

牛乳主要过敏原及其检测技术研究进展

党慧杰^{1,2}, 刘振民^{1*}, 郑远荣¹

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 上海乳业生物工程技术研究中心, 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 牛乳过敏是婴幼儿常见的食物过敏之一, 能引发皮肤、胃肠道或者呼吸系统方面的疾病。明确牛乳过敏原的结构及致敏机制, 并建立准确且敏感度高的检测分析方法有助于人们预防这类疾病。牛乳中常见的过敏原为酪蛋白、 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白。本文详述了这些主要过敏原蛋白的结构、致敏机制以及相关的抗体识别序列, 并结合国内外关于乳过敏原检测的相关报道, 阐述了基于蛋白质和 DNA 的牛乳过敏原检测技术, 包括 ELISA、免疫传感器、PCR 以及环介导等温扩增技术, 以及这些技术应用的优缺点, 旨在为牛乳过敏的防控和乳过敏患者的健康提供一定的理论支撑。

关键词: 牛乳; 过敏原; 检测技术; 蛋白质; DNA

Research progress of cow milk allergens and their detection techniques

DANG Hui-Jie^{1,2}, LIU Zhen-Min^{1*}, ZHENG Yuan-Rong

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: Cow milk allergy is one of the common food allergies in infants, which can cause skin, gastrointestinal or respiratory diseases. It is helpful for people to prevent this kind of disease by knowing the structure and sensitization mechanism of milk allergens and establishing accurate and sensitive detection and analysis methods. Casein, β -lactoglobulin and α -lactalbumin are common allergens in milk. This paper described the structure, sensitization mechanism and related antibody recognition sequences of these main allergens in detail. Through the research on the related researches of milk allergens detection at home and abroad, this review also expounded the detection technology of milk protein allergen based on protein and DNA, including ELISA, immunosensors, PCR, and loop-mediated isothermal amplification techniques, as well as the advantages and disadvantages of these techniques, in order to provide essential supports for cow milk allergy control and ensure the health of those people suffering from milk allergy.

KEY WORDS: cow milk; allergen; detection technology; protein; DNA

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604205)、上海乳业生物工程技术研究中心项目(19DZ2281400)

Fund: Supported by National Key R&D Program of China (2018YFC1604205), Shanghai Engineering Center of Dairy Biotechnology (19DZ2281400)

*通讯作者: 刘振民, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品科学。E-mail: liuzhenmin@brightdairy.com

*Corresponding author: LIU Zhen-Min, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China. E-mail: liuzhenmin@brightdairy.com

1 引言

牛乳蛋白营养丰富,几乎含有所有的人体必需氨基酸^[1],在婴幼儿的生长发育中起关键作用^[2]。但和人乳相比,在蛋白质类型和同源性上存在较大的差异,相关的研究显示,约有 2%~7%的婴幼儿因为摄入牛乳而出现呕吐、腹泻、起红疹等食物过敏现象^[3,4]。明确牛乳蛋白的致敏机制,并避免接触这些过敏原是预防牛乳过敏的有效方法。为了保障人体的健康,发达国家均要求对食品中的过敏原信息进行标识^[5]。因此,建立准确且灵敏度高的过敏原分析方法有助于食品包装的标识,且对乳过敏人群的健康保障具有重要意义。目前,研究人员们开发了许多牛乳过敏原的检测技术,以进行牛乳过敏原的检测和防控,并取得了显著的成效。鉴于此,本文结合国内外对于乳蛋白致敏机制的研究进行分析总结,对牛乳中主要过敏原蛋白的结构、致敏表位等现状进行详细介绍,并分别从蛋白质和 DNA 2 个方面阐述乳过敏原的检测方法,主要集中在免疫化学分析技术、质谱技术、实时 PCR 方法,以及新兴的环介导等扩增方法,旨在为预防牛乳致敏提供一定的参考。

2 牛乳过敏原蛋白

食物过敏原是指食物中能够选择性激活免疫细胞,引起机体免疫系统异常反应的成分,大多为蛋白质。牛乳蛋白约占牛乳的 3%^[6],至少有 25 种不同种类,且都可能作为过敏原^[7]。它们含有可以被人体免疫系统识别的线性或构象抗原表位,当被人体摄入时,可能会被识别为“有害”物质,刺激免疫细胞产生大量抗体,主要是免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)。多余的抗体附着在肥大细胞等表面含有受体的细胞上面,等到再接触抗原时,能够刺激这些细胞释放组胺等化学物质,引发人体过敏^[8]。酪蛋白、 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin, β -LG) 和 α -乳白蛋白 (α -lactalbumin, α -LA) 是牛乳中含量较高的蛋白质,且组成和含量与人乳差别较大,是常见的牛乳过敏原。

2.1 酪蛋白

酪蛋白属于一大类分泌钙结合磷蛋白,以胶束状态存在于乳中,约占乳蛋白的 80%^[9],由位于同一染色体上的不同基因编码,被分为 α s1-、 α s2-、 β -和 κ -酪蛋白四种。人乳和牛乳中酪蛋白的结构和含量的差异是导致酪蛋白致敏的主要原因。有研究表明,乳过敏人群中大概有 65%对酪蛋白过敏^[6]。Bernard 等^[10]分离纯化了 4 种酪蛋白,并用固定化抗原的方式,用 58 名对全酪蛋白过敏的儿童的血清分别与 4 种酪蛋白进行抗原抗体反应,发现 85%的儿童对 4 种酪蛋白都存在特异性 IgE。

4 种酪蛋白的氨基酸构成已经较为清楚^[4],鉴定抗原中的 IgE 识别位点逐渐变成探究乳蛋白过敏的重要途径^[11],

大量的研究也定位了一些乳蛋白氨基酸序列的 IgE 结合区域^[12-14],甚至确定了一些 IgE 结合的关键残基^[15]。Spuerger 等^[14]利用合成肽的方法,鉴定出 α s1-酪蛋白序列上过敏性受试者产生过敏反应的三个区域,分别为 19~30 位、93~98 位以及 141~150 位,且这部分氨基酸序列位于酪蛋白的疏水区,说明了酪蛋白在人体中可经过变性或降解而增大致敏性。Chatchatee 等^[16]采用纤维素衍生膜上合成法确定了 α s1-酪蛋白上的 6 个主要 IgE 结合区,其中包含了 Spuerger 鉴定出来的三段序列,并提出持续性和暂时性牛乳过敏患者在抗原表位识别上面存在差异。Jarvinen 等^[17]在纤维素衍生膜上合成了部分乳蛋白的已知 IgE 结合的肽段,其中有 5 个和酪蛋白相关的肽段被乳过敏患者血清识别。Cerecedo 等^[12]利用肽芯片免疫分析方法研究 IgE 和 IgG 抗体与乳蛋白结合的特异性,在 4 种酪蛋白中鉴定出 8 个致敏性较强的片段,并提出,患者和正常人血清对于这些乳蛋白识别模式不同。Cong 等^[18]用血清学方法确定了 α s1-酪蛋白的 IgE 和 IgG 结合表位,并通过丙氨酸扫描分析法确定了 α s1-酪蛋白上的致敏的关键残基,为第 22 和 23 位。

各项研究由于采取的方法不同,定位到的致敏片段不同,但其中 α s1-酪蛋白氨基酸序列的第 69~178 位以及 173~194 位^[13,14,19], α s2-酪蛋白的第 171~180 位以及 191~200 位^[19,20], β -酪蛋白的第 45~50、55~70 以及 173~194 位^[12,16], κ -酪蛋白的第 13~22、34~44 位以及 155~164 位^[12,16,19]已被多项研究证实,是主要的抗原表位。

2.2 乳清蛋白

乳清蛋白占乳蛋白的 20%,主要的致敏组分为 α -LA 和 β -LG^[6]。和酪蛋白相比,乳清蛋白具有较高的二级、三级结构,而 β -LG 具有较高的四级结构。它们没有被磷酸化,并且含有分子内的二硫键^[1],球形结构特征导致其对于酸或酶水解具有一定的耐受性,能够在消化后保持某些结构的完整性,从而能够顺利的通过肠粘膜,并被人体内的免疫细胞识别,引发免疫反应,具有很高的致敏潜能^[21]。国外的研究显示,在牛乳过敏患者当中,约有 27.6%~62.8%对 α -LA^[11,12]过敏,约有 82%对 β -LG 过敏^[4]。石径等^[22]研究了我国乳过敏儿童血清中对 4 种主要乳蛋白过敏原的抗体特异性情况,发现 α -LA 和 β -LG 的特异性 IgE 阳性率分别高达 44.3%和 39.3%。

在乳清蛋白的致敏肽段的相关研究中, Jarvinen 等^[17]通过纤维素衍生膜合成法探究了 11 位牛乳过敏患者血清对于 α -LA 和 β -LG 的识别,发现了 α -LA 上的 4 个 IgE 结合区和 3 个 IgG 结合区以及 β -LG 上的 7 个 IgE 结合区和 6 个 IgG 结合区。Hochwarner 等^[23]的研究表明, α -LA 可与 66 名实验患者的 57.6%发生 IgE 抗体反应,并确定了 α -LA 上的 6 个 IgE 结合区域,包括 Jarvinen 提出的 3 个片段。之后, Li 等^[24]确定了 α -LA 上的 6 个线性 IgE 结合片段,其中有 2 个片段和前人的研究结果一致。Cong 等^[25]通过免

疫标记技术,结合丙氨酸扫描分析法鉴定出了 β -LG上的20、23和27位是IgE结合的关键氨基酸,26和31位是IgG结合关键氨基酸。并在之后的研究中^[26],又鉴定出了 α -LA上的6个IgE结合关键氨基酸,以及5个IgG结合关键氨基酸。通过对各项研究的对比分析, α -LA公认的致敏区域位于其氨基酸序列的第1-16、15-26、62-72以及93-109位^[17,23,24], β -LG的为第58-77、72-78、121-134位^[12,15,17]。而通过对这些抗原表位的识别和鉴定,可以为检测和评估乳蛋白的过敏性提供一定的依据,并且,对于开发新的降低乳蛋白致敏性的技术和方法更有针对性和高效性。

3 牛乳过敏原检测方法

牛乳及其制品在日常生活中的广泛存在,增加了过敏人群接触过敏原的风险,为了降低这种风险,人们开发了许多检测乳过敏原的方法^[27-30]。基本的原理是利用过敏蛋白和抗体之间的特异性反应,或者基于蛋白肽段之间的差异性来进行分析。分为两大类:基于过敏原蛋白质以及基于过敏原DNA的检测方法。

3.1 基于蛋白质的检测方法

基于牛乳蛋白质的检测方法原理是以目标蛋白为靶向,利用抗原抗体间的特异性反应来检测特定蛋白。分为传统免疫化学法,如酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫传感器等,和以质谱技术为代表的蛋白质组学方法。目前,免疫传感器和质谱技术在抗原的分析方面较为先进^[31]。

3.1.1 传统免疫化学法

抗体可与特定抗原特异性结合,导致机体的免疫应答,传统的免疫化学法正是基于此原理。ELISA检测食物中的过敏组分是最广泛使用的方法,通过将未知样品的光学或荧光信号与标准曲线进行比较来得到定量结果^[31]。ELISA有3种形式,即直接、间接和竞争性ELISA^[32-34]。Shi等^[35]采用竞争性ELISA法测定了乳酸菌发酵对牛乳中 α -LA、 β -LG、 α -和 β -酪蛋白含量的影响,很好地测定出4种乳蛋白在不同作用时间下的含量,显示出该方法用于检测过敏蛋白的可靠性。Luis等^[36]开发了2种ELISA方法(间接竞争和双抗体夹心法),用于检测加工食品中的 β -LG,检测限分别为0.5和0.05 mg/kg。目前,对于ELISA系统进行过敏原分析的研究主要集中在提高它的特异性和敏感性。Orcajo等^[32]基于IgE抗体和 β -LG的识别,建立并优化了一种针对加工食品中的 β -LG的免疫反应性的竞争性ELISA法,检测限小于0.2 μ g/mL。该方法可以很好的避免常规ELISA出现的交叉反应引起的检测误差。目前,由于对可快速并可靠检测食品中特定过敏原的需求的增加,各种商业的ELISA试剂盒已进入市场,它们能够快速检测特定的蛋白质。尽管不同的食品类型和加工方式会影响到检

测值,但检测限也在0.015~2 mg/L之间^[4]。虽然应用较广泛,但ELISA也有一些诸如无法检测到加热形成的不溶性蛋白、只能检测一种蛋白等局限性^[37]。

目前,较为热门的方法为生物传感器检测法,具有快速、微量检测、可重复性高等优点,并具有完全自动化的潜力。生物传感器是基于对于受体(抗体或探针)和靶分子(蛋白质或DNA)生物相互作用的直接识别,通过传感器产生可测量的信号^[38]。人们用生物传感器的技术检测不同食品基质中的过敏原,最低可以检测到11.0 pg/mL的含量^[39]。Ashley等^[40]用固相印迹法合成对牛 α -酪蛋白具有高亲和力纳米粒子,并将其结合到等离子共振传感器中,可以定量检测 α -酪蛋白,且检测限远低于ELISA试剂盒。Jiang等^[41]基于乳酪蛋白造成的肥大细胞接触抗体引起电流信号的显著变化,开发出一款新型可快速检测牛乳酪蛋白的电化学生物传感器,检测限为32 ng/mL,成本低,再现性好。

免疫测定可以检测到不用食物基质中的乳蛋白,但也存在交叉反应导致假阳性结果、食物基质干扰、食品加工干扰等缺点^[38],且对其乳蛋白消化后的免疫反应性的探究也不多见^[42]。

3.1.2 质谱技术

质谱在蛋白质组学研究中起着重要的作用,是一种分析蛋白质和多肽的有效技术,包括对食物过敏原的鉴定、表征和测定。一个完整的质谱平台包括:离子源、质量分析仪和检测器^[43],具有快速、准确、灵敏性强、特异性好和可重现等优点^[44]。其敏感性可与ELISA和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)相媲美,可一次性检测多个目标,特异性好。此外,通常与免疫检测相关的交叉反应问题也被消除,因为目标肽或者蛋白质的检测不需要与抗体相互作用,从而能够直接且明确地识别目标分析物。质谱分析通常在蛋白质或肽水平上的一个或多个分离步骤(凝胶电泳、液相色谱)之后进行。目前,应用质谱分析进行乳过敏原的检测、定量和定性有2种方式,第1种较为常见,即先用酶水解蛋白质,之后用液相色谱串联质谱技术分析,第2种则是蛋白质直接在质谱仪中破碎,避免蛋白质的水解步骤^[38]。

利用质谱技术检测食品中乳过敏原的研究呈现增长的趋势,可在葡萄酒、饼干、婴儿配方乳粉和烘焙产品等不同的食品基质中检测到不同的乳过敏原,灵敏度在0.01~5 mg/kg之间^[45-49]。最近, Ji等^[50]开发了一种可监测多反应的液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem multiple reactions-monitoring, mass spectrometry, LC-MRM/MS)方法,用于检测和定量不同食品中的3种乳过敏原(α -LA、 β -LG和 α s1-酪蛋白),最低检测限为0.48 μ g/mL。

和免疫测定的方法一样,食品基质也会影响到质谱法的灵敏度,因此,对于复杂基质的乳过敏原检测的检测限较高。食品加工也会改变过敏原或目标蛋白的结构或性

质,这可能也会影响检测的准确性。然而,由于其高准确度、特异性和多靶点分析的优点,使得质谱平台在过敏原分析中显示较好的应用前景^[38]。

3.2 基于 DNA 的检测方法

基于 DNA 的检测方法通常是使用特异性引物,对编码过敏原蛋白基因的序列进行扩增^[38],使检测结果具有高度特异性。灵敏度高、不受与抗体产生相关的生物学效应的影响以及分子热稳定性高,被证明是蛋白质方法的极好替代品,特别是分析高加工食品的时候。包括常用的 PCR 技术以及新型的环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。

3.2.1 聚合酶链式反应技术

大多数使用 DNA 方法的研究都是使用特异性引物通过 PCR 扩增初始目标 DNA 序列,从而使检测结果具有高度的特异性^[38]。目前,检测食品中的乳过敏原的基于 PCR 的技术包括终点 PCR、多重、实时 PCR 和 PCR-ELISA^[31]。Köppel 等^[51]开发了 2 种六重链实时 PCR 系统,用于同时检测食品中的几种过敏原,包括乳过敏原,至少能够检测到 0.1% 的含量。Xiao 等^[52]建立了一种利用 TaqMan 小槽粘合剂探针检测食品中 α -LA 的实时 PCR 方法,该方法在牛的 DNA 检测中最低可以检测到 0.05 ng,并应用于 42 个商业样品的验证中,其中包含大量的乳及含乳制品。

近年来,随着研究的深入,一些基于 PCR 的检测和定量 DNA 靶标的新方法,包括,与高分辨率熔融分析结合的实时 PCR、单管嵌套实时 PCR、DNA 微阵列和基因传感器等逐渐取得新的进展^[53-56],未来有望广泛应用在乳过敏原的检测中。

3.2.2 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术是较为新型的 DNA 扩增技术,在特定的 DNA 聚合酶以及 4 条引物存在的条件下,可以特异性识别靶序列上的 6 个位点,在等温的条件下实现 DNA 的指数式增长^[57]。目前,LAMP 技术在食品行业应用广泛,如食品微生物的检测等。在乳品的检测方面,KIM 等^[58]采用此方法检测牛奶和山羊奶,最低检测限分别达到了 0.1 和 1 pg。此方法较传统的 PCR 方法检测限更低,具有成本低,耗时少,技术要求低等优点,在检测乳过敏原方面具有广阔的应用前景。

4 总 结

牛乳过敏严重影响乳过敏人群的健康生活,在全球范围内的发生率都比较高。各国政府都高度重视降低乳制品过敏的研究,致力于推动乳过敏原分析和检测,并完善食品的标签制度。建立灵敏度高,特异性好的分析检测方法对于保障乳过敏人群健康具有重大的意义。在乳过敏原的研究方面,目前研究的热点在于对特定致敏位点的探索,

这可以为乳蛋白的定向改性提供依据。在乳蛋白的检测方面,ELISA 是较为常用的检测乳过敏原的方法,特异性好,检测速度快、分析成本低。但乳制品的一些加工工艺对此方法检测结果影响较大,同时不同来源蛋白质的交叉反应对此方法也有一定的影响。质谱技术用在乳过敏原的检测中,可以同时识别多靶点,检测限低,灵敏度高。但建立质谱平台成本高以及对人员有较高要求。DNA 标记和定量检测乳过敏原在近几年中得到了广泛的关注,与蛋白质相比,DNA 分子即使是在高强度的食品加工下,也能保持一定的完整性。DNA 分子扩增技术检测快速,且稳定性强,不容易出现交叉反应现象,分析成本适中。尤其是 LAMP 技术,特异性强,且不需要昂贵的仪器设备,相比传统的 PCR 方法更简便快捷,在乳过敏原检测中应用前景更为广阔。在实际检测中,应当结合具体情况,选择合适的检测方法。同时,对于乳过敏原的检测还需要更多研究的投入,开发稳定性更好、检测限更低、更加快速以及成本更低的检测方法。

参考文献

- [1] Fox PF. Milk proteins as food ingredients [J]. *Int J Dairy Technol*, 2001, 54(2): 41-55.
- [2] Do AB, Williams K, Toomer OT. In vitro digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins [J]. *Food Chem*, 2016, 190(1): 581-587.
- [3] Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, *et al.* Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(6): 866-870.
- [4] Villa C, Costa J, Oliveira MBPP, *et al.* Bovine milk allergens: a comprehensive review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2018, 17(1): 137-164.
- [5] 王文枝, 温焕斌, 靳淑敏, 等. 世界各国食品过敏原种类及标识情况概述 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 419-422.
Wang WZ, Wen HB, Jing SM, *et al.* Summary of food allergens and their identification in the world [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2011, 32(4): 419-422.
- [6] Wal JM. Cow's milk proteins/allergens [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002, 89(6 Suppl 1): 3-10.
- [7] Martorell-Aragones A, Echeverria-Zudaire L, Alonso-Lebrero E, *et al.* Position document: IgE-mediated cow's milk allergy [J]. *Allergol Immunopath (Madr)*, 2015, 43(5): 507-526.
- [8] Golkar A, Milani JM, Vasiljevic T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1): 159-172.
- [9] Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, *et al.* Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention [J]. *Methods*, 2014, 66(1): 22-33.
- [10] Bernard H, Creminon C, Yvon M, *et al.* Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 115(3): 235-244.

- [11] Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes [J]. *Allergol Int*, 2015, 64(4): 332–343.
- [12] Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, *et al.* Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(3): 589–594.
- [13] Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, *et al.* Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 107(2): 379–383.
- [14] Spuergin P, Mueller H, Walter M, *et al.* Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG [J]. *Allergy*, 1996, 51(5): 306–312.
- [15] Cong YJ, Li LF. Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes in beta-lactoglobulin by alanine scanning analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(11): 6307–6312.
- [16] Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, *et al.* Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients [J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(8): 1256–1262.
- [17] Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, *et al.* Ige and Igg binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 126(2): 111–118.
- [18] Cong Y, Yi H, Qing Y, *et al.* Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes on alpha1-casein by alanine scanning analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(11): 6870–6876.
- [19] Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, *et al.* B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(2): 293–297.
- [20] Busse PJ, Jarvinen KM, Vila L, *et al.* Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129(1): 93–96.
- [21] Miciński J, Kowalski IM, Zwierzchowski G, *et al.* Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction [J]. *Polish Ann Med*, 2013, 20(1): 69–76.
- [22] 石径, 周亚迪, 罗永康, 等. 牛乳蛋白与过敏儿童患者血清特异性 IgE 结合情况的检测与分析[J]. *中国农业大学学报*, 2017, 22(9): 40–44.
- Shi J, Zhou YD, Luo YK, *et al.* Detection and analysis of the binding of milk protein to serum specific IgE in allergic children [J]. *J China Agric Univ*, 2017, 22(9): 40–44.
- [23] Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, *et al.* Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(6): 1279–1285.
- [24] Li X, Yuan S, Huang M, *et al.* Identification of IgE and IgG epitopes on native Bos d 4 allergen specific to allergic children [J]. *Food Funct*, 2016, 7(7): 2996–3005.
- [25] Cong YJ, Li LF. Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes in β -lactoglobulin by alanine scanning analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(11): 6307–6312.
- [26] Cong YJ, Zhou SY, Li LF. Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes in α -lactalbumin by alanine scanning analysis [J]. *J Food Sci*, 2016, 81(10): 2597–T2603.
- [27] 孙静丽, 杜瑶, 朱莉莉, 等. 牛乳粉中乳蛋白糖基化分析及其水解程度研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(7): 110–115.
- Sun JL, Du Y, Zhu LL, *et al.* Glycosylation analysis and hydrolysis degree of milk protein in bovine milk powder [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(7): 110–115.
- [28] 丛艳君, 李晔, 刘家琦, 等. 牛乳 α -乳白蛋白免疫球蛋白 G 线性表位的关键氨基酸识别[J]. *食品科学*, 2018, 39(7): 195–200.
- Cong YJ, Li Y, Liu JQ, *et al.* Key amino acid recognition of linear epitope of bovine milk α -lactalbumin immunoglobulin G [J]. *Food Sci*, 2018, 39(7): 195–200.
- [29] 詹丽娜, 陈沁, 古淑青, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测食品中的牛奶过敏原酪蛋白[J]. *色谱*, 2017, 35(4): 405–412.
- Zhan LN, Chen Q, Gu SQ, *et al.* Determination of milk allergen casein in food by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole / electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(4): 405–412.
- [30] Quintieri L, Monaci L, Baruzzi F, *et al.* Reduction of whey protein concentrate antigenicity by using a combined enzymatic digestion and ultrafiltration approach [J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54(7): 1910–1916.
- [31] Costa J, Fernandes TJR, Villa C, *et al.* Food safety: Innovative analytical tools for safety assessment [M]. Wiley-Scrivener Publishers, 2017.
- [32] Orcajo J, Lavilla M, Martinez-De-Maranon I. Specific and sensitive ELISA for measurement of IgE-binding variations of milk allergen beta-lactoglobulin in processed foods [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1052(1): 163–169.
- [33] Ivens KO, Baumert JL, Hutkins RL, *et al.* Effect of proteolysis during cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(3): 1629–1639.
- [34] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. *食品科学*, 2003, 8): 200–204.
- Zhang Y, Liu YX. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and rapid detection of food safety [J]. *Food Sci*, 2003, (8): 200–204.
- [35] Shi J, Luo Y, Xiao Y, *et al.* Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins [J]. *Int Dairy J*, 2014, 35(1): 75–80.
- [36] Luis RD, Lavilla M, Sánchez L, *et al.* Development and evaluation of two ELISA formats for the detection of β -lactoglobulin in model processed and commercial foods [J]. *Food Control*, 2009, 20(7): 643–647.
- [37] 谭梦, 华家才, 冯凤琴. 牛乳过敏原及加工技术对其致敏性的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(5): 384–387, 393.
- Tan M, Hua JC, Feng FQ. Effect of milk allergen and processing technology on its sensitizing properties [J]. *Food Ind Technol*, 2016, 37(5): 384–387, 393.
- [38] Prado M, Ortea I, Vial S, *et al.* Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56(15): 2511–2542.
- [39] Ruiz-Valdepenas MV, Campuzano S, Torrente-Rodriguez RM, *et al.* Electrochemical magnetic beads-based immunosensing platform for the determination of alpha-lactalbumin in milk [J]. *Food Chem*, 2016, (213): 595–601.
- [40] Ashley J, Shukor Y, D'aurelio R, *et al.* Synthesis of molecularly imprinted polymer nanoparticles for alpha-casein detection using surface plasmon resonance as a milk allergen sensor [J]. *ACS Sens*, 2018, 3(2): 418–424.
- [41] Jiang DL, Ge PW, Wang LF, *et al.* A novel electrochemical mast cell-based

- paper biosensor for the rapid detection of milk allergen casein [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 130(1): 299–306.
- [42] Damodaran S, Li Y. A two-step enzymatic modification method to reduce immuno-reactivity of milk proteins [J]. *Food Chem*, 2017, 237(1): 724–732.
- [43] Koeberl M, Clarke D, Lopata AL. Next generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(8): 3499–3509.
- [44] Picariello G, Mamone G, Addeo F, *et al.* The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(42): 7386–7398.
- [45] Planque M, Arnould T, Dieu M, *et al.* Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1464(1): 115–123.
- [46] Cristina L, Elena A, Davide C, *et al.* Validation of a mass spectrometry-based method for milk traces detection in baked food [J]. *Food Chem*, 2016, 199(1): 119–127.
- [47] Jira W, Schwägele F. HPLC-MS/MS-detection of caseins and whey proteins in meat products [J]. *Procedia Food Sci*, 2015, 5(1): 129–132.
- [48] Goma A, Boye J. Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) [J]. *Food Chem*, 2015, 175(1): 585–592.
- [49] Chen Q, Zhang J, Ke X, *et al.* Quantification of bovine β -casein allergen in baked foodstuffs based on ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam A*, 2015, 32(1): 25–34.
- [50] Ji J, Zhu P, Pi F, *et al.* Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens [J]. *Food Control*, 2017, 74(1): 79–88.
- [51] Köppel R, Van Velsen-Zimmerli F, Bucher T. Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food [J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(5): 843–852.
- [52] Guan X, Cai Q, Zhang WJ, *et al.* Development of a real-time quantitative PCR assay using a TaqMan minor groove binder probe for the detection of α -lactalbumin in food [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(3): 1716–1724.
- [53] Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis [J]. *Food Chem*, 2014, 158(1): 245–254.
- [54] Costa J, Oliveira MBPP, Mafra I. Novel approach based on single-tube nested real-time PCR to detect almond allergens in foods [J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 228–235.
- [55] Bettazzi F, Lucarelli F, Palchetti I, *et al.* Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 614(1): 93–102.
- [56] Sun X, Jia M, Guan L, *et al.* Multilayer graphene-gold nanocomposite modified stem-loop DNA biosensor for peanut allergen-Ara h1 detection [J]. *Food Chem*, 2015, 172(1): 335–342.
- [57] 宋玉财, 王彬, 王官晓, 等. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2016, 33(6): 60–62.
- Song YC, Wang B, Wang GX, *et al.* Research progress of ring-mediated isotherm amplification [J]. *Anim Quarant China*, 2016, 33(6): 60–62.
- [58] Kim MJ, Kim H Y. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use [J]. *Food Chem*, 2018, 246(1): 26–31.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



党慧杰, 硕士, 主要研究方向为食品工程。

E-mail: huijie-Dang@foxmail.com



刘振民, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: liuzhenmin@brightdairy.com