

花生致敏原检测技术的研究进展

荣策¹, 徐静², 李一尘², 徐君怡², 郑秋月², 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: 目前食物致敏原检测已经成为食品安全领域面临的重要话题。花生是一种主要的食物致敏原, 开展食品中花生致敏原检测技术研究, 对预防过敏反应, 快速诊断病情, 保障食品安全具有重要意义。本文综述了近十年来花生致敏原检测技术的研究进展, 介绍了花生的致敏机制, 分析了不同检测方法的优缺点, 举例说明了这些方法的实际应用, 讨论了该领域面临的挑战, 旨在为花生的致敏原检测、脱敏技术等研究提供有价值的参考意见。

关键词: 花生; 致敏原; 检测技术; 进展

The advances in peanut allergen detection technology

RONG Ce¹, XU Jing², LI Yi-Chen², XU Jun-Yi², ZHENG Qiu-Yue², CAO Ji-Juan^{2*}

(1. College of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: The detection of food allergen is one of the principal problems faced in the field of food safety at present. Peanut is a major food-borne allergen, so it has a great significance to carry out the research of peanut allergen detection technology in food to prevent allergies, guarantee food security and diagnose rapidly. This article outlines the progress of peanut allergen detection technology in recent decade, introduces the peanut allergic mechanism, analyses the advantages and disadvantages of different detection methods, illustrates the practical application of these methods and discusses the challenges facing in the field in order to provide valuable advisory opinion for the research on allergy testing and desensitization technology of peanut.

KEY WORDS: peanut; allergen; detection technique; progress

1 引言

花生作为一种上佳的经济作物与佐膳食品, 因营养价值高、种植范围广等诸多特点, 受到人们广泛的青睐。据美国农业部(United States Department of Agriculture)2011年的统计数据显示, 我国以1600万吨的年产量成为世界上最大的花生种植国。然而, 花生也是主要食源性致敏原之一。1995年世界粮农组织(Food and Agriculture Organization)报告已将花生列为八类重要的食物致敏原之一。

相比于其它食物过敏反应, 花生过敏症状尤为严重, 且微量摄入就可能导致较高的致病率^[1]。花生过敏反应在3岁以上儿童群体中发病率较高, 其中过敏性皮炎是最常见的症状^[2]。随着发病时间的延长, 还会伴有呼吸系统紊乱、口腔过敏综合征等不良反应^[2]。在2001年, 美国开展了关于儿童食品过敏的调查: 在有食品过敏记录的儿童中, 对花生过敏的占68%^[3]。2003年至2005年期间, 英国一项针对适龄入学儿童的调查表明: 有2.8%的儿童对花生过敏^[4]。2008年, 在深圳进行的一项常见食物致敏原普查中,

基金项目: 国家公益性行业科研专项课题“常见食品过敏原的定量检测方法研究”(2007GYJ036)

*通讯作者: 曹际娟, 女, 博士, 研究员, 主要从事食品安全检测与研究。E-mail: cjj0909@163.com

儿童对花生过敏的阳性率达到 6.44%, 已经成为继牛奶、鸡蛋等致敏原之后, 最为常见的食源性致敏原之一^[5]。

2 致敏机理

花生致敏反应是指当机体同花生过敏原接触后, 由 B 淋巴细胞分泌的特异性 IgE, 介导肥大细胞产生组胺等血管活性物质, 使机体的某些组织、器官出现功能性失调, 常见的症状有恶心、哮喘、过敏性休克等。花生致敏原大多是糖基化程度非常高的种子贮藏蛋白, 分子量介于 0.7~100 kDa 之间。目前, 国际上已识别出 8 种致敏蛋白(见表 1、图 1), 按照致敏原标准命名原则分别为: Ara h1、Ara h2、Ara h3、Ara h4、Ara h5、Ara h6、Ara h7 及 Ara h8, 其中 Ara h1 和 Ara h2 是最主要的致敏原, 90%以上的病人血清都能对其识别^[11]。

3 检测方法的研究进展

目前, 检测花生致敏原的方法分为两个层面: 一是基于致敏蛋白的检测方法, 如: 酶联免疫吸附试验(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)、放射性致敏原吸附试验(RAST; radio-allergosorbent test)、酶标记致敏原吸附试验(EAST; enzyme-allergosorbent

test)、放射性免疫分析(RIA; radioimmunoassay)、免疫印迹(IB; immunoblotting)、高压液相色谱技术(HPLC; high pressure liquid chromatography)及质谱分析技术(MS; mass spectrometry); 二是基于致敏原成分基因的检测方法, 如: 聚合酶链反应(PCR; polymerase chain reaction)、实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR; real-time polymerase chain reaction)。

3.1 致敏蛋白的检测方法

3.1.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附检测花生致敏原是指将花生致敏原与特定的酶标抗体结合, 最后通过显色反应对花生致敏原进行定量的技术。其中, 竞争式 ELISA 和夹心式 ELISA 是应用最广泛的两种方法。

2009 年, 吉坤美^[12]等利用免疫小鼠制备抗花生总蛋白的多克隆抗体, 构建了双抗体夹心 ELISA 检测食品中花生致敏原的方法, 同时检测 15 种以花生为原料的食品, 均得到与预期相符的实验结果。Francesca^[13]等于 2010 年利用表面被磁微粒的抗体, 建立了 ELISA 检测 Ara h3、Ara h4 的新方法。此方法创新之处在于具有磁性的抗体抗原复合物可通过磁性吸附从反应液中迅速分离, 极大地优化了传统 ELISA 的洗脱工艺, 从而获得较高的回收率(大于 82%)。Hiroshi^[14]等(2010 年)利用人鼠杂交瘤细胞分

表 1 花生致敏蛋白信息表
Table 1 Information of peanut allergens

致敏原	蛋白种类	肽链长度	功能	数据库	文献来源
Ara h1	Vicilin	418aa	种子贮藏蛋白	PDB: 3S7E	Chruszcz ^[6]
Ara h2	Conglutin	500aa	种子贮藏蛋白	PDB: 3OB4	Mueller*
Ara h3	Glycinin	510aa	种子贮藏蛋白	PDB: 3C3V	Jin ^[7]
Ara h4	Glycinin	530aa	种子贮藏蛋白	NCBI: AAD47382.1	Kleber ^[8]
Ara h5	Profilin	131aa	肌动蛋白结合蛋白	NCBI: AAD55587	Kleber ^[8]
Ara h6	Conglutin	127aa	种子贮藏蛋白	PDB: 1W2Q	Lehmann ^[9]
Ara h7	Conglutin	160aa	种子贮藏蛋白	NCBI: AAD56719	Kleber ^[8]
Ara h8	Conglutin	157aa	种子贮藏蛋白	NCBI: AAQ91847	Diana ^[10]

注: *Mueller 的文章将要发表, 暂无出版信息, 可通过 PDB 查询。

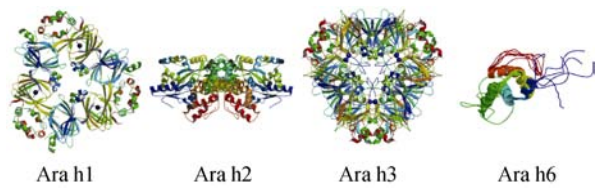


图 1 花生致敏蛋白的空间结构^[6,7,9]
Fig. 1 Space structure of peanut allergens

泌的单克隆抗体 IgM, 特异性地检测花生致敏蛋白 Ara h1。其科研团队通过合成一系列 Ara h1 中的部分短肽, 最终确定抗原表位的氨基酸序列为谷氨酰胺-谷氨酸-色氨酸。邵景东^[15]等在 2011 年利用新西兰大耳兔制备出效价为 200000 的花生致敏原特异性抗体, 建立了间接竞争 ELISA 检测花生致敏原的方法。在花生抗原浓度为 0.01~100 ng/mL 范围内, 线性关系

良好。最低检出浓度高达 0.1 ng/mL。

ELISA 是目前免疫学检测中应用最为广泛的技术。由于所使用的酶反应活性高、催化效果强,客观上放大了反应结果,进而获得较高的灵敏度。同时,因为抗原与抗体结合部位具有特异性互补结构,检测的针对性也得到了大幅提升。但是该方法存在抗体制备难度大、检测成本高、花生致敏蛋白种类繁多易导致假性结果的问题。

3.1.2 放射性致敏原吸附试验与酶标记致敏原吸附试验

放射性致敏原吸附试验与酶标记致敏原吸附试验检测花生致敏原的方法是将纯化的花生致敏原与固相载体结合后加入到待检血清当中,固相载体上的致敏原与血清中的致敏原争相键合 IgE,再与标记同位素(或酶)的抗 IgE 抗体反应,然后检测固相载体的放射性(或酶活性),最终通过标准曲线分析待检血清中特异性 IgE 的含量。

Diana^[10]等(2004 年)采用双盲对照激发试验对双重过敏患者(花生和桦树花粉均表现出过敏反应)进行 RAST 检测。结果表明,双重过敏症状很可能是由一种与 Ara h8 同源的 Bet v1 蛋白介导的交叉反应所引起的。在 2005 年, Mondoulet^[16]等分析了热处理加工对花生致敏原蛋白的影响。研究者采用 EAST 技术检测了 37 名花生过敏患者的血样。结果表明, IgE 对于烘烤处理过花生 Ara h1 及 Ara h2 的免疫活性要比未加工或蒸煮处理的花生高。换言之,热加工能提高 IgE 与 Ara h1 及 Ara h2 之间的结合绑定能力,特别是经过烘烤处理的花生样品。同时,这一理论与 Maleki^[17]、Roland^[18]、Kirsten^[19]等早先研究结论吻合。Hervé^[20]等(2009 年)率先研制出一种反向 EAST 技术。固定化的抗 IgE 单克隆抗体首先捕获血清中全部的 IgE 抗体,然后通过测定结合抗 Ara h2 和抗 Ara h6 特异性 IgE 的含量,最终达到定量测定的目的。这种反向 EAST 技术可以用来研究 IgE 分别与 Ara h2、Ara h6 结合的密切交互作用。实验结论表明, Ara h2 与 Ara h6 分子结构域具有同源性,两者均包含可由 IgE 识别的主要抗原决定基,并在致敏反应中起到了重要的作用。

RAST 是目前检测超敏反应的有效方法之一,具有敏感性高、对患者安全等优点,不但有助于过敏病情的诊断,对致敏原的甄别也有重要的应用意义。但是 RAST 采用的放射性同位素易过期且具有污染性,在一定程度上限制了其使用的广泛性,因而在我国

鲜有应用报道。

3.1.3 放射性免疫分析法

放射性免疫分析法检测花生致敏原是指将放射性同位素标记的花生致敏原和非标记的待测花生致敏原同时与数量恒定的特异性抗体竞争键合,通过测定放射性同位素的含量来间接计算待测花生致敏原含量。

Davoudzadeh^[21]于 2004 年采用 Turbo-MPTTM免疫分析设备对包括花生致敏原在内的 13 种食源性致敏原特异性 IgE 进行定量检测。其科研团队通过对比不同实验室的数据结果,证明了 Turbo-MPTTM免疫分析设备定量性能的良好重现性。与此同时 Turbo-MPTTM所产生的实验数据可通过 Pharmacia UniCAP 读取,克服了传统放射性免疫分析设备数据交互性能低的缺点。

尽管放射性免疫分析需要专业的仪器设备,但至今其仍是最为廉价的检测方法。唯有的不足之处在于放射性免疫分析具有放射性污染的可能性,因而在使用过程中需要有特殊的预防机制及官方的许可。

3.1.4 免疫印迹

免疫印迹检测花生致敏原是指将提取的花生蛋白(通常采用层析分离)喷洒在硝化纤维膜上,用酶标记特异性抗体与花生致敏原结合,通过酶与底物反应颜色来计算花生致敏原的含量。

Burks^[22]于 2002 年研发了一项免疫印迹法检测花生致敏原的专利技术。此专利采用离子交换层析提取佛州蔓生(一种美国花生)的致敏原蛋白,采用二维电泳技术和免疫印迹技术对过敏患者的血样进行检测。结果表明,致敏原为一种分子量为 17 kDa, pI 为 5.2 的蛋白质。其 N 端的起始序列为:可变氨基酸-谷氨酰胺-谷氨酰胺-可变氨基酸-谷氨酸-亮氨酸-谷氨酰胺-天冬氨酸-亮氨酸,最终断定此种致敏蛋白是 Ara h2。

免疫印迹亦称蛋白印迹,是目前蛋白分析的一种常规技术。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,极大地提高了检测的分辨能力。目前,已经有许多公司针对不同蛋白设计特异性抗体。商业化试剂盒的价格虽然昂贵,但未参与反应的抗体可回收重复利用,这也在一定程度上降低了检测成本。

3.1.5 高压液相色谱与质谱分析

高压液相色谱可鉴定花生氨基酸与异硫氰酸苯酯反应生成的乙内酰苯硫脲衍生物。质谱检测花生致敏原主要是根据不同致敏蛋白分子在均匀电场中停

留时间不同,进而达到分离鉴定的目的。

2006年,Shefcheck^[23]等采用液相色谱与质谱联用的方法来检测花生黑巧克力中Ara h1的特异性肽链。通过优化蛋白提取过程,使最低检测限度达到2 ppm。此方法提供了一种通过蛋白标记来确定花生类食品Ara h1的方法。Maria^[24]等在2008年利用液相色谱-电喷雾离子化串联质谱来定量检测麦片中花生致敏蛋白Ara h3、Ara h4。此种方法最低检测浓度可达3 mg/kg(花生/麦片)。通过与ELISA进行比较,证明此方法快速、可靠,在花生致敏蛋白检测中具有实际应用价值。

液相色谱-质谱联用技术是近些年来比较热门的化学分析方法。此技术一方面结合了液相色谱对复杂样品的高分辨能力,另一方面又融合了质谱技术高灵敏、分子定量化的特点,在蛋白质鉴定、蛋白质药物开发等领域拥有广泛的应用前景。

3.2 致敏原成分基因的检测方法

3.2.1 聚合酶链反应

聚合酶链反应检测花生致敏原的机理为应用PCR技术扩增花生源性成分的DNA片段,最终通过凝胶电泳来判断扩增结果。

Delano^[25]于2004采用普通PCR方法针对花生叶绿体tRNA基因中tml区域设计一对引物,扩增出642 bp的片段,成功地检测出原料中的花生源性成分;并在此基础上深入地探讨了多重PCR检测谷物致敏原的可行性。然而,PCR方法只能甄别原料中是否存在花生源性成分,并不能够特异性地检测花生致敏蛋白基因,从而导致此种方法颇具局限性。但该方法却具有不会漏检致敏原花生源性成分的优势,具有可靠的安全保障性。

3.2.2 实时荧光聚合酶链反应

实时荧光聚合酶链反应检测花生致敏原是指在整个PCR反应体系中加入荧光物质,通过荧光信号量的积累来实时监测PCR进程,以达到检测花生致敏原特异性基因的目的。Taqman探针法和SYBR Green 荧光染料法是此技术应用最为广泛的两种荧光标记方法。

Oliver^[26]等在2004年利用实时荧光PCR对Ara h2基因的编码区进行特异性检测,并同时与ELISA方法相比较:在针对30余种随机样品的检测中,实时荧光PCR的检出率更高。Elena^[27]等(2008年)采用Taqman探针法,检测Ara h3基因的特异性序列。研究者发现Ara h3基因序列在细胞内多次重复,极大

增加了检测的灵敏性。此方法花生DNA最低检测限度为2.5 pg,这个量已经小于一个花生基因组的拷贝数。2011年,陈家杰^[28]建立SYBR Green 实时荧光PCR检测花生致敏原的方法。此方法针对Ara h1 DNA序列特异性片段设计引物,对8种花生食品的检测结果均与标签成分相符,证明其可用于食品中花生致敏原Ara h1的检测。

自上世纪九十年代世界第一台实时荧光PCR的问世,PCR技术实现了从定性到定量的飞跃。由于其特异、敏感、高效等优点受到科研工作者广泛垂青。但是,鉴于近些年来的一些报道^[19,29],某些加工处理可除去一定量的花生致敏蛋白,但致敏基因仍大量残存,这也使得基因检测手段存在弊端。

4 展 望

建立和开展食品中花生致敏原检测技术,在预防过敏反应,快速诊断病情,保障食品安全等方面颇具重要性。各国的研究人员均对该领域展开了深入研究,建立了一系列的方法并加以应用,取得了众多研究成果。尽管如此,开展花生致敏原检测技术研究仍面临着很多挑战。1.花生类食品呈现生产工艺复杂化、品目种类多样化等特点,因而增加了辨别花生真实属性和致敏蛋白的困难程度;2.鉴定方法能否满足自动化、标准化、高通量、低成本的要求。这些挑战也将是今后的重点研究方向。当前,鉴于严峻的形势,美国与欧盟建立了完善的食物致敏原标签制度,以避免过敏患者的误食^[30]。同时,国家标准GB7718-2004《预包装食品标签通则》已于2012年4月20日起正式施行,其中增加了含有致敏成分食品的包装推荐标示^[31]。随着我国花生产业的迅猛发展,花生过敏发病率将呈现递增趋势。因此,广泛开展花生致敏原检测方法的研究,对于预防过敏反应及快速诊断病情具有重要意义。

参考文献

- [1] Hourihane JO, Kilburn SA, Dean J, *et al.* Clinical characteristics of peanut allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 1997, 27(6): 634-639.
- [2] Rancé F, Kanny G, Dutau G, *et al.* Food hypersensitivity in children: Clinical aspects and distribution of allergens [J]. *Pediatr Allergy and Immu*, 1999, 10(1): 33-38.
- [3] Sicherer SH, Furlong TJ, Furlong AM, *et al.* A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants [J]. *J Allergy Clin Immun*, 2001, 108(1): 128-132.
- [4] Hourihane JO, 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 Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(5): 1197–1202.
- [5] 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.
- [6] Chruszcz M, Maleki SJ, Majorek KA, *et al.* Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 39318–39327.
- [7] Jin T, Guo F, Chen Y, *et al.* Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 1796–1804.
- [8] Kleber-Janke T, Cramer R, Appenzeller U, *et al.* Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology [J]. *Int Arch Allergy Imm*, 1999, 119(4): 265–274.
- [9] 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.
- [10] 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, 112(6): 1410–1417.
- [11] 郑文杰. 食品中过敏原及其成分检测 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 30–120.
- [12] 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.
- [13] Speroni F, Elviri L, Careri M, *et al.* Magnetic particles functionalized with PAMAM-dendrimers and antibodies: a new system for an ELISA method able to detect Ara h3/4 peanut allergen in foods [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 3035–3042.
- [14] Shinmoto H, Matsuo Y, Naganawa Y, *et al.* Epitope analysis of peanut allergen Ara h1 with human monoclonal IgM antibody 92-2 [J]. *Cytotechnology*, 2010, 62(4): 307–311.
- [15] 邵景东, 孙秀兰, 张银志, 等. 酶联免疫吸附分析法检测花生过敏原的研究 [J]. *分析科学学报*, 2011, 27(1): 89–92.
- [16] Mondoulet L, Paty E, Drumare MF, *et al.* Influence of Thermal Processing on the Allergenicity of Peanut Proteins [J]. *Food Chem*, 2005, 93(11): 4547–4553.
- [17] Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, *et al.* The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106(4): 763–767.
- [18] Poms RE, Capelletti C, Anklam E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(6): 459–464.
- [19] Beyer K, Morrow E, Li XM, *et al.* Effects of cooking methods on peanut allergenicity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 107(6): 1077–1081.
- [20] Bernard H, Drumare MF, Guillon B, *et al.* Immunochemical characterisation of structure and allergenicity of peanut 2S albumins using different formats of immunoassays [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(1): 139–146.
- [21] Davoudzadeh D, Chen A, Valcour A, *et al.* Inter-laboratory reproducibility and inter-assay correlation of the Turbo-MP™ radioimmunoassay for quantitative measurement of allergen-specific immunoglobulin E [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(2): 290.
- [22] Burks J, Wesley AM, Ricki M. Immunoassay for peanut allergen: USA, 6441142 [P]. 2002–27–08.
- [23] 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]. *Food Chem*, 2006, 98(2): 7953–7959.
- [24] Careri M, Elviri L, Lagos JB, *et al.* Selective and rapid immunomagnetic bead-based sample treatment for the liquid chromatography–electrospray ion-trap mass spectrometry detection of Ara h3/4 peanut protein in foods [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1206(2): 89–94.
- [25] James D, Schmidt A. Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (trnL) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens [J]. *Food Res Int*, 2004, 37(4): 395–402.
- [26] 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]. *Food Chem*, 2004, 82(12): 3754–3760.
- [27] Scaravelli E, Brohé M, Marchelli R, *et al.* Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2008, 227(3): 857–869.
- [28] 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 h1 成分 [J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(9): 69–74.
- [29] 尤丽丽. 花生乳中致敏蛋白分离和去除的初步研究 [D]. 中国农业大学, 2006.
- [30] Taylor, Steve L, Hefle, *et al.* Food allergen labeling in the USA and Europe [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6(3): 186–190.
- [31] CN-GB. 食品安全国家标准预包装食品标签通则 [S]. 2011.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



荣策, 男, 硕士在读, 主要从事微生物学与分子生物学研究。

E-mail: 165119681@qq.com



曹际娟, 女, 研究员, 主要从事食品安全检测与研究。

E-mail: cjj0909@163.com