

牛奶 β -乳球蛋白实时荧光定量PCR检测方法的建立

贾敏¹, 张银志², 张亦凡³, 孙秀兰^{*1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122;
3. 汉中市产品质量监督检验所, 陕西汉中 723000)

摘要: 建立一种快速、特异、灵敏的Taqman实时荧光定量PCR(real-time PCR)方法,用于牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的检测。根据GenBank登录的牛 β -乳球蛋白的DNA序列设计,合成一对特异性引物和探针。将扩增产物连接到pMD19-T载体上,制备质粒标准品并测序鉴定,10倍梯度稀释含有 β -乳球蛋白基因的重组质粒,进行实时荧光定量PCR扩增,绘制标准曲线,检测该方法的特异性、稳定性、灵敏性,同时将建立的方法用于10种市售食品的检测。成功建立了 β -乳球蛋白的实时荧光定量PCR检测方法,标准曲线的Ct值与模板浓度在 $3.18 \times 10^3 \sim 3.18 \times 10^7$ copies范围内线性关系良好, R^2 值为0.997 8;检测灵敏度高(318 copies/ μ L);特异性强,对羊奶、豆浆DNA均无扩增反应;稳定性好,组内、组间的变异系数均在5%以内。对10种食品牛奶过敏原的检测结果与标签相符。表明所建立的实时荧光定量PCR方法可应用于食品中牛奶过敏原 β -乳球蛋白的检测并可推广到其它过敏原的检测。

关键词: 牛奶过敏原; β -乳球蛋白; Taqman实时荧光定量PCR法; 检测

中国分类号: TS252.1; TS252.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)06—0605—08

Establishment of a Taqman Real-Time Quantitative PCR for the Detection of β -Lactoglobulin Gene

JIA Min¹, ZHANG Yinzhong², ZHANG Yifan³, SUN Xiulan^{*1,2}

(1. School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Hanzhong Products Quality Supervision and Inspection Institute, Hanzhong 723000, China)

Abstract: The research aimed to establish a Taqman real-time fluorescence quantitative assay for the rapid detection of milk allergen β -lactoglobulin in food. Specific primers and Taqman probe were first designed based on the gene sequence of β -lactoglobulin for real-time PCR. The purified DNA product was linked with the pMD19-T vector to construct recombinant plasmids as a standard PCR template. Plasmids were then identified with colony PCR and subjected to sequencing. Real-time fluorescence PCR assay was performed with plasmids and the standard curve was constructed with DNA copies and Ct. Sensitivity, specificity, reproducibility and application of the real-time method were also evaluated. Results showed that the β -lactoglobulin DNA fragment was successfully cloned

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B03)

*通信作者: 孙秀兰(1976-), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: sxlzz@yahoo.com.cn

and the standard curve had a good linear relationship ranging from 3.18×10^3 to 3.18×10^7 copies. The detection sensitivity reached up to 318 copies/ μL . Furthermore, specificity and stability of the method were good. Ten foods were detected with the β -Lg DNA residue and the results were consistent well with their allergen labels. Therefore, the method may become a complementary tool for milk allergen detection and it is applicable for other food allergens.

Keywords: milk allergen, β -lactoglobulin, Taqman real-time quantitative PCR, detection

牛乳及乳制品是常见的八大食物过敏原之一,牛乳过敏(CMA)是由于摄入乳或含有乳制品的食物而引起的异常免疫反应,尤其影响婴幼儿及儿童(3岁以内)的身体健康,其发病率高达7.5%^[1-4]。牛乳致敏蛋白质主要有酪蛋白质、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白以及牛血清蛋白质等,其中 β -乳球蛋白被认为是其中重要的致敏蛋白质之一^[5]。 β -乳球蛋白是一种重要的乳清蛋白质,约占牛乳总蛋白质的十分之一,其一级结构含有162个氨基酸残基,分子量约为18.4 kDa,存在两种基本形式,分别为变异体A和B^[6]。 β -乳球蛋白不存在于母乳中,且不能被胃蛋白酶消化水解,因此可通过胃肠道进入血液循环^[7]。因而被认为是牛乳中最主要的过敏原,刺激婴儿免疫系统发生超敏反应。研究表明:约82%的牛乳过敏病人都对 β -乳球蛋白过敏^[8]。

目前, β -乳球蛋白检测方法主要有两种:直接检测致敏性蛋白质的免疫学方法,如放射性变应原吸附试验(RAST)^[9],酶标记过敏原吸附抑制(EAST)^[10],火箭免疫电泳法(RIE)^[11],酶联免疫法(ELISA)^[12];间接指示过敏原组分存在的特异性DNA片段,主要是PCR^[13-14]。酶联免疫法(ELISA)可直接检测出致敏性蛋白质,具有快速、灵敏、可商业化等优点,是目前应用最广泛的过敏原检测方法^[15-17]。但逐渐发现ELISA存在以下缺点:特异性抗体难获得,复杂的生物基质容易导致假阳性,加工过程酶、温度、压力破坏蛋白质的结构。而近年来发展起来的实时荧光定量PCR技术以其定量准确、灵敏度高、特异性强、重复性好等优点,逐渐应用于食品安全检测。DNA比较稳定,食品加工对其影响较小,因而基于DNA的常规PCR和实时荧光定量PCR可以作为蛋白质检测的补充方法。目前许庆金^[18]等人建立了基于 β -乳球蛋白基因的常规PCR定性检测方法,但还未见 β -乳球蛋白基因的Taqman探针实时荧光PCR检测方法的相关报道。因此,本试

验针对牛奶 β -乳球蛋白的基因序列,设计特异性引物和探针,首次建立牛奶 β -乳球蛋白过敏原的Taqman探针实时荧光定量PCR检测方法,特异性检测食物中牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白,并应用于市售食物中牛奶过敏原组分的快速检测,确保该方法的可靠性和准确性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

鲜牛奶、饼干、蛋糕、饮料等食品,购于无锡欧尚超市。pMD19T-Vector Cloning Kit,PCR胶回收试剂盒,质粒DNA小量纯化试剂盒,2X PCR Master Mix,大连Takara公司提供;引物及探针(HPLC纯化),由上海生工生物工程有限公司合成;溴化乙锭(EB),TBE缓冲液,琼脂糖,上海生工生物工程有限公司产品;Tris-饱和酚、氯仿、乙醇及异戊醇等其它常规分析纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司;感受态菌,氨苄青霉素,LB培养基,由上海博仕生物医学服务中心(水源生物)提供。

1.2 仪器与设备

伯乐C1000TM型PCR仪,凝胶成像仪,美国Bio-rad(伯乐)公司制造;SLAN[®]全自动实时荧光定量PCR仪,上海宏石医疗科技有限公司制造;DYY-8C琼脂糖凝胶电泳仪,北京六一制造厂制造;TU-1900型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司制造。

1.3 DNA的提取

参照田雨^[19]、徐仙^[20]等提取方法并稍加改动,提取市售鲜牛奶中的DNA:

1)取50 mL鲜牛奶置于4个100 mL的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min离心15 min,弃上清液,用棉球去除上层乳蛋白质和乳脂;

2)加入10 mmol/L PBS,溶解沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min离心10 min;

3)加入 880 μL TEN (1 mL 1 mol/L Tris + 0.2 mL 0.5 mol/L EDTA + 58 g NaCl 定容至 100 mL)和 0.2 mol/L NaOH 溶液 120 μL,悬浮沉淀并震荡混匀 30 s,95℃ 条件下水浴 8 min,期间颠倒混匀几次,4℃、12 000 r/min 离心 10 min;

4)取上清液至灭菌离心管中,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1),剧烈震荡 2~3 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min;

5)取上清液,加入等体积的氯仿,混匀,12 000 r/min 离心 10 min;

6)上清液移入灭菌离心管,加入等体积预冷异丙醇,慢慢上下颠倒 30 s,-20℃ 条件放置 30 min;12 000 r/min 离心 2 min,管底部有可见的白色 DNA 沉淀;

7)白色沉淀以体积分数 70% 乙醇洗涤 2 次,用

N₂气吹干至无乙醇味;

8)加 50 μL TE 缓冲液溶解,测其浓度;

9)用 CTAB^[21-22]法进行牛奶饮料及饼干样品的 DNA 提取。

1.4 引物和探针

根据 NCBI 上已公布的牛奶过敏原,将 β-乳球蛋白(β-Lg)基因的核酸序列,充分考虑检测引物和探针的退火温度的一致性、GC 含量的相似性等因素,采用 Primer select 软件设计合成检测牛奶 β-乳球蛋白成分的引物和 Taqman-BHQ 探针,PCR 目标扩增片段长度为 226 bp。通过 GenBank 的 Blast 功能寻找该引物和探针的同源性,结果显示该基因具有很高的特异性,其他基因与该基因的同源性较小。引物和探针的序列见下表 1。

表 1 扩增 β-乳球蛋白的引物和探针

Table 1 Primers and Probe sequence for PCR detection of β-lactoglobulin

名称	碱基序列 (5' to 3')	引物长度/bp	GC/%	T _m /℃	目的片段长度/bp
β-Lg-F Primer	5'-CACCTGAGGAATGCTCTC-3'	19	57.89	57.22	226
β-Lg-R Primer	5'-CACGTAACCTTTGTCATCTCTT-3'	22	40.91	56.40	
β-Lg-Probe	5'-FAM-CCGTGTCTCCAGTCTGTGTTGA-3'-BHQ	23	56.52	64.22	

1.5 牛奶定性 PCR 扩增和电泳检测

用上述引物对 3 种市售鲜牛奶 DNA 进行扩增,每种样品都设置了 3 种退火温度(50, 55, 60℃),PCR 扩增总体积 30 μL: PCR Mixture 2×Mix 15 μL,上下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L),DNA 模板 2 μL,余下体积用灭菌超纯水补足至 30 μL。同时设置空白对照,即在 30 μL PCR 体系中用等量超纯水代替 DNA 模板。PCR 反应条件为起始模板预变性 95℃,3 min;循环体:变性 95℃ 30 s,退火(50、55、60℃) 30 s,延伸 72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

将上述 PCR 产物利用琼脂糖凝胶电泳进行检测:将 3 μL 6×Loading Buffer 与 6 μL PCR 产物混合,加入质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶点样孔中,在 TBE 电泳缓冲液中进行电泳,以 DNA Maker 1000 作为分子质量标准,100 V 电泳 45 min,凝胶成像仪观察结果。

1.6 目的基因与载体的连接、转化及鉴定

1.6.1 连接 按试剂盒说明进行 PCR 胶回收纯化,以 TaKara 的 pMD19-T vector 作为载体进行连接,10 μL 连接体系为:PCR 回收片段 4 μL,pMD19-T vector 1 μL,T4ligase 1 μL,10×T4ligase buffer 1 μL,

dH₂O 3 μL。16℃ 1 h,然后 4℃ 过夜,第 2 天转化。

1.6.2 转化 用氯化钙法将连接产物(10 μL)转入 E.coli Top10 感受态细胞中,冰浴 30 min。42℃ 静止水浴 45 s,再冰浴 1 min。加入 1 mL 无抗性的 LB,37℃,150 r/min,复苏 40 min。12 000 r/min 离心 1 min,去掉 1 μL 上清液,剩下的混匀涂于带有蓝白斑筛选氨苄抗性的培养板。培养板置培养箱,37℃ 过夜。

1.6.3 菌落 PCR 和测序鉴定 以单菌落为模板进行阳性克隆菌落 PCR 扩增,反应条件同荧光定量 PCR。琼脂糖电泳验证 PCR 扩增结果。将初步鉴定为阳性的菌落接种 LBA 液体培养基,37℃ 培养过夜,第 2 天抽提并纯化质粒 DNA。重组质粒测序,验证重组质粒是否构建成功。其同源性比较采用 Gene Bank 中的 BLAST 进行分析。

1.7 实时荧光定量 PCR

将重组质粒 pMD19T-Lg 用 HindIII 单酶切成线性化的标准模板质粒并定量,线性化质粒转化为相应的拷贝数为 3.18×10⁹,按 10 倍梯度稀释,选择 3.18×10³~3.18×10⁷ 拷贝数标准品进行 Taqman 探针法实时荧光定量 PCR 扩增反应。定量 PCR 反应体

系为:总体积 30 μL ,其中含 $2\times\text{qPCR mix}$ 15 μL ,上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),探针 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),模板 DNA 2 μL ,灭菌超纯水 11 μL 。实时荧光定量 PCR 运行条件同定性 PCR 优化好的条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 检测荧光信号,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。以初始模板量对数值为横坐标,以循环阈值(C_t)为纵坐标绘制标准曲线。

1.8 实际样品检测

为对本研究中建立的 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 方法的实用性进行考察,对 10 种食品牛奶过敏原 β -乳球蛋白进行检测。利用 CTAB 法对牛奶饮料及饼干基因组 DNA 进行提取,以提取的基因组 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。利用标准曲线计算其 β -乳球蛋白过敏原基因拷贝数,利用检测限来判断实际样品是否含有牛奶 β -乳球蛋白过敏原。

2 结果与分析

2.1 牛奶基因组 DNA 的提取

经测定提取的 DNA 基因组的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 1.7 左右, DNA 纯度较好,浓度较高,可用于后续 PCR 扩增试验。见表 2。

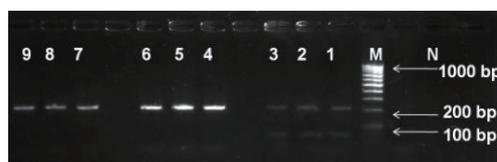
表 2 样本基因组 DNA 测定值

Table 2 Detection results of DNA obtained from food samples

样 本	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	DNA 质量浓度/(ng/ μL)
光明鲜牛奶	1.79	67.82
现代鲜牛奶	1.66	59.63
特仑苏鲜牛奶	1.74	112.56
A 品牌复原乳	1.72	32.94
B 品牌麦芽牛乳	1.72	28.24
C 品牌高纤燕麦饮料	1.44	181.87
D 品牌花生牛乳饮料	1.49	146.43
E 品牌果粒奶优	0.92	160.99
F 品牌夹心饼干	1.61	103.45
G 品牌曲奇饼干	1.54	128.23
H 品牌法式蛋糕	1.29	75.96
I 品牌豆浆	1.85	138.41
J 品牌果汁	1.02	63.89

2.2 PCR 定性分析

分别以提取的光明、现代、特仑苏鲜牛奶基因组 DNA 为模板进行定性 PCR 检测,PCR 的电泳结果(图 1)表明,通过本研究中设计的引物可从商业牛奶基因组 DNA 中扩增出牛的 β -乳球蛋白的预期条带,且退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 时条带较亮,扩增效率较高,因此选用 55 $^{\circ}\text{C}$ 进行后续定量的扩增实验。根据此结果将扩增得到的 PCR 条带进行割胶回收做 T/A 克隆,构建 pMD19T-Lg 载体。



M: DNA 标准品 DL1000; 1—3. 光明牛奶温度 (50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$); 4—6. 现代牛奶温度 (50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$); 7—9. 特仑苏牛奶温度 (50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$); N: 阴性对照

图 1 不同牛奶基因组 DNA 及退火温度的定性 PCR 产物

Fig.1 PCR products from extracted genomic DNA of three commercial milk with different annealing temperature.

2.3 重组质粒的鉴定

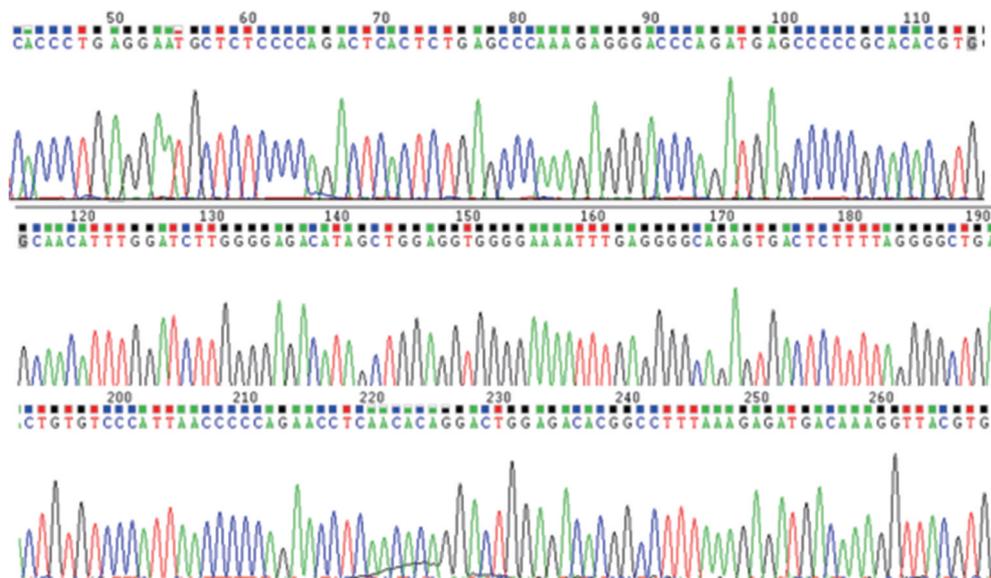
连接产物转化后挑取 5 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定,PCR 产物经质量分数 2% 琼脂糖电泳。图 2 为菌落 PCR 扩增电泳结果,在 226 bp 处出现条带,与目的片段大小一致,初步判断为阳性克隆。



图 2 重组质粒菌落 PCR 结果

Fig.2 Colony PCR analysis of the recombinant plasmid

选取亮度最大的 1、2 号菌落接种培养,提取质粒进行 DNA 序列测定,测序结果通过 NCBI 上的 blast 进行同源性比对分析。结果表明,克隆的序列与 GenBank 中已登录的牛的 β -乳球蛋白基因序列完全一致,同源性达到 100%。说明插入的外源基因即为目的片段,即重组质粒构建成功。标准模板测序结果如图 3 所示。



20
 | | |
 CACCCTGAGGAATGCTCTCCCCAGACTCACTCTGAGCCCAAAGAGGGACCCAGATGAGCCCCGCACACGTGGCAACA
 80
 | | |
 TTTGGATCTTGGGGAGACATAGCTGGAGGTGGGGAAAATTGAGGGGCAGAGTGACTCTTTTAGGGGCTGAACTGTGT
 160
 | |
 CCCATTAACCCCCAGAACCTCAACACAGGACTGGAGACACGGCCCTTTAAAGAGATGACAAAGGTTACGTG

图3 标准模板β-乳球蛋白基因片段DNA测序结果

Fig.3 DNA sequence analysis of β-Lg allergen gene fragment as a standard template

2.4 实时荧光定量PCR标准曲线

将重组质粒 pMD19T-Lg 用 HindIII 进行单酶切,回收线性化的质粒作为标准品。将质粒标准品 10 倍稀释作为扩增模板,每个梯度重复 3 次测定。实验结果表明,在 $3.18 \times 10^7 \sim 3.18 \times 10^3$ 拷贝数范围内,Ct 值与模板 DNA 分子的起始拷贝数的对数值呈良好的线性关系(见图 4),以基因拷贝数的对数值为横坐标,以相应的 Ct 值为纵坐标作图,制作标准曲线, R^2 为 0.997 8,标准曲线回归方程为

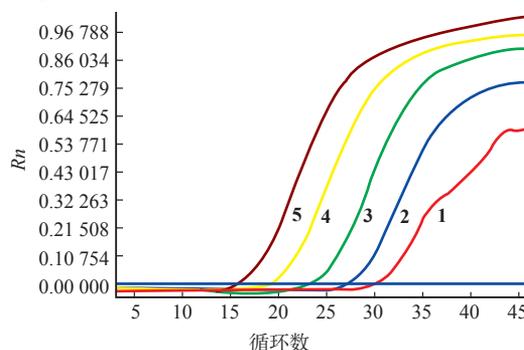
$$y = -3.59x + 46.01,$$

式中:y 为循环阈值(Cycle Threshold, Ct);x 为质粒 DNA 拷贝数对数值(见图 5)。通过标准曲线方程和样品的 Ct 值便可计算出样品中所测组分 DNA 的含量。

2.5 方法学评价

2.5.1 灵敏度分析 取 β-Lg 重组质粒标准品 10 倍梯度稀释($3, 31, 3.18 \times 10^2, 3.18 \times 10^3, 3.18 \times 10^4, 3.18 \times$

10^5 copies/μL),以其为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。结果显示,最小检测拷贝数属 318 copies/μL 的 β-Lg 样品。见图 6。



1—5: 模板浓度 $3.18 \times 10^3, 3.18 \times 10^4, 3.18 \times 10^5, 3.18 \times 10^6, 3.18 \times 10^7$ copies/μL

图4 标准模板质粒 pMD19T-Lg DNA 系列梯度的扩增曲线

Fig.4 Establishment of amplification curve for detection of α-La DNA template by Real-time PCR

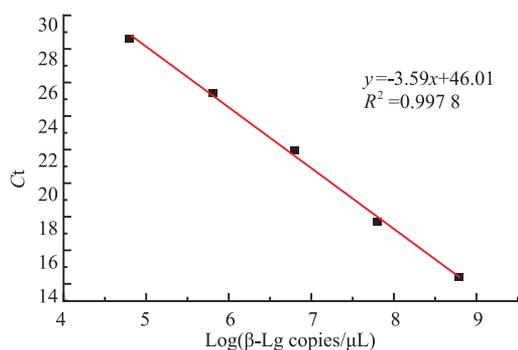
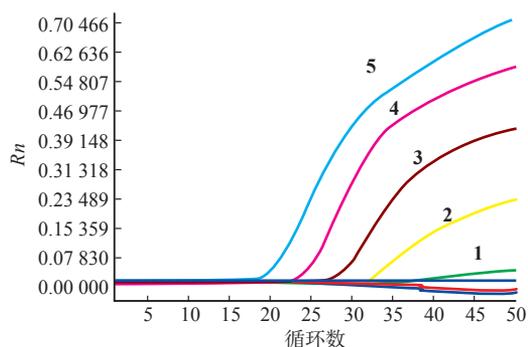


图5 牛奶 β -乳球蛋白 Taqman 实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig 5 Standard curve for detection of milk β -Lg gene by real-time PCR



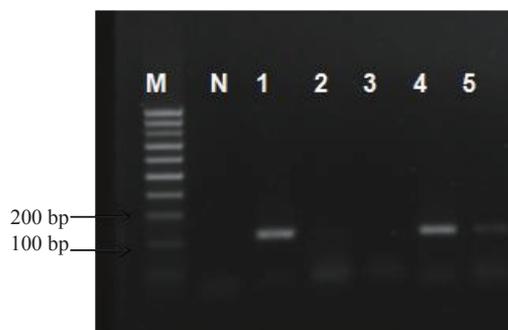
1—5: 模板浓度 31 , 3.18×10^2 , 3.18×10^3 , 3.18×10^4 , 3.18×10^5 copies/ μ L

图6 荧光定量PCR灵敏度试验

Fig 6 Sensitivity tests of real-time PCR

2.5.2 特异性分析 为考察所建立的 Taqman 探针荧光定量 PCR 检测法是否能特异性针对牛奶 β -乳球蛋白基因,以鲜牛奶基因组 DNA 为阳性对照,

提取羊奶、豆浆,牛奶饮料、牛奶饼干食物基因组 DNA,PCR 扩增后进行质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳。见图 7。结果显示,仅牛奶及奶制品食物基因组 DNA 扩增出目的片段,羊奶及豆浆基因组 DNA 扩增均成阴性。说明建立的实时荧光定量 PCR 具有较好的特异性。



M: DNA 标准品 DL1000; 1. 牛奶; 2. 羊奶; 3. 豆浆; 4. 牛奶饮料; 5. 牛奶饼干

图7 荧光定量PCR特异性试验

Fig.7 Specificity tests of real-time PCR

2.5.3 重复性分析 选择浓度为 3.18×10^3 、 3.18×10^5 、 3.18×10^7 copies/ μ L 的质粒标准品进行重复性实验。组内:同一时间同一反应条件下,对 3 个浓度的质粒标准品进行 3 次试验,分析组内重复性。组间: 6 d 内对 3 个浓度的标准品分别单独进行 3 次 Taqman 实时荧光定量 PCR 测定,分析组间重复性。结果如表 3 所示,变异系数 CV 均在 5% 以内,说明建立 Taqman 实时荧光定量 PCR 方法重复性较好。

表3 荧光定量PCR的重复性结果

Table 3 Reproducibility test of the real-time PCR

标准模板 质粒浓度 (copies)	Intra-assay (n=3)					Inter-assay (n=3)				
	Ct					Ct				
	1	2	3	Mean	CV /%	Day1	Day2	Day3	Mean	CV /%
3.18×10^3	32.42	31.87	33.01	32.43	1.76	30.18	29.76	30.62	30.18	1.41
3.18×10^5	23.25	23.96	24.67	23.96	0.3	25.79	24.02	26.12	24.98	3.58
3.18×10^7	17.03	17.45	17.18	17.22	1.24	17.46	17.94	16.87	17.42	3.07

2.6 实际样品检测

利用建立的荧光定量 PCR 方法对 10 种食品中的牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白基因进行检测,以复原乳为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照。利用田雨提取牛奶 DNA 法^[9],对液体样品进行基因组 DNA 提取,利用改进的 CTAB 法对饼干等固体食品的基因

组 DNA 进行提取,进行实时 PCR 扩增。根据本研究的灵敏度 318 copies / μ L 来考察食品是否含有牛奶 β -乳球蛋白过敏原。表 4 为检测结果,8 种标签标示牛奶过敏原的食品中 7 种 β -乳球蛋白检测呈阳性,其中果粒奶优虽然标示有牛奶,但是重复 3 次检测结果均为阴性,推断可能原因为果粒奶优饮

料含有牛奶量较少或食品加工过程对DNA破坏较大,影响实时荧光定量PCR检测结果。豆浆及果汁检测结果均为阴性,与标示一致。检测结果表明,建立的荧光定量PCR法用于食品检测具有较高的准确性和可靠性,符合率达90%,可用于市售食品的牛奶过敏原检测。

表4 市售食品中牛奶过敏原 β -乳球蛋白的检测结果

Table 4 Detection results of commercial food

编号	样本名称	成分标示	RT-PCR法检测结果
1	A 品牌复原乳	Positive	阳性
2	B 品牌麦芽牛乳	含有	阳性
3	C 品牌高纤燕麦饮料	含有	阳性
4	D 品牌花生牛乳饮料	含有	阳性
5	E 品牌果粒奶优	含有	阴性
6	F 品牌夹心饼干	含有	阳性
7	G 品牌曲奇饼干	含有	阳性
8	H 品牌法式蛋糕	含有	阳性
9	I 品牌豆浆	不含有	阴性
10	J 品牌果汁	不含有	阴性
11	ddH ₂ O	Negative	阴性

注 Positive: ≥ 318 copies/ μ L; Negative: ≤ 318 copies/ μ L.

3 讨论

为避免消费者误食过敏原导致严重的过敏反应,提供消费者清晰准确的食物过敏原信息至关重要。因此,美国(USA)和欧盟(EU)近来都制定了规范食品过敏原标签的法律法规。2010年我国修订国家标准《GB/T23779—2009预包装食品中的致敏原成分》,要求食品标签增加牛奶等其他过敏原的标识。因此,迫切需要建立快速、灵敏、特别的牛奶过敏原检测方法,以为食品过敏原的标识提供支持保障。

本研究中根据NCBI登录的 β -乳球蛋白质核酸序列,设计了一对特异性引物和探针,对目标基因 β -乳球蛋白的一段DNA序列进行荧光定量PCR

扩增,构建重组质粒标准品,建立标准曲线。结果表明,该质粒作为标准模板建立的标准曲线线性关系良好,在 $3.18 \times 10^7 \sim 3.18 \times 10^3$ 拷贝数范围内,Ct值与质粒拷贝数的对数值呈线性关系,通过标准曲线,可对目的基因浓度进行准确定量。与许庆金等人建立的 β -乳球蛋白常规PCR检测方法相比,Taqman探针实时荧光定量PCR可省去电泳步骤、简便安全、灵敏度高、特异性强,并且实现了定性PCR到定量PCR的飞跃。用本研究中设计的引物和探针对羊奶、豆浆及饼干、饮料进行扩增,结果显示该检测方法特异性针对牛奶 β -乳球蛋白,灵敏度达到318 copies/ μ L。根据建立的灵敏度对10种食品进行检测,除果粒奶优饮料检测结果与标签不符,推测该饮料DNA破坏严重或含量较低影响检测,其他食品检测结果与标签过敏原标识一致,说明该方法具有较高的可靠性和准确性。

4 结语

作者建立的Taqman探针实时荧光定量PCR方法,用于食品中牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白质基因的检测,为食品致敏原的标签管理和检测提供了可靠的技术支持。Taqman实时荧光定量法可定量分析食品中 β -乳球蛋白含量,与常规PCR方法相比具有灵敏、快速、特异、简单、安全等优点。与直接检测致敏性蛋白质的免疫分析方法相比,可大大降低复杂生物基质中交叉反应导致的假阳性结果,避免对大量抗体的需求,而DNA比蛋白质稳定,受食品加工条件影响较小,因此可通过对过敏原DNA片段的检测间接指示食物过敏原组分的存在。基于以上优点,本试验中建立的实时荧光定量PCR检测方法可作为目前常用的免疫检测的有效补充,为食物牛奶过敏原的检测提供可靠的保障,可推广到食品中牛奶过敏原实际的检测。

参考文献

[1] Arjon J van Hengel. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389(1): 111-118.
 [2] Linda Monaci, Virginie Tregoeat, Arjon J van Hengel, et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review [J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 223(2): 149-179.
 [3] 张海英, 刘旻, 吴冬雪, 等. 食品中 β -乳球蛋白过敏原检测方法的比较[J]. *食品安全质量检测学报*, 2012, 3(4): 295-298
 ZHANG Haiying, LIU Yang, WU Dongxue, et al. Comparison of two detection methods of β -lactoglobulin allergens in food[J].

- Journal of Food Safety and Quality**, 2012, 3(4) : 295–298. (in Chinese)
- [4] Zsuzsanna Bugyi, Judit Nagy, Kitti Török, et al. Towards development of incurred materials for quality assurance purposes in the analysis of food allergens[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2010, 672(1): 25–29.
- [5] Massimo Natale, Carolina Bisson, Giovanna Monti, et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2004, 48(5): 363–369.
- [6] Michael Zeece, Thom Huppertz, Alan Kelly. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2008, 9(1): 62–69.
- [7] Jean-Michel Wal. Cow's milk proteins/allergens[J]. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 2002, 89(6): 3–10.
- [8] Makoto Hattori, Ken-ichi Numamoto, Kazuo Kobayashi, et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000, 48(6): 2050–2056.
- [9] Sampson H A. Food allergy—accurately identifying clinical reactivity[J]. **Allergy**, 2005, 60(s79): 19–24.
- [10] Hill D J, Hosking C S, Reyes-Benito L V. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests[J]. **Clinical & Experimental Allergy**, 2001, 31(7): 1031–1035.
- [11] Holzhauser T, Dehne L I, Hoffmann A, et al. Rocket immunoelectrophoresis (RIE) for determination of potentially allergenic peanut proteins in processed foods as a simple means for quality assurance and food safety[J]. **Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und-Forschung A**, 1998, 206(1): 1–8.
- [12] Dominique Godfrin, Hélène S en echal, Jean-Pierre Sutra, et al. A modified enzyme-linked immunosorbent assay adapted for immunodetection of low amounts of water-insoluble proteins[J]. **Journal of Immunological Methods**, 2007, 326(1): 83–92.
- [13] Mustorp S, Engdahl-Axelsson C, Svensson U, et al. Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR[J]. **European Food Research and Technology**, 2008, 226(4): 771–778.
- [14] Ren e K oppel, Veronika Dvorak, Franziska Zimmerli, et al. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food[J]. **European Food Research and Technology**, 2010, 230(3): 367–374.
- [15] 布冠好, 郑喆, 郑海, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(6): 71–76.
BU Guanhao, ZHENG Zhe, ZHENG Hai, et al. A method for detecting β -lactoglobulin in cow milk allergens by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. **Journal of China Agricultural University**, 2008, 13(6): 71–76. (in Chinese)
- [16] 张忠华. 牛乳 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- [17] 赵金龙. β -乳球蛋白两种酶联免疫检测方法的建立和比较[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [18] 许庆金, 邓志瑞, 张文举, 等. 牛奶过敏原 PCR 监测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 104–107.
XU Qingjin, DENG Zhirui, ZHANG Wenju, et al. PCR method for the detection of allergen in milk[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(6): 104–107. (in Chinese)
- [19] 田雨. 从牛奶中分离 DNA 方法的建立[J]. 乳业科学与技术, 2006(3): 112–113.
TIAN Yu. Establishment of method of separating DNA from milk[J]. **Journal of Dairy Science and Technology**, 2006, (3): 112–113. (in Chinese)
- [20] 徐仙, 陈沁, 雍克岚, 等. PCR 方法在区分牛奶牧场来源中的应用[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 258–261.
XU Xian, CHEN Qin, YONG Kelan, et al. Application of PCR in analyzing farm sources [J]. **Food Science and Technology**, 2008, 33(12): 258–261. (in Chinese)
- [21] 张舒亚, 于翠, 宋青, 等. 食品过敏原大豆 P34 蛋白基因的实时荧光 PCR 检测[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(6): 661–665.
ZHANG Shuya, YU Cui, SONG Qing, et al. Detection allergen soybean in food using real-time PCR[J]. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, 2012, 34(6): 661–665. (in Chinese)
- [22] Thomas H Tai, Steven D Tanksley. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1990, 8(4): 297–303.
- [23] Linda Monaci, J rgen V N rregaard, Arjon J van Hengel. Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix[J]. **Analytical Methods**, 2010, 2(7): 967–972.