

花生过敏原及其检测方法研究进展

洪宇伟¹, 陈启², 张京顺², 任一平^{1,2*}

(1. 浙江工业大学, 杭州 310014; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要: 花生过敏可导致某些人群严重的食品安全问题。过敏患者只能通过避免食用含有花生过敏原成分的食物来避免过敏。但是, 食品在生产加工、储存、运输、销售过程中有可能被过敏原污染。因此, 确定各类加工食品中是否含有花生过敏原成分, 对于预防食用者发生花生过敏反应具有重要意义。花生中已确定的过敏原蛋白有13种(Ara h 1~Ara h 13)。本文综述了花生中过敏原蛋白的结构信息, 当前流行的提取方法, 以及各种定性定量的检测方法, 总结了各种方法的优缺点。同时对建立一种具有特异性强、灵敏度高、定量准确的花生致敏蛋白检测方法的发展趋势进行了展望。

关键词: 花生过敏原; 总蛋白提取; PCR法; ELISA法; 质谱法; 蛋白质组学; 液质联用技术

Research progress of peanut allergens and its detection methods

HONG Yu-Wei¹, CHEN Qi², ZHANG Jing-Shun², REN Yi-Ping^{1,2*}

(1. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: Peanut allergy represents an important food safety issue because of the potential lethal effects. The only effective treatment is to avoid eating allergen foods. However, during the process of manufacture, machining, storing, transporting and selling, foods may be unintentionally contaminated by food allergens. Therefore, it is of great significance to quantify the amount of peanut allergens in a food for preventing the anaphylaxis. Thirteen potentially important allergens of peanut have been identified to date, assigned as Ara h 1~Ara h 13, respectively. This article summarized the structural information of peanut allergens and several popular extraction methods. At the same time, various qualitative and quantitative methods to determine the peanut allergens in foods were described in detail. At last, the trend of development in establishing a specific, sensitive and accurate method was prospected.

KEY WORDS: peanut allergens; extraction of protein; PCR; ELISA; mass spectrometry; proteomics; liquid chromatography-mass spectrometry

1 引言

食物过敏已经成为威胁人类身体健康的原因之一。在发达国家, 1%~2%成年人和4%~8%的儿童对食物发生过敏^[1-3]。联合国粮食与农业组织(FAO)1995年公布了8种常见的过敏食物, 分别为牛奶、鸡蛋、大豆、花生、小麦、坚

果类(包括核桃、榛子、杏仁、腰果、山核桃和开心果等)、鱼及甲壳类^[4], 它们引起90%以上的食物过敏反应。食物过敏症状主要有皮肤红肿、呕吐、腹泻、哮喘等, 严重的甚至会导致过敏性休克和过敏性死亡^[5,6]。因此, 欧盟、美国等发达国家为了保护消费者, 强制要求食品包装标签中标识过敏原成分^[7,8]。而我国于2012年4月20

*通讯作者: 任一平, 高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术, 食品安全检测技术。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

日实施的国家标准 GB7718.2011《预包装食品标签通则》中也增加了在含有致敏成分食品包装上推荐注明标示的条款^[9]。但是, 国际上至今还未见对食品中主要过敏原颁布统一限量规定的相关文件^[10]。国际上普遍认为食品过敏原的检测方法的定量限应该满足 1~10 mg 蛋白质/kg 的限量要求^[11-13]。

作为一种常见的过敏原食物, 花生引起的过敏占食物过敏的 1%~20%^[14-16]。花生过敏反应在儿童群体中的发病率较高^[17-19]。在 2001 年, 美国开展了一项关于儿童食品过敏的调查, 发现对花生过敏的儿童占了总过敏人群的 68%^[20]。2003 年至 2005 年期间, 英国的一项针对入学儿童的调查表明有 2.8% 的儿童对花生过敏^[21]。2008 年, 在深圳进行的一项常见食物致敏原调查中, 儿童对花生过敏达到了 6.44%, 已经成为继牛奶、鸡蛋、小麦、虾等致敏原之后, 最为常见的食源性致敏原之一^[22]。目前, 国际过敏原命名委员会已公布并命名了 13 种花生致敏蛋白^[23](见表 1)。其中, Ara h 1 和 Ara h 2 是最主要的致敏原, 其含量分别占花生总蛋白含量的 12%~16%和 5.9%~9.3%^[30]。90% 以上的过敏患者血清都能对其识别^[24,25]。

2 关于花生过敏原

花生是一种营养丰富且深受人们喜爱的常见食物, 含水约 7.5%, 脂肪约 50%, 蛋白质约 24%~36%, 碳水化合物约 10%~23%以及丰富的维生素与矿物质^[26,27]。

2.1 花生蛋白

花生蛋白主要为花生的萌发提供能量与营养。该类蛋白糖基化以及磷酸化程度较高, 其碳水化合物含量为 3.89%, 磷含量为 0.19%, 氮含量为 13.99%, 凯氏定氮系数为 5.46^[28]。花生蛋白种类繁多, 其主要成分为清蛋白和球蛋白, 分别占了 10%和 90%^[29]。球蛋白主要包括花生球蛋白(14S, 类似于 11S 大豆球蛋白)、伴花生球蛋白 I(7.8S, 类似于 7S 豌豆球蛋白)和伴花生球蛋白 II(2S)^[29]。

2.2 花生过敏原

Ara h 1 能被 90% 以上花生过敏患者血清所识别^[24]。Ara h 1 约占花生蛋白总量的 12%~16%^[30], 在天然状态下主要是以单聚体和三聚体形式存在的可溶性蛋白, 该两种存在形式的 Ara h 1 都能用 Tris 缓冲溶液提取, 并且在 NaCl 溶液中保持稳定^[31]。根据 Van Boxtel E.L.等^[32]的研究, 除了单聚体和三聚体外, Ara h 1 可以通过离子键形成更复杂的多聚体结构。Ara h 1 的三聚体结构稳定耐胃肠道消化^[31], 所以 Ara h 1 的 IgE 结合位点不易被破坏, 会引起过敏反应。加热不易改变 Ara h 1 的过敏性^[33]。另外, Cabanos 等^[34]的研究也证实了 Ara h 1 具有稳定的三聚体结构, 并在文章中进一步详细介绍了该空间结构。Ara h 1 包含 23 个线性 IgE 结合位点^[35](见表 1)。

Ara h 2 能被 90% 以上花生过敏患者血清所识别^[25]。Ara h 2 约占花生蛋白总量的 5.9~9.3%^[30]。Ara h 2 包含两种遗传变异体, 分别被命名为 Ara h 2.01^[36]与 Ara h 2.02^[37], 分子量分别为 18 kDa 和 16.7 kDa。与 Ara h 2.01 相比, Ara h 2.02 在 72~83 号位点上缺失了一条长度为 12 个氨基酸的序列。Ara h 2 稳定性高、耐酶解。主要原因是 Ara h 2 含有大量二硫键, 用以保持其结构稳定。在破坏二硫键的情况下, 可以大大增加其水解敏感性^[38,39]。Ara h 2 具有典型的胰蛋白酶抑制剂的结构, 并且经过烘烤处理后, Ara h 2 蛋白的抑制剂活性被显著提高, 但是通过破坏其二硫键, 可以降低它的抑制剂活性^[40]。而且 Ara h 2 与 Ara h 1、Ara h 3 会引起 IgE 交叉反应^[41]。包含 10 个线性 IgE 结合位点^[42](见表 1)。

Ara h 3 具有低聚态稳定结构^[43], 含有两个遗传变异体, 分别被命名为 Ara h 3.01 和 Ara h 3.02。Ara h 3.01 可被 44% 以上花生过敏患者血清所识别^[44]。Ara h 3.01 在天然状态下是一个分子量达到 300 kDa 以上的六聚体蛋白聚合物, 可降解为一系列分子量为 60 kDa 的亚基^[45]。Ara h 3.02 在 2010 年前被命名为 Ara h 4。后来通过比对两者蛋白质一级结构序列发现它们有 93.9% 的相同氨基酸序列^[46], 因此, 它们被认为是同源过敏原, 原命名法 Ara h 4 被取消。Ara h 3.02 能被 53% 以上花生过敏患者血清所识别^[47]。据 Dodo 等^[46]对 cDNA 的研究分析发现, Ara h 3.01 和 Ara h 3.02 与蛋白酶抑制剂的结构相似, 推测 Ara h 3.01 和 Ara h 3.02 具有蛋白酶抑制剂活性。Ara h 3.01 和 Ara h 3.02 中包括 4 个相同的线性 IgE 结合位点^[44](见表 1)。

与前 3 种花生过敏蛋白相比较, 后 9 种花生过敏原研究较少, 信息不完善。其中, Ara h 5 是抑制蛋白家族(profilin)中的一种结构蛋白, 用于控制肌动蛋白的聚合作用^[48]。Ara h 5 的三维空间结构与 Hev b 8、Bet v 2 的相似^[49]; Ara h 6 属于 2S 白蛋白, 在花生中含量很低, 其与 Ara h 2 有 59% 的同源性, 而且热稳定性好, 耐酶解^[50-52]; Ara h 7 含量极低, 也属于 2S 白蛋白, 与 Ara h 2 蛋白氨基酸序列有 35% 的相似度^[46], 且含有 2 种遗传变异体, 分别命名为 Ara h 7.01 和 Ara h 7.02^[53], 两者序列具有 70.8% 的相似度, 自 126 号位点开始区别较大; Ara h 8 热稳定性差, 不耐酶解^[54], 也有两种遗传变异体, 分别命名为 Ara h 8.01 和 Ara h 8.02, 具有 52.5% 的相似度, 61~119 号位点区别较大。Ara h 9 是一种非特异性的脂转运蛋白(nsLTP, nonspecific lipid transfer protein)^[55], 耐酶解、耐高温^[56], 具有两种遗传变异体, 分别命名为 Ara h 9.01 和 Ara h 9.02, 具有 71.5% 的相似度, 1~27 号位点区别较大。Ara h 10 和 Ara h 11 属于油质蛋白, 主要来自花生油脂中^[57]。Ara h 10 有两种遗传变异体, 分别命名为 Ara h 10.01 和 Ara h 10.02, 具有 86.9% 的相似度, 自 150 号位点以后区别较大。Ara h 12 和 Ara h 13 属于防卫素。

表 1 花生过敏原
Table 1 Peanut allergens

名称	种属	分子质量(SDS-PAGE)	异构体	等电点	IgE 结合位点
Ara h 1	Cupin (Vicillin-type, 7S globulin)	64 kDa		5.4	25-34, 48-57, 65-74, 89-98, 97-105, 97-105, 107-116, 123-132, 134-143, 143-152, 294-303, 311-320, 325-334, 344-353, 393-402, 409-418, 461-470, 498-507, 525-534, 539-548, 551-560, 559-568, 578-587
Ara h 2	Conglutin (2S albumin)	17 kDa	Ara h 2.01 Ara h 2.02	5.7 5.7	15-24, 21-30, 27-36, 39-48, 49-58, 57-66 67-74, 115-124, 127-136, 143-152
Ara h 3.01	Cupin (Legumin-type, 11S globulin, Glycinin)	58 kDa		5.5	33-47, 240-254 279-293, 303-317
Ara h 3.02	Cupin (Legumin-type, 11S globulin, Glycinin)	61 kDa		4.6	
Ara h 5	Profilin	15 kDa		5.2	
Ara h 6	Conglutin (2S albumin)	15 kDa		5.6	
Ara h 7	Conglutin (2S albumin)	15 kDa	Ara h 7.01 Ara h 7.02		
Ara h 8	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	17 kDa	Ara h 8.01 Ara h 8.02		
Ara h 9	Nonspecific lipid-transfer protein	9.8 kDa	Ara h 9.01 Ara h 9.02		
Ara h 10	16 kDa oleosin	16 kDa	Ara h 10.0101 Ara h 10.0102		
Ara h 11	14 kDa oleosin	14 kDa			
Ara h 12	Defensin	8 kDa、12 kDa、 5.184 kDa			
Ara h 13	Defensin	8 kDa、11 kDa、 5.472 kDa			

3 花生总蛋白的提取

一个高效、可靠的蛋白提取方法是建立食物过敏原检测方法的前提。然而，食品加工过程中，尤其加热过程会使蛋白质变性，降低蛋白质的溶解度^[58]，复杂的食品基质会影响蛋白质的提取效率^[59]，如食品基质中的丹宁酸与蛋白质通过氢键结合在一起，使蛋白质的提取变得更为困难。因此，选择合适的提取方法显得尤为重要。Poms 等^[60]比较了 11 种提取缓冲液和 6 种商用提取缓冲液的提取效果。实验结果表明花生蛋白提取效果主要受缓冲溶液的 pH 影响，最佳 pH 范围为 8~11。在缓冲液中加入 6 mmol/L 尿素可以提高花生蛋白的提取效率，但是会使蛋白质变性。同时研

究发现，花生经过烘烤或油炸加工后，花生蛋白的提取效率降低 50%~80%。Koppelman 等^[30]使用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 从花生中提取蛋白，提取效率约为 62%~93%。Chassaigne 等^[61]采用两步提取法提取非变性花生致敏蛋白。首先用 TBS 缓冲液(20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)粗提取，然后用甲醇/水(20:80)去脂纯化，提取的非变性蛋白占总蛋白的 25%~36%。但是这些方法同样不能完全把非变性蛋白和变性蛋白提取出来，而且有些提取方法在提取过程中会使非变性蛋白变性，所以是否能设计一个方法，可以不通过提取步骤直接检测致敏蛋白，省去蛋白提取步骤，如样品悬浊液酶切法，将样品不经过蛋白提取步直接酶切后用于质谱检测。

4 花生过敏原的检测方法

检测食物中花生过敏原成分主要有 2 类方法: (1) 基于过敏原基因残留检测的方法, 如聚合酶链式反应(PCR); (2) 基于致敏蛋白检测的方法, 如酶联免疫吸附法(ELISA)、表面等离子共振法(SPR)、质谱法。

4.1 PCR 法

PCR 是一种以检测 DNA/RNA 为基础的方法。该方法较早地被应用于过敏原的检测。目前, 传统 PCR 和 Real-time PCR 已经广泛应用于国内外食品中花生过敏原成分的检测, 具有高灵敏度、特异性强等优点^[62]。在食品工业加工过程中经常采用加热处理方法, 会使致敏蛋白结构被破坏^[60]。而花生过敏原基因 DNA 即使经高温长时间处理, 也仍能保持一定的完整性。相比于检测花生过敏原蛋白成分的方法, 检测花生过敏原基因 DNA 的残留就显得更加可靠^[62]。López-Calleja 等^[63]采用 Real-time PCR 技术扩增花生过敏原 Ara h 2 的基因片段, 该方法的检测限为 10 mg/kg。Stephan 和 Vieths^[64]采用类似的 Real-time PCR 技术, 检测限可达 2 mg/kg。Koppel 等^[65]采用多重 PCR 技术检测 8 种常见过敏原, 其中花生过敏原的检测限可以达到 10~50 mg/kg。而国内, 陈家杰^[66]等采用套式 PCR 和荧光实时定量 PCR 两种方法检测食品中花生主要过敏原 Ara h 1 基因成分, 从而定性检测食品中是否含有花生过敏原成分。

但是, PCR 技术是基于 DNA 的检测技术, 而不直接检测致敏蛋白。现代食品工业技术可以将蛋白质与 DNA 等其他物质完全分离, 这样也给 PCR 法带来了无法逾越的困难。

4.2 ELISA 法

ELISA 法利用抗体抗原之间的特异性反应直接检测致敏蛋白。它是花生过敏原检测的常用方法之一。ELISA 法检测时间短、灵敏度高、特异性强^[62]。目前, 用于花生过敏原的检测方法有双抗夹心 ELISA 法和竞争 ELISA 法。Poms 等^[67]对市售的 5 种花生 ELISA 检测试剂盒进行了评估, 分别检测了饼干和巧克力中的花生残留, 检测限为 5~10 mg/kg。Kiening 等^[68]优化了双夹心 ELISA 法将检测限提高到 0.2~1.2 mg/kg。Schmitt 等^[69]采用竞争抑制 ELISA 法检测了花生中的主要过敏原 Ara h 1 和 Ara h 2, 检测灵敏度分别为 12 ng/mL 和 0.5 ng/mL。现在国内, 吉坤美^[70]等建立了双抗体夹心 ELISA 法测定食物中花生过敏原蛋白成分, 最低检测限为 8 ng/mL。闫飞^[71]等建立了基于花生过敏原蛋白 Ara h 6 的间接竞争酶联免疫检测法, 对食品中花生进行定量检测, 其检测限为 16.5 ng/mL, 定量检测范围为 16.5~10000 ng/mL。

但是由于加热过程会改变蛋白质的一级结构, 导致抗体无法正确识别被检测过敏原, 产生假阴性现象^[72]。此外, 采用抗原抗体技术不可避免会产生交叉反应, 导致

假阳性现象。所以 ELISA 法无法用于花生致敏蛋白的准确定量。

4.3 表面等离子共振法(SPR)

表面等离子共振(SPR)技术是基于生物芯片技术的一种新型检测方法。芯片表面会与待分析物结合, 导致折射率发生变化, 其折射率的变化和结合的待分析物质量成正比, 利用此原理可建立定量检测方法^[73]。SPR 也采用了抗原抗体技术, 继承了 ELISA 法特异性强、灵敏度高的优点; 同时与 ELISA 法相比, SPR 法采用了自动化进样过程, 提高了该方法的再现性。该法不需要在抗体上耦合标记物, 即可达到与 ELISA 法相似的灵敏度。目前, SPR 技术主要应用于检测生物分子相互作用的研究^[74]、临床医学诊断^[75]、小分子物质的检测^[76]以及过敏原检测。Polleta 等^[77]结合 SPR 法与纳米磁珠抗体提取技术, 快速准确检测巧克力中花生过敏原 Ara h 1, 其检测限在 0.09 µg/mL。

由于同样采用抗体抗原技术, SPR 法具有与 ELISA 法相类似的假阳性、假阴性等缺点。

4.4 仪器法

利用仪器法检测致敏蛋白的文献数量并不多, 主要原因为标准品缺乏。在无法获得标准品的情况下, 利用传统的仪器法无法建立定量和定性检测方法。

除此之外, 传统的蛋白质分离手段主要有液相色谱法^[78]和毛细管电泳法^[79,80]。但是花生蛋白质之间的理化性质较为接近, 采取上述方法无法使蛋白质之间达到基线分离^[79], 甚至一些极为相似的蛋白质根本无法分离^[81]。由于蛋白质在氨基酸序列上存在天然变异, 各遗传变异体的保留时间不同, 产生多重峰的现象, 增加了检测难度^[78]。液相色谱法和毛细管电泳法常用紫外检测器在波长 280 nm 处检测。在此波长下不但所有蛋白质都有吸收, 而且基质中的干扰物质也会吸收。所以上述方法特异性差, 灵敏度低, 检测限只能达到 5~15 µg/mL^[78]。因此, 此方法不适用于检测食品基质中微量或痕量致敏蛋白。

利用 ESI-单四级杆质谱检测器可以部分解决上述问题。质谱检测器利用不同蛋白质的质荷比差异, 可以将液相无法分离的蛋白质通过质谱检测器进行区分^[82,83]。蛋白质在通过电喷雾电离后主要呈现多电荷分布, 其电荷分布情况与流动相 pH、仪器等因素有关。选择一种或者几种质荷比进行检测是当今学术界争论的焦点, 如 Chen 等^[84]采用 HPLC-MS 测定山羊奶中掺假牛奶, 选择了丰度最高的质荷比进行检测。Monaci 等^[85]利用液质联用法测定果汁中的乳清蛋白, 针对多个丰度较高的质荷比进行检测, 检测限可达 1 µg/mL。

因为质谱的离子化效率易受到基质干扰, 所以必须采用内标法以获得更为准确的检测结果。理论上, 最适合的内标是同位素标记的蛋白质, 但是由于现有技术限制, 无法获得由同位素标记的完整蛋白。因此, 有研究者尝试

利用同一蛋白在不同物种的遗传变异体作为内标。Ren 等^[82]建立了超高效液相色谱-质谱联用法用于检测婴幼儿配方奶粉中的牛 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量,他们选择了与其高度相似的人 α -乳白蛋白作为内标检测定量限为 0.15~0.19 $\mu\text{g/mL}$,回收率为 94.0%~98.7%。Czerwenka 等^[83]检测牛奶乳制品中的 β -乳球蛋白的含量,采用羚羊和山羊奶的 β -乳球蛋白为内标。

但是在食品加工过程尤其加热过程中,蛋白质易变性,产生聚合产物和美拉德反应产物。蛋白质的变性会导致色谱、质谱行为发生变化,所以经过热处理的花生致敏蛋白无法应用以上方法进行检测^[86]。

另一种检测策略将蛋白质组学与液质联用定量检测技术结合,通过对目标蛋白进行酶切,筛选出特异性肽段,建立 MRM 定量检测方法。Heick 等^[87]利用液质联用法同时定性检测多种过敏原,其中花生的检测限为 11 mg/kg。Shefcheck 等^[88]采用液质联用法检测冰激凌中 Ara h 1 的特异性肽链,检测限达到 10 mg/kg。随后 Shefcheck 等^[89]通过优化蛋白提取过程,将黑巧克力中 Ara h 1 检测限降低至 2 mg/kg。

在内标的选择方面,各个小组都选择了不同的物质作为内标。Careri 等使用亮氨酸-脑啡肽作为内标,定量检测巧克力^[90]与早餐食品^[91]中花生致敏蛋白 Ara h 2、Ara h 3,其定量限为 3~14 mg/kg。Zhang 等^[86]建立了对婴幼儿配方奶粉中牛 α -乳白蛋白的 MRM 方式定量检测方法,其定量限达到 1 mg/kg。他将特异多肽序列修改后人工合成,作为内标使用。与亮氨酸-脑啡肽相比,该内标的理化性质更为接近特异多肽,并且参与酶解过程,可用于校正前处理中与离子化过程中的不稳定性。此外,该研究还证实了利用此方法能同时检测变性与非变性蛋白质。Lutter 等^[92]建立了对食品中牛奶蛋白的 SRM 方式检测方法,其定量限能达到 2 mg/kg。该方法利用稳定同位素标记的氨基酸按照特异肽序列合成了内标,在预处理结束后加入样品中用以校正质谱离子化的不稳定性。该内标与 Zhang 等的内标相比在离子化过程中起到更好的校正效果,但是不参与酶解过程,无法对前处理的不稳定性进行校正。随后, Zhang 等^[93]在 Lutter 等方法的基础上,设计了同位素标记的长多肽作为内标。该多肽以同位素标记的特异肽序列为基础,根据乳铁蛋白的序列,向氮端和碳端各延长了 6~8 个氨基酸。该多肽在酶切后可形成同位素标记的特异肽,所以它不但能对离子化过程进行校正,而且能校正基质对酶切过程造成的干扰,使建立的方法较之前的方法更加准确可靠。由此可见液质联用检测技术是分析过敏原蛋白的有效新方法。

5 总 结

经济的发展,生态环境的恶化,人为新物种的培育等

原因,导致了过敏原的增加,过敏患者不断增加。而现代化食品种植、加工技术的发展,促使食品生产工艺复杂化、种类多样化、易交叉污染等,增加了致敏物质污染的可能性,而且同时增加了致敏物质检测的困难度。本文综述了多种基于蛋白质和 DNA 检测的花生致敏物质检测方法。这些方法或多或少存在着不足,使得定量结果准确度欠佳。如现在的食品加工工艺完全能做到将食品中花生过敏原的 DNA 基因片段分离除去,使 PCR 法无法准确检测该食品中含有的花生过敏原。而食品加工工艺,如加热等过程,经常会破坏花生致敏蛋白的一级结构,使 ELISA 法和表面等离子共振法的检测结果出现假阴性。另外,其他一些仪器法检测方法也存在无法检测热变性蛋白的局限性。因此,建立一个既能直接检测致敏蛋白又能检测变性蛋白的检测方法用于食品中的花生过敏原的定量测定无疑是非常必要的。针对上述问题,蛋白质组学结合液质联用法无疑是一个在未来具有巨大发展潜力的方法。如选择样品悬浊液酶切,省去蛋白提取步骤,可以解决变性蛋白提取效率低的问题;该方法检测目标蛋白酶切产生的特异性肽段,能直接检测目标蛋白和变性蛋白;选择以同位素标记的特异性肽段作为内标,可以解决其基质干扰所带来的一系列问题。此外,该方法还具有特异性强、灵敏度高、定量准确等优势,因此该方法有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103(5): 717-728.
- [2] Jansen JJ, Kardinaal AF, Huijbers G, *et al*. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 93(2): 446-456.
- [3] Mills ENC, Mackie AR, Burney P, *et al*. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe [J]. *Allergy*, 2007, 62(7): 717-722.
- [4] FAO technical consultation on food allergens. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995
- [5] Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents [J]. *N Engl J Med*, 1992, 327(6): 380-384.
- [6] Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children [J]. *Pediatrics*, 1998, 102(1): e6-e6.
- [7] European Union. Directive 2003/89/EC.
http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_308/l_30820031125en0015-0018.pdf, 2003.
- [8] U.S. Food and Drug Administration. Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (Public Law 108-282, Title II).
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm106187.htm>
- [9] G7718-2011 食品安全国家标准预包装食品标签通则[S].
G7718-2011 National food safety standards of pre-packaged food labels general [S].
- [10] Remington BC, *et al*. Quantitative risk assessment of foods containing

- peanut advisory labeling. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62: 179–187.
- [11] Pedreschi R, Nørgaard J, Maquet A. Current Challenges in Detecting Food Allergens by Shotgun and Targeted Proteomic Approaches: A Case Study on Traces of Peanut Allergens in Baked Cookies [J]. *Nutrients*, 2012, (4): 132–150.
- [12] Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, *et al.* The range of minimum provoking doses in hazelnut-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges [J]. *Clin Exp Allergy*, 2002, 32(12): 1757–1762.
- [13] Hourihane JOB, Kilburn SA, Nordlee JA, *et al.* An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 1997, 100(5): 596–600.
- [14] Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF. How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland [J]. *Arch Dis Child*, 2002, 86(4): 236–9.
- [15] Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, *et al.* Population study of food allergy in France [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2001, 108(1): 133–140.
- [16] Emmett SE, Angus FJ, Fry JS, *et al.* Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members [J]. *Allergy*, 1999, 54(4): 380–385.
- [17] Grundy J, Matthews S, Bateman B, Dean T, *et al.* Rising prevalence of allergy to peanut in children: data from 2 sequential cohorts [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2002, 110(5): 784–789.
- [18] Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, *et al.* Clinical characteristics of peanut allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 1997, 27(6): 634–639.
- [19] Sicherer SH, Furlong TJ, Munoz-Furlong A, *et al.* Avoluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2001, 108(1): 128–132.
- [20] Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Burks A, *et al.* Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 1999, 103(4): 559–562.
- [21] Hourihane JOB, Aiken R, Briggs R, *et al.* The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in United Kingdom children at school entry [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2007, 119(5): 1197–1202.
- [22] 刘萍, 吴海强, 郑跃杰, 等. 儿童过敏患者致敏原筛查及相关因素分析 [J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(7): 806–807.
- Liu P, Hu HQ, Zheng YJ, *et al.* Allergen screening and its correlated factor analysis among 2276 allergic children [J]. *Chin J Publ Health*, 2008, 24(7): 806–807.
- [23] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2013.11.07, <http://www.allergen.org/>
- [24] Burks AW, Cockrell G, Stanley JS, *et al.* Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(4): 1715.
- [25] Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, *et al.* Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut - allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(4): 583–590.
- [26] Hoffpauir CL. Peanut composition, relation to processing and utilization [J]. *J Agric Food Chem*, 1953, 1(10): 668–671.
- [27] Grosso NR, Guzman CA. Chemical composition of aboriginal peanut (*Arachis hypogaea L.*) seeds from Peru [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(1): 102–105.
- [28] Monteiro, PV, Prakash V. Effect of proteases on arachin, conarachin I, and conarachin II from peanut (*Arachis hypogaea L.*) [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(2): 268–273.
- [29] Lusas EW. Food uses of peanut protein [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1979, 56(3): 425–430.
- [30] Koppelman SJ, Vlooswijk RAA, Knippels LMJ, *et al.* Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world [J]. *Allergy*, 2001, 56(2): 132–137.
- [31] Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, *et al.* Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5844–5849.
- [32] Van Boxtel EL, van Beers MM, Koppelman SJ, *et al.* Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(19): 7180–7186.
- [33] Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CA, Hessing M *et al.* Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(8): 4770–4777.
- [34] Cabanos C, Urabe H, Tandang-Silvas M R, *et al.* Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1 [J]. *Mol Immunol*, 2011, 49 (1–2):115–123.
- [35] Burks A, Shin D, Cockrell G, *et al.* Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 245(2): 334–339.
- [36] Burks A, Williams LW, Connaughton C, *et al.* Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 90(6): 962–969.
- [37] Chatel JM, Bernard HE, Orson FM. Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003, 131(1): 14–18.
- [38] Sen M, Kopper R, Pons L, *et al.* Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes [J]. *J Immunol*, 2002, 169(2): 882–887.
- [39] Lehmann K, Schweimer K, Reese G, *et al.* Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions [J]. *Biochem J*, 2006, 395: 463–472.
- [40] Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, *et al.* The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(1): 190–195.
- [41] Bublin M, Kostadinova M, Radauer C, *et al.* IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and the nonhomologous allergens Ara h 1 and Ara h 3 [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2013, 132(1): 118–124.
- [42] Stanley JS, King N, Burks A, *et al.* Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE Binding Epitopes of the Major Peanut Allergen Ara h 2 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 342(2): 244–253.
- [43] Yusnawan E, Marquis CP, Alice LN *et al.* Purification and characterization of Ara h1 and Ara h3 from four peanut market types revealed higher order oligomeric structures [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(41):10352–10358.

- [44] Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, *et al.* Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3 [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(4): 535–542.
- [45] Jin T, Guo F, Chen YW, *et al.* Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(8): 1796–1804.
- [46] Dodo HW, Viquez OM, Maleki SJ, *et al.* cDNA clone of a putative peanut (*Arachis hypogaea* L.) trypsin inhibitor has homology with peanut allergens Ara h 3 and Ara h 4 [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(5): 1404–1409.
- [47] Viquez OM, Konan KN, Dodo HW. Genomic organization of peanut allergen gene, Ara h 3 [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(12): 1235–1240.
- [48] Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, *et al.* Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells [J]. *J Mol Biol*, 1977, 115(3): 465–483.
- [49] Wang Y, Fu TJ, Howard A, *et al.* Crystal structure of peanut (*arachis hypogaea*) allergen Ara h 5 [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(7): 1573–1578.
- [50] Suhr M, Wicklein D, Lepp U, *et al.* Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(5): 390–399.
- [51] Koppelman SJ, De Jong GAH, Laaper-Ertmann M, *et al.* Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2 [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(4): 490–497.
- [52] Chen X, Wang Q, El-Mezayen R, *et al.* Ara h 2 and Ara h 6 have similar allergenic activity and are substantially redundant [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 160(3): 251–258.
- [53] Schmidt H, Krause S, Gelhaus C, *et al.* Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of the 2S albumin family [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3701–3709.
- [54] Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, *et al.* Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(6): 1410–1417.
- [55] Krause S, Reese G, Randow S, *et al.* Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a mediterranean allergic population [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(4): 771–778.
- [56] Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, *et al.* Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(2): 473–480.
- [57] Pons L, Chery C, Romano A, *et al.* The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts [J]. *Allergy*, 2002, 57(s72): 88–93.
- [58] Mondoulet L, Paty E, Drumare MF, *et al.* Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(11): 4547–4553.
- [59] Frazier RA, Papadopoulou A, Mueller-Harvey I, *et al.* Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(18): 5189–5195.
- [60] Poms RE, Capelletti C, Anklaam E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(6): 459–464.
- [61] Chassaigne H, Brohée M, Nørgaard JV, *et al.* Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis [J]. *Food Chem*, 2007, 105(4): 1671–1681.
- [62] Scaravelli E, Brohée M, Marchelli R, *et al.* The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(1): 127–137.
- [63] López-Calleja IM, la Cruz SD, Pegels N, *et al.* Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods [J]. *Food Control*, 2013, (2): 480–490.
- [64] Stephan O, Vieths S. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3754–3760.
- [65] 陈家杰, 王海燕, 梁秋妮, 等. 两种 PCR 方法检测食品中花生过敏原 Ara h 1 成分 [J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(9): 69–74.
- Chen JJ, Wang HY, Liang QN, *et al.* Development of two PCR assays to detect peanut allergen Ara h 1 DNA residue in food products [J]. *Food Res Devel*, 2011, 32(9): 69–74.
- [66] Köppel R, Dvorak V, Zimmerli F, *et al.* Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 230(3): 367–374.
- [67] Poms RE, Agazzi ME, Bau A, *et al.* Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate [J]. *Food Add Contam*, 2005, 22(2): 104–112.
- [68] Kiening M, Niessner R, Drs E, *et al.* Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3321–3327.
- [69] Schmitt DA, Cheng H, Maleki SJ, *et al.* Competitive inhibition ELISA for quantification of Ara h 1 and Ara h 2, the major allergens of peanuts [J]. *J AOAC Int*, 2004, 87(6): 1492–1497.
- [70] 吉坤美, 陈家杰, 汤慕瑾, 等. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中花生过敏原蛋白成分 [J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(6): 110–114.
- Ji KM, Chen JJ, Tang MJ, *et al.* Detection of peanut allergen protein trace in food products by sandwich-antibody enzyme linked immunosorbent assay [J]. *Food Res Devel*, 2009, 30(6): 110–114.
- [71] 闫飞, 周宁菱, 罗春萍, 等. 基于 Ara h 6 的花生间接竞争 ELISA 检测方法的建立 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(17): 303–306.
- Yan F, Zhou NL, Luo CP, *et al.* A method for detecting peanut based on Ara h 6 by indirect competitive enzyme-linked immuno sorbent assay [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(17): 303–306.
- [72] Iqbal A, Ateeq N. Effect of processing on the detectability of peanut protein by elisa [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1651–1654.
- [73] Pattnaik P. Surface plasmon resonance [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 126(2): 79–92.
- [74] Rich RL, Day YS, Morton TA, *et al.* High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE [J]. *Anal Biochem*, 2001, 296(2): 197–207.
- [75] Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, *et al.* Quantitative evaluation of adhesion of lactobacilli isolated from human intestinal tissues to human colonic mucin using surface plasmon resonance (BIACORE assay) [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102(1): 116–123.
- [76] van der Gaag B, Spath S, Dietrich H, *et al.* Biosensors and multiple

- mycotoxin analysis [J]. Food Control, 2003, 14(4): 251–254.
- [77] Pollet J, Delpont F, Janssen KPF, *et al.* Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor [J]. Talanta, 2011, 83(5): 1436–1441.
- [78] Pellegrino L, Tirelli A. A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products [J]. Int Dairy J, 2000, 10(7): 435–442.
- [79] García-Ruiz C, Torre M, Marina ML. Analysis of bovine whey proteins in soybean dairy-like products by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1999, 859(1): 77–86.
- [80] García-Ruiz C, Concepción García M, Torre M, *et al.* Characterization and quantitation of soybean proteins in commercial soybean products by capillary electrophoresis [J]. Electroph, 1999, 20(10): 2003–2012.
- [81] Ferreira IM, Mendes E, Ferreira MA. HPLC/UV analysis of proteins in dairy products using a hydrophobic interaction chromatographic column [J]. Anal Sci, 2001, 17(4): 499–501.
- [82] Ren Y, Han Z, Chu X, *et al.* Simultaneous determination of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in infant formulae by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2010, 667(1): 96–102.
- [83] Czerwenka C, Maier I, Potocnik N, *et al.* Absolute quantitation of β -lactoglobulin by protein liquid chromatography–mass spectrometry and its application to different milk products [J]. Anal Chem, 2007, 79(14): 5165–5172.
- [84] Chen RK, Chang LW, Chung YY, *et al.* Quantification of cow milk adulteration in goat milk using highperformance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(10): 1167–1171.
- [85] Monaci L, van Hengel AJ. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 2008, 1192(1): 113–120.
- [86] Zhang J, Lai S, Zhang Y, *et al.* Multiple reaction monitoring-based determination of bovine α -lactalbumin in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using tryptic signature peptides and synthetic peptide standards [J]. Anal Chim Acta, 2012, 727: 47–53.
- [87] Heick J, Fischer M, Pöpping B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(7): 938–943.
- [88] Shefcheck KJ, Musser SM. Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(10): 2785–2790.
- [89] Shefcheck KJ, Callahan JH, Musser SM. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(21): 7953–7959.
- [90] Careri M, Costa A, Elviri L, *et al.* Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h 2 and Ara h 3/4 for food control by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(6): 1901–1907.
- [91] Careri M, Elviri L, Maffini M, *et al.* Determination of peanut allergens in cereal-chocolate-based snacks: metal-tag inductively coupled plasma mass spectrometry immunoassay versus liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(6): 807–811.
- [92] Lutter P, Parisod V, Weymuth H. Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. J AOAC Int, 2011, 94.
- [93] Zhang J, Lai S, Cai Z, *et al.* Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard [J]. Anal Chim Acta, 2014, 829: 33–39.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



洪宇伟, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: pinfanjiandan1015@163.com



任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检测技术及食品安全检测技术。

E-mail: renyiping@263.net