

食品过敏原牡蛎成分 PCR 检测方法的初步研究

张懿翔, 曲勤凤, 余顺吉, 胡雪莲, 熊 薇, 葛 宇*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要:目的:建立基于 PCR 技术的过敏原牡蛎成分快速检测方法,结合溶解曲线及特异的 T_m 值与 C_t 值,用于不同产品的牡蛎成分检测。方法:根据 NCBI 上的牡蛎线粒体序列,通过 DNA Star 等软件设计引物,分别采用普通 PCR 和 SYBR Green I 实时荧光 PCR 的方法建立食品过敏原牡蛎成分的检测方法,对十种牡蛎阳性样品和二十余种阴性样品进行实验,并且对几种牡蛎相关食品进行检测。结果:研究建立的检测方法可以检测出含牡蛎成分 0.1% 的样品,其中荧光 PCR 的灵敏度达到 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$,特征峰的 T_m 温度为 80.08°C ,能够检测出牡蛎相关食品中的牡蛎成分。结论:该方法是一种操作安全方便、成本较低、特异、灵敏的实时荧光 PCR 方法,对于收集到的食品相关产品以及保健品中牡蛎粉的检出率为 100%,该方法可广泛应用于食品中牡蛎成分的快速鉴定。

关键词:食品过敏原,牡蛎成分,PCR,定性检测

Preliminary Study on PCR Detection Method for Food Allergen Oyster

ZHANG Yi-xiang, QU Qin-feng, YU Shun-ji, HU Xue-lian, XIONG Wei, GE YU*

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

Abstract: Objective: A PCR based method combined with melting curve analysis and site-specific T_m and C_t analysis was established to detect oyster as allergen in different types of food. Methods: According to the DNA sequences of oyster mitochondria from NCBI database, oyster-specific primers for both conventional PCR and SYBR Green I RT-qPCR were designed by DNA star software. 10 samples were confirmed to contain oyster (positive) and 20 samples were negative in the oyster presentation. Some samples made of the oyster were used in our experiments as positive controls. Results: The minimum detectable proportion of oyster component in food samples was 0.1% (w/w), with a $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ detection limit of qPCR and a melt curve peak at $T_m 80.08^\circ\text{C}$ by this methods. Conclusion: Compared with the existing methods for oyster detection in food industry, the qPCR based protocol established here was step-wise, cost-effective with higher specificity and sensitivity. In this study, the detection efficiency of oyster components in all collected samples was 100%, which indicated this method would be widely applied for quick qualification of oyster component in food industry.

Key words: food allergen; oysters; PCR; qualitative detection

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)02-0251-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.043

引文格式: 张懿翔, 曲勤凤, 余顺吉, 等. 食品过敏原牡蛎成分 PCR 检测方法的初步研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 251-256.

食品过敏原是指能对特定人群产生免疫反应或者过敏反应的蛋白质和其他相关物质。食品过敏属于机体对外源物质产生的一种变态反应^[1]。据统计,全球约有 1% 的成人和 2.5% 的儿童患有食物过敏症,每年因此造成 150 人以上的死亡以及超过 2 万人次的急救处理^[2]。在发达国家约有 6% 的儿童和 3%~4% 的成年人被这种免疫介导性疾病所困扰^[3-4]。食物过敏已被世界卫生组织列为 21 世纪重点防控疾病之一^[5]。目前大约有 160 多种食品含有可以导

致过敏反应的食品过敏原。尤其是对海产品成分过敏现象较为严重。近年来对于海产品过敏原的研究也日益增加,黄榕芳等^[6]、伍慧妍等^[7]、刘志刚等^[8]发现海产品中软体类动物主要的过敏原是蛋白原肌球蛋白,曹际娟等^[9]建立了对虾源性成分的 PCR 方法,沈海旺等^[10]对甲壳类食品过敏原三维结构的研究,获得 4 种过敏原分子特征抗原表位及部分三维结构。牡蛎属于欧盟法规中食品过敏原的种类 14 个种类中的软体动物。目前对于甲壳类动物与软体动

收稿日期: 2018-03-06

作者简介: 张懿翔(1987-),男,硕士,助理工程师,研究方向:分子生物学, E-mail: zhangyx1@sqi.org.cn。

* 通讯作者: 葛宇(1971-),女,博士,教授级高工,研究方向:食品检测, E-mail: geyu@sqi.org.cn。

基金项目:上海市技术性贸易措施应对专项项目(16TBT004)。

物之间具有交叉过敏原^[11-13]的情况有一定报道,然而关于牡蛎过敏原的相关报道却较少。

牡蛎是常见的世界性的贝类,属于软体动物。在我国及世界其他国家都是一种营养价值很高的珍贵海产品,目前已发现有 100 多种,全世界濒海各国几乎都有存在^[14]。牡蛎不仅是重要的食材,而且具有较高的药用价值,但同时牡蛎又可引起各种过敏反应症状,其食用安全性令人担忧,随着牡蛎相关保健品及其他产品的不断开发,对于牡蛎成分检测的需求也在提高。目前基于牡蛎线粒体基因分析的一些研究^[15-16],虽然能够检测出牡蛎样品,但是其特异性不足,不能区分出相类似的样品(扇贝、蛤蜊等)。

针对上述问题,本研究旨在建立一种灵敏度高且特异性强的食品过敏原牡蛎成分的检测方法,以期能够快速有效的对牡蛎相关产品进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海外牡蛎(澳洲、爱尔兰、法国、加拿大、丹麦) 上海市出入境检验检疫局;国产牡蛎(山东青岛、山东乳山、福建、浙江、海南等) 来自实验室收集样品;蛤蜊、扇贝、鲍鱼、青鱼、虾、猪肉、牛肉、羊肉、牦牛肉、鸡肉、鸭肉、猫肉、大豆、玉米、大米、黄瓜、番茄、狗肉、蜗牛等阴性样品 为本实验室收集样品;海蛎干、海蛎罐头、蚝油、蚝汁等牡蛎类产品 收集于市场或超市;SYBR Green I PCR 扩增试剂 2 × SYBR® Premix Ex Taq™(2X),货号 RR420L 宝生物(大连)有限公司;商业化 DNA 提取试剂盒 High Pure PCR Template Preparation Kit 瑞士 Roche 公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取液(54.9 mmol/L CTAB、1.4 mol/L NaCl、0.1 mol/L Tris-HCl、0.02 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),pH8.0) 实验室自制。

Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR 仪;7500/7500 Fast Real Time PCR System 实时荧光 PCR 仪 美国 ABI 公司;DYY-6C 型电泳仪 北京六一仪器厂;UNIVERSAL HOOD II 凝胶成像仪 美国 BIO-RAD 公司;微量紫外分析仪 DS-11 美国 DeNovix 公司;冷冻离心机 Centrifuge 5810R 德国 Eppendorf 公司;FreeZone 4.5 Plus 冷冻干燥仪 美国 Labconco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人工污染模拟样品 使用冷冻干燥仪将粉碎好的牛肉和牡蛎肉干燥再磨成粉末状,并于 80 ℃烘干 6 h。以牛肉为主要基质与其他样品配成牡蛎含量为 10%、1%、0.1% 的模拟样品。

1.2.2 样品 DNA 的提取 150 mg 左右的样品中加入 1 mL CTAB 提取液(20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na₂EDTA,pH8.0)和 20 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL),56 ℃振荡 2 h(或者过夜),13000 × g 离心 5 min,转移上清液 800 μL 到新的离心管中,加入与上清液等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混合液用力振荡混合后,13000 × g 离心 10 min,将上清液 600 μL 转移到新的离心管中,

再次加入与上清液等体积的氯仿/异戊醇(24:1)溶液,用力振荡混合后,13000 × g 离心 10 min,将上清液 400 μL 转移到新的离心管中,加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇溶液,混合均匀后室温放置 20 min,13000 × g(离心 2 min,弃去上清液,加入 1 mL 70%乙醇溶液洗涤沉淀 2 次,倒去乙醇溶液,晾干后加入 200 μL TE 溶液(1 mmol/L Tris-HCl,0.1 mmol/L Na₂EDTA,pH8.0)溶解。DNA 提取完成后,用微量紫外分析仪测定 DNA 浓度,所提取的样品的 DNA 溶液均稀释到工作浓度(约 100 ng/μL)。对于一些含量较低的样品与深加工样品使用 High Pure PCR Template Preparation Kit Roche 试剂盒进一步纯化。

1.2.3 引物设计及筛选 引物设计:线粒体 DNA 标记,由于其基因分布的普遍性、序列和结构的相对保守性而被广泛应用于分子系统研究及种的鉴定等方面。利用 DNASTAR 软件针对牡蛎 DNA 中序列高度保守的三段基因序列,牡蛎线粒体 DNA 基因序列(AF177226.1)、细胞色素 c 氧化酶亚基 I(COI)基因序列(AF300616.1)、牡蛎 16S rRNA 基因序列(AY510450)设计 10 对引物,引物均由上海英潍捷基合成。

引物筛选:通过对牡蛎阳性样品扩增效果确定各个引物的最佳退火温度、初步筛选引物;选取扩增特异性最强、扩增效果与熔解曲线最适宜的引物,获得下列最佳引物。

AD-3(5'-3'): TGGGGCTTAGTTTGATAGTAGTA,AD-4(5'-3'): TAGCTCCAGGGTTATAAAGTCTCC,365 bp。

1.2.4 PCR 扩增条件优化 以牡蛎(样品)DNA 为模板,使用筛选出的最佳引物进行实验。

普通 PCR 反应体系和反应条件:DNA 模板 1 μL,2 × Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,用无菌水补至总体积为 20 μL。扩增条件为:94 ℃,3 min;94 ℃,30 s,48 ℃,30 s,72 ℃,30 s,35 个循环;72 ℃,7 min。取 5 μL PCR 产物,加 1 μL 6X 上样缓冲液点样进行电泳。PCR 电泳检测所用的凝胶浓度为 2.0%。阴性对照为不含牡蛎成分的样品,空白对照为无菌水。

SYBR Green I 实时荧光 PCR 反应体系和反应条件:SYBR Premix Ex Taq™2 × 10 μL,PCR 上游引物(5 μmol/L) 0.5 μL,PCR 下游引物(5 μmol/L) 0.5 μL,DNA 模板 1 μL,用灭菌蒸馏水补足 20 μL 的总反应体系。PCR 反应程序(参照荧光 SYBR Green I PCR 扩增试剂的说明进行调整):预变性,95 ℃,30 s,循环数 1;PCR 反应,第一步,95 ℃变性 5 s;第二步,65 ℃退火延伸 34 s,同时在退火过程中收集荧光信号,共进行 40 个循环;熔解曲线分析:95 ℃,15 s;60 ℃,1 min;95 ℃,15 s。退火温度摸索范围为 61~68 ℃。

1.2.5 PCR 产物的测序验证 对 PCR 产物进行测序,然后于 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行 BLAST,与牡蛎相关序列进行对比。

1.2.6 PCR 检测灵敏度实验 用微量紫外分析仪测定通过提取得到的样品 DNA 浓度,用无菌去离子水

将 DNA 溶液稀释成质量浓度分别为 100、50、3.125、0.78、0.2、0.1、0.05、0.025、0.01 ng/μL 的溶液,分别取 1 μL进行普通 PCR 扩增以及荧光 PCR 扩增。反应体系同 1.2.4,同时将牡蛎含量为 10%、1%、0.1% 的人工模拟污染样品提取 DNA 用于灵敏度实验。

1.3 数据处理

普通 PCR 结果通过电泳图谱分析,SYBR Green I 实时荧光 PCR 的结果通过 ABI 7500 自带的曲线分析功能与 Ct 值数据确认牡蛎的特异峰与 Tm 温度。每个样品取至少双平行复孔,重复 10 次实验。TM 温度通过各个阳性样品的平均值得出。

2 结果与分析

2.1 引物筛选 PCR 检测

分别对利用十对设计引物进行 PCR 扩增,根据特异性等条件筛选如图 1。有 6 对引物能够成功扩增,于是又对上述引物进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 实验,只有 AD-3,AD-4 为上下游引物具有明显的扩增曲线与熔解曲线。

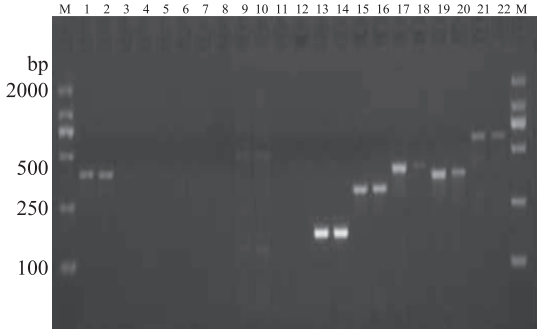


图 1 PCR 引物筛选

Fig.1 Screening results of PCR primers

注:1~22:分别为设计的引物扩增结果;

其中 19、20 为最终选择引物 AD3、AD4 的扩增结果。

最终选择引物 AD-3,AD-4 为最佳上下游引物,分别对十种牡蛎阳性样品进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示,可以看出该引物能够扩增出牡蛎成分,扩增产物大小为 365 bp。同时对其他二十余种动植物样品进行 PCR 扩增,结果样品与空白对照均为阴性如图 3。

2.2 PCR 扩增结果的测序验证

通过对扩增产物进行测序,将其结果在 NCBI 上进行 BLAST,结果显示与 AF177226.1 同源性达到了 99%,如图 4,同时与 KJ855245.1、EU672831.1 等牡蛎线粒体序列的同源性也达到了 99%。

2.3 SYBR Green I 荧光 PCR 结果分析

本实验分别对所收集样品进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测,获得了 S 型扩增曲线,得到 PCR 仪分析出的从基线到指数增长的拐点所对应的循环次数 Ct 值,结合熔解曲线与其对应的熔解温度(Tm)分析得到的特征峰(见图 5),平均 Tm 值通过对各个样品收集数据计算出为 80.08 °C 平均 Ct 值为 19.40 (见表 1),所有牡蛎样品的 Ct 值和 Tm 值与阳性对照相符,由此通过基于 SYBR Green I 的熔解曲线分析荧光 PCR 方法可以快速的检测牡蛎成分。在实验

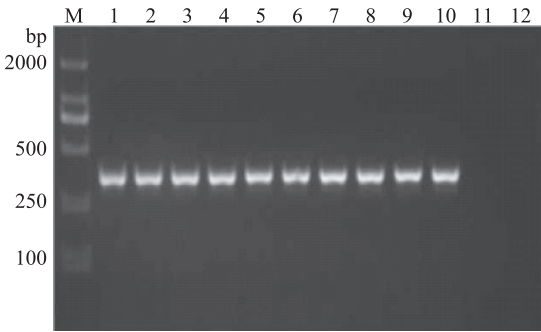


图 2 阳性样品 PCR 结果

Fig.2 Samples with positive PCR results

注:1~10:牡蛎样品分别来自澳洲、爱尔兰、法国、加拿大、丹麦、山东青岛、山东乳山、福建、浙江、海南;11:阴性对照;12:空白对照。



图 3 阴性样品 PCR 结果

Fig.3 Samples with negative PCR results

注:1~3:为阳性对照、阴性对照、空白对照;4~22 为牡蛎阴性样品蛤蜊、扇贝、鲍鱼、青鱼、虾、猪肉、牛肉、羊肉、牦牛肉、鸡肉、鸭肉、猫肉、大豆、玉米、大米、黄瓜、番茄、狗肉、蜗牛。

表 1 牡蛎样品平均 Tm 值

Table 1 Average Tm of oyster samples					
样品	Ct	Tm(°C)	样品	Ct	Tm(°C)
威海	23.16	80	法国	22.14	80.4
青岛	13.53	80	澳大利亚	15.82	80.3
湛江	17.12	79.9	爱尔兰	16.09	80
福建	21.62	80.3	加拿大	18.51	80
乳山	21.35	80	丹麦	21.08	80
浙江	22.93	80	平均	19.40	80.08

过程中初步退火温度选择为 60 °C 时,阴性样品中蛤蜊样品与扇贝样品出现了非特异性扩增。在进一步的实验中,分别选择 61~68 °C 作为退火温度进行实验,当退火温度为 63 °C 时,蛤蜊的 Ct 值在 35 左右,扇贝的 Ct 值在 38 左右,从熔解曲线分析可知牡蛎样品的特征峰值更高,而蛤蜊、扇贝等样品的特征峰偏低并且 Tm 值较牡蛎低。随着退火温度的升高(61~64 °C)蛤蜊、扇贝样品的 Ct 值、Tm 值下降但仍存在一部分非特异性扩增的情况,当退火温度提升至 65 °C 时,基本能消除非特异性扩增,阴性样品均无 S 型扩增曲线出现,并且无特征峰和相应的 Tm 值(见图 6),而退火温度提升至 68 °C 时,虽然非特异性扩增被完全消除,但阳性样品的扩增也会受到一定抑

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
673 bits(364)	0.0	366/367(99%)	0/367(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TTGGGGCTTAGTTTGATAGTAGGTATCTTACGTAATTCTGACTCTGGAGTGTACTCTTTG				60
Sbjct 15350	TTGGGGCTTAGTTTGATAGTAGGTATCTTACGTAATTCTGACTCTGGAGTGTACTCTTTG				15409
Query 61	TACTCTCAGAGTGCTTTGGACCATAAGTTAAGGATTAAACTGTCAAACTTCAAATTTGAA				120
Sbjct 15410	TACTCTCAGAGTGCTTTGGACCATAAGTTAAGGATTAAACTGTCAAACTTCAAATTTGAA				15469
Query 121	ACTACCATAAATGGGTTGGTCTAAGATAATGATCTCACCAGGAATTAAGTTTTTTTTTA				180
Sbjct 15470	ACTACTCATAATTGGGTTGGTCTAAGATAATGATCTCACCAGGAATTAAGTTTTTTTTTA				15529
Query 181	AAAGGTTTCGCTCCTTTAAAGTGTTTTTCCCTTGTCAGTCTCTCTTTTGGAAAAGCGGG				240
Sbjct 15530	AAAGGTTTCGCTCCTTTAAAGTGTTTTTCCCTTGTCAGTCTCTCTTTTGGAAAAGCGGG				15589
Query 241	GGACATTTATGTCAACAAATCATTTAGACATTGGAAGGTTTTATATAGTATTTGGATTTT				300
Sbjct 15590	GGACATTTATGTCAACAAATCATTTAGACATTGGAAGGTTTTATATAGTATTTGGATTTT				15649
Query 301	GAGCTGTTCTTGCGGGAAGTGGTTTAGGTCTCTTATTCGTTGGAGACTTTATAACCCCTG				360
Sbjct 15650	GAGCTGTTCTTGCGGGAAGTGGTTTAGGTCTCTTATTCGTTGGAGACTTTATAACCCCTG				15709
Query 361	GAGCTAA	367			
Sbjct 15710	GAGCTAA	15716			

图 4 测序产物 BLAST 结果
Fig.4 Results of BLAST sequencing products

表 2 不同退火温度下样品 Tm 值

Table 2 Tm of samples at different annealing temperatures

退火温度(℃)	61		63		65		68	
样品	Ct	Tm(℃)	Ct	Tm(℃)	Ct	Tm(℃)	Ct	Tm(℃)
蛤蜊	28.15	80	35.02	71	>40	65.7	>40	67.8
扇贝	30.37	79.2	38.08	79.3	>40	65.4	>40	65.4
牡蛎	18.5	80	16.09	80	18.70	79.7	20.75	79.6

制(见表 2)。

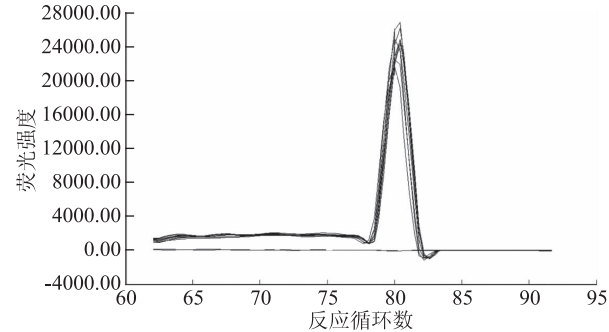


图 5 牡蛎阳性样品的 SYBR Green I 熔解曲线
Fig.5 Dissolution curves of SYBR Green I for positive oyster samples

2.4 牡蛎成分的 PCR 检测灵敏度

分别取 1 μL 浓度为 100、50、12.5、3.125、0.78、0.2、0.1、0.05、0.025、0.01 ng/μL 的样品 DNA 溶液进行普通 PCR 扩增以及 SYBR Green I 实时荧光 PCR 扩增。在检测中,普通 PCR 的电泳结果表明,可以明确检测出浓度为 0.05 ng/μL 的样品(见图 7),当样品 DNA 浓度的进一步降低的情况下,电泳条带变得不明显,而同样的浓度使用荧光 PCR 时,则均出现扩增曲线,Ct 值随着浓度的降低依次递减(见图 8、表 3),均出现熔解曲线的特征峰,可以检测出 0.01 ng/μL 浓度的阳性样品。对于人工模拟污染样品使用 SYBR Green I 方法检测,结果如图 9,10%、1%、0.1% 的样

品均出现扩增曲线,且 Ct 值与 Tm 值符合预期,表明该方法能够在其他基质混合的样品中检测到牡蛎含量为 0.1% 的样品。

表 3 检测灵敏度 Ct 值
Table 3 Ct of detection sensitivity

浓度(ng/μL)	Ct 值	浓度(ng/μL)	Ct 值
100	25.02	0.2	31.46
50	23.73	0.1	32.37
12.5	24.6	0.05	33.37
3.125	26.83	0.025	33.87
0.78	27.36	0.01	34.9
0.39	28.47		

结果表明普通 PCR 的方法能够满足一般样品的检测,可作为结果确认的一种方法。而 SYBR Green I 实时荧光 PCR 的检测检出限更低,具有更高的灵敏度,通过熔解曲线可以排除一些非特异性扩增,能够满足更低浓度人工模拟污染样品的检测,所以选择此方法进一步对牡蛎相关产品进行实验。

在分析样品是否阳性时,要结合 Ct 值与熔解曲线进行判定,当 Ct 值小于 35 时且具有特异的 Tm 值时,样品牡蛎成分为阳性;当 Ct 值小于 35,而无特异的 Tm 值时,应重复检测进行确证;当 Ct 值大于 35,且无特异的 Tm 值时,样品牡蛎成分为阴性。

2.5 不同牡蛎产品的检测

运用建立的熔解曲线方法对市场收集的海蛎

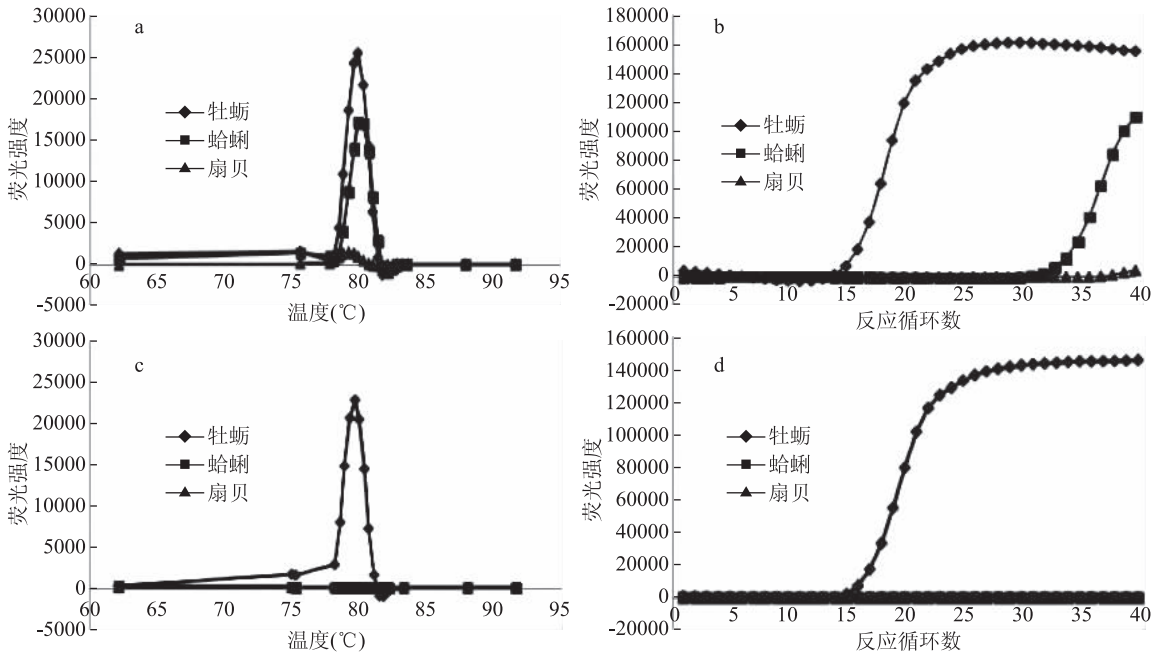


图 6 蛤蜊、扇贝、牡蛎阳性样品的溶解曲线、扩增曲线比较

Fig.6 Comparison of dissolution curves and amplification curves for positive samples of clams,scallops and oysters
注:a.60 °C 退火溶解曲线;b.60 °C 退火扩增曲线;c.65 °C 退火溶解曲线;d.65 °C 退火扩增曲线。

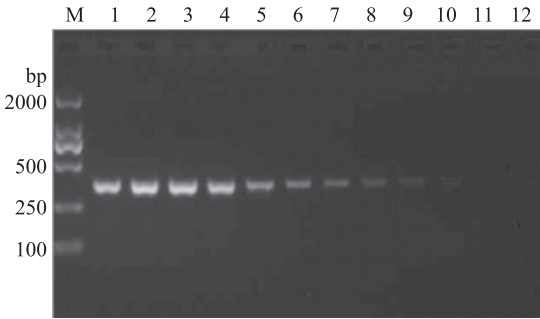


图 7 牡蛎成分普通 PCR 检测灵敏度

Fig.7 Detection sensitivity of normal PCR for oyster samples
注:1~10:牡蛎浓度分别为 100、50、12.5、3.125、0.78、0.2、0.1、0.05、0.025、0.01 ng/μL;
11:阴性对照;12:空白对照。

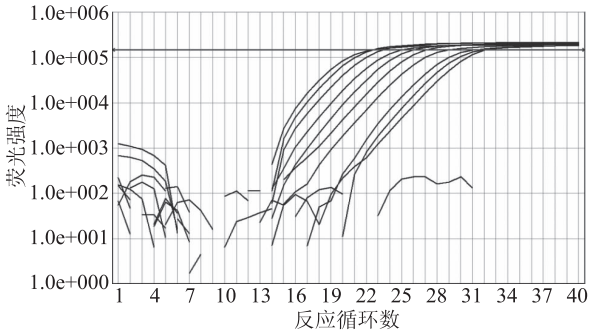


图 8 牡蛎成分荧光 PCR 检测灵敏度

Fig.8 Detection sensitivity of real-time PCR sensitivity for oyster samples
注:从左到右牡蛎浓度依次为 100、50、12.5、3.125、0.78、0.2、0.1、0.05、0.025、0.01 ng/μL。

干、海蛎罐头、蚝油、蚝汁、牡蛎粉等样品进行检测,样品类型和检测结果见(见表 4、表 5),实验中几种

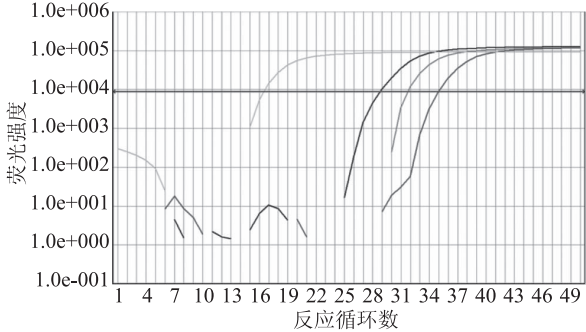


图 9 人工污染模拟样品牡蛎成分荧光 PCR

Fig.9 Real-time PCR for low concentration oyster samples
注:从左到右牡蛎浓度依次为阳性样品、10%、1%、0.1% 牡蛎含量样品。

即食产品(牡蛎干、牡蛎罐头)的 Ct 值 <35 且溶解曲线 Tm 值与牡蛎阳性样品相符(80.08 ±0.4) °C),通过电泳验证也证实含有牡蛎成分;在牡蛎类保健品中,牡蛎粉都能检测出牡蛎成分,而部分胶囊和药片(成分为牡蛎提取物)的产品未能检测出牡蛎成分。对于深加工食品的检测效果,部分蚝油中检测到了信号微弱的牡蛎特异峰,然而样品中的 Ct 值与 Tm 值均不能同时符合阳性标准,因此未检测出牡蛎源性成分。

表 4 牡蛎制品检测结果

Table 4 Test results of oyster products

样品类型	样品数量	检出牡蛎成分阳性
牡蛎相关食品(牡蛎干、牡蛎罐头)	18	18
牡蛎保健品(牡蛎粉)	5	5
其他牡蛎保健品(胶囊类等)	5	0
深加工调味料(蚝油、蚝汁等)	10	0

表5 牡蛎制品检测 Ct、Tm 值

Table 5 Ct and Tm results of oyster products

样品类型	Ct	Tm(℃)
牡蛎相关食品	23.16	80
牡蛎保健品(牡蛎粉)	23.53	80
其他保健品	>40	75.33
蚝油	>40	66.91
蚝汁	>40	72.33

3 结论

本试验利用普通 PCR 和 SYBR Green I 荧光 PCR 的方法进行分析检测牡蛎成分,普通 PCR 的方法阳性样品与阴性样品的电泳结果以及测序结果均与预期相符,而荧光 PCR 的检出限达到了 0.01 ng/ μ L,同时适用于低浓度样品的检测,能够检测出牡蛎成分含量为 0.1% 的样品。通过结合 Ct 值与熔解曲线的特征峰 Tm 值分析,SYBR Green I 荧光 PCR 的方法能更快的分析得到结果,不仅操作安全方便,检测方法特异性高,而且可以降低检测成本。针对容易出现非特异性扩增的样品(蛤蜊、扇贝)等样品进行检测,通过调整退火温度后,也具有良好的效果。

通过对牡蛎干、牡蛎粉等牡蛎食品及相关产品的检测,证明这本方法可以快速检测出过敏原牡蛎成分,其中对于收集到的食品相关产品以及保健品中牡蛎粉的检出率为 100%。而对于深加工产品(如蚝油、蚝汁)的检测中,可能影响结果的原因有:不同的蚝产品前处理方式不同,而且深加工样品 DNA 在加工过程中破坏较为严重导致提取出的 DNA 质量不高。样品在加工过程中添加的各类高盐、高渗类辅料对 PCR 反应产生抑制。样品中牡蛎成分添加量较低或未添加。由此造成提取 DNA 比较困难,得到的 DNA 质量也比较差,导致不能检测出牡蛎源性成分。在今后的实验研究中一方面需要对深加工样品进行前处理的优化,另一方面初步建立了探针和环介导等温扩增 Lamp 技术的方法进行比较检测,Lamp 方法试验条件简单,更适合于现场在线检测。

参考文献

[1] Waisarayutt, Surojanametakul V, Kaepadub S, et al. Investigation on the understanding and implementation of food allergen management among Thai food manufacturers[J]. Food

Control, 2014, 46: 182-188.

[2] 刘欣,姚晗璐.世界主要贸易国对食品过敏原的法规和要求及对中国的借鉴[J].世界农业,2011(8):59-61.

[3] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: Recent advance in pathophysiology and treatment[J]. Annual Review of Medicine, 2009, 60: 261-277.

[4] Caleb K, Venu G. Sex disparity in food allergy: evidence From the Pubmed database [J]. Journal of Allergy, 2009 (2009): 159845.

[5] 王薇.食品过敏原标识管理,我国还需加把劲[N].中国食品报,2013-05-28.

[6] 黄榕芳.软体类海产品主要过敏原的基因克隆及生物信息学分析[D].青岛:中国海洋大学,2014.

[7] 伍慧妍,何颖,许晨霞,等.牡蛎过敏原 Crag1 的二级结构及其 B 细胞和 T 细胞表位分析[J].中国医药导报,2013, 10(19):12-15.

[8] 刘志刚,邬玉兰,吴淑勤,等.虾夷扇贝过敏原 tropomyosin 的克隆表达、纯化及免疫学鉴定[J].水生生物学报,2010, 34(5):979-983.

[9] 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.

[10] 沈海旺,陈亨莉,曹敏杰,等.甲壳类动物 4 种过敏原的序列分析、抗原表位预测及三维结构建模[J].免疫学杂志,2012(7):613-619.

[11] Lopata A L, Lehrer S B. New insights into seafood allergy[J]. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2009, 9(3):270-277.

[12] Ayuso R. Update on the diagnosis and treatment of shellfish allergy[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2011, 11(4):309-316.

[13] Taylor S L. Molluscan shellfish allergy[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2008, 54:139-177.

[14] 董晓伟,姜国良,李立德,等.牡蛎综合利用的研究进展[J].海洋科学,2004, 28(4):62-65.

[15] Shuang Li, Qi Li, Hong Yu, et al. Genetic variation and population structure of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the northwestern Pacific inferred from mitochondrial COI sequences[J]. Fisheries Science, 2015, 81:1071-1082.

[16] 李咏梅,陈秀荔,赵永贞,等.钦州湾牡蛎线粒体 16SrRNA 和 COI 基因片段的序列变异分析[J].广东海洋大学学报, 2009, 29(3):11-18.

(上接第 250 页)

2012, 30(9):889-895.

[10] 达晶,王钢力,曹进,等.QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定植物性食品中 30 种氨基甲酸酯类农药残留[J].色谱, 2015, 33(8):830-837.

[11] 闫震,聂继云,徐国锋,等.超高效液相色谱-串联质谱法对比 4 种净化方式对不同色素含量基质中 19 种农药残留检测的影响[J].分析测试学报,2014(9):1000-1009.

[12] Kadar A, Faucon J P. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2005, 54:9741-9746.

[13] NEN EN 15662-2008. Foods of plant origin-determination of pesticides residues using gc-ms and/or lc-ms(/ms) following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive spe-quechers-method[S]. EU:2008.

[14] 林峰,奚星林,陈捷,等.食品安全分析检测技术[M].北京:化学工业出版社,2015.

[15] SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides[S]. EU:2015.

[16] GB2763-2016. 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量[S]. CHN:2016.