

常规 PCR 法同时检测食品中的小麦、大麦和 黑麦致敏原

柯燕娜, 葛宇*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 建立一种常规 PCR 法同时检测食品中的小麦、大麦和黑麦致敏原(WBR155bp)。**方法** 采用 ClustalW 软件分析小麦 ω -醇溶谷蛋白、大麦醇溶谷蛋白和黑麦 ω -黑麦碱的核苷酸编码序列的同源性, 进而确定同源区域, 用 Primer Premier5.0 基于同源区域设计引物。选取不同种属的植物考查所建立 PCR 方法的特异性。将小麦粉, 大麦粉、黑麦粉与米粉混合制备谷物含量梯度为 100%、10%、1.0%、0.1%、0.01% 的样品, 考查 WBR155 bp 的检出限。**结果** 扩增产物片段 <200 bp, 可以检测到高度降解的 DNA 片段。引物 WBR155bp 对小麦、大麦和黑麦的检出限分别为 1.0%、0.01% 和 0.1%。**结论** 该方法具有良好特异性, 可用于食品中的小麦、大麦和黑麦致敏原的日常检测。

关键词: 小麦; 大麦; 黑麦; 谷蛋白; PCR; 乳糜泻

Simultaneous determination of wheat, barley and rye allergen in food by conventional PCR

KE Yan-Na, GE Yu*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of wheat, barley and rye allergen (WBR155bp) in food by conventional PCR method. **Methods** ClustalW software was used to analyze the homology of the nucleotide coding sequences of wheat ω -gliadin, hordein and ω -secalin, and then to determine the homologous region. Primer Premier 5.0 was used to design primers based on homologous regions. The specificity of the PCR method was tested by selecting plants of different species. The grain content gradient of wheat flour, barley flour, rye flour and rice flour was 100%, 10%, 1.0%, 0.1%, and 0.01%, respectively. The detection limit of WBR155 bp was examined. **Results** Amplified product fragment was <200 bp, and highly degradable DNA fragments could be detected. The detection limits of primer WBR155bp on wheat, barley and rye were 1.0%, 0.01% and 0.1%, respectively. **Conclusion** This method has good specificity and can be used for routine detection of wheat, barley and rye allergens in food.

KEY WORDS: wheat; barley; rye; gluten; PCR; coeliac disease

基金项目: 上海市食品质量安全检测与评价专业技术服务平台(18DZ2292400)

Fund: Supported by Shanghai Food Quality and Safety Inspection and Evaluation Professional Technical Service Platform (18DZ2292400)

*通讯作者: 葛宇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: ghgygc@126.com

*Corresponding author: GE Yu, Ph.D, Professor Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: ghgygc@126.com

1 引言

食物过敏已成为一个备受关注的食品安全问题。据统计世界范围内约8%婴儿和2%成人产生过强烈的食物过敏反应^[1]。超过160多种食物能引起过敏反应,其中含谷蛋白的谷物、鸡蛋、坚果、甲壳类、大豆、花生、鱼和牛奶引起的过敏反应超过90%^[2,3]。含有谷蛋白的谷物会使人患乳糜泻,一种小肠慢性炎症性疾病。乳糜泻患者无法容忍存在于小麦、大麦和黑麦中的谷蛋白。这些谷蛋白分别为小麦醇溶谷蛋白、大麦醇溶谷蛋白、黑麦碱^[4,5]。目前对燕麦蛋白是否会引发乳糜泻还存在争议。

目前乳糜泻最有效的治疗措施就是避免摄入谷物致敏原。乳糜泻需引起足够重视,因其可导致不孕不育^[6]、肝功能异常、骨质疏松症^[7]和恶性肿瘤^[8]等严重并发症。随着血清学检测方法的不断进步,全世界范围内乳糜泻患病率目前估计约为1/200。

为了保护敏感个体,欧盟颁布了2003/89/EC指令,所有导致过敏的成分都必须标识^[9,10]。目前,我们经常会在产品标签上看到如下警示,比如“可能含有牛奶致敏成分”、“可能含有谷物致敏原”等等。

目前,致敏原检测方法主要分为2大类,一类是基于DNA,另一类是基于蛋白质。聚合酶链式反应(PCR)基于DNA,酶联免疫反应基于蛋白质。但基于蛋白质的方法,容易出现假阴性。食品原料比较复杂,可能会对检测造成干扰,导致假阴性出现。而蛋白质本身不够稳定,会在食品加工过程中遭到破坏,结构发生改变,抗体难以识别,进而导致假阴性出现。DNA成分相对比较稳定,但目前基于DNA的PCR技术同时检测食品中的小麦、大麦和黑麦致敏原研究相对较少。

所以本研究建立了一种基于DNA的常规PCR方法,可以使食品中的小麦、大麦和黑麦致敏原可在同一PCR反应体系中被同时检出,简单高效降低实验成本。为监管部门快速检测小麦、大麦和黑麦致敏原提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

材料:小麦、大麦、黑麦、燕麦、薏仁米、荞麦、大米、小黄米、玉米、红豆、黄豆、高粱米、松仁酥、麦片、燕麦粥(与生产含有小麦成分的产品共用生产线)、面包、方便面、蛋糕、小麦粉、谷粒酸奶(含大麦仁)、混合谷物薄饼(含大麦粉)、大麦面包、黑麦片、大麦早餐营养麦片、黑麦薄脆饼干、黑麦面包均购自超市。

试剂:溴化十六烷基三甲铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)、苯酚(分析纯,上海捷信思基因技术有限公司); β -巯基乙醇、Tris、蛋白酶K(上海生工生物工程有限公司);

氯仿、异戊醇、异丙醇、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);PVP40 聚乙烯吡咯烷酮(美国Sigma公司);2×PCR-Master mix 试剂(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);琼脂糖(电泳专用)、DNA Marker(100~600 bp)(天根生化科技有限公司);10×TBE buffer 粉末(上海生工生物工程公司)。

仪器:Centrifuge 5415R 离心机(德国艾本德股份公司);580 BR PCR 扩增仪(美国应用生物系统公司);PowerPac Basic 电泳仪、Universal Hood II凝胶电泳成像仪(美国伯乐公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 样品前处理

谷物含量梯度样品制备:将小麦仁、大麦仁、黑麦仁和大米分别用粉碎机制成均匀粉末。将小麦粉、大麦粉和黑麦粉分别与米粉混合,制备成小麦、大麦和黑麦含量梯度为100%、10%、1.0%、0.1%、0.01%的样品^[11]。

2.2.2 DNA的提取

采用改良CTAB裂解法^[12,13]提取小麦、大麦、黑麦、燕麦、薏仁米、荞麦、大米、小黄米、玉米、红豆、黄豆、高粱米、松仁酥、麦片、燕麦粥(与生产含有小麦成分的产品共用生产线)、面包、方便面、蛋糕、小麦粉、谷粒酸奶(含大麦仁)、混合谷物薄饼(含大麦粉)、大麦面包、黑麦片、大麦早餐营养麦片、黑麦薄脆饼干、黑麦面包的DNA。

取适量(约100 mg)经研磨成均质粉末的样品加入离心管,加入500 μ L改良CTAB裂解液和10 μ L蛋白酶K(20 mg/mL),于65 $^{\circ}$ C水浴裂解24 h,取出,加入酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V:V:V)混合液600 μ L,混匀,离心,提取上清液,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1, V:V)混合液,混匀,离心,提取上清液加入0.8倍体积异丙醇,-20 $^{\circ}$ C放置约1.5 h,离心后晾干,用100 μ L TE缓冲液溶解DNA沉淀。

2.2.3 引物设计

在NCBI的Genbank中查找小麦的 ω -醇溶谷蛋白(ω -gliadin)、大麦的大麦醇溶谷蛋白(hordein)和黑麦的 ω -黑麦碱(ω -secalin)的核苷酸编码序列^[14,15]。用ClustalW软件^[16]对核苷酸编码序列进行同源性分析,进而确定目标序列和同源区域,目标序列见表1,同源区域见图1。

2.2.4 PCR反应体系及反应条件

PCR反应体系包含10 μ L 2×PCR-Master Mix, 1 μ L模板(50~100 ng/ μ L), 1 μ L引物(10 μ mol/L), 8 μ L ddH₂O。扩增产物先用琼脂糖凝胶电泳检测,具体条件如下:琼脂糖凝胶浓度为1.8%(溴化乙锭0.5 μ g/mL),上样量8 μ L,电压110 V,电泳50 min。电泳结束后,用凝胶成像系统检测。

2.2.5 PCR产物的测序

将分别以小麦、大麦和黑麦为模板,经PCR扩增获得的产物送上海生工生物工程有限公司测序,并利用DNASTAR将测序结果和目标序列进行比对。

表 1 目标序列信息
Table 1 Information of target sequences

谷物	引物	扩增片段/bp	目标序列编码蛋白	Genbank 登录号
小麦		153	ω -gliadin	AB059812.1
大麦	WBR155bpF/ WBR155bpR	156	hordein	X60037.1
黑麦		153	ω -secalin	AF000227.1

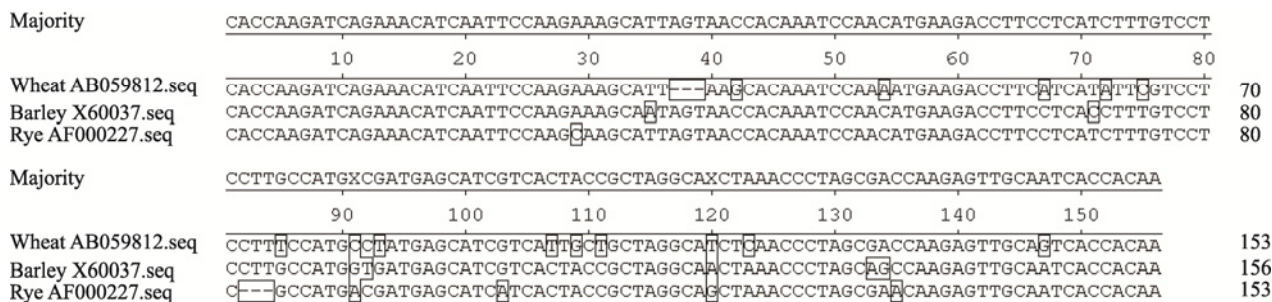


图 1 小麦 ω -醇溶谷蛋白、大麦醇溶谷蛋白、黑麦 ω -黑麦碱编码序列的同源区域
Fig.1 Homologues sequences of the target gene coding for wheat ω -gliadin, barley hordein and rye ω -secalin

利用 Primer Premier5.0 软件基于同源区域设计引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物信息见表 2, 引物 WBR155 bp 的 PCR 反应条件见表 3。

表 2 引物信息
Table 2 Primer information

引物名称	引物序列
WBR155bp	F:5'-caccaagatcagaaacatca-3' R:5'-ttgtggtgattgcaactctt-3'

表 3 引物 WBR155 bp 的 PCR 反应条件
Table 3 PCR reaction condition of WBR155 bp

引物	PCR 反应条件
WBR155 bp	94 °C, 4 min→35 个循环(94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 40 s)→72 °C, 5 min→4 °C, +∞

3 结果与分析

3.1 特异性实验

选取了小麦、大麦、黑麦、燕麦、薏仁米、荞麦、大米、小黄米、玉米、红豆、黄豆、高粱米对 WBR155 bp 引物进行了特异性实验, 结果如图 2 所示。

从图 2 可以看到, WBR155 bp 只在小麦、大麦和黑麦处出现相应明亮的目标条带, 在其他样品处均没有出现相应条带, 说明引物对小麦、大麦和黑麦具有很好的特异性, 能满足实验要求。



注: L1: Marker(100 ~ 600 bp)、L2: 小麦、L3: 大麦、L4: 黑麦、L5: 燕麦、L6: 薏仁米、L7: 荞麦、L8: 大米、L9: 小黄米、L10: 玉米、L11: 红豆、L12: 黄豆、L13: 高粱米、L14: 阴性对照。

图 2 引物 WBR155 bp 特异性实验电泳图
Fig.2 Specific experimental electropherogram of primer WBR155 bp.

3.2 检出限实验

按照实验方法中确立的参数, 将小麦粉、大麦粉和黑麦粉分别与米粉混合, 制备成小麦、大麦和黑麦含量梯度为 100%、10%、1.0%、0.1%、0.01% 的样品, 以这些样品的 DNA 为模板对 PCR 体系的检出限进行了研究, 结果如图 3 所示。

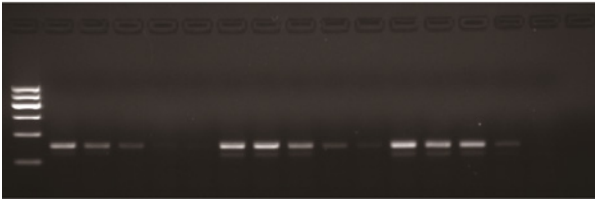
从图 3 可以看到 WBR155 bp 对小麦、大麦和黑麦的检出限分别为 1.0%、0.01% 和 0.1%, 检出限较低说明所建立 PCR 方法的灵敏度较高, 在检测食品中痕量致敏原时有实际应用价值。

3.3 实样检测实验

为了验证所建立 PCR 方法的实用性, 对 14 种样品进行了检测, 其结果如图 4 所示。从图 4 可以看出所有样品都在 155 bp 处出现了相应明亮的目标条带, 检测结果与样

品标签标注相符,表明所建立 PCR 体系具有很好的实际应用性,能应用于谷物致敏原的日常检测。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

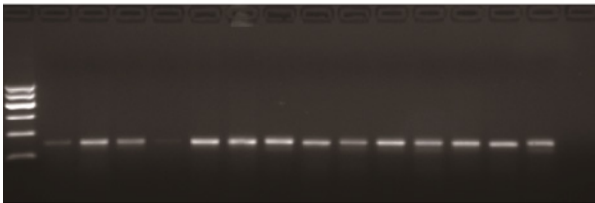


注: L1: Marker(100~600 bp)、L2: 小麦 100%、L3: 小麦 10%、L4: 小麦 1.0%、L5: 小麦 0.1%、L6: 小麦 0.01%、L7: 大麦 100%、L8: 大麦 10%、L9: 大麦 1.0%、L10: 大麦 0.1%、L11: 大麦 0.01%、L12: 黑麦 100%、L13: 黑麦 10%、L14: 黑麦 1.0%、L15: 黑麦 0.1%、L16: 黑麦 0.01%、L17: 阴性对照。

图 3 WBR155 bp 检出限实验电泳图

Fig.3 Detection limit experimental electropherogram of WBR155 bp

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



注: L1: Marker(100~600 bp)、L2: 松仁酥、L3: 麦片、L4: 燕麦粥(与生产含有小麦成分的产品共用生产线)、L5: 面包、L6: 方便面、L7: 蛋糕、L8: 小麦粉、L9: 谷粒酸奶(含大麦仁)、L10: 混合谷物薄饼(含大麦粉)、L11: 大麦面包、L12: 黑麦片、L13: 大麦营养麦片、L14: 黑麦薄脆饼干、L15: 黑麦面包、L16: 阴性对照。

图 4 WBR155 bp 实样检测实验电泳图

Fig.4 Actual sample detection experimental electropherogram of WBR155 bp

3.4 PCR 产物测序

从图 5、图 6 和图 7 可以发现以小麦、大麦和黑麦 DNA 为模板的 WBR155bp 扩增产物与各自模板序列的匹配度分别达到了 93.3%、96.8%和 95.5%,说明扩增结果与模板序列保持了较高的一致性,扩增得到的是目标产物。

Table with 7 columns: Seq1, Seq2, Similarity Index, Gap Number, Gap Length, Consensus Length. Row 1: WBR155bp(Wheat).seq vs Wheat AB059812.seq, Similarity Index 93.3, Gap 1, Length 1, Consensus 103.

图 5 以小麦 DNA 为模板的 WBR155 bp 扩增产物测序结果与模板序列的比对图

Fig.5 Comparison diagram of WBR155bp amplification product

sequencing results and template sequences using wheat DNA as template

Table with 7 columns: Seq1, Seq2, Similarity Index, Gap Number, Gap Length, Consensus Length. Row 1: WBR155bp(Barley).seq vs Barley X60037.seq, Similarity Index 96.8, Gap 2, Length 2, Consensus 122.

图 6 以大麦 DNA 为模板的 WBR155 bp 扩增产物测序结果与模板序列的比对图

Fig.6 Comparison diagram of WBR155 bp amplification product sequencing results and template sequences using barley DNA as template

Table with 7 columns: Seq1, Seq2, Similarity Index, Gap Number, Gap Length, Consensus Length. Row 1: WBR155bp(Rye).seq vs Rye AF000227.seq, Similarity Index 95.5, Gap 0, Length 0, Consensus 110.

图 7 以黑麦 DNA 为模板的 WBR155 bp 扩增产物测序结果与模板序列的比对图

Fig.7 Comparison diagram of WBR155 bp amplification product sequencing results and template sequences using rye DNA as template

4 结论

本研究建立的 PCR 方法检测过程简洁、高效、特异性强、灵敏度好,且扩增产物片段<200 bp,可以检测到高度降解的 DNA 片段。适用于食品中的小麦,大麦和黑麦致敏原的同时检测,为食品安全检验机构日常检测工作提供参考依据。

参考文献

[1] Hendra T. Passing the food allergen test [J]. Gere Foods World, 2003, 48(1): 20-23. [2] 李青. 浅谈美国对食品过敏源的管控[J]. 中国标准化, 2018, 522(10): 166-167. [3] Li Q. Control of food allergens in the United States [J]. China Stand, 2018, 522(10): 166-167. [4] FAO. Report of the FAO technical consultation on food allergies food and agriculture organization [Z]. [5] Taylor SL. Allergic and sensitivity reactions to food components [J]. Nutr

- Toxicol, 1987, (2): 173–197.
- [5] Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, *et al.* Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains [J]. *Gastroenterology*, 2003, (125): 1105–1113.
- [6] Meloni GF, Dessole S, Vargiu N, *et al.* The prevalence of coeliac disease in infertility [J]. *Human Reprod*, 1999, 14(11): 2759–2761.
- [7] Mcfarlane XA, Bhalla AK, Reeves DE, *et al.* Osteoporosis in treated adult coeliac disease [J]. *Gut*, 1995, 36(5): 710–714.
- [8] Holmes JM, Hutton PA. ‘Optimal’ model selection when the true relationship is weak and occurs with a delay [J]. *Econ Lett*, 1989, 30(4): 333–339.
- [9] 殷冉, 陈君义, 王毅谦. 食品过敏原标签要求及生产过程控制初探[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 3(8): 1127–1131.
- Yin R, Chen JY, Wang YQ. Preliminary study on food labeling requirements of allergens and their process control [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 3(8): 1127–1131.
- [10] Popping, Bert DA, Carmen. European regulations for labeling requirements for food allergens and substances causing intolerances: History and future [J]. *JAOAC Int*, 2018, 101(1): 2–7.
- [11] Caterina V, Joana C, Cristina G, *et al.* Effect of food matrix and thermal processing on the performance of a normalised quantitative real-time PCR approach for lupine (*Lupinus albus*) detection as a potential allergenic food [J]. *Food Chem*, 2018, 79 (4): 251–259.
- [12] Yan MM, Wei GC, Pan XH, *et al.* A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant modified CTAB method [J]. *Agric Sci Technol*, 2008, 9(2): 39–41.
- [13] 徐杨, 孙瑶, 杜影, 等. 食品中鲍鱼过敏源基因成分的检测[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, (1): 124–128.
- Xu Y, Sun Y, Du Y, *et al.* Detection of allergen gene of abalone in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (1): 124–128.
- [14] Martin S, Lisa L, Monica F, *et al.* Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods [J]. *Eur Food Res Technol*, 2003, (217): 344–349.
- [15] Benson DA, Karschmizrach I, Lipman DJ, *et al.* Genbank nucleic acids research oxford academic [J]. *Nucl Acids Res*, 2009, (36): 25–30.
- [16] Daniela Z, Marcus A, Glomb DM. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat [J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, (228): 321–330.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



柯燕娜, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: keyan_na@163.com



葛宇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: ghgygc@126.com