

# 实时荧光 PCR 法测定婴幼儿谷类辅助食品中麸质过敏原成分

许银叶<sup>1,2\*</sup>, 苏少霖<sup>1,2</sup>, 许佩勤<sup>1,2</sup>, 庄俊钰<sup>1,2</sup>, 冯志强<sup>1,2</sup>

(1. 广东省食品工业研究所有限公司, 广州 511442; 2. 广东省质量监督食品检验站, 广州 511442)

**摘要: 目的** 建立实时荧光 PCR 法检测婴幼儿谷类辅助食品中麸质过敏原成分的含量。**方法** 样品加入淀粉酶液化后, 采用试剂盒方法提取样品 DNA, 考察大麦 Hordein 基因、小麦 Gliadin 基因、黑麦 Secl 基因和燕麦 Avenin 基因检测方法的特异性、灵敏度和检出限, 并应用于检测实际样品。**结果** 确定了实时荧光 PCR 反应体系条件, 各个基因的检测方法具有特异性强且灵敏度高, 检出限为 0.1%。**结论** 该方法操作简便, 准确率高, 适用于婴幼儿谷类辅助食品中麸质成分的检测。

**关键词:** 麸质; 过敏原; 实时荧光 PCR; 婴幼儿谷类辅助食品

## Determination of gluten allergens in cereals of supplementary foods for infants and young children by real-time fluorescent PCR method

XU Yin-Ye<sup>1,2\*</sup>, SU Shao-Lin<sup>1,2</sup>, XU Pei-Qin<sup>1,2</sup>, ZHUANG Jun-Yu<sup>1,2</sup>, FENG Zhi-Qiang<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Food Industry Institute Co., Ltd, Guangzhou 511442, China; 2. Guangdong Food Quality Supervision and Inspection Station, Guangzhou 511442, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of gluten allergens in cereal supplement foods for infants and young children by real-time fluorescent PCR method. **Methods** After the sample was liquefied by amylase, the sample DNA was extracted by kit method. The specificity, sensitivity and detection limit of the detection method of Hordein gene, wheat Gliadin gene, rye Secl gene and oat Avenin gene were investigated and applied to the detection of actual sample. **Results** The conditions of the real-time fluorescent PCR reaction system were determined. The detection methods of each gene were specific and sensitive, and the detection limit was 0.1%. **Conclusion** This method is simple, accurate and suitable for the detection of gluten allergens in cereal supplement foods for infants and young children.

**KEY WORDS:** gluten; allergen; real-time fluorescent PCR; infant cereal supplements

## 1 引言

麸质是一类特殊的食品致敏原成分, 是国际社会最

早关注和研究的食品致敏原。麸质一般存在于大麦、小麦、黑麦、燕麦和它们的杂交品种中。婴幼儿谷类辅助食品是一种或一种以上的谷物为原料, 并且谷物含量占干重的

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2017B020207009)

Fund: Supported by Science and Technology Project of Guangdong Province (2017B020207009)

\*通讯作者: 许银叶, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: 503205733@qq.com

\*Corresponding author: XU Yin-Ye, Engineer, Guangdong Food Industry Institute Co., Ltd, No.303, Jinxin Road, Panyu District, Guangzhou 511442, China. E-mail: 503205733@qq.com

25%以上, 添加适当的营养强化剂和/或其他辅料, 经过加工调制而成的供 6 月龄以上婴幼儿食用的辅助食品<sup>[1,2]</sup>。据成都市妇女儿童中心医院皮肤科对 2016 年 1 月至 2017 年 5 月该院皮肤科诊治的 1 岁以下 1294 例过敏性皮肤病婴儿进行食物过敏原皮肤点刺试验, 统计分析结果得出结论: 最容易导致 1 岁以下婴儿过敏性皮肤病的食物为小麦、鸡蛋清、花生、鸡蛋黄、大豆<sup>[3]</sup>。其中, 小麦中的麸质成分是最主要的致敏成分。

GB/T 23779-2009《预包装食品中的致敏原成分》中定义, 致敏原是能够诱发机体发生过敏反应的抗原物质<sup>[4]</sup>。同时也罗列出了常见 8 大类食物过敏原, 即含麸质的谷类、甲壳类、鱼类、蛋类、花生、大豆、乳及其制品、坚果。目前过敏原已成为重要的食品安全问题, 为保护消费者的健康, 很多国家和地区都制订了针对食品致敏原标签、标识的法律、法规, 而评价和检测食品过敏原生物活性也是其中很关键的环节。

食物过敏原检测方法主要分为 2 大方法: 基于蛋白质和基于核酸的检测方法<sup>[5]</sup>。基于蛋白质的有包括电泳法、质谱法、免疫学方法和酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等; 基于核酸的主要采用各种 PCR 的方法, 如实时荧光定量 PCR、多重 PCR<sup>[6]</sup>、逆转录 PCR、数字 PCR。目前应用最广泛的是测定蛋白的 ELISA 法和测定 DNA 的 PCR 法<sup>[7]</sup>。PCR 法应用于复杂食品中过敏原的定性定量分析及物种鉴定方面, 不仅具有效率高、结果准确、适用性强、操作简单等优点, 而且食物基质中目标 DNA 的降解速度要比蛋白质慢很多<sup>[8]</sup>, 这是 PCR 方法在食物过敏原检测方面所存在的优势<sup>[9]</sup>。曹际娟等<sup>[10]</sup>建立了一种实时荧光 PCR 方法检测含麸质的谷类产品的的方法, 但该方法在处理部分婴幼儿谷类辅助食品时, 加入 CTAB 后, 出现样液形成糊状, 影响 DNA 提取后续操作, 最终 DNA 提取效率低等问题<sup>[11]</sup>。

本研究建立一种简便、快捷的实时荧光定量 PCR 检测方法, 可以检测婴幼儿谷类辅助食品中的麸质过敏原成

分(大麦、小麦、黑麦、燕麦), 为消费者选购食品提供依据, 为监管部门监管食品提供保障。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与耗材

DNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR 扩增配套试剂盒 Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(Probe qPCR)、PCR 扩增引物、荧光探针(宝生物工程(大连)有限公司)。

### 2.2 仪器与设备

Z 236K 高速台式冷冻离心机(德国 HermLe 公司); Maxq4450 小型台式恒温摇床(美国 Thermo Scientific 公司); Alrstream I 级 A2 型生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司); Qubit3.0 核酸蛋白分析仪(美国 ABI 公司); QuantStudio6 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

### 2.3 样品信息

用于特异性试验样品: 大麦、小麦、黑麦和燕麦各 2 种样品以及 8 种粮谷蔬菜(大豆、玉米、大米、黑豆、芝麻、胡萝卜、糙米、油菜), 样品来源于广州某市场。

用于灵敏度试验样品: 将已提取的麸质 DNA 与其他用于特异性实验的 DNA 按不同比例进行混合以得到不同麸质含量的样品, 麸质含量分别为 100%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 共 8 个浓度梯度。

实际样品: 20 份婴幼儿谷类辅助食品购于广州各超市、婴幼儿店, 见表 1。

### 2.4 引物与探针

用于试验扩增的引物和探针分别为: 大麦 Hordein 基因、小麦 Gliadin 基因、黑麦 Sec1 基因以及燕麦 Avenin 基因, 引物探针信息来自 SN/T 1961.11-2013《出口食品过敏原成分检测 第 11 部分: 实时荧光 PCR 方法检测麸质成分》<sup>[12]</sup>, 序列如表 2 所示。

表 1 实际样品  
Table 1 Practical samples

样品编号	样品名称	样品编号	样品名称	样品编号	样品名称
FZ-01	鱼肉蔬菜营养米粉-1	FZ-08	营养米粉	FZ-15	钙铁锌营养面条#
FZ-02	牛肉番茄营养米粉	FZ-09	婴儿营养米粉☆	FZ-16	燕麦营养米粉△
FZ-03	有机小米营养米粉	FZ-10	淮山薏米营养米粉-2☆	FZ-17	铁锌钙营养米粉
FZ-04	营养细米粉* #	FZ-11	鱼肉蔬菜营养米粉-2☆	FZ-18	南瓜营养米粉
FZ-05	五谷珍宝营养米粉△	FZ-12	胡萝卜营养米粉☆	FZ-19	玉米胡萝卜多维米乳
FZ-06	淮山薏米营养米粉-1	FZ-13	黑米红枣营养米粉☆	FZ-20	鳕鱼蔬菜营养米粉
FZ-07	骨汤营养面条#	FZ-14	强化钙铁锌营养米粉		

注: \*为添加了大麦; #为添加了小麦; △为添加了燕麦; ☆为此生产线也加工含有乳制品、鱼制品、含麸质的谷物制品的食品。

表 2 引物与探针序列  
Table 2 Primers and probes sequences

目的基因	引物序列(5'→3')	探针序列
大麦 Hordein	5'-AACAGCTAAACCCATGCAAGGTA-3'	5'-FAM-TCCTCCAGCAGCAGTGCAGCCCT-TAMRA-3'
	5'-GTTCGGGGATTGGGGTAGTTG-3'	
小麦 Gliadin	5'-CCCAAAGTACGACGCAACGAC-3'	5'-FAM-CATGCCGACACACATCAAGGTTGAC-TAMRA-3'
	5'-GGATTCGGTTATGCCTTCGTG-3'	
黑麦 Secl	5'-AAAAGAACAATCATATCCGCAGCA-3'	5'-FAM-TCACACCAACCATTTCACACCCGC-TAMRA-3'
	5'-GAATTGGCTGTTGGGGCTGG-3'	
燕麦 Avenin	5'-CGGCGATGTGCGATGTATACG-3'	5'-FAM-CCCACCGCAGTGCCCTGTCGC-TAMRA-3'
	5'-AGCCCTGTAGTGTCTTAGAAGC-3'	

## 2.5 方法

### 2.5.1 样品核酸的提取

将用于特异性试验的样品进行前处理,用粉碎机将其粉碎,分装到密封袋中保存备用。用 1.5 mL 离心管称取约 25 mg 样品,按照 DNA 提取试剂盒所述的方法提取样品的 DNA。此外,处理婴幼儿谷类辅助食品样品时,应加入 20  $\mu$ L 的淀粉酶使裂解体系液化。

### 2.5.2 DNA 浓度和纯度的测定

使用紫外分光光度计测定所提 DNA 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,并使用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的浓度。经测定, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  的值均在 1.7~1.9 之间,表明可用于 PCR 实验等后续的操作。同时将浓度稀释至 50 ng/ $\mu$ L,于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.5.3 实时荧光 PCR 试验

实时荧光定量 PCR 反应体系(20  $\mu$ L)见表 3,实时荧光定量 PCR 反应条件见表 4,同时在每个循环的退火延伸阶段收集荧光信号。

依据实时荧光 PCR 反应原理及相关食品检测标准,设定本方法的判定原则:(1)空白、阴性对照不得有 Ct 值;(2)当 Ct 值  $\leq$  35,有典型扩增曲线时,判定为检出;(3)当 Ct 值  $>$  35,无典型扩增曲线或无 Ct 值,判定为未检出。

表 3 实时荧光定量 PCR 反应体系  
Table 3 Reaction system of real-time fluorescent PCR

试剂	体积( $\mu$ L)
实时荧光 PCR 预混液	10
正、反引物(10 $\mu$ mol/L)	0.4
荧光探针(10 $\mu$ mol/L)	0.2
DNA 模板(50 ng/ $\mu$ L)	2
无菌超纯水	7.4
总体积	20

表 4 实时荧光 PCR 反应条件

Table 4 Reaction conditions of Real-time fluorescence PCR

步骤	反应	温度/ $^{\circ}$ C	时间/s	循环数
1	预热	95	10	1
2	变性	95	5	40
3	退火延伸	60	34	

### 2.5.4 特异性试验

提取 16 种用于特异性试验样品的 DNA,利用建立的实时荧光定量 PCR 方法,分别检测大麦 Hordein、小麦 Gliadin、黑麦 Secl 以及燕麦 Avenin 基因,验证方法的特异性。

### 2.5.5 灵敏度试验

将已提取的麸质 DNA 和其他用于特异性实验的 DNA 按比例混合,得到 4 种类各 8 浓度梯度的样品(详见 2.3),与对应的引物、探针配置反应体系并进行扩增,确定方法的检出限。

### 2.5.6 检测方法的实际应用

从超市选购 20 批婴幼儿谷类辅助食品,对样品进行前处理后,使用 DNA 提取试剂盒提取样品的 DNA 并稀释至所需浓度后进行实时荧光定量 PCR 检测。

## 3 结果与分析

### 3.1 特异性试验结果

引物与探针的特异性需要验证其种间特异性,以确定该引物是否满足检测的需要。16 种样品与麸质(大麦、小麦、黑麦、燕麦)的引物和探针进行实时荧光定量 PCR 扩增的结果如图 1。结果显示:大麦、小麦、黑麦和燕麦样品在对应的源性基因中均出现了典型的扩增曲线,说明检测出其源性成分;而其他样品均无出现扩增曲线。实验结果表明引物、探针特异性满足检测要求。

### 3.2 灵敏度试验结果

将麸质(大麦、小麦、黑麦、燕麦)DNA 分别与其他用于特异性实验的 DNA 混合, 分别制成麸质 DNA 含量为 100%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.01%和 0.001%的

混合 DNA, 进行实时荧光定量 PCR 实验, 检测结果如表 5、图 2。由结果可以得出, Hordein、Gliadin、Secl 和 Avenin 基因在含量为 0.1%时依然可以检出, 得出本研究方法的检出限为 0.1%。

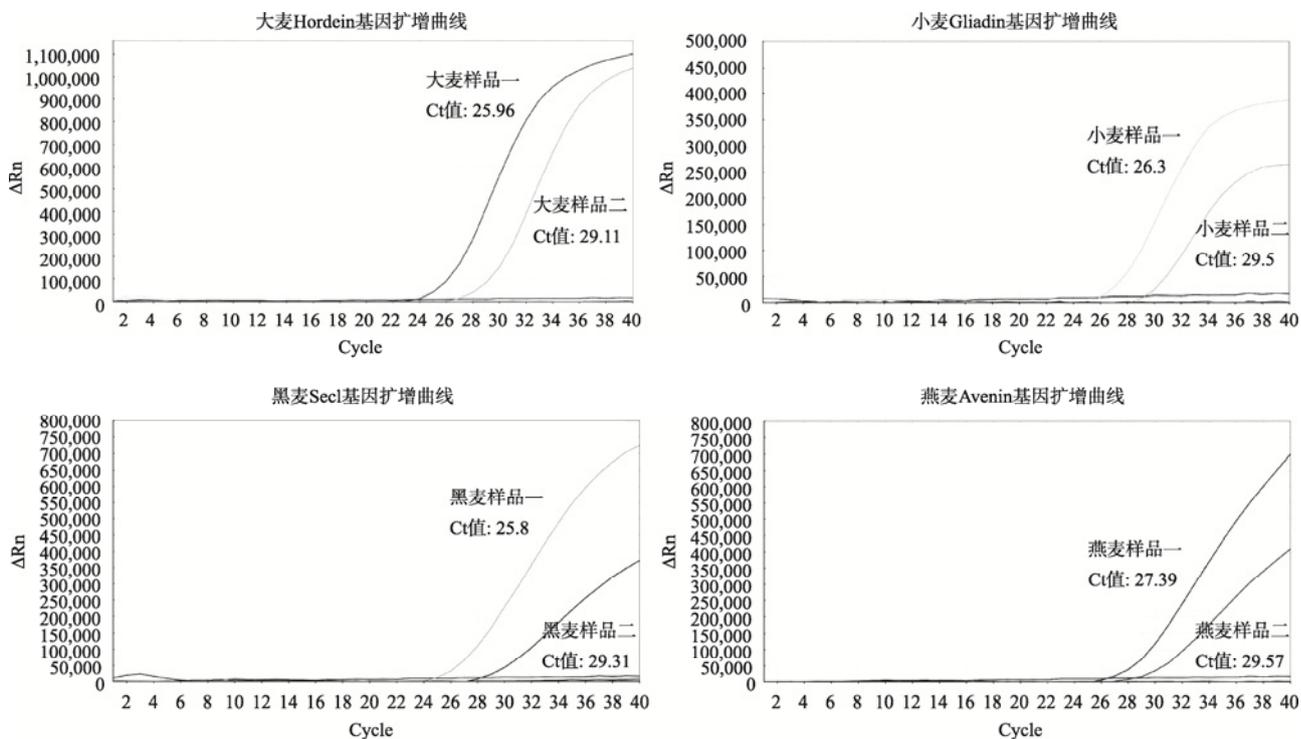


图 1 特异性试验结果

Fig.1 Test results of specificity

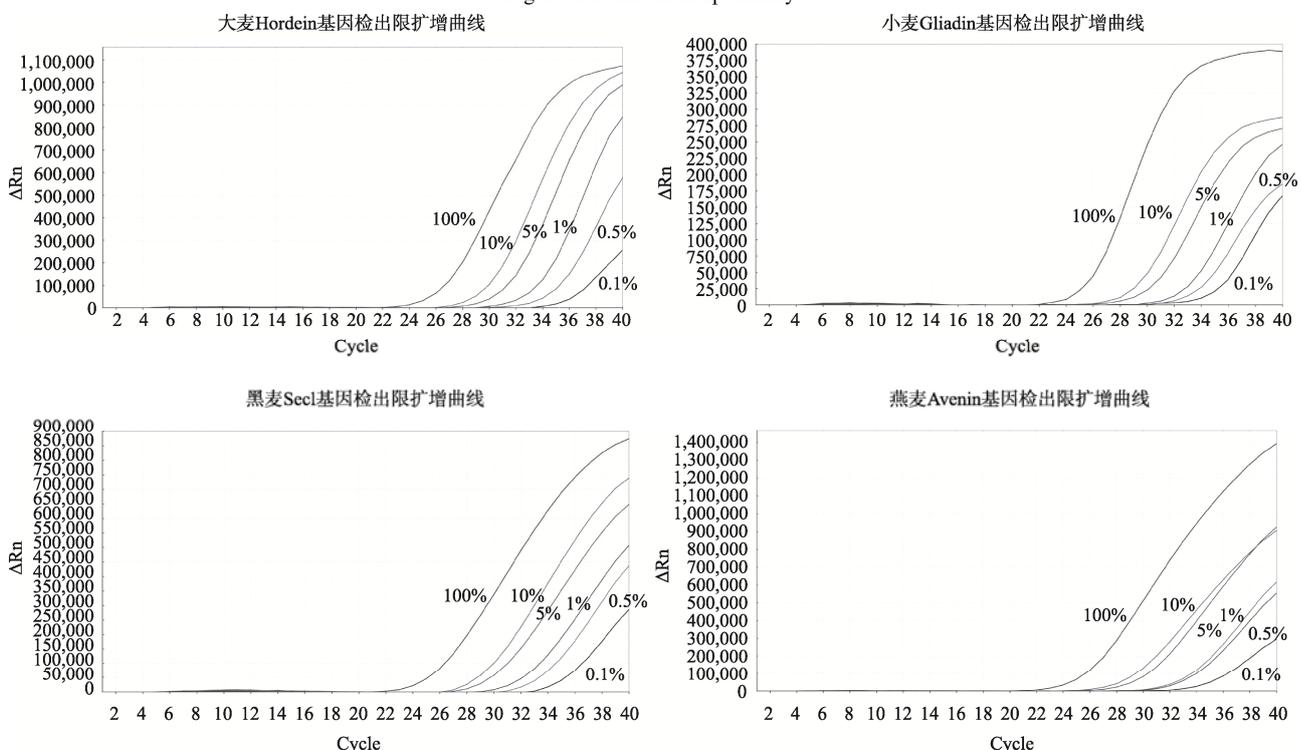


图 2 灵敏度试验结果

Fig.2 Test results of sensitivity

表5 灵敏度试验结果 Ct 值  
Table 5 Test result Ct value of sensitivity

浓度	大麦 Hordein Ct 值	小麦 Gliadin Ct 值	黑麦 Sec1 Ct 值	燕麦 Avenin Ct 值
100%	25.62	23.55	24.78	24.53
10%	28.93	27.19	28.46	28.21
5%	30.33	27.98	29.42	29.14
1%	32.57	30.95	31.77	32.40
0.5%	34.21	31.89	33.00	32.73
0.1%	34.53	33.15	34.97	34.97
0.01%	/	/	/	/
0.001%	/	/	/	/

### 3.3 检测方法应用结果

为了验证方法的可靠性和实用性,我们从市场选择了20批婴幼儿谷类辅助食品(具体信息见表1)。利用本文建立的实时荧光定量PCR方法,对样品进行DNA提取,稀释至合适浓度后进行实时荧光定量PCR扩增。结果显示,18批样品的实时荧光定量PCR结果与样品实际情况一致。编号FZ-05的样品,标示添加了燕麦成分,实验结果检出了燕麦和大麦成分,如图3;编号FZ-10的样品,标示“此生产线也加工含有乳制品、鱼制品、含麸质的谷物制品的食品”,实验结果检出了小麦成分,如图4。经复检,判定结果一致。对市售商品的实际检测结果表明本实验建立的方法适用于市售婴幼儿谷类辅助食品中麸质中过敏原成分的检测。

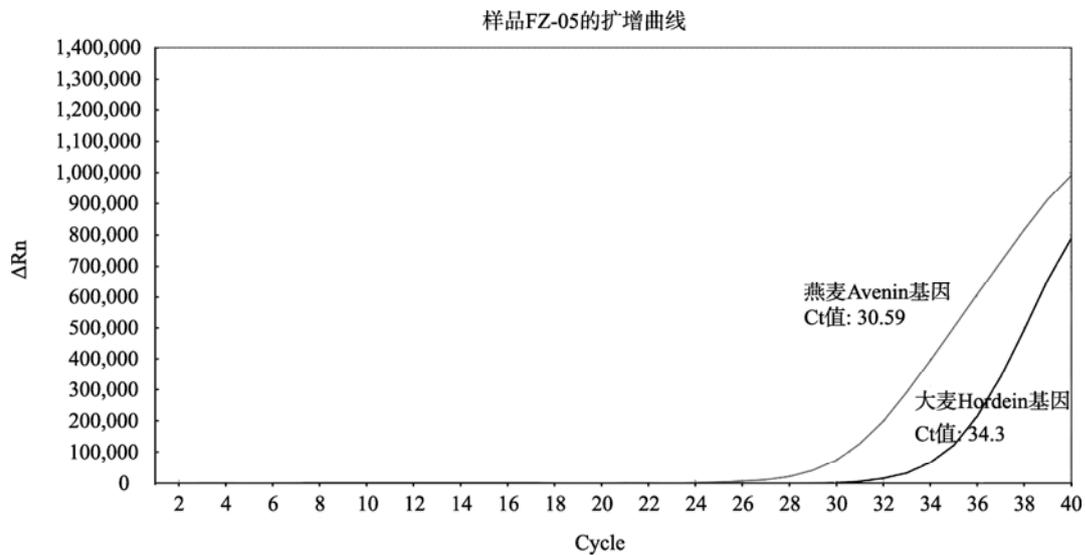


图3 样品 FZ-05 检测结果  
Fig.3 Test results of sample FZ-05

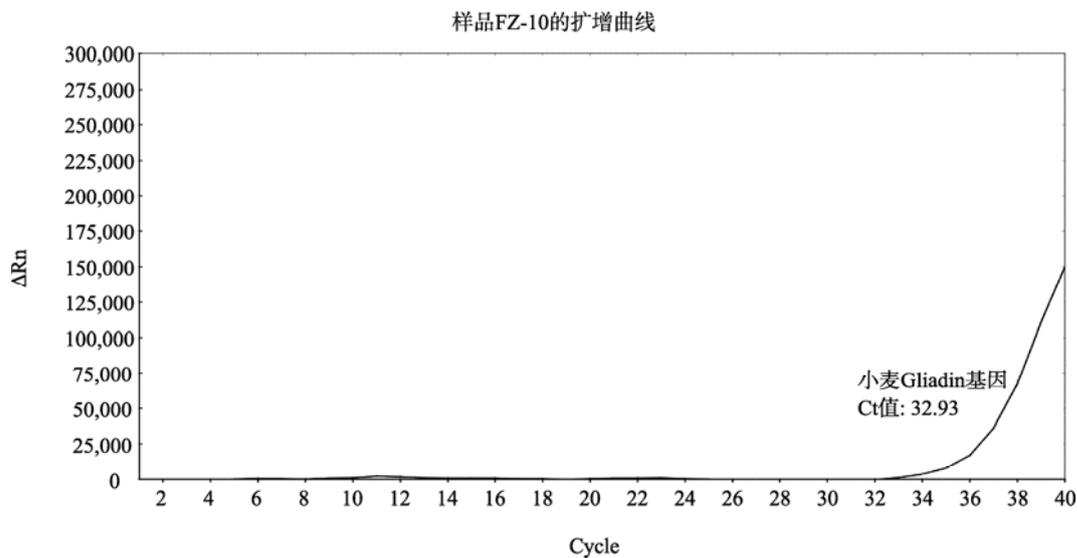


图4 样品 FZ-10 检测结果  
Fig.4 Test results of sample FZ-10

## 4 结论与讨论

免疫学检测方法的特异性和准确性基于抗原抗体的识别, 但食品工业中常用的热加工、酶解等深加工技术使过敏原蛋白质变性或降解, 易导致结果出现假阴性<sup>[13]</sup>; 对于某些过敏原, 如虾、龙虾和蟹等其他甲壳类<sup>[14]</sup>, 存在较大的交叉反应, 此外, 有研究表明 ELISA 试剂盒不适用于鱼过敏原蛋白的检测<sup>[15]</sup>, 因此免疫学检测方法在过敏原检测方面限制了其应用。而普通 PCR 方法存在操作复杂, 易污染等不足。

实时荧光 PCR 法是一种新型的检测技术, 在食品与非食品中过敏原检测中发挥了非常重要的作用。对比于普通 PCR 法, 它在密闭管中进行, 无需在反应结束后进行电泳分析, 因此可降低反应的污染率。实时荧光定量 PCR 法是检测过敏原的一个重要的研究方向。本研究采用实时荧光定量 PCR 法, 建立检测婴幼儿谷类辅助食品中麸质中过敏原成分的方法, 该方法具有很好的特异性和灵敏度, 检出限为 0.1%。该方法检验条件稳定, 操作简单, 适用性强, 可准确检测市售常见婴幼儿谷类辅助食品中的麸质过敏原成分, 适合推广使用。有利于维护消费者的知情权, 选购合适的产品供婴儿食用, 为相关检测机构日常监管工作提供了理论基础与数据支持。

## 参考文献

- [1] 秦宇. 我国婴幼儿谷类辅助食品行业质量调研报告[J]. 质量与标准化, 2015, (09): 38-41.  
Qin Y. China's infant and young children cereal supplement food industry quality research report [J]. Qual Stand, 2015, (09): 38-41.
- [2] GB 10769-2010 食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].  
GB 10769-2010 National food safety standard-Cereal-based complementary foods for infants and young children [S].
- [3] 徐海涛, 唐瑶, 冉琴, 等. 婴儿过敏性皮肤病食物过敏原分析[J]. 中国医学前沿杂志, 2018, 10(8): 123-126.  
Xu HT, Tang Y, Ran Q, et al. Analysis of food anaphylactogen in infants with anaphylactoid dermatosis [J]. Chin J Front Med Sci, 2018, 10(8): 123-126.
- [4] GB/T 23779-2009 预包装食品中的致敏原成分[S].  
GB/T 23779-2009 Allergenic ingredients in prepackaged foods [S].
- [5] 方娟, 陈朝银, 赵声兰, 等. 核桃过敏原及其检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 361-365.  
Fang J, Chen CY, Zhao SL, et al. Research progress in walnut allergens and its detection methods [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(23): 361-365.
- [6] 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): 156-160.  
Wang W, Han JX, Wu YJ, et al. Detection of mustard and other seven food allergens by multiplex PCR [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(6): 156-160.
- [7] 冯彦娟, 袁娟丽, 佟平, 等. 大豆过敏原的检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 365-369.  
Feng YJ, Yuan JL, Tong P, et al. Research progress in the detection of soybean allergens [J]. Food Sci, 2012, 33(23): 365-369.
- [8] Popms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: A review [J]. Food Addit Contam, 2004, 21: 1-31.
- [9] 尚柯, 张彪, 段庆梓, 等. 小麦和榛子过敏原成分检测的实时荧光PCR方法[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 234-240.  
Shang K, Zhang B, Duan QZ, et al. Real-time fluorescence PCR in allergens detecting of wheat and hazelnuts [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(4): 234-240.
- [10] 曹际娟, 邵娟, 于珂, 等. 实时荧光 PCR 方法检测含麸质的谷类产品管家基因[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2010, 33(3): 374-379.  
Cao JJ, Shao J, Yu K, et al. Detecting housekeeping gene of gluten-containing cereals by real-time PCR [J]. J Liaoning Norm Univ (Nat Sci Ed), 2010, 33(3): 374-379.
- [11] 王洪健, 许银叶, 曾伟婷. 蛋白粉中转基因成分实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 123-126.  
Wang HJ, Xu YY, Zeng WT. Establishment of real-time pcr method for detection of genetically modified components in protein powder [J]. Food Ferment Sci Technol, 2018, 54(1): 123-126.
- [12] SN/T 1961.11-2013 实时荧光 PCR 方法检测麸质成分[S].  
SN/T 1961.11-2013 Real time PCR method for detecting gluten components [S].
- [13] 陈颖, 王玮. 食物过敏原检测方法研究进展[J]. 检验检疫学报, 2011, 21(3): 4-19.  
Chen Y, Wang W. Overview of the detection methods for food allergen [J]. J Inspect Quarant, 2011, 21(3): 4-19.
- [14] Rejeb SB, Davies D, Cleroux C, et al. Enzyme immunoassay for the detection of crustacean proteins in foods [C]. Association of Official Analytical Chemists International, Annual Meeting, Los Angeles, CA, 2002: 102.
- [15] Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: A review [J]. Food Addit Contam, 2004, 21(1): 1-31.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



许银叶, 硕士, 工程师, 主要研究方向  
食品安全与检测。

E-mail: 503205733@qq.com