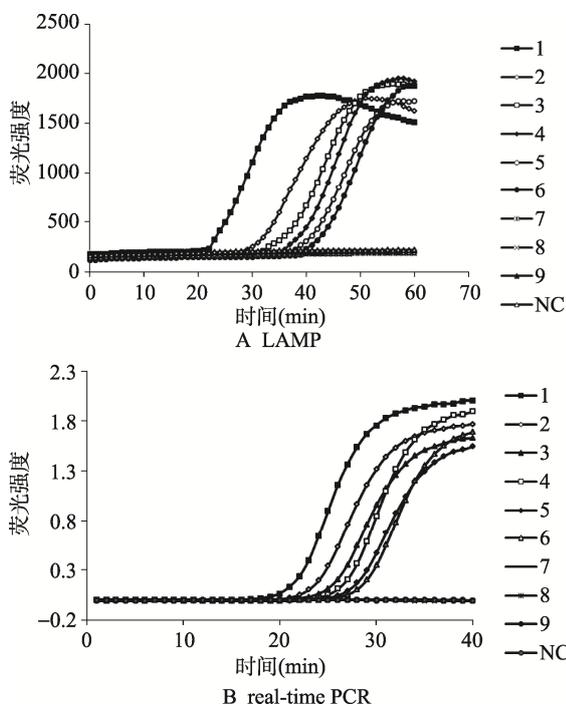


图 4 LAMP、real-time PCR 特异性试验结果

Fig. 4 The results of LAMP/real-time PCR specificity test  
注: 图 4 A、B 中 PC 为阳性对照, NC 为阴性对照, 1~9 分别和表 1 中的样品编号相对应。

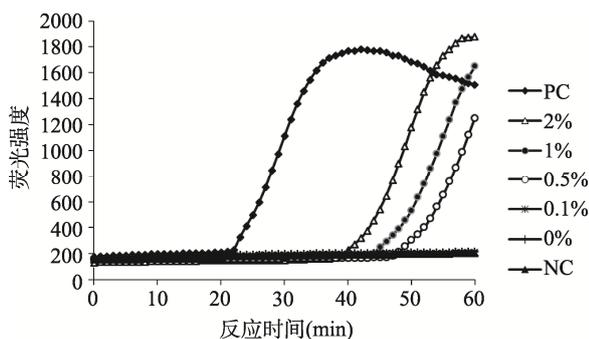


图 5 LAMP 灵敏度图

Fig. 5 The sensitivity of LAMP

### 3.4 实际食品样品的检测

购买不同种类的实际样品进行 LAMP、real-time PCR 两种方法的检测, 检测结果如表 2 所示。7 类食品样品包括纯牛奶类、酸牛奶类、奶粉类、牛奶饮品

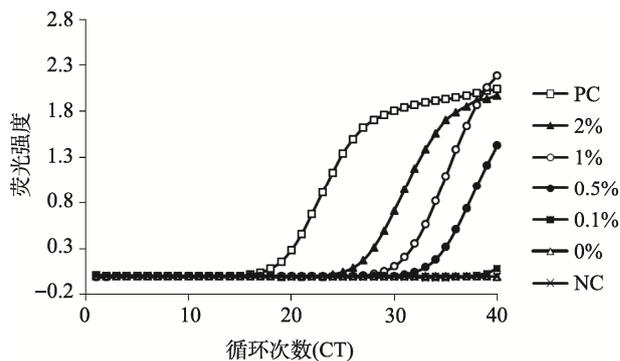


图 6 real-time PCR 灵敏度图

Fig. 6 The sensitivity of real-time PCR  
注: 图 5、图 6 中 PC 为阳性对照, NC 为阴性对照, 2%、1%、0.5%、0.1%和 0%代表添加水平为 2%、1%、0.5%、0.1%和 0%的牛奶添加样品

表 2 实际样品检测结果

Table 2 The detection results of practical samples

食品样品类别	样品数	阳性结果批数		与标识不符的样品数
		LAMP	real-time PCR	
牛奶类	10	10	10	0
酸牛奶类	5	5	5	0
奶粉类	6	5	5	0
牛奶饮品类	23	21	21	2
饼干类	15	12	12	1
山羊奶制品	4	0	0	0
其它	6	6	6	0
样品总数	69			
与标识不符的样品数				3

类、饼干类、山羊奶制品类、其他类(包括咖啡、果冻、巧克力等), 总共 69 份样品, 两种检测方法的检测结果一致, 共检出 3 份实际样品与样品标识不符, 由大量的实际应用结果可见, 应用本方法检测致敏原牛奶成分, 具有较好的应用效果。

## 4 结 论

本研究建立的食品过敏原牛奶成分 LAMP 检测方法简单经济, 检测结果可靠, 可有效缩短检测时间, 适用于牛奶过敏原成分的检测, 具有良好的应用前景。

### 参考文献

[1] Dearman RJ, Kimber I. Food allergy: what are the issues? [J].

- Toxicol Lett, 2001, 120(1-3): 165-170 .
- [2] Macdougall C, Etuwewe O. How dangerous is food allergy? [J]. Current Paediatrics, 2005, 15(3): 228-232 .
- [3] Wal JM. Structure and function of milk allergens [J]. Allergy, 2001, 56(67): 35-38.
- [4] Mills EN, Valovirta E, Madsen C, *et al.* Information provision for allergic consumers where are we going with food allergen labeling [J]. Allergy, 2004, 59(12): 1262-1268.
- [5] Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(4): 1016-1018.
- [6] Pourpak Z, Motsafaie A, Hasan Z, *et al.* A lobotatory method for Puritication of major cows' milk allergens [J]. J Immunoassay Immunochem, 2004, 25(4): 385-397.
- [7] Food and Drug Administration (FDA) Food Allergen Labeling and Consumer Protection act of 2004 [S].
- [8] 周淑红 . 国外关于食品过敏标签的现状启示[J]. 世界农业, 2007, 22(6): 67-68.  
Zhou SH. The food allergy label status and enlightenment [J]. World Agric, 2007, 22 (6): 67-68.
- [9] 王玮, 韩建勋, 吴亚君, 等. 芥末等 8 种食物过敏原的多重 PCR 检测技术[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 156-159.  
Wang W, Han JX, Wu YG, *et al.* Detection of Mustard and other 8 kinds of food allergen by multiplex PCR[J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(6): 156-159.
- [10] Scaravelli E, Brohée M, Marchelli R, *et al.* Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products [J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(3): 857-869.
- [11] 罗家琴, 王加启, 卜登攀, 等 . 饲料中牛、羊、猪、鸡源性成分的 PCR 检测方法及其应用[J]. 中国农业科学, 2008, 41(7): 2112-2119 .  
Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, *et al.* Detection of feed cattle, sheep, pigs, chicken derived ingredients by PCR [J]. Chin Agric Sci, 2008, 41(7): 2112-2119.
- [12] Lahiff S, Glennon M, O'Brien L, *et al.* Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal(MBM) [J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(1): 27-35.
- [13] Colgan S, O'Brien L, Maher M, *et al.* Development of a DNA based assay for species identification in meat and bone meal[J]. Food Res Int, 2001, 34(5): 409-414.

(责任编辑:赵静)

## 作者简介

程晋霞, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与控制。  
E-mail: cjk19881031@sina.cn

张海子, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 主要研究方向为农产品的贮藏与加工。  
E-mail: zhysph@sina.com