

环介导等温扩增技术检测花生过敏原

李一鸣, 王宇珂, 叶宇鑫, 闫鹤, 石磊

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 花生引起的过敏已经越来越受到重视, 因此对花生过敏原进行检测也变得越来越重要。目前对花生过敏原的检测大多数采用抗原抗体法或 PCR 方法, 抗原抗体法耗时比较长, 而 PCR 方法需要昂贵的仪器设备。本项目通过建立环介导等温扩增快速检测技术来检测食物中花生过敏原的基因, 为食品中花生过敏原成分检测提供方便。该方法快速, 简便, 灵敏度高, 可以很好的应用到现实检测中去, 这个方法的建立具有很重大的意义, 为食品的安全检测提供了很大的方便。

关键词: 环介导等温扩增; 食物过敏; 花生过敏原

文章编号: 1673-9078(2012)1-127-130

Application of Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection Peanut allergy

LI Yi-ming, WANG Yu-ke, YE Yu-xing, YA He, SHI Lei

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: More and more attention is paid to peanut allergies, so the detection of peanut allergens is becoming increasingly important. In most case, antigen-antibody method and PCR method are mostly used in the detection of peanut allergen. However, antigen-antibody method takes longer, and the PCR method requires expensive equipment. In this report, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed to detect the gene of peanuts which is related to allergens producing. This method is rapid, simple and sensitive, which can provide convenience for peanut allergens detection. The establishment of the LAMP method has great significance and it provide a great convenience for food safety testing.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; food allergy; peanut allergens

花生是一种营养很丰富、又很受人们喜欢的常见食物, 但是这种食物中存在有过敏原^[1]。有美国报道说, 在食物过敏引起的死亡病人中, 花生是最主要的一种食物过敏原。现在美国和英国有 59% 的食物过敏是由花生过敏原引起的, 占到了第一位^[2]。在德国和法国有 0.5%~1% 的人会对花生过敏。在英国的报道里面提到, 几乎每一年都要人因为花生导致过敏性休克和过敏死亡^[3]。其中在一个岛上对花生过敏的人甚至占到了这个岛上居民的 1.5%^[4]。在亚洲一些的国家和一些地方, 花生是食品里面引起儿童食物过敏的主要原因, 吃了很少量的花生过敏原就可能引起过敏反应, 如肠胃不舒服、过敏性皮炎等疾病, 对花生过敏的患者来说, 不吃含有花生的食物是目前最有效的预防方法。正因为这样, 近年来美国及欧洲等国家食品标签法中, 规定要把花生作为主要过敏原成分进行并标明, 另外要对部分进口的食品进行花生过敏原的检测, 而

收稿日期: 2011-09-02

作者简介: 李一鸣 (1990-), 女, 研究方向为食品质量与安全

通讯作者: 石磊 (1961-), 男, 教授, 研究方向为食品安全及生物技术

我们中国的一些食品出口公司常常因食品过敏原标志不对而被美国食品与药品监督管理局通报, 并且进行退货^[5]。

目前, 中国也已经意识到食品过敏原成分标识的重要性, 2008 年北京奥运会期间就已经正式开始了对食品过敏原的检测和一些标签标准的制定工作。根据食品过敏或过敏性反应网络统计的结果表明, 约 90% 的过敏反应是由花生、果仁、鱼、贝类、鸡蛋、牛奶、大豆和小麦 8 类食物引起的, 在这里面又以花生引起的过敏反应最严重, 因此评价和检测食品中花生的过敏原成分正在一天天的受到国家的重视。

因此, 对食品过敏原的检测与分析就是一个非常重要的问题, 随着全世界经济的一体化和食品出口贸易的全球化, 食品过敏问题具有很大的潜在的危险性, 因此建立可靠的过敏原检测方法是十分重要的, 只有这样才能保证食品标签的一致性, 还能保证消费者的安全。但是食物过敏原在食品中的含量非常少, 而且还可以被其他东西包裹, 所以食物过敏原的检测十分困难和不易, 另外, 现在的一些检测方法不是很灵

敏, 所以要提高检测方法的灵敏度, 一般来说, 对于蛋白的检测, 食物中检测极限要求在 1~100 mg/kg, 也就是说每 1 kg 食物中含 mg 量级过敏性蛋白。

食品过敏原检测的一个新目标就是食品蛋白的 DNA。以 DNA 为测试对象的检测方法越来越多地应用到外来食物的检测中, 如转基因植物等。这种方法优点在于, 以 DNA 为检测对象的方法与以蛋白质为检测对象的方法相比, 在比较热的条件下, DNA 可以很好的提取出来, 而蛋白提取出来的时候受食物里面其他东西的影响比较大; 它的另一个优点是它很稳定, 它不象蛋白质组成那样受地理条件和季节变化的影响。DNA 比蛋白质更不容易受到热处理和压力作用的影响, 尤其对于一些过敏原很难获得相应的血清抗体, 因此可以通过 PCR 方法检测是否存在过敏原蛋白基因, 从而判断是否存在过敏原。DNA 分子可以通过 PCR 技术扩增, 在 PCR 过程中 DNA 分子的引物也得到了扩增。产物即可利用分子量的大小在琼脂糖电泳上进行分离。一般来说通过引物的选择可以使具有一定同源性的 DNA 分子之间的交叉反应降低到最低程度, 尽可能的避免假阳性结果的产生。PCR 方法的优点是比较快, 如果要研究已知序列的 DNA, 这个分析过程只需要 7~10 d。对于一个已经纯化的过敏原, ELISA 分析要用一个月甚至更长时间, 此外, 制备其特异性的抗体要再加一个月。PCR 技术是以简单、确定的 DNA 序列为基础的, 而 ELISA 分析却要依赖于质量稳定的动物抗体。将来重组抗体将有助于抗血清的标准化。

环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)其特点是在等温条件下即可高效、快速、高特异、高灵敏地扩增靶序列^[6-7]。环介导恒温扩增技术(LAMP)与常规 PCR、实时定量 PCR 作比较, 具有使用成本低、特异性极高、不依赖仪器判读结果的优点, 整个检测流程只包括加入待测样品 DNA、金属浴恒温 60 min、试样溶液后判读三个步骤。

LAMP 与以往的核酸扩增方法相比具有如下优点: (1)操作简单: LAMP 核酸扩增是在等温条件下进行, 只需要水浴锅即可, 产物检测用肉眼观察或浊度仪检测沉淀浊度即可判断。对于 RNA 的扩增只需要在反应体系中加入逆转录酶就可同步进行(RT-LAMP), 不需要特殊的试剂及仪器。(2)快速高效: 因为不需要预先的双链 DNA 热变性, 避免了温度循环而造成的时间损失。核酸扩增在 1 h 内均可完成, 添加环状引物后时间可以节省 1/2, 多数情况在 20~30 min 均可检测到扩增产物。且产物可以扩增至 10^9 倍, 达 0.5 mg/mL。应用专门的浊度仪可以达到实时定量

检测。(3)高特异性: 由于是针对靶序列 6 个区域设计的 4 种特异性引物。6 个区域中任何区域与引物不匹配均不能进行核酸扩增。故其特异性极高。(4)高灵敏度: 对于病毒扩增模板可达几个拷贝, 比 PCR 高出数量级的差异。

LAMP 法是一种快速、简便、高特异性和高灵敏度的分子检测技术已经在临床检验、食品安全、转基因检测等领域中广泛使用^[8]。目前中国的食品过敏原成分检测还处在刚开始的起步阶段, 本研究尝试在国内开发出实用性强、灵敏度高、特异性高的花生过敏原 DNA 成分检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

不同产地新鲜花生样品、含有花生的食品(鱼皮花生)、不含花生的食品(饼干)及花生酥均购于普通市场。Bst DNA 聚合酶: BioLabs 公司, Betaine: Sigma 公司。琼脂糖: 日本 TaKaRa 公司, DK28D 型电热恒温金属浴: 上海一恒科技有限公司。凝胶成像分析系统 Gel Doc: Bio-RAD 公司。核酸电泳仪: BioRad 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

通过登陆数据库查找已经公开发表的关于花生过敏原检测的文献, 分析发现对于花生过敏原的分子检测是大多数是通过花生过敏原 $arah2$ 基因的检测来达到检测目的的。通过登陆美国国立生物信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的GenBank数据库, 将已经公布的花生过敏原 $arah2$ 基因序列下载后, 再通过数据库中的BLAST序列比对, 找出基因序列中的保守序列, 也就说找到花生过敏原独有的序列。

然后登陆日本荣研化学公司的引物在线设计网页, (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>), 将筛选出来的独有引物序列上传至网站中, 然后设定参数, 具体参数如下: GC含量(50%~60%)、长度(均为18~25 bp)、Tm值(55~63 °C)、设计出一套特异性的LAMP引物, 包括两条外引物F3、B3和两条内引物FIP、BIP。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

引物序列如下:

PNarOF1: CGTACAGCCCTAGTCAGGAT

PNarOB1: AGCTCCCTCTTGAAGTGTG

PNarIF1: CACCTCTCTTGGTGCTGAGAGGCC
GTACAGCCCTAGTCCA

PNarIB1: ACAACCAAAGGTGCATGTGCGATGC
AACCTATCGCTCTGGT

1.2.2 DNA 模板的制备

将新鲜花生样品、含有花生的食品（鱼皮花生）、不含花生的食品（饼干）及花生酥研磨破碎后，采用 CTAB 法提取花生基因组 DNA。具体提取方法如下：

（1）2% CTAB 抽提缓冲液在 65 °C 水浴中预热。

（2）取少量花生制品（约 1 g）置于研钵中，用液氮磨至粉状；

（3）加入 700 μL 的 2% CTAB 抽提缓冲液，轻轻搅动；

（4）将磨碎液分倒入 1.5 mL 的灭菌离心管中，磨碎液的高度约占管的三分之二；

（5）置于 65 °C 的水浴槽或恒温箱中，每隔 10 min 轻轻摇动，40 min 后取出；

（6）冷却 2 min 后，加入氯仿-异戊醇（24:1）至满管，剧烈振荡 2~3 min，使两者混合均匀；

（7）放入离心机中 10000 r/min 离心 10 min，与此同时，将 600 μL 的异丙醇加入另一新的灭菌离心管中；

（8）10000 r/min 离心 1 min 后，移液器轻轻地吸取上清液，转入含有异丙醇的离心管内，将离心管慢慢上下摇动 30 s，使异丙醇与水层充分混合至能见到 DNA 絮状物；

（9）10000 r/min 离心 1 min 后，立即倒掉液体，注意勿将白色 DNA 沉淀倒出，将离心管倒立于铺开的纸巾上；

（10）60 s 后，直立离心管，加入 720 μL 的 75% 乙醇及 80 μL 5 M 的醋酸钠，轻轻转动，用手指弹管尖，使沉淀与管底的 DNA 块状物浮游于液体中；

（11）放置 30 min，使 DNA 块状物的不纯物溶解；

（12）10000 r/min 离心 1 min 后，倒掉液体，再加入 800 μL 75% 的乙醇，将 DNA 再洗 30 min；

（13）10000 rpm 离心 30 s 后，立即倒掉液体，将离心管倒立于铺开的纸

巾上；数分钟后，直立离心管，干燥 DNA（自然风干或用风筒吹干）；

（14）加入 50 μL 0.5 \times TE(含 RNase)缓冲液，使 DNA 溶解，置于 37 °C 恒温箱约 15 h，使 RNA 消解；

（15）置于 -20 °C 保存、备用。

1.2.3 LAMP 扩增

根据目前已有的文献报道，进行优化测试后确定 LAMP 反应体系如下：25 μL LAMP 反应体系含有 1.6 $\mu\text{mol/L}$ FIP、1.6 $\mu\text{mol/L}$ BIP、0.4 $\mu\text{mol/L}$ F3、0.4 $\mu\text{mol/L}$ B3、1 mol/L Betaine、6 mmol/L MgSO_4 、8 U Bst DNA 聚合酶、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μL 10 \times Thermopol Buffer

及 DNA 模板 1 μL ，将配置完成的 PCR 管放入 DK28D 型电热恒温金属浴，设置相应的反应温度和时间，进行恒温扩增。

1.2.4 LAMP 产物的检测

LAMP 产物的检测方法：向 LAMP 产物中加入 1 μL 稀释 100 倍后的 SYBR Green I 染料后通过肉眼来观测其颜色变化，如果颜色立刻变绿则是发生了特异性扩增，橙色为阴性。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

2 结果与分析

2.1 反应温度优化

选择不同反应温度，即 58 °C、60 °C、63 °C 和 65 °C 四个温度进行 LAMP 反应，确定最佳反应温度。

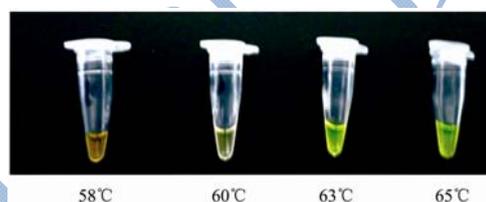
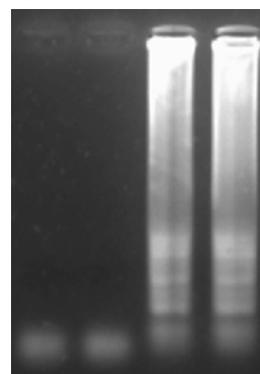


图 1 不同温度 LAMP 反应结果

Fig.1 LAMP reaction result at different temperatures



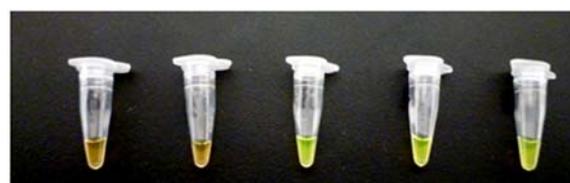
58°C 60°C 63°C 65°C

图 2 不同温度 LAMP 反应产物的凝胶电泳图

Fig.2 Electrophoresis of the LAMP products at different temperatures

综合图 1 和 2 的结果，表明在 63 °C 的情况下扩增效果最佳。

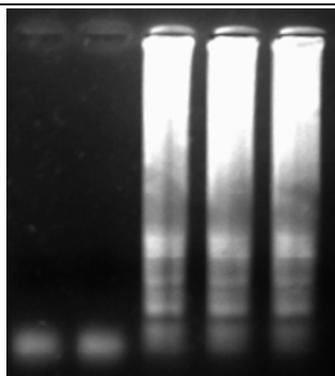
2.2 反应时间优化



15 min 45 min 60 min 75 min 90 min

图 3 不同反应时间 LAMP 反应结果

Fig.3 LAMP reaction results with different reaction time



15min 45min 60min 75min 90min

图4 不同反应时间LAMP反应产物的凝胶电泳图

Fig.4 Electrophoresis of the LAMP products with different reaction times

选择不同反应时间, 即15 min、45 min、60 min、75 min和90 min五个时间进行LAMP反应, 确定最好的反应时间。

反应结果表明: 60 min的反应效果最好, 60 min为最好的反应时间。

2.3 特异性实验



图5 不同花生样本LAMP反应结果

Fig.5 LAMP reaction results of different peanut samples

注: 1-鱼皮花生; 2-新鲜花生; 3-普通饼干。

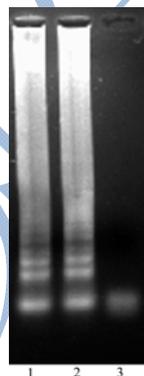


图6 不同花生样本LAMP反应产物电泳图

Fig.6 Electrophoresis of the LAMP products of different soybean samples

注: 1-鱼皮花生; 2-新鲜花生; 3-普通饼干。

用建立的LAMP方法分别对新鲜花生样品、含有花生的食品(鱼皮花生)、不含花生的食品(饼干)进行扩增, 验证方法的特异性。

实验结果表明, 含有花生的食品的检测结果为阳性, 没有含花生的食品的检测结果为阴性。

3 讨论

过敏性疾病如过敏性哮喘、食物过敏等是临床上常见病、多发病, 被世界卫生组织列为二十一世纪重点防治三大疾病之一, 世界各国过敏性疾病总发病率高达10%~30%^[9]。其中, 花生作为一种最主要的食物过敏原可引起包括过敏性休克和过敏性死亡等严重的食物过敏反应^[10]。国外相关研究表明, 花生过敏病人食用花生油可能会出现过敏, 但发生这种情况的机会很少。多数花生过敏患者对粗提花生油过敏, 而对精炼花生油无过敏反应。美国农业部研究人员找到了不含一种使人过敏的蛋白质的花生品种。统计显示, 美国花生过敏症患者总人数约150万, 每年有50~100名美国人因花生过敏而死亡。美国花生过敏症患者中, 一半以上会对其中名为“Ara h1”和“Ara h2”两种蛋白质产生过敏反应。据报道, 美国农业部研究人员对300个花生品种进行测试后发现, 其中有一种花生不含“Ara h2”蛋白质。目前, 研究人员正在继续寻找不含“Ara h1”蛋白质的花生品种。研究人员打算将这些更“安全”的花生品种与受消费者青睐的食用花生品种进行杂交繁殖, 最终也许可以培育出不引发过敏症的花生。目前中国还没有花生品种与含过敏的蛋白质这方面研究报道。

LAMP方法是一种新型的DNA环介导等温扩增法, 扩增反应是在等温的条件下进行的, 没有核酸的变复性过程, 因此不需要特殊仪器设备, 只需用普通水浴锅就可以, 而PCR反应程序却较为复杂, 反应时间较LAMP反应时间长。总之, LAMP方法是一种便携、特异性强、灵敏度高的检测方法, 其产物的检测方法比较多, 可通过肉眼观测其混浊度的变化, 也可通过加入稀释后的SYBR Green I染料来观察产物的颜色变化。

在本文中, 通过针对特异基因设计的引物检测特异性良好, 反应体系的稳定性, 重复性强, 能够使反应的达到较好的检测效果, 染料法更加快捷, 能够满足快速检测的要求LAMP方法实现了对花生过敏原快速、简便的检测。通过这一检测方法的建立, 将有助于解决我国食品安全中的过敏问题, 有助于预防因错食花生过敏原导致的严重过敏性疾病的发生提供预警技术手段, 保障公众健康, 有利于促进我国食品国际贸易, 并为制定我国食品过敏原标签管理奠定了一定的技术基础。如果对LAMP方法进行进一步完善、优化和推广, 该技术将会在食物过敏原检测中发挥重要的作用。

4 结论

本研究通过针对 *arah2* 基因设计了 4 条特异性引物, 并通过反应体系优化实验发现在反应时间为 63 °C、反应时间为 60 min 的情况下扩增效果最佳。并且, 通过分别对新鲜花生样品、含有花生的食品(鱼皮花生)、不含花生的食品(饼干)进行 LAMP 扩增, 验证了该方法的特异性。同时, 通过两种不同的结果判断方法, 均证明了本研究的可行性。

参考文献

- [1] Hideaki T, Masumi K, Yasuo N. Allergens in major crops [J]. Nutrition Research, 2001, 21(6): 925-934
- [2] Allan S, Anne M F, Hugh A S. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001~2006 [J]. J Allergy ClinImmunol, 2007, 119(4): 1016-1018
- [3] 丁兆云.花生致过敏性休克死亡 2 例[J].中国全科医学, 2001,4(8):665-665
- [4] David M F, Conover M K. The natural progression of peanut allergy: resolution and the possibility of recurrence [J]. J Allergy ClinImmunol, 2003, 112(1): 183-189
- [5] 周淑红.国外关于食品过敏标签的现状及其启示[J].世界农业,2007
- [6] 朱胜梅,吴佳佳,徐驰,等.环介导等温扩增技术快速检测沙门菌[J].现代食品科技,2008,24(7):725-730
- [7] 刘芳,王丽,李琳,等.环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻[J].现代食品科技,2007,23(11):71-74
- [8] Wen H W, Wlodzimierz B W, Thomas R D, et al. Peanut Allergy [J]. Peanut, 2007, 144(1): 85-90
- [9] Stephan O, Vieths S. Development of a real-time PCR and a sandwich food: a review [J]. Food Addit Contam, 2004, 21(1): 1-31
- [10] Dean D M, Hugh A S, Ronald A S. Food Allergy: Adverse reactions to foods and food additives (Second Edition)[M]. USA Black science inc, 1997