

基于多重连接依赖探针扩增 (MLPA) 技术检测 加工食品中过敏原成分

刘艳, 王鸣秋, 李诗瑶, 张涛, 何名扬, 朱必婷, 林津, 徐芬, 张莉*

(湖北省食品质量安全监督检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术),
湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

摘要: 该研究基于多重连接探针扩增技术 (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) 同时检测开心果、巴西坚果、芹菜、麸质、夏威夷果、芝麻、榛子、大豆、花生、葵花籽、核桃、腰果、杏仁、芥末等 14 种植物源性的过敏原成分, 针对 ITS 序列设计特异性杂交探针, 样本核酸经 95 °C 变性后, 与探针进行特异性结合, 经连接和 PCR 扩增反应得到不同大小的目标片段, 通过毛细管电泳分析目标片段的有无来判断是否含有待测过敏原成分。利用混合探针体系检测单一模板只能扩增出单一扩增峰, 表明探针具有高特异性, 检测限结果表明, MLPA 扩增最低可检出的 DNA 质量浓度为 1 ng/μL。通过 20 份实际样本的检测, 证明该研究基于 MLPA 建立的加工食品中过敏原成分的检测方法, 具有特异性强, 灵敏度高的特点, 可以应用于食品安全监管工作。

关键词: 多重连接探针扩增技术; 过敏原; 特异性; 灵敏度

文章编号: 1673-9078(2023)06-290-297

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0637

Detection of the Allergens in Processed Foods Based on Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

LIU Yan, WANG Mingqiu, LI Shiyao, ZHANG Tao, HE Mingyang, ZHU Biting, LIN Jin, XU Fen, ZHANG Li*

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

Abstract: In this study, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was applied to simultaneously detect 14 plant-derived allergens from pistachio, Brazil nut, celery, gluten, macadamia nut, sesame, hazelnut, soybean, peanut, sunflower seed, walnut, cashew, almond and mustard. Specific hybridization probes were designed for ITS sequences. After the sample nucleic acid was denatured at 95 °C, specific binding was carried out with the probes, and target fragments of different sizes were obtained through ligation and PCR amplification reaction. The target fragments were analyzed by capillary electrophoresis to determine whether or not the allergens were present. Using the mixed probe system to detect a single template can only amplify a single amplification peak, indicating that the probe had high specificity. The detection limit results showed that the lowest detectable DNA concentration of MLPA amplification was 1 ng/μL. Through the detection of 20 actual samples, it is proven that the detection method of allergens in processed foods established in this study on the basis of MLPA has the characteristics of high specificity and high sensitivity, and can be applied to food safety supervision.

Key words: multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA); allergen; specificity; sensitivity

引文格式:

刘艳,王鸣秋,李诗瑶,等.基于多重连接依赖探针扩增 (MLPA) 技术检测加工食品中过敏原成分[J].现代食品科技,2023,39(6):290-297.

LIU Yan, WANG Mingqiu, LI Shiyao, et al. Detection of the allergens in processed foods based on multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 290-297.

收稿日期: 2022-05-19

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020BCA091); 国家市场监督管理总局科技计划项目 (2020MK067)

作者简介: 刘艳 (1985-), 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: 297331182@qq.com

通讯作者: 张莉 (1978-), 女, 硕士研究生, 正高级工程师, 研究方向: 食品质量与安全管理, E-mail: 38496899@qq.com

过敏属于炎症反应,是指当一些外来物侵入人体时,人体的免疫系统产生的过度免疫反应^[1,2]。过敏性疾病的发病率在全球处于逐年上升的趋势,数据统计发现,全世界每年食物过敏的患者有 3~5 亿^[3],食物过敏问题越来越受到民众的重视,成为食品安全领域的突出问题。过敏症患者摄入过敏原可引发红肿、荨麻疹、瘙痒、水肿、鼻炎、呕吐、腹痛腹泻等多种免疫反应,病情严重的,可因支气管痉挛、窒息或过敏性休克而死亡^[4]。临床上过敏性疾病治疗方法多样,但针对过敏原对症治疗仍是关键,找到过敏原,尽量避免接触过敏原,是预防引起过敏反应发生的主要措施。

我国对于食品过敏原标签标识的研究相较于欧美国家起步较晚,2008 年北京市出台的地方标准 DB 11/Z 521-2008《奥运会食品安全 食品过敏原标识标注》是我国最早的针对食品过敏原标识的法规,并且在奥运会结束后废止。在 2011 年 4 月颁布的国家标准 GB 7718-2011《预包装食品标签通则》中,首次提出了过敏原标注要求,规定食品及其制品若可能导致过敏反应,无论是用作配料还是在加工过程中直接带入这些食品及其制品,都需要进行标注^[5]。其后市场上流通的食品包装大都标注了致敏原信息,但由于加工生产线存在交叉情况,由生产过程带入过敏原的情况非常普遍,然而有时微量摄入也可引起致敏反应^[6]。

过敏原标识是否规范需要通过对产品是否含有过敏原进行检测,我国对于食品过敏原的检测标准的制定方面尚处于起步阶段,现有的检测方法主要分为基于蛋白质水平的检测和基于核酸水平的检测^[7-11],基于蛋白质水平的检测方法有免疫学方法(ELISA、免疫印迹、免疫层析、蛋白质芯片等)、质谱检测方法和生物传感器检测方法,基于核酸水平的检测方法有聚合酶链式反应(PCR)、环介导等温扩增(LAMP)和基因芯片等。ELISA 检测方法相对较为成熟,已实现了商品化和标准化,常用于工业化生产中的大批量检测,在食品加工过程中过敏原结构易发生变化,加工食品基质也较为复杂,容易对抗原-抗体作用产生干扰,导致 ELISA 检测结果产生偏差。质谱检测和生物传感器检测方法对设备和操作技术要求较高,检测成本也较高。PCR 和 LAMP 技术克服了过敏原结构对检测结果的干扰,但是在高通量上依然不占优势,多重 PCR 引物之间易产生干扰,基因芯片技术可以实现大

规模和高通量,但目前在过敏原检测中的应用还未见推广。近年发展起来的多重连接探针扩增(MLPA)技术,通过针对检测靶标设计特异性引物,用连接酶将与靶序列杂交的长探针和短探针连接成含通用引物的全长探针,每个探针扩增产物的长度唯一,产物可通过毛细管电泳分离,可以实现在单个反应中同时对 50 个靶基因进行定性和半定量的分析,具有高灵敏度、高通量、操作简便、结果准确的优点,在遗传疾病、病原检测、肿瘤诊断等工作中得到了广泛的研究和应用^[12-21]。本研究拟针对常见食品过敏原建立多重检测体系,开发其在食品过敏原检测中的应用潜力,建立一种简便、快速、灵敏、准确、低成本的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

开心果、巴西坚果、芹菜、麸质(小麦、燕麦、大麦、黑麦)、夏威夷果、芝麻、榛子、大豆、花生、葵花籽、核桃、腰果、杏仁、芥末、大米、鱼、虾、蟹、牛奶、鸡蛋、桃及 20 份过敏原检测加工食品样本(婴幼儿辅食、固体饮料、糕点、方便食品、膨化食品、冷冻饮品)等均购于商超店。微生物材料(大肠埃希氏菌 ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538)来自于本实验室储藏菌株。

DNeasy® meicon Food Kit 购自德国 Qiagen 公司;SALSA MLPA EK5 reagent kit 100 reactions-FAM 购自荷兰 MRC-Holland 公司;MLPA 探针由武汉擎科生物公司合成;毛细管电泳缓冲液、POP-7 胶、Hi-Di Formamide、GeneScan 500 LIZ dye Size Standard 均购自美国 ABI 公司;Premix Ex Taq(Probe qPCR)购自大连宝生物公司。

1.2 仪器与设备

5424R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;恒温金属浴,天根生化科技(北京)有限公司;T100 Thermal Cycler PCR 仪和 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-rad 公司;3500 毛细管基因分析仪,美国 ABI 公司;Tissue LyserII 组织研磨仪和 QIAxpert 核酸浓度测定仪,德国 Qiagen 公司;A11 basic 研磨仪,德国 IKA 公司;GM 300 均质器,德国 Retsch GmbH 公司。

表 1 MLPA 检测探针及引物序列

Table 1 Probes and primers used in MLPA method

ID	Primer 名称	引物序列(5' to 3')	碱基数	理论大小/bp	实际大小/bp
开心果	Pistachionut-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGTGTGCCTCCACCCGTGCTT	40	89	88.18
	Pistachionut-RPO-1	CGTCGGGTGTCGGTCGTATGCTTCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	49		
巴西坚果	Brazilnut-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACACGACGAGTGGTGGATCACGACACG	45	93	90.11
	Brazilnut-RPO-1	CGCCCCGCGTCGTGCCGCGCCCGTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	48		
芹菜	Celery-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACACATTGGGCAAGCGTCGGTGGGCTTTGG	48	95	94.17
	Celery-RPO-1	TCCGCCGTTTGCAAACCTTTGGTATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	47		
麸质 1	Wheat-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t CAATGCAGTGCATCCGGCGCGCAGCT	47	98	95.37
	Wheat-RPO-1	GGCATTATGGCCTTTGAACGACCCAACATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	51		
夏威夷果	Macadamianut-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGATTGCGCGATCAAGGTAGGGCGTGGGAGCGTGAG	52	100	97.13
	Macadamianut-RPO-1	CTCCTTCTTCCCGACCCTTGTAATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	48		
麸质 2	Barley-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t tCAATCCTCCGACGATGGCATTGTT	47	103	101.79
	Barley-RPO-1	CGTCGTTCCGCCAATTCCTCGACCGCCTCCA _g tCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	56		
芝麻	Sesame-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t gTCACGACCAGTGGTGGTTGAACGCTCAACT	53	104	103.16
	Sesame-RPO-2	CGCGTGCTGTCGTGCCGCGCTC _g tgtg _t CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	51		
榛子	Hazelnut-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGAACGGCGGGGAGACACTCGTGCCCTTCT	48	112	110.98
	Hazelnut-RPO-1	TGCCGAACAACGAACCCCGCGCGGTCTG _g tgtgtgtgt _t CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	64		
大豆	Soybean-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t gtgtgt _t CGACTTCGCCGTGATAAAATGGTGGATGAG	59	117	115.67
	Soybean-RPO-1	CCACGCTCGAGACCAATCAGTGCAGCCGGTCA _g TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	58		
花生	Peanut-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t gGAAGCCAAACGTTTCTGCTCTCCCCGCCGGCTCCGGAGA	61	122	119.61
	Peanut-RPO-2	CGGCATCCGGTCGGGGCGACGAGTGACCACAAGAGTTATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	61		
葵瓜子	Sunflower-LPO-1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAGTTAACACATCTGGCCTTGCCGGGACCGAAGCAITTTGTTTC	63	123	121.63
	Sunflower-RPO-1	GGCCCTGTGAGTCCTTGTCGACGTGCGTTCATGCATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	60		
核桃	Walnut-LPO-4	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAg _t gtCACGTTGAGATATGCCACCGCTCCTCGTGTGTGGTTGGTCAATCTTCT	72	125	123.75
	Walnut-RPO-1	CGTTCCTTCCCGATCGAACAATGAAC _g t _g TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	53		
腰果	Cashewnut-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGAGTCGCGCCAAGGAATCTTACTTGAGAGGGCTCGCTCCCGTCGCCCGTGCT	73	130	128.1
	Cashewnut-RPO-2	CGGTGCGCGTGGGGGAAGCGTTGCCTCCTTTCATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	57		
杏仁	Almond-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAATCGGTGGTTGCGAGACCTCGGTTGCCCGTCGTGTGCGTTTCGT	64	132	130.78
	Almond-RPO-2	CGCGCATCGAGGGCTCGAAAAAATGCTCGGCTCCGGCTCGGCTTTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	68		
芥末	Brownmustard-LPO-2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTAAGGACGTCAGGAGCGTCTTGACATGCGGTGGTGAATTTAATCTCGTCATA	73	137	135.55
	Brownmustard-RPO-2	TAGTCAGACGTTCCGGTCCAAAAGCTCTTGATGACCCAAAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	64		
通用引物	Common Primer-F	FAM-5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'	/	/	/
	Common Primer-R	5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'			

1.3 实验方法

1.3.1 探针设计及合成

从 NCBI 数据库中搜索过敏原物种的内转录间隔区 ITS (Internal Transcribed Sequence) 序列, 每个物种获得 10 条及以上靶基因序列, 利用 Sequencer/Geneious 软件进行序列比对, 剔除一致性较差的序列, 导出比对后序列; 通过比对不同过敏原的序列, 找出存在差异的序列, 并以此为目标序列使用 Primer 5 设计对应的 MLPA 探针对。同时选取植物保守序列设计通用探针作为内参, 过程监控样品核酸质量。参考 MRC-Holland 公司探针设计指南, 控制每个物种探针长度 (75~200 bp)、GC 含量 (30%~70%)、T_m (68~80 °C) 值等, 由于不同物种扩增片段是通过片段大小来区分, 设计不同物种探针的总长度差异至少相差 2 bp; 通过 UseUNAFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) 评价探针质量, BLAST 验证特异性。合成探针采用 HPLC 纯化, 右侧探针 (RPO) 进行 5' 端磷酸化处理, 探针信息见表 1。扩增引物使用试剂盒自带引物, 探针使用浓度为 1 μmol/L。

1.3.2 过敏原样品 DNA 提取

收集常见的过敏原成分开心果、巴西坚果、芹菜、麸质、夏威夷果、芝麻、榛子、大豆、花生、葵花籽、核桃、腰果、杏仁、芥末等, 用研磨仪磨成粉末, 分别称取 200 mg 样品粉末, 按照 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取, 提取后的 DNA 用核酸蛋白浓度测定仪测定纯度和浓度, 存放于 -20 °C 备用。食品样品用深加工提取试剂盒进行核酸提取, 液体样品取 50 mL 于离心管中 4 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀作为 DNA 提取起始样本; 固体样品直接称取 2 g, 按照试剂盒说明书步骤进行基因组 DNA 提取。测定浓度后稀释至 20 ng/μL, -20 °C 存放备用。

1.3.3 探针与靶标核酸杂交和连接反应

取靶标核酸 5 μL (20 ng/μL) 95 °C 变性 5 min 后冷却至 25 °C, 加入 1.5 μL SALSA 缓冲液和 1.5 μL 探针混合物, 探针混合物中各探针终浓度为 2 fmol。60~68 °C 杂交 2~20 h; 杂交反应结束后加入连接酶缓冲液 (3 μL 缓冲液 A, 3 μL 缓冲液 B, 25 μL H₂O) 和 1 μL 连接酶 Ligase-65 (共 32 μL), 54 °C 孵育 15 min 进行连接, 98 °C, 5 min 灭活连接酶。

1.3.4 PCR 扩增和毛细管电泳分析

连接反应液冷却至 25 °C 后加入 PCR 反应混合液 10 μL (7.5 μL H₂O, 2 μL PCR primer mix, 0.5 μL SALSA 聚合酶), 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 循环 35 次, 72 °C 20 min。每个反应设置 2 个平行。

PCR 产物稀释后取 1 μL 加入 9 μL HiDi 和 0.5 μL GeneScan 500 LIZ dye Size Standard 混合, 于 ABI 3500 基因分析仪上用 POP7 的胶和 50 cm 规格的毛细管以片段分析模式进行毛细管电泳片段分析。电泳条件为: 运行温度 60 °C; 进样时间 5 s; 进样电压 1.6 kV; 运行时间 1 800 s; 运行电压 15 kV。检测数据文件 (.fsa) 用 GeneMapper 4.0 软件进行分析。首先用各物种标准品 DNA 进行实验得到标准的阳性结果, 在软件上得到各物种的标准片段大小和位置。

1.4 数据分析

应用 SPSS 23 软件进行统计学分析, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 探针特异性分析

探针序列针对 ITS 区域作为靶标来设计, 在 NCBI Genbank 中经 BLAST 比对验证, 每个过敏原设计 1~4 对探针, 每种探针与相对应的物种 DNA 模板进行 MLPA 测试, 筛选出产生单一扩增峰, 且没有交叉反应的探针作为过敏原的探针。设计的麸质的探针没有筛选出能同时检测出多种麸质靶标的探针, 故保留 2 对能检出常见麸质的探针 (麸质 1 和麸质 2), 将表 1 中所列探针按照 MLPA 扩增反应要求制备成混合探针, 以开心果、巴西坚果、芹菜、麸质 (大麦、小麦、燕麦、黑麦等)、夏威夷果、芝麻、榛子、大豆、花生、葵花籽、核桃、腰果、杏仁、芥末提取的 DNA 混合后为模板进行 MLPA 扩增, 扩增片段大小分别为: 开心果 (88.18 bp)、巴西坚果 (90.11 bp)、芹菜 (94.17 bp)、麸质 1 (95.37 bp)、夏威夷果 (97.13 bp)、麸质 2 (101.79 bp)、芝麻 (103.16 bp)、榛子 (110.98 bp)、大豆 (115.67 bp)、花生 (119.61 bp)、葵花籽 (121.63 bp)、核桃 (123.75 bp)、腰果 (128.1 bp)、杏仁 (130.78 bp)、芥末 (135.55 bp), 结果见图 1。

同时利用 14 种过敏原随机组合后, 用混合探针进行 MLPA 扩增, 以无模板 TE 作为空白对照, 结果见图 2, 从图 2 可以看出, 利用多种探针进行随机多重检测, 均能得到与预期大小一致的扩增峰, 从无模板空白对照中没有扩增出任何目的扩增峰, 说明该体系能进行 14 种过敏原的同时检测。混合探针实际片段大小与理论值有约 2 bp 偏差, 其原因可能为① GeneScan 500 LIZ dye Size Standard 与待测片段荧光标记不同导致的电泳迁移率不同; ② 不同片段 DNA 结构和碱基组成的不同导致迁移率不同。

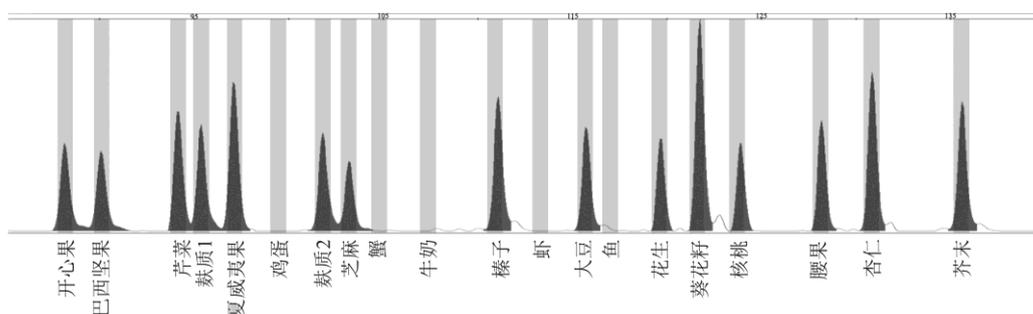


图 1 14 种过敏原混合 MLPA 毛细管电泳检测图

Fig.1 Capillary electrophoresis of the MLPA system using a mixture of 14 allergens mixed DNAs

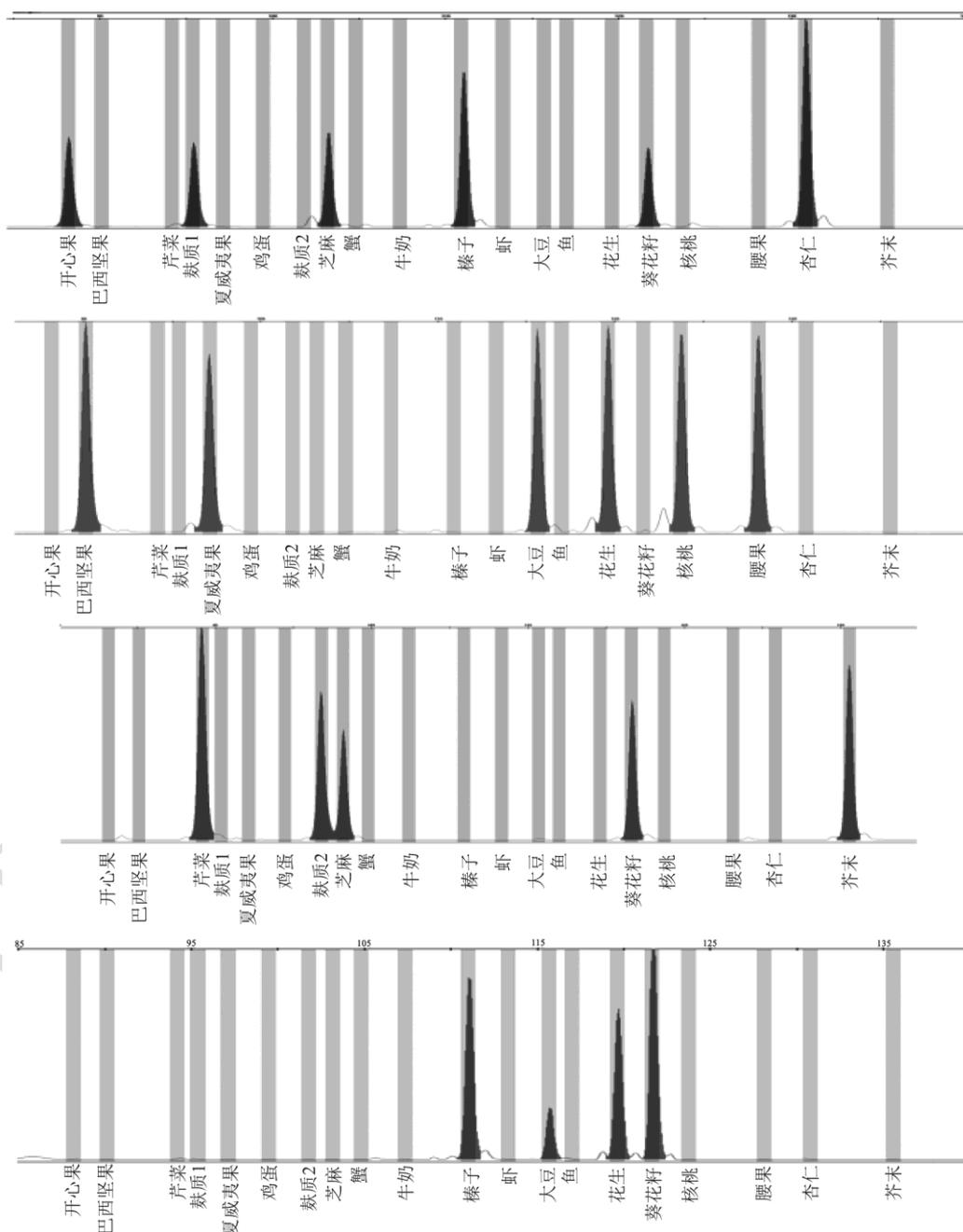


图 2 14 种过敏原随机组合 MLPA 毛细管电泳检测图

Fig.2 Analysis of 14 allergens by MLPA capillary electrophoresis

为了模拟食品基质的复杂性,将含过敏原食品中可能出现的物种作为特异性筛查对象进行验证。MLPA 检测发现,探针与检测靶标之外的待测物种无交叉反应,麸质 1 能检测小麦、大麦和燕麦,麸质 2 能检测出小麦和黑麦,提示探针特异性较好,麸质需要 2 对探针同时参与体系才能较好的覆盖到常见的物种。

2.2 反应条件优化

表 2 正交实验方案

Table 2 The table of levels and factors to orthogonal test

试验号	因素		
	探针浓度/fmol	杂交时间/h	杂交温度/°C
1	1 (1.3)	1 (2)	1 (60)
2	1 (1.3)	2 (6)	3 (68)
3	1 (1.3)	3 (16)	2 (64)
4	2 (3.0)	1 (2)	2 (64)
5	2 (3.0)	2 (6)	1 (60)
6	2 (3.0)	3 (16)	3 (68)
7	3 (5.0)	1 (2)	3 (68)
8	3 (5.0)	2 (6)	2 (64)
9	3 (5.0)	3 (16)	1 (60)

通过调整 MLPA 反应体系中探针浓度、杂交温度、杂交时间三个因素设计三因素三水平正交试验,正交试验方案见表 2,取混合样本 DNA (大豆、芝麻、榛子、花生、核桃、杏仁) 为模板,用混合探针 (大豆、芝麻、榛子、花生、核桃、杏仁) 进行 MLPA 检测,体系中加入沙门氏菌核酸质粒及探针作为对照,以扩

增峰面积与沙门氏菌扩增峰面积的比值为指标,考察探针浓度、杂交温度、杂交时间三个因素对体系的影响,每个反应设置 2 平行。结果显示见表 3,单独查看每一种过敏原 (大豆、芝麻、榛子、花生、核桃、杏仁),扩增峰面积的比值之间差异不显著 ($P>0.05$),提示探针浓度在 1.3~5.0 fmol,杂交时间为 2 h~16 h,杂交温度为 60 °C~68 °C 范围内反应体系均能得到稳定的结果。

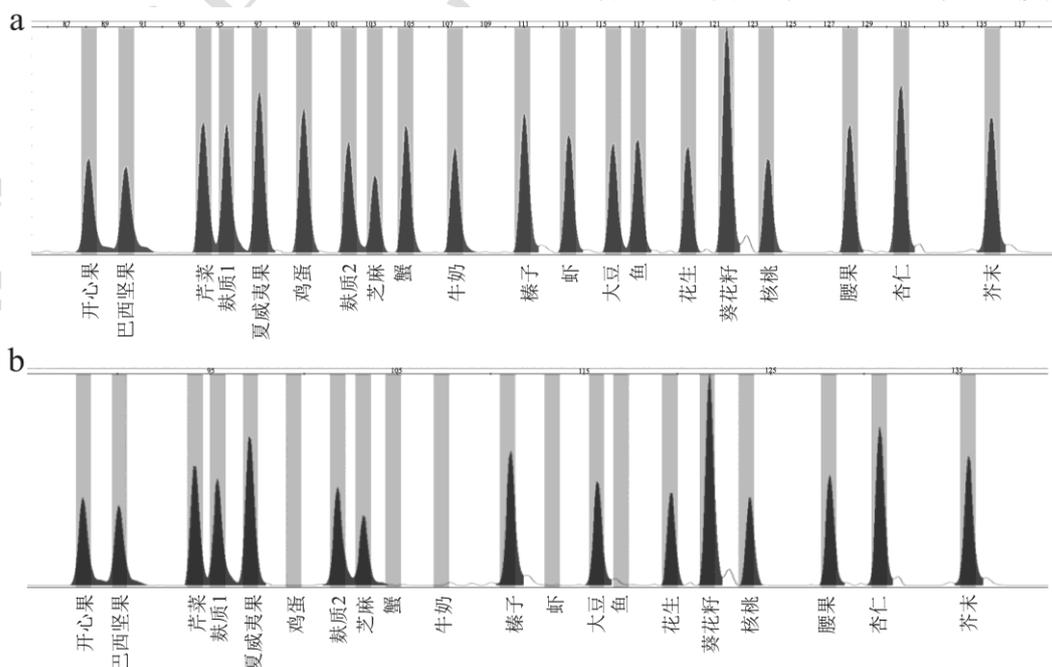
表 3 过敏原扩增结果方差分析

Table 3 Anova analysis of allergen amplification results

组别 BM	扩增峰面积比值			F	P
	探针 浓度/fmol	杂交 时间/h	杂交 温度/°C		
大豆	1.13±0.86	1.21±0.84	1.12±0.79	0.019	0.895
芝麻	1.70±0.45	1.84±0.49	1.71±0.81	0.698	0.431
榛子	2.40±0.91	2.59±0.67	2.69±0.72	0.520	0.494
花生	3.07±0.76	2.68±0.82	2.83±0.59	0.044	0.841
核桃	2.42±0.06	2.30±0.75	2.25±0.40	0.359	0.568
杏仁	2.74±0.57	2.46±0.54	3.22±0.56	1.282	0.295

2.3 检测灵敏度分析

将提取到的过敏原核酸经浓度测定仪检测后,按照梯度进行稀释,分别得到 100、50、20、10、5、1、0.1、0.05 ng/μL 的溶液,分别取 5 μL 进行 MLPA 测定,每个反应设置 2 平行。在 100~1 ng/μL 时均能稳定得到扩增峰,0.1 ng/μL 和 0.05 ng/μL 质量浓度下有非特异性扩增出现,目标峰也只有部分能扩增出 (见图 3),表明该体系最低可检出的 DNA 质量浓度为 1 ng/μL。



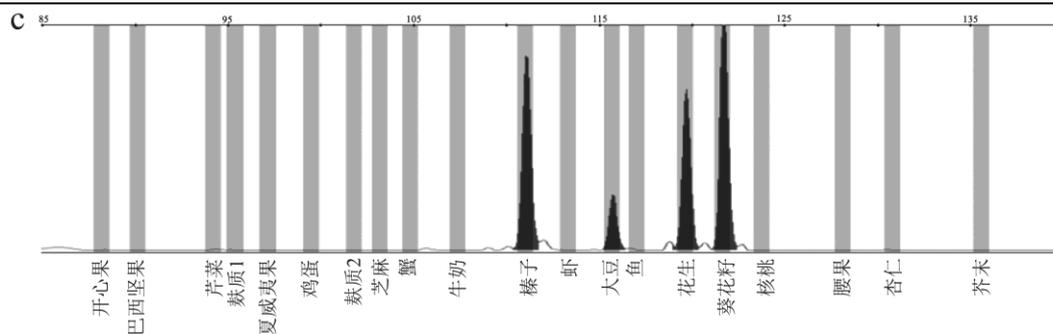


图3 不同过敏原核酸质量浓度 MLPA 毛细管电泳检测图

Fig.3 MLPA capillary electrophoresis of different allergen nucleic acid concentrations

注: 过敏原核酸质量浓度 a 为 1 ng/μL, b 为 0.1 ng/μL, c 为 0.05 ng/μL。

表4 市售食品过敏原 MLPA 检测结果

Table 4 Results after MLPA and real time PCR analysis of commercial food products

样品编号	样品名称	声称过敏原成分	标识可能含有过敏原成分	MLPA 结果	实时荧光 PCR 结果
1	满嘴香青稞米棒	麸质、青稞、花生、大豆	芝麻	花生、芝麻、大豆	花生
2	鸡肉蔬菜粥	鸡、南瓜、白菜、大米、淀粉	乳制品、大豆、小麦	大豆	/
3	黑芝麻糊	大豆、黑芝麻、核桃	/	芝麻、大豆、花生	芝麻
4	即食燕麦	/	坚果、大豆	杏仁	/
5	水果麦片	巴旦木	豆类制品	杏仁、大豆	杏仁
6	早餐麦片	榛子、扁桃仁	/	榛子、杏仁	榛子、杏仁
7	坚果麦片	扁桃仁、大豆制品	花生	杏仁、大豆	杏仁
8	传统口味麦片	榛子	/	榛子	榛子
9	山药黑米粉	大豆	坚果、花生	大豆、花生、芝麻	大豆
10	黑豆五谷粉	黑芝麻、大豆、花生	坚果	芝麻、大豆	大豆
11	红枣早餐饼干	小麦	花生、大豆、芝麻	芝麻、大豆	/
12	草莓蛋蛋饼	麸质、鸡蛋	/	麸质、大豆	/
13	芝麻酱	芝麻	/	芝麻、花生	芝麻
14	榛果巧克力	榛子、大豆	/	榛子、大豆	榛子
15	黑巧克力	榛子、扁桃仁、大豆	坚果	榛子、大豆	榛子
16	水果酵素固体饮料	芹菜、黑豆	/	芹菜、大豆	大豆
17	清汤酵素	芹菜、燕麦、扁桃仁、大豆	芝麻	芹菜、杏仁、大豆	大豆
18	坚果冰淇淋	大豆制品、花生	芝麻、坚果	花生	花生
19	香草口味冰淇淋	大豆制品、花生	腰果、杏仁、芝麻	花生、芝麻	花生
20	麻糖	芝麻	/	芝麻	芝麻

2.4 实际样品检测

依据本研究建立的多重食品过敏原检测体系, 对市售 20 份食品样品进行了过敏原 MLPA 测定, 评估该体系对于实际样品的检测能力, 包括婴幼儿辅食、固体饮料、糕点、方便食品、膨化食品、冷冻饮品等。同时用 SN/T 1961 出口食品过敏原成分检测中的引物探针进行实时荧光定量 PCR, 检测样本中的过敏原成分。检测结果见表 4, 从结果可以看出, MLPA 结果仅有 8% 的样品 (8、14、16、20 号) 检测过敏原结果与标签完全一致, 7 份样品 (1、2、4、5、9、11、19

号) 检出标识可能含有的过敏原成分, 说明在食品生产过程中, 同一生产线的不同产品中的确存在着过敏原成分的交叉污染, 有 3 份样品 (3、9、13 号) 检出产品包装上未标识的过敏原。实时荧光定量 PCR 结果仅 8 号和 20 号检测结果与标签标识一致, 未检出标识可能含有的过敏原成分。16 份样品 (1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19 号) 通过 MLPA 检测到的过敏原成分明显多于荧光定量 PCR 的检测结果, 说明 MLPA 可以较好的检测出含量很低的过敏原成分, 检测灵敏度和稳定性比实时荧光定量 PCR 更好, 在实际样品检测中的优势更加明显。

3 结论

目前 MLPA 技术在食品领域的应用报导较少,本研究基于 MLPA 技术建立了一种食品中过敏原成分的多重检测体系,探针特异性检测结果表明每对探针能从混合模板中扩增出与预期大小基本一致的目的片段,相互之间无干扰,特异性良好,且可以根据具体检测需求灵活将 14 种过敏原探针进行组合。MLPA 探针标记简单、用量少、成本低,而且对于模板序列的完整性要求较低,食品在加工过程中,核酸存在一定程度的降解,终产品 DNA 提取质量一般不高,浓度也较低,因此常规 PCR 检测较难检测到含量较低的过敏原成分,本研究建立的多重过敏原 MLPA 检测体系能够同时对 14 种过敏原进行检测,最低可检出的 DNA 浓度为 1 ng/ μ L,特异性较好、灵敏度高,性能满足市售样品检测需求,有望成为加工食品过敏原检测及过敏原标签监管的有力技术支撑。

参考文献

- [1] 傅玲琳,王彦波.食物过敏:从致敏机理到控制策略[J].食品科学,2021,19:1-19.
- [2] Ronaldvan Ree, Lars K. Poulsen, Gary WK Wong,等.食物过敏的定义、流行性、诊断及治疗[J].中华预防医学杂志,2015,1:6.
- [3] 杜静,朱天川,周薇,等.过敏性皮肤病患者血清特异性过敏原 IgE 分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(11):1537-1539.
- [4] 张罗,王向东,王成硕.严重过敏反应的诊断和治疗[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,8:3.
- [5] GB 7781-2011,食品安全国家标准预包装食品标签通则[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [6] Sathe S K, Liu C, Zaffran V D. Food allergy [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2016, 7(1): 191-220.
- [7] 丁亮,付琳,吴秀莲,等.基于蛋白质和 DNA 的食品过敏原检测技术的研究进展[J].中国酿造,2017,36(7):157-160.
- [8] 古淑青,赵超敏,程甲,等.基于质谱技术的食品过敏原检测方法研究进展[J].色谱,2016,34(7):639-646.
- [9] Dzantiev B B, Byzova N A, Urusov A E, et al. Immunochromatographic methods in food analysis [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014, 55: 81-93.
- [10] 李欣,徐子豪,黄美佳,等.乳酸菌降低牛乳中蛋白质致敏性的研究进展[J].食品与生物技术学报,2021,40(1):12-19.
- [11] 马秀丽,张九凯,孙劲旅,等.芝麻过敏原 Ses i3 同源建模及 B 细胞线性抗原表位预测[J].中国食品学报,2021,21(4):9-18.
- [12] 史喜菊,马贵平,乔彩霞,等.多重连接探针扩增(MLPA)技术同时检测五种病毒的研究[J].农业生物技术学报,2013,21(6):745-752.
- [13] 张丹妍,冯雪菲,戴礼猛,等.应用多重连接依赖探针扩增和微阵列比较基因组杂交技术检测不明原因智力障碍患儿[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(2):11-12,46,133.
- [14] 汪波,周豫新,覃桂,等.多重连接探针扩增技术检测川贝母掺伪的研究[J].药物分析杂志,2018,38(12):2104-2109.
- [15] Eid O M, Kader R, Fathalla L A, et al. Evaluation of MLPA as a comprehensive molecular cytogenetic tool to detect cytogenetic markers of chronic lymphocytic leukemia in Egyptian patients [J]. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2021, 34(3): 390-394.
- [16] 余诗琪.基于 MLPA 和 LC/MS2 筛查中药材多种毒源真菌污染的方法及应用[D].武汉:湖北中医药大学,2019.
- [17] 贾双荣,湛晓琴,邓少丽,等.1 种检测基因点突变的新型 MLP-RT-PCR 技术构建[J].免疫学杂志,2018,34(11):989-996.
- [18] 何海健,刘正奎,吴瑗,等.猪病毒性腹泻病相关病原的 MLPA 检测技术的建立及应用[J].农业生物技术学报,2020, 28(9):1699-1710.
- [19] Cardenas-Morales M, Hernandez-Trujillo V. Infant anaphylaxis: a diagnostic challenge [J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2021, 21(2): 12.
- [20] Bosa L, Martellosi S, Tardini G, et al. Early onset food protein-induced enterocolitis syndrome in two breastfed newborns masquerading as surgical diseases: case reports and literature review [J]. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2021, 34(3): 390-394.
- [21] Eischeid A C, Stadig S R, Rallabhandi P. Comparison of real-time PCR and ELISA for the detection of crustacean shellfish allergens [J]. Food Additives and Contaminants Part A, 2021, 38(4): 563-572.