

# 恒温实时荧光法快速检测婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的研究

牛会敏<sup>1,2</sup>, 蒋静<sup>1,2</sup>, 户瀚文<sup>1,2</sup>, 王静怡<sup>1,2,3</sup>

(1. 河南省食品和盐业检验技术研究院, 河南 郑州 450003; 2. 河南省特殊食品工程技术研究中心, 河南 郑州 450003; 3. 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术), 河南 郑州 450003)

**摘要:** 为建立婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的恒温实时荧光快速检测方法, 根据胡萝卜 *ITS1-5.8SRNA-ITS2* 基因序列设计合成恒温实时荧光法(LAMP)的特异性引物, 以常见农产品及不同胡萝卜质量分数的白萝卜 DNA 分别验证方法的特异性和灵敏度, 选取不同品系胡萝卜种子验证方法的适用范围, 并通过预包装食品检测其实用性。结果表明: 所建方法与其他物种无交叉反应, 特异性强, 能在 1 h 内检测低至质量分数为 0.01% 的胡萝卜成分, 灵敏度高, 适用于不同品系胡萝卜的检测。适用范围广, 通过实际样本的检测验证, 结果快速、准确。该方法操作简单、成本较低、数据智能判读实时同步、结果准确快速, 可用于婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的快速检测, 为婴幼儿食品标签管理及食品安全监管提供技术依据。

**关键词:** 胡萝卜, 恒温实时荧光法, 过敏原, 婴幼儿辅助食品, 快速检测

中图分类号: TS 207.3

文章编号: 1673-1689(2023)10-0094-06

DOI: 10.12441/spyswjs.20220303002

## Study on Rapid Determination of Carrot Components in Complementary Foods for Infant and Young Children by Isothermal Real-Time Fluorescence Assay

NIU Huimin<sup>1,2,3</sup>, JIANG Jing<sup>1,2,3</sup>, HU Hanwen<sup>1,2,3</sup>, WANG Jingyi<sup>1,2,3</sup>

(1. Henan Institute of Food and Salt Industry Inspection Technology, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan Special Food Engineering Technology Center, Zhengzhou 450003, China; 3. Key Laboratory of Food Safety Quick Testing and Smart Supervision Technology for State Market Regulation, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** In order to establish a rapid detection method for carrot components in complementary foods for infant and young children using isothermal real-time fluorescence, specific primers for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) were designed and synthesized based on the carrot *ITS1-5.8 SRNA-ITS2* gene sequence. The specificity and sensitivity of the method were verified by DNA from common crop and white radish with different carrot mass ratios. Different cultivars of carrot seeds were selected to verify the applicability of the method, and its practicality was tested through pre-packaged food. The results indicated that the established method exhibited strong specificity without cross-reactivity with other species. It can detect the composition of carrot as low

收稿日期: 2022-03-03 修回日期: 2022-04-01

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(182102110384); 河南省科技发展计划项目(202102210193); 河南省市场监督管理局科技计划项目(2020sj39)。

作者简介: 牛会敏(1985—), 女, 硕士, 工程师, 主要从事食品微生物及分子生物学检测研究。E-mail: 530796065@qq.com

as 0.01% mass ratio within 1h, demonstrating high sensitivity. It is suitable for the detection of different carrot cultivars with a wide range of application. The method proved to be fast and accurate when validated with actual samples. This method offers simplicity, cost-effectiveness, real-time synchronization of intelligent data interpretation, and accurate and rapid visualization of results. Therefore, it can be used for the rapid detection of carrot components in complementary foods for infant and young children, providing a technical basis labeling management and food safety supervision in complementary foods for infant and young children.

**Keywords:** carrot, isothermal real-time fluorescence assay, allergen, complementary foods for infant and young children, rapid detection

胡萝卜是伞形科草本植物,因其独特的营养价值和保健作用,常被作为食品配料用于各种饮料、糕点、面食以及功能性食品中<sup>[1-3]</sup>,尤其在婴幼儿辅助食品中,其富含的胡萝卜素能帮助婴幼儿提高视力和免疫力,抵抗病菌侵袭,促进健康成长<sup>[4]</sup>。但胡萝卜也是一种常见食物过敏原,全世界约25%的过敏反应是由食品中的胡萝卜成分产生的<sup>[5]</sup>,我国《亚运食品安全食品过敏原标识标注》<sup>[6]</sup>列出的导致过敏反应的食品中,胡萝卜位列其中,目前关于胡萝卜过敏的报道也时有发生<sup>[7-9]</sup>。在婴幼儿辅助食品的生产销售中,若标签标识不规范,利用掺杂掺假、以次充好谋取利益,或擅自改变产品组成,造成产品的真实属性与标签不符,这种行为不仅涉及经济、营养价值,更直接影响婴幼儿的健康安全,引发食源性过敏反应。因此,婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的真实性检测是市场监管中亟待解决的问题。

环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型的等温核酸扩增方法,该方法针对靶基因的6个区域设计4条特异引物,利用一种链置换DNA聚合酶在恒温条件下即可完成核酸扩增反应<sup>[10]</sup>,缩短了检测时间,无需昂贵的温控和辅助设备且操作简单,具有简单、快速、准确等优点,可广泛应用于食品中致病微生物检测<sup>[11-12]</sup>、转基因成分鉴定、掺假肉鉴别<sup>[13]</sup>及动植物病害检测等方面。但LAMP扩增结果的表达方式有浊度分析法和目视荧光法,这2种结果判断方式都需要靠检测人员肉眼去观察,结果判读受外界因素的影响较大。

基于LAMP技术并结合实时荧光技术和恒温荧光检测设备,作者根据胡萝卜的*ITS1-5.8SRNA-ITS2*基因,设计特异性引物,建立了快速检测婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的恒温荧光PCR方法,旨

在为标签管理、食品安全监管和食品质量控制提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验材料** 从当地超市或农贸市场购买大豆、玉米、大米、白萝卜、心里美萝卜、青萝卜、水萝卜、白菜、芹菜、韭菜、花生、核桃等用于特异性试验。不同品系的胡萝卜种子随机购自农贸市场,用于灵敏度和适应性试验。用于验证方法实用性的样本均为单位抽检样品。

**1.1.2 主要试剂** 植物DNA提取试剂盒、植物内源恒温扩增试剂盒:广州澳澳生物科技有限公司产品;无水乙醇、异丙醇:市售分析纯试剂。

**1.1.3 主要仪器** QuantStudio 7 flex 实时荧光定量PCR仪:赛默飞世尔科技公司产品。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 样品制备及DNA提取** 称取适量待测新鲜胡萝卜样品,用已灭菌的均质杯打碎混合均匀,按照植物DNA提取试剂盒说明书要求进行DNA提取。提取后的DNA使用核酸蛋白分析仪测定 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ ,通过 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值确定DNA浓度和纯度。

**1.2.2 引物设计** 根据Genbank上公布的胡萝卜的*ITS1-5.8SRNA-ITS2*基因序列,设计并合成特异性引物,包括2条外引物F3和B3,2条内引物FIP和BIP,2条环引物FLP和BLP,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

**1.2.3 恒温扩增反应** 使用实时荧光定量PCR仪进行恒温扩增反应,所有反应均设置空白对照、阴性对照和阳性对照。反应条件为:63℃,15 s;63℃,45 s,共60个循环。反应体系见表2。

表 1 胡萝卜引物序列

Table 1 Primer sequences of carrot

成分	基因名称	引物序列
胡萝卜	5.8SRNA	F3:5'- GAAATTGGCTCCCGTGC-3'
		B3:5'-GCTTAAACTCAGCGGGTAGT-3'
		FIP:5'-AACCACCGATGTCGCGATGCCTTTTGTGTGCGGTTGGC-3'
		BIP:5'-GTCGTTGTGTATACCCGCCGCGGGTCACAATCGAAGTGCA-3'
		FLP:5'-CGTCACCAGAGACTCATTTTTGA-3'
		BLP:5'-GGCCCTTGGGCACAGCAAA-3'

表 2 恒温扩增的反应体系

Table 2 Reaction system of isothermal amplification

组分	体积/ $\mu$ L
Master Mix(2X)	12.5
Bst-DNA 聚合酶	1.0
荧光染料	0.5
外侧上游引物 F3(10 $\mu$ mol/L)	0.5
外侧下游引物 B3(10 $\mu$ mol/L)	0.5
内侧上游引物 FIP(40 $\mu$ mol/L)	1.0
内侧下游引物 BIP(40 $\mu$ mol/L)	1.0
上游环引物 FLP(20 $\mu$ mol/L)	1.0
下游环引物 BLP(20 $\mu$ mol/L)	1.0
DNA 模板	2.0
去离子水	4.0

**1.2.4 胡萝卜成分恒温实时荧光法的特异性验证试验** 分别提取常见农作物如粮食类:大米、大豆、玉米;坚果类:核桃、花生;蔬菜类:芹菜、白菜、韭菜、白萝卜、青萝卜、心里美萝卜和水果萝卜等的 DNA 作为模板,用 1.2.3 的方法进行胡萝卜特异性恒温扩增反应。

**1.2.5 胡萝卜成分恒温实时荧光法的灵敏度试验** 称取新鲜的胡萝卜 10 g、白萝卜 90 g,用均质杯充分均质混匀,制备成含胡萝卜质量分数为 10%的样本,取样本 10 g、白萝卜 90 g,充分均质混匀,制备成含胡萝卜质量分数为 1%的样本,同法,分别制备质量分数为 0.1%、0.05%、0.01%、0.005%和 0.001%的样本,分别提取 DNA 进行恒温扩增,确定胡萝卜源性成分的恒温扩增检测灵敏度。

**1.2.6 胡萝卜成分恒温实时荧光法适用性试验** 为验证引物和方法的适用性,购买不同品系的 7 种胡萝卜种子(改良八寸红、农大红芯胡萝卜、三红特选八寸参、韩红参王九寸红、豫丰红笋 908、红龙特级三红七寸参、新红秀胡萝卜),以确定方法的适用范围。

**1.2.7 预包装食品中胡萝卜成分恒温实时荧光法检测试验** 选择单位抽检的 7 种食品,其中包括婴幼儿辅助食品米粉、果泥、面条等(6 种食品标签标识含有胡萝卜成分,1 种食品无胡萝卜成分标识),提取 DNA,按照 1.2.3 的方法进行检测,通过核对检测结果与标签标示是否相符,确定本方法检测实际样本中胡萝卜成分的能力。

2 结果与讨论

2.1 引物特异性试验

基于胡萝卜的 *ITS1-5.8SRNA-ITS2* 基因设计的内、外及环引物对胡萝卜 DNA 有显著扩增,见图 1,对其他 11 种常见农作物尤其是白萝卜、心里美萝卜、青萝卜等物种均无 DNA 扩增,说明该引物对胡萝卜源性成分恒温扩增检测有良好的特异性,与上述物种没有交叉反应。

2.2 灵敏度试验

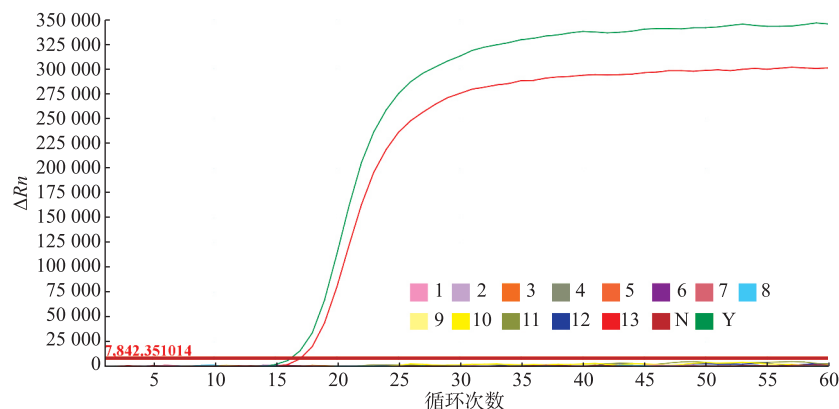
提取含有胡萝卜质量分数为 10%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%和 0.001%样品的 DNA, 分别进行恒温扩增, 结果见图 2。结果显示,10%、1%、0.1%、0.05%、0.01%质量比的样品均出现典型的“S”形扩增曲线,且随着胡萝卜质量分数增加,开始出现指数扩增的时间越短,循环阈值(cycle threshold,  $C_t$ )越小,而 0.005%和 0.001%的样品未呈现典型扩增曲线,因此本检测方法对胡萝卜检测限可低至质量分数 0.01%。将新鲜胡萝卜、白萝卜样品粉碎后按比例进行均匀混合,模拟实际样本的混合情况,相对于直接对 DNA 进行梯度稀释,考虑了 DNA 提取效率的影响,因此按质量比进行灵敏度的测试,更能准确反映检测方法的技术指标。

2.3 适用性试验

提取不同品系的 7 种胡萝卜种子的 DNA,按

照 1.2.3 的方法,对 7 个样本进行检测,结果见图 3。实验数据表明,7 个样本均获得典型的荧光扩增曲

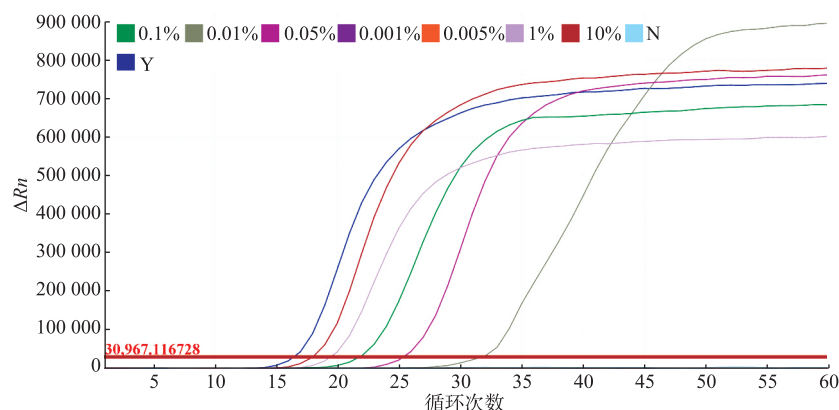
线,说明建立的方法能检测出不同品系的胡萝卜,方法实用性良好。



Y 阳性;1-12 为:大米、大豆、玉米、芹菜、白菜、韭菜、核桃、花生、白萝卜、青萝卜、心里美萝卜、水果萝卜;13:胡萝卜;N:阴性对照。

图 1 胡萝卜恒温实时荧光特异性扩增结果

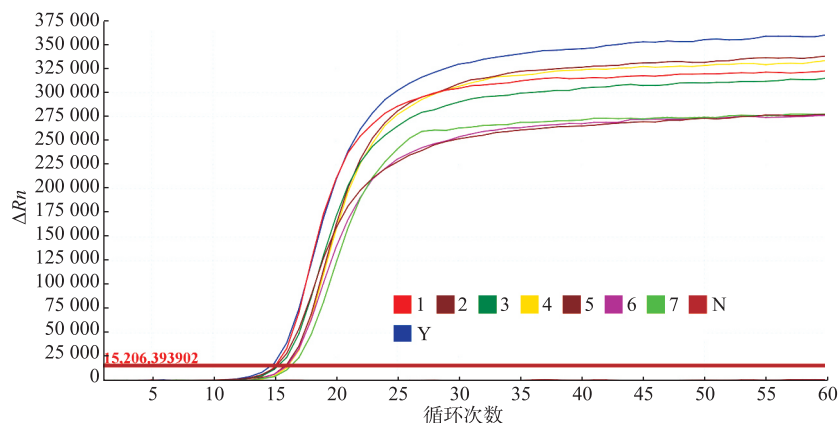
Fig. 1 Results of real-time fluorescence isothermal specific amplification of carrot and others



Y:阳性对照;1~7:10%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001%;N:阴性对照。

图 2 胡萝卜恒温实时荧光灵敏度检测扩增结果

Fig. 2 Results of real-time fluorescence isothermal sensitivity amplification of carrot



Y 阳性对照;1-7 为豫丰红笋 908、新红秀胡萝卜、农大红芯胡萝卜、红龙特级三红七寸参、韩红参王九寸红、改良八寸红;N 阴性对照。

图 3 不同品系胡萝卜的恒温实时荧光检测扩增结果

Fig. 3 Amplification results of different cultivars of carrot by isothermal real-time fluorescence amplification



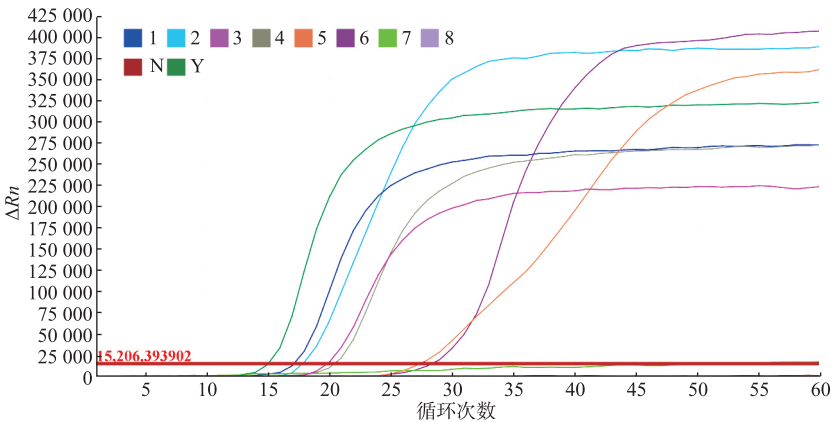
2.4 实际样本检测

采用恒温荧光扩增方法对抽检的 7 种预包装食品,其中 5 种是婴幼儿辅助食品的样本进行胡萝卜成分检测,检测结果和扩增曲线见表 3 和图 4。7 种食品中有 6 种检出胡萝卜源,标签标识有胡萝卜成分的食品均有检出,与配料表中胡萝卜成分标识结果一致,表明作者建立的恒温扩增方法可用于实际样本尤其是婴幼儿辅助食品中胡萝卜成分的检测,结果准确可靠。

表 3 实际样品的恒温扩增结果

Table 3 Results of isothermal amplification of actual samples

样品编号	样品名称	标示是否含有胡萝卜	检测结果
1	牛肉胡萝卜粥	是	检出
2	婴幼儿营养小米胡萝卜米粉	是	检出
3	胡萝卜苹果泥	是	检出
4	思念胡萝卜饺子	是	检出
5	鲜邦胡萝卜面条	是	检出
6	农夫果园混合果蔬汁饮料	是	检出
7	有机营养米粉	否	未检出



Y 阳性对照;1~7 为胡萝卜苹果泥、婴幼儿营养小米胡萝卜米粉、思念胡萝卜饺子、鲜邦胡萝卜面条、牛肉胡萝卜粥、农夫果园混合果蔬汁饮料、有机营养米粉;N 阴性对照。

图 4 不同预包装食品的胡萝卜恒温实时荧光扩增结果

Fig. 4 Results of isothermal real-time fluorescence amplification of carrots from different pre-packaged foods

3 结 语

作者设计了胡萝卜成分恒温荧光 PCR 法快速检测的特异性引物和反应体系,使用多种不同植物物种进行特异性验证,证实了该方法具有较高的特异性,且可在 1 h 内检测低至质量分数 0.01%的胡萝卜成分,方法灵敏度较高,采用多种不同品系胡萝卜进行适用性验证,适用性广泛且结果准确。同时对多种不同种类的预包装食品尤其是婴幼儿辅助食品进行验证,证明该方法对成分复杂、加工程

度不同的市售食品中胡萝卜成分的实际检测亦有较好的适用性。

作者利用恒温实时荧光 PCR 技术,建立的胡萝卜成分快速检测的新方法,集恒温扩增、实时荧光检测、智能数据判读及实时数据同步等优势,将样品中存在的微量胡萝卜核酸,扩大转化为设备可读的荧光信号,快速检测婴幼儿辅助食品中的胡萝卜成分,为婴幼儿辅助食品的标签规范管理及过敏原成分检测提供了依据。

参考文献:

[ 1 ] 阮婉贞. 胡萝卜的营养成分及保健功能[J]. 中国食物与营养,2007,13(6):51-53.  
RUAN W Z. Nutritional components and health care functions of carrots[J]. Food and Nutrition in China,2007,13(6):51-53.  
(in Chinese)  
[ 2 ] 王鹏,王文亮. 胡萝卜的保健功能及其食品开发前景[J]. 农产品加工(学刊),2009(12):54-56.

- WANG P, WANG W L. The healthy protection of carrot and the development prospects of food[J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2009(12):54-56. (in Chinese)
- [3] 陈瑞娟, 毕金峰, 陈芹芹, 等. 胡萝卜的营养功能、加工及其综合利用研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(10):201-206.  
CHEN R J, BI J F, CHEN Q Q, et al. Research status nutritional and healthy function of carrot and its processing and comprehensive utilization[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2013, 39(10):201-206. (in Chinese)
- [4] 杨文智, 李斌, 马力. 研究婴幼儿辅助食品胡萝卜泥加工工艺和配方[J]. 中外食品工业, 2014(11):1-3.  
YANG W Z, LI B, MA L. , 2014(11):1-3. (in Chinese)
- [5] ZAGON J, JANSEN B, KNOPPIK M, et al. Gene transcription analysis of carrot allergens by relative quantification with single and duplex reverse transcription real-time PCR[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2010, 396(1):483-493.
- [6] 亚运会食品安全食品过敏原标识标注. DBJ 440100/T 28-2009.
- [7] 王丽, 王念蓉. 伴或不伴食物过敏湿疹患儿治疗前后的生活质量比较[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(10):726-729.  
WANG L, WANG N R. Comparison of the quality of life before and after treatment of eczema in infants with or without food allergies[J]. **Journal of Clinical Pediatrics**, 2016, 34(10):726-729. (in Chinese)
- [8] 王怀珍, 梁红霞, 陈永云. 食物依赖运动诱发过敏性休克 1 例[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(34):11-13.  
WANG H Z, LIANG H X, CHEN Y Y. Anaphylactic shock induced by food-dependent exercise: a case report[J]. **Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use**, 2013, 6(34):11-13. (in Chinese)
- [9] 杨小军, 杨军平, 魏志勇, 等. 南昌市过敏性疾病患者血清过敏原特异性 IgE 分布的调查分析[J]. 南昌大学学报(医学版), 2016, 56(6):74-76.  
YANG X J, YANG J P, WEI Z Y, et al. Distribution of serum allergen-specific IgE in patients with allergic diseases in Nanchang [J]. **Journal of Nanchang University (Medical Sciences)**, 2016, 56(6):74-76. (in Chinese)
- [10] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. **Nucleic Acids Research**, 2000, 28(12):e63.
- [11] 张文敏, 石育娇, 戚成, 等. 恒温实时荧光法快速检测不同样品中的单增李斯特菌[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5):44-50.  
ZHANG W M, SHI Y J, QI C, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different samples by real time fluorescence isothermal amplification[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2019, 38(5):44-50. (in Chinese)
- [12] 王彦人, 焦敬波, 张钧森, 等. LAMP 在阪崎克罗诺杆菌检测中的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(2):1-7.  
WANG Y R, JIAO J B, ZHANG J S, et al. Progress of loop-mediated isothermal amplification in detection of *Cronobacter sakazakii*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(2):1-7. (in Chinese)
- [13] 吴潇, 吕贝贝, 蒋玮, 等. 环介导等温扩增技术在鸭源成分检测中的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(8):126-133.  
WU X, LV B B, JIANG W, et al. Rapid detection technique of duck-derived components in beef and sheep products by LAMP[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2019, 38(8):126-133. (in Chinese)