

# 食品中鲍鱼过敏源基因成分的检测

徐 杨<sup>1</sup>, 孙 瑶<sup>1</sup>, 杜 影<sup>2</sup>, 战晓微<sup>3</sup>, 郑秋月<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 大连市疾病预防控制中心, 大连 116021;  
3. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866)

**摘 要:** **目的** 本文建立食品中鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 检测方法。**方法** 采用蛋白酶 *K* 消化法提取鲍鱼肌肉组织中基因组 DNA, 针对鲍鱼管家基因 16S rRNA 基因设计特异性引物和探针, 确定实时荧光 PCR 反应体系和反应条件, 建立了鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 快速检测方法。选用鱿鱼、海参等海产品进行特异性试验; 采用添加方法制备灵敏度试验样品, 分别制备了鲍鱼过敏源基因成分含量分别为 100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0.001% 的样品。**结果** 对非鲍鱼类食品进行检测, 结果显示出良好的特异性; 灵敏度试验表明, 本文建立方法的最低检测下限为 0.01%。**结论** 本文建立了特异性好, 灵敏度高的鲍鱼过敏源基因成分检测方法。

**关键词:** 食品; 鲍鱼过敏源基因成分; 检测

## Detection of allergen gene of abalone in food

XU Yang<sup>1</sup>, SUN Yao<sup>1</sup>, DU Ying<sup>2</sup>, ZHAN Xiao-Wei<sup>3</sup>, ZHENG Qiu-Yue<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 2. Dalian Municipal Center for Disease Control, Dalian 116021, China; 3. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a real-time fluorescent PCR method for detection of abalone gene anaphylactogen in food. **Methods** Genomic DNA of abalone muscle tissue was extracted by proteinase *K* digestion method. Specific primers and the probe were designed based on 16S rRNA genes of abalone. After PCR reaction system and conditions were optimized, the rapid real-time PCR detection method of abalone anaphylactogen was developed. The seafood including squid, sea cucumber and so on, was tested for specificity. The samples that contained abalone-derived components of 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, and 0.001% respectively were made by blend method for sensitivity test. **Results** It was of high specificity by testing non abalone products, and the sensitivity test showed that the lowest amount of detecting was 0.01%. **Conclusion** The detection method of allergic abalone gene anaphylactogen with high specificity and sensitivity was established in this research.

**KEY WORDS:** food; allergen gene of abalone; detection

基金项目: 辽宁出入境检验检疫局资助项目 (LK2013-29)

**Fund:** Supported by Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (LK2013-29)

\*通讯作者: 郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: zhengqyciq@163.com

\*Corresponding author: ZHENG Qiu-Yue, Doctor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang east Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: zhengqyciq@163.com

## 1 引 言

过敏,是指人体免疫系统对某种本身无害的物质发生异常反应,也称变态反应。患者常有过敏体质,发病与接触物、食物、吸入物等生活中常见的致敏源有关<sup>[1]</sup>。香港专家研究发现,逾 80%对海鲜皮肤过敏的香港市民会对多种海鲜敏感,单壳的贝类海产,如鲍鱼、田螺、蜗牛及鲍贝更是引发严重过敏的高危海产<sup>[2]</sup>。根据流行病学调查,澳洲每年有 600 例过敏性病症发生。发达国家对食物过敏反应的人群约占 3.5%~5%,这些过敏性人群即使摄入含微量过敏原的食物,也会产生很严重的过敏性反应,甚至致命<sup>[3]</sup>。据不完全统计,我国过敏反应发病率高于发达国家<sup>[4-8]</sup>。在儿童和成人中,90%以上食物过敏反应是由 8 类,共 170 种富含蛋白质的食物引起的。这些食物包括:蛋类、花生、乳类、黄豆、小麦、树果仁、贝类(包括甲壳类和软体动物)、鱼等<sup>[9-10]</sup>。海产品是一种常见的致敏性食物,虾类、鱿鱼和鲍鱼等甲壳类、软体类动物等引起过敏疾病比较普遍<sup>[4]</sup>。目前花生、芝麻等过敏源成分研究较多,对于鲍鱼过敏源成分的研究还是空白。本文设计特异性的引物和探针,建立实时荧光 PCR 方法检测鲍鱼过敏源基因成分。

## 2 材料与方 法

### 2.1 试 剂

三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、氯仿、无水乙醇(分析纯,赛默飞世尔生物化学制品公司)。

70%乙醇;裂解液:1% CTAB, 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0); TE 缓冲液(Tris-Cl、EDTA 缓冲液): 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0); 提取缓冲液、20 mg/mL 蛋白酶 K、20 μg/mL RNA 酶、饱和酚、3mol/L NaAc 和 TE 缓冲液(赛默飞世尔生物化学制品公司)。

Taq DNA 聚合酶; dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP); 10×PCR 缓冲液[200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4), 200 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>](宝生物工程(大连)有限公司)。实时荧光 PCR 引物、Tagman 探针(宝生物工程(大连)有限公司合成)。

### 2.2 仪器与设备

紫外分光光度计(NANODROP2000C, Thermo 公

司); ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

### 2.3 实验材料

盘鲍、皱纹盘鲍、杂色鲍和九孔鲍、鱿鱼、海参、虎头蟹、海蟹、赤甲蟹、虾爬、韭菜、油菜、大蒜、银鱼、比目鱼、黄花鱼、细香葱、红辣椒、辣根、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙鱼、青鱼、小麦、大马哈鱼、紫石房蛤、江瑶贝、章鱼等购自大连农贸市场, 海鲜市场和獐子岛渔业集团。

### 2.4 样品制备及 DNA 提取

蛋白酶 K 消化法提取鲍鱼肌肉组织中基因组 DNA: 取 200~300 mg 冷冻真空干燥后的鲍和鱿鱼肌肉组织, 粉末后在含 1% SDS 和 100 μg/mL 蛋白酶 K 的提取缓冲液(10 mmol/L, Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol/L EDTA, pH 8.0)中 55 °C 消化 4 h, 再用 10 mg/mL 无 DNA 酶的 RNA 酶来降解鲍鱼肌肉中的 RNA, 经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 二倍体积乙醇沉淀后用 TE 溶解, 用于 PCR 扩增。

### 2.5 实时荧光 PCR 引物和探针设计

根据 NCBI 上已公布的鲍鱼管家基因 16S rRNA 基因的核酸序列, 采用 DNAMAN 8.0 软件设计鲍鱼致敏源成分检测引物和探针。鲍鱼 16SrRNA 正向引物 5'-TAT ATT ATC ACA ACC AAG GAG C-3'; 反向引物 5'-GAA TAA ATT TAA AAT CCT CTA TTC-3'; 探针 5'-FAM-CGC GGC CGT TTA ACC CGT AGG TC-Eclipse-3'。

### 2.6 实时荧光 PCR 检测方法建立

#### 2.6.1 反应体系的建立

为优化实时荧光 PCR 反应程序, 本文在预变性时间、升温速率, PCR 反应循环次数、时间、温度等反应参数方面进行最佳系数摸索实验。最终建立了稳定的实时荧光 PCR 反应程序。

#### 2.6.2 实时荧光 PCR 结果判定

实验中同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常, 检测样品无荧光增幅现象, 判断样品中未检出鲍鱼过敏源基因成分; 同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常, 检测样品有明显的荧光增幅曲线, 且 *C<sub>t</sub>* 值 > 35, 判断样品中检出鲍鱼过敏原基因成分; 同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常, 若检测样品荧光增幅曲线的 *C<sub>t</sub>* 值在 35~40 之间, 则应重新进行实时荧光 PCR 反应。再次扩增后的结果 *C<sub>t</sub>*

值仍在 35~40 之间, 可判断样品中检出鲍鱼过敏源基因成分, 否则可判断样品中未检出鲍鱼过敏源基因成分。

### 2.6.3 鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 检测方法灵敏度研究

不同质量的各种鲍鱼样品磨碎处理后, 分别添加到不含鲍鱼过敏源基因成分的鱼粉基质中, 制备成 20、10、5、2、1 mg/kg 共 5 个梯度添加样品, 从高到低逐份添加原料。应用本文建立的方法进行检测, 确定检测灵敏度。

### 2.6.4 鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 检测方法特异性研究

采用本研究建立的方法检测鲍鱼过敏源基因成分的样品。同时检测鱿鱼、海参、虎头蟹、海蟹、赤甲蟹、虾爬、韭菜、油菜、大蒜、银鱼、比目鱼、黄花鱼、细香葱、红辣椒、辣根、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙鱼、青鱼、小麦、大马哈鱼、紫石房蛤、江瑶贝、章鱼等非鲍鱼过敏原基因 DNA, 进行特异性试验。

## 3 结果与分析

### 3.1 实时荧光 PCR 检测鲍鱼过敏源基因成分方法建立

本文建立了稳定的实时荧光 PCR 反应程序, 预

变性: 95 °C, 10 S; PCR 反应: 95 °C, 5 S, 60 °C, 34 S, 40 个循环。

### 3.2 实时 PCR 反应检测结果

用实时荧光 PCR 引物及其探针检测各种鲍鱼类产品, 都出现荧光信号增长, 出现特异性扩增。而阴性对照未见荧光信号的增长。

### 3.3 鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 基因检测特异性实验结果

特异性试验结果如图 1 所示, 检测含有鲍鱼过敏源基因成分的样品, 都出现荧光曲线增幅现象,  $C_t$  值 35, 检测结果为阳性, 而其他非鲍鱼样品未检测到无荧光增幅, 说明本文所设计鲍鱼过敏源基因成分的检测引物和探针具有很好的特异性。

### 3.4 鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 基因检测灵敏度试验结果

通过对 100%、50%、10%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001% 共 8 个梯度添加量的样品进行检测, 分析并确定实时荧光 PCR 基因检测灵敏度, 结果如图 2 所示, 浓度为 0.01% 的鲍鱼过敏原添加样品仍能被检出。表明该标准方法对原料产品中鲍鱼过敏源基因成分的检测灵敏度较高。

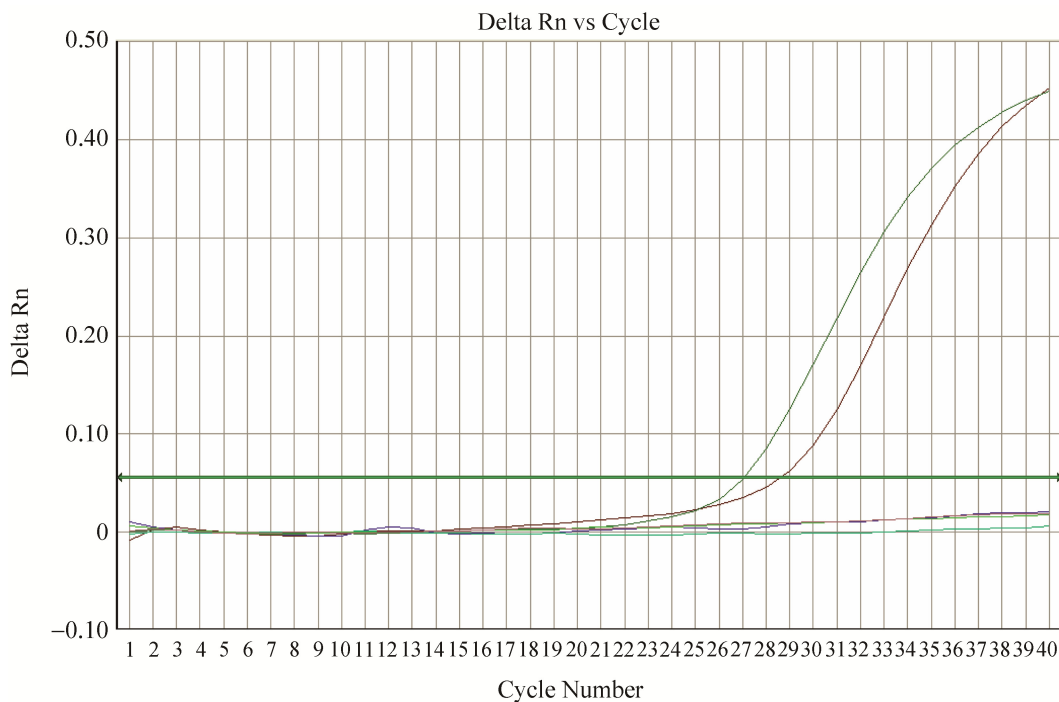


图 1 鲍鱼过敏源基因成分的引物和探针特异性检测结果

Fig. 1 The result of specific detection for the primers and probe of allergic abalone gene anaphylactogen

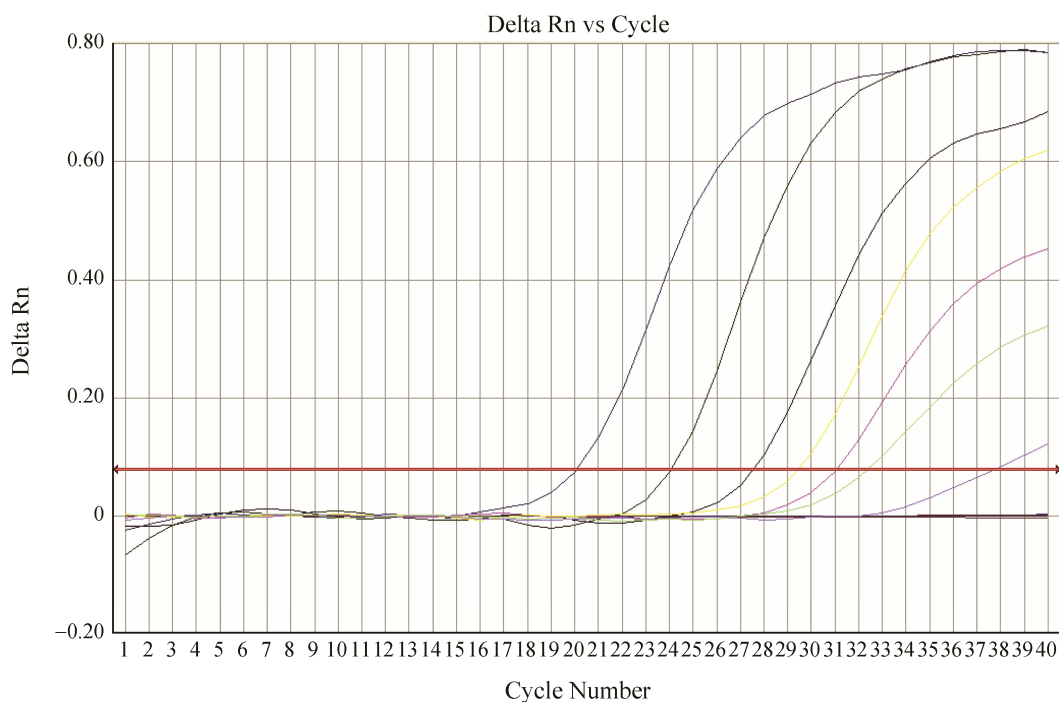


图 2 鲍鱼过敏源基因成分灵敏度检测实时荧光 PCR 图谱

Fig. 2 The sensitivity detection result of allergic abalone gene anaphylactogen by real-time fluorescent PCR  
(阳性荧光增幅曲线从左到右依次含量为 100%、50%、10%、1%、0.5%、0.1%、0.01%)

(The positive fluorescent amplification curves showed content of 100%, 50%, 10%, 1%, 0.5%, 0.1%, and 0.01% successively from left to right)

## 4 讨论

过敏性人群必须避免食用含有相关过敏原或超过耐受限量的食物, 应对任何含有潜在致敏反应的食物进行合理标识。欧盟关于食品配料标签要求的 2003/89/EC 指令规定, 任何含有该指令所涉及的过敏原的产品必须标识。该指令列出了所有过敏原食物, 包括任何含有或源自谷物、甲壳类动物、鸡蛋、鱼类、花生、大豆、乳及乳制品、坚果、芝麻、芹菜、芥末及硫酸盐; 欧盟 2006 年新增了羽扇豆(lupin)和软体动物(mollusa)作为新的过敏原(欧盟 2006/142 EC 号指令)。美国《2004 年食品过敏原标识和消费者保护法规》规定: 对于鱼类、甲壳贝类、树坚果三类食品必须标注具体的食品名称。在联合国粮农组织提出的八大类引起过敏的食物之中, 鲑鱼和鲍鱼等甲壳类、软体类动物及其制品是重要的一类。

目前, 虽有许多过敏原检测方法可供借鉴, 但在具体应用上都存在着各自不同的问题。体内实验方法可提供最为直接的证据, 但要考虑安全因素<sup>[11,12]</sup>。体外实验方法具有方便、安全的优点, 但存在准确性差的缺点<sup>[13]</sup>。实验室体外检测过敏原方法主要是酶

标记过敏原吸附实验法, 放射免疫法(RIA)和酶联免疫吸附试验法(ELISA)等<sup>[14]</sup>, 但能检测的商品不多, 主要应用于食品中花生、小麦、黑麦、大麦、燕麦中过敏原含量的检测<sup>[15]</sup>。

本文根据鲍鱼成分的特异核酸序列, 设计特异性强的引物和探针, 建立了鲍鱼过敏源基因成分实时荧光 PCR 基因检测方法。方法简便、快速而且成本相对较低。虽然 ELISA 方法具有可直接检测致敏蛋白的优势, 但其灵敏度要低于 DNA 方法, 使得 ELISA 方法不适用于深加工食品中致敏源成分的检测。因而本文建立的实时荧光 PCR 法可弥补 ELISA 法的劣势, 具有很好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 陈红兵, 高金燕. 食物过敏反应及其机制[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 105-109.  
Chen HB, Gao JY. Food allergy reaction and its mechanism [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2007, 29(2): 105-109.
- [2] 刘英华. 食物过敏与人体健康[J]. 食品与健康, 2005, (12): 14.  
Liu YH. Food allergy and human health [J]. Food Health, 2005, (12):14.
- [3] 李启沅, 李荔, 刘志刚. 鱼虾贝类的主要过敏原分子免疫学特

- 性研究进展[J]. 水产科学, 2008, 27(3): 154-156.
- Li QY, Li L, Liu ZG. A review: immunological characteristics of the major allergen in fish, shrimp and shellfish [J]. Fish Sci, 2008, 27(3): 154-156.
- [4] 夏秀华. 食品加工技术对于食品过敏原的影响[J]. 粮食与食品工业, 2012, 19(5): 52-55.
- Xia XH. Effect of food processing technology on food allergy [J]. Cereal Food Ind, 2012, 19(5): 52-55.
- [5] 吴海明, 胡志和. 海虾过敏原的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(7): 167-171.
- Wu HM, Hu ZH. Research advance of shrimp allergens [J]. Food Res Devel, 2010, 31(7): 167-171.
- [6] 曹际娟, 赵彤彤, 刘冉, 等. PCR 检测食品中致敏原虾源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 274-278.
- Cao JJ, Zhao TT, Liu R, *et al.* Detection of shrimp-derived components of allergen in food by PCR[J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(4): 274-278.
- [7] 徐婷婷. 荧光定量 PCR 技术应用综述[J]. 畜禽业, 2010, (10): 48-50.
- Xu TT. Application overview of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Livestock Poul Ind, 2010, (10): 48-50.
- [8] 刘雪涛. 关于在食品标签中明示过敏成分的探讨[J]. 中国标准化, 2007, (12): 19-22.
- Liu XT. Discussion on express allergen in food labels [J]. China Standard, 2007, (12): 19-22.
- [9] 刘光明, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 水产品过敏原的研究现状和展望[J]. 中国食品学报, 2012, 12(5): 1-9.
- Liu GM, Cao MJ, Cai QF, *et al.* Current status and future perspectives in research on seafood allergens [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2012, 12(5): 1-9.
- [10] 向钱, 李宁. 食品致敏性研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册), 2006, 33(6): 376-380.
- Xiang Q, Li N. Research progress of food allergen [J]. Foreign Med Sci (Sec Hyg), 2006, 33(6): 376-380.
- [11] 杨增茹, 张庆远, 邓川莲. 食物过敏反应的皮内检测结果与分析[J]. 现代预防医学, 2005, (9): 1181-1182.
- Yang ZR, Zhang QY, Deng CL. Result and analysis of intradermal test of food allergic reaction [J]. Mod Pre Med, 2005, (9): 1181-1182.
- [12] 闻敬梅, 李巍, 赵巍. 出口食品加工企业的过敏源管理[J]. 企业标准化, 2008, (7): 26.
- Wen JM, Li W, Zhao W. Allergic source management of export food processing enterprises [J]. Enter Standard, 2008, (7): 26.
- [13] 侯廷政, 刘预. 变态反应过敏原检测及临床分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(4): 392-394.
- Hou TZ, Liu Y. Allergens detection of allergy and clinical analysis [J]. Lab Med Clin, 2011, 8(4): 392-394.
- [14] 王守法, 阚春月, 许学书. 食品科学酶联免疫吸附试验在食品检测中的应用[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 489-492.
- Wang SF, Kan CY, Xu XS. Application of ELISA method in food detection [J]. Food Sci, 2009, 30(23): 489-492.
- [15] 荣策, 徐静, 李一尘, 等. 花生致敏原检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 254-258.
- Rong C, Xu J, Li YC, *et al.* The advances in peanut allergen detection technology [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(4): 254-258.

(责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



徐 杨, 本科, 主要研究方向为分子生物学检测。

E-mail: lnciqxy@163.com



郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。

E-mail: zhengqyciq@163.com