

牛乳过敏原 β -乳球蛋白检测方法的研究进展

何圣发¹, 陈红兵^{2*}, 龙彩云³, 邹丽君¹, 胡恭华¹, 熊亮¹, 高艳芳¹

(1. 赣南医学院预防医学系, 赣州 341000; 2. 南昌大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047;
3. 赣州市疾病预防控制中心, 赣州 341000)

摘要: 目的 食物过敏已成为全球性的食品安全问题, 欧美等发达国家均要求对食品中的过敏原成分进行标识, 其中就包括作为八大过敏性食物之一的牛乳及其乳制品。 β -乳球蛋白是牛乳中的主要过敏原, 约占乳清蛋白的 50%, 牛乳总蛋白的 10%, 并且约有 82% 的牛乳过敏患者对 β -乳球蛋白过敏, 因此其可以作为检测食品中是否含牛乳蛋白的一个有效的标志物。建立灵敏、可靠的 β -乳球蛋白检测方法, 对牛乳过敏原标识及保障牛乳过敏人群的安全消费具有重要意义。本文主要综述了牛乳 β -乳球蛋白的高效液相色谱法、超高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法、免疫层析法、电化学免疫法、蛋白微阵列法、等离子体共振法等色谱学和免疫学检测方法的研究进展, 并对未来发展方向作出展望, 以期促进牛乳 β -乳球蛋白等过敏原检测方法的研究与开发。

关键词: 牛乳过敏; β -乳球蛋白; 检测方法

Research progress on the detection methods of cow's milk allergen β -lactoglobulin

HE Sheng-Fa¹, CHEN Hong-Bing^{2*}, LONG Cai-Yun³, ZOU Li-Jun¹, HU Gong-Hua¹,
XIONG Liang¹, GAO Yan-Fang¹

(1. Department of Preventive Medicine, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Ganzhou Center for Disease Control and Prevention, Ganzhou 341000, China)

ABSTRACT: Food allergies have become global health concern. In European Union, America and other developed countries, food allergens are need to be labeled, including cow's milk and its products, regarded as one of the eight major allergic foods. Bovine β -lactoglobulin is one of the major allergens of milk, accounts for 10% of total milk proteins and 50% of whey proteins. In addition, approximately 82% of cow's milk allergy patients are sensitive to β -lactoglobulin. Therefore, β -lactoglobulin could be as an important biomarker for detection of milk protein. Development of sensitive and reliable β -lactoglobulin detection methods are important for milk allergens labeling, and aiding in the prevention of exposure to milk allergens. In this paper, the β -lactoglobulin detection methods were summarized, such as high performance liquid chromatography, ultra performance liquid chromatography, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography, electrochemical immunosensor, protein microarray and surface plasmon resonance. Finally, we outlook the research trend of detection methods in the future, in order to promote the research and development of β -lactoglobulin detection methods.

*通讯作者: 陈红兵, 教授, 主要研究方向为食物过敏。E-mail: chenhongbing@ncu.edu.cn

*Corresponding author: CHEN Hong-Bing, Professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: chenhongbing@ncu.edu.cn

KEY WORDS: cow's milk allergy; β -lactoglobulin; detection methods

1 引言

食物过敏已成为严重的全球性公共卫生问题,约 5% 的成年人和 8% 的儿童对食物过敏,其中约 1/3 由牛乳过敏引起,且发病率呈上升趋势^[1]。牛乳是联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)认定的八大过敏性食物之一,婴幼儿是牛乳过敏的主要人群。我国最新流行病学调查表明,我国约有 2.69% 的婴幼儿对牛乳蛋白过敏^[2]。在食品加工中,牛乳蛋白被广泛添加到各类食品中,而且在食品加工、储存、运输等环节也存在牛乳蛋白污染的可能性。因而增加了牛乳过敏人群接触牛乳过敏原的风险,严重影响牛乳过敏人群的身体与健康与生活质量。目前,食物过敏尚无特效疗法,牛乳过敏患者需要严格避免食用含牛乳蛋白的食品。欧美等发达国家均要求标识食品中的过敏原成分,其中就包括牛乳及乳制品^[3]。牛乳中超过 30 种蛋白具有潜在致敏性,主要过敏原为酪蛋白和乳清蛋白。其中, β -乳球蛋白约占牛乳总蛋白的 10%,乳清蛋白的 50%,而且约 82% 的牛乳过敏患者对 β -乳球蛋白过敏^[4]。因此, β -乳球蛋白可以作为一种检测食品中是否含牛乳蛋白的一种有效标志物。

目前,有关过敏原的检测方法众多,按检测原理可以分为 3 大类:基于过敏原 DNA 的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测法、基于过敏原蛋白的色谱检测法和免疫学检测法。其中,PCR 对食物过敏原中的基因成分进行检测和分析,具有较高特异性和灵敏性,主要用于检测目标 DNA 含量较高的食物,如鱼、虾、花生、大豆、坚果等动植物组织^[5,6]。但牛乳中基本不含过敏原相关的 DNA,所以色谱技术和免疫学技术是检测牛乳过敏原的主要方法。色谱学方法主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)及液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrophotograph, LC-MS)。免疫学方法主要包括酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫层析技术(immunchromatography assay, ICA)、电化学免疫技术、芯片技术和表面等离子体共振技术(surface plasmon resonance, SPR)等。随着牛乳过敏患者人数及发病率的增加,消费者对食品安全意识的增强,以及欧美等发达国家对食物过敏原标识的强制要求,检测食品中 β -乳球蛋白的含量对牛乳过敏原标识具有重要意义。

本研究对牛乳 β -乳球蛋白的色谱学检测方法和免疫学检测方法进行简要综述,并对 β -乳球蛋白检测方法的未

来发展趋势进行展望,为促进牛乳过敏原检测方法的研究与开发提供参考。

2 牛乳 β -乳球蛋白色谱学检测方法

2.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)是色谱法的一个重要分支,以液体为流动相,通过高压输液系统将具有不同极性的流动相泵入填充有固定相的色谱柱中,在柱内被分离,然后进入检测器被检测,实现对待检样品的分析。根据固定相的不同,可以分为正向高效液相色谱(positive-phase high performance liquid chromatography, PP-HPLC)和反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC),其中 RP-HPLC 是目前应用最多的 HPLC 方法^[7]。

早在 1998 年,Bober 等^[8]通过 RP-HPLC 法(C-18 柱)同时分离和定量了牛乳中的 6 种主要过敏原(α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白)及其不同亚型,并对来自 234 头奶牛的牛乳蛋白质组成进行分析,结果与牛乳蛋白参考值相似,该方法的批内偏差低于 5.1%,批间偏差低于 7.1%,对 β -乳球蛋白的线性检测范围为 1.4~11.3 μg 。随后,Bordin 等^[9]通过 RP-HPLC 法(C-4 柱)对牛乳主要过敏原(α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白-A、 β -乳球蛋白-B、 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白)进行分离和定量,其中对 β -乳球蛋白-A 的最低检测限(limit of detection, LOD)、最低定量限(limit of quantification, LOQ)和线性检测范围分别是 0.14 μg 、0.48 μg 和 0.46~2.81 μg ,对 β -乳球蛋白-B 的 LOD、LOQ 和检测范围分别是 0.08 μg 、0.28 μg 和 0.46~2.78 μg ,并对多种牛乳产品进行检测,但粉状乳产品需要经过高温处理,结果部分对热敏感的乳清蛋白发生变性,导致检测结果比液态乳产品差。Bonfatti 等^[10]则以 C-8 柱建立同时检测牛乳主要过敏原蛋白及其常见亚型(α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白-A、 β -乳球蛋白-B、 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白-A1、 β -酪蛋白-A2、 β -酪蛋白-B、 β -酪蛋白-1、 κ -酪蛋白-A 和 κ -酪蛋白-B)的 RP-HPLC 方法的 RP-HPLC 方法,对 β -乳球蛋白-A 和 β -乳球蛋白-B 的 LOD 分别为 0.5 μg 和 0.7 μg ,并分析了来自 4 个不同品系奶牛的 40 份样品以及 BCR-063R 脱脂奶粉中各蛋白的含量。另外,Bonfatti 等^[11]还通过 RP-HPLC 方法(C-8 柱)对水牛乳的主要蛋白(α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白)及其不同亚型进行了分离和定量检测,并对 536 份样品进行了检测分析。

2.2 超高效液相色谱法

超高效液相色谱法(UPLC)是在 HPLC 的基础上进行的升级,采用小颗粒高性能固定相、超高压输液泵、高速采样的灵敏检测器、低扩散和低交叉污染自动进样器,其检测速度、灵敏度和分离度相较 HPLC 都有不同程度的提升^[12]。在牛乳过敏原蛋白的检测中,Boitz 等^[13]通过亚 2 μm 颗粒反相柱的 UPLC 检测热处理牛乳样品中的 β -乳球蛋白,只需要 1.8 min(共 3 min)即可检测到 β -乳球蛋白,其 LOD、LOQ 和线性检测范围分别为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20~560 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并检测了商业牛乳样品中 β -乳球蛋白的含量。该方法相较传统 HPLC、UPLC 的检测速度明显更快。

2.3 液相色谱-质谱联用法

液相色谱-质谱联用法(LC-MS)是近年发展迅速的一种可以准确定量蛋白质含量的分析方法,该方法是以液相色谱为分离系统,以质谱作为检测系统。样品经过分离、离子化后,再通过质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开,经过检测器得到质谱图。LC-MS 体现了色谱和质谱优势的互补,相对于液相色谱,前者具有更高的灵敏度、特异性、重现性、回收率等特点,且可以对复杂基质中的单个或多个目标蛋白质进行分析,但需要复杂的前处理。根据检测对象,可以分为基于蛋白水平(分析天然蛋白质)和多肽水平(分析消化后的特征肽)对目标蛋白质进行定量检测。基于蛋白质水平检测具有高稳定性及避免消化步骤带来的不稳定因素等优点。如 Czerwenka 等^[14]建立了一种 LC-MS 方法对多种反刍动物乳产品中的非消化 β -乳球蛋白进行定量检测,其中对牛乳 β -乳球蛋白的检测范围为 25~1 $\times 10^3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$,对山羊乳 β -乳球蛋白的检测范围为 12.5~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

基于多肽水平则可以检测蛋白质的标志性多肽(如过敏原 IgE 表位肽),具有高特异性,但需要对样品进行酶解,需要更多时间^[15]。特征肽的选择是该方法的关键环节,应该具有以下特点:唯一性、稳定性、消化重现性、容易被质谱检测、在样品中含量较多、未被修饰、易提取及 6-12 个氨基酸等^[16]。另外,对过敏原蛋白质的水解也是该方法的关键步骤,不同的酶具有不同的酶切位点,因此,酶的选择会影响水解结果。由于胰蛋白酶的酶切位点位于人们所熟知的精氨酸(R)与赖氨酸(K)之间,且胃液中也存在胰蛋白酶,因此该酶成为目前最常用的样品水解酶^[16]。例如,Ansari 等^[17]利用胰蛋白酶对牛乳蛋白先进行消化,再通过液质串联多反应监测技术法(LC-MRM/MS)对水解产物中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的特征性肽进行检测,其中 β -乳球蛋白的标志性肽为 LIVTQTMK,也是该蛋白的主要 IgE 表位肽^[18],其 LOD 为 1.11 ng/mL 。最近, Ji 等^[19]则先对样品进行提取,再通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后进行胰蛋白酶消化,最后通过

LC-MRM/MS 检测牛乳 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和 α_{SI} -酪蛋白的特征肽,其中 β -乳球蛋白的特征肽为 LIVTQTMK 和 TPEVDDEALEK,前者为 β -乳球蛋白的主要 IgE 表位肽^[18],后者也是 β -乳球蛋白 IgE 表位的部分序列^[20],对 β -乳球蛋白的线性检测范围、LOD 和 LOQ 分别为 0.48~31.25、0.20 和 0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但样品水解时间需要 16 h。

3 牛乳 β -乳球蛋白免疫学检测方法

3.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)具有灵敏度高、特异性强、操作简单、费用低、速度快和高通量等优点,是检测过敏原最常用、最成熟的方法之一,也是牛乳 β -乳球蛋白商业检测试剂盒的主要方法(表 1)。根据 ELISA 检测类型,可以分为间接竞争 ELISA(cELISA)和夹心 ELISA(sELISA)。在 cELISA 法检测牛乳 β -乳球蛋白中,张忠华^[21]利用 β -乳球蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,基于该抗体建立了 cELISA 方法,其线性检测范围和 LOD 分别为 10~1 $\times 10^3$ ng/mL 和 50 ng/mL ,但没有验证所建方法的可靠性。袁水林等^[22]利用 β -乳球蛋白多克隆抗体建立 cELISA 方法,其线性检测范围为 1~1 $\times 10^3$ ng/mL ,对多个牧场的牛乳和乳清中的 β -乳球蛋白进行检测,并通过 RP-HPLC 对结果进行验证,结果表明 2 种方法检测结果具有良好一致性。

由于 ELISA 法是基于抗体与表位的结合对过敏原进行检测,当过敏原经过加工处理,如加热、酶解等,其表位可能被破坏(尤其是构象性表位),免疫反应性也会受到影响,导致检测结果不准确^[23]。因此, Negroni 等^[24]制备针对天然 β -乳球蛋白和热处理 β -乳球蛋白的单克隆抗体,并建立了 sELISA 检测方法,对天然 β -乳球蛋白和热处理过的 β -乳球蛋白的 LOD 分别为 30 pg/mL 和 200 pg/mL ,线性检测范围分别为 0.05~5 ng/mL 和 0.2~20 ng/mL ,可以分别检测食品中天然和热处理过的 β -乳球蛋白。另外, IgE 表位是引起牛乳过敏的物质基础,我们团队制备了特异性识别牛乳 β -乳球蛋白 IgE 表位的多克隆抗体和单克隆抗体,并基于 IgE 表位识别建立了多种 sELISA 检测方法。首先,韩婷^[25]基于表位疫苗原理,以 β -乳球蛋白的 7 个主要 IgE 线性表位和 1 个 T 细胞表位为基础,构建了表位串联体原核表达体系,并制备了相应的重组蛋白和兔多克隆抗体。随后, He 等^[26]通过 cELISA 对所制备抗体的免疫学性质进行分析,结果表明该抗体能识别表位串联体中的 7 个 IgE 表位及其阻断肽,且具有良好的特异性和灵敏性。之后,以 β -乳球蛋白多克隆抗体为捕获抗体,以表位串联体多克隆抗体为检测抗体建立了 sELISA 检测方法,其 LOD、LOQ 和线性检测范围分别为 1.96、3.91 和 31.25~8 $\times 10^3$ ng/mL ,并通过 RP-HPLC 法验证所建方法的可靠性^[27]。然后, He 等^[28]以

表位串联体多克隆抗体为捕获抗体,将 β -乳球蛋白多克隆抗体与纳米铂偶联制备检测探针,建立了高灵敏 sELISA 检测方法,同时以 β -乳球蛋白多克隆抗体为检测抗体建立了普通 sELISA 检测方法,前者的 LOD、LOQ 和线性检测范围分别为 0.12、0.49 和 $0.49\sim 1.6\times 10^4$ ng/mL,后者分别为 1.96、7.81 和 $62.5\sim 5.12\times 10^5$ ng/mL,表明纳米铂可以显著提高方法的检测性能,且对婴幼儿水解奶粉等样品进行了检测分析,2 种方法检测结果与商业 sELISA 试剂盒具有良好一致性。此外,He 等^[29]还制备了 β -乳球蛋白 IgE 表位单克隆抗体,并结合 β -乳球蛋白多克隆抗体及双氧水敏感型量子点,建立了荧光 sELISA,该方法的 LOD、LOQ 和线性检测范围分别为 0.49、7.81 和 $0.49\sim 4\times 10^3$ ng/mL,基于该抗体的普通 sELISA 方法的 LOD、LOQ 和线性检测范围则分别为 7.81、15.63 和 $62.5\sim 2\times 10^3$ ng/mL,表明量子点也能够提高所建方法的灵敏度,通过商业 sELISA 试剂盒验证了所建方法的可靠性。最近,我们团队将表位单克隆抗体共价固定于酶标板表面,将 β -乳球蛋白多克隆抗体与胶体金偶联制备检测探针,建立了 sELISA 方法,该方法的 LOD、LOQ 和线性检测范围分别为 0.49、3.9 和 $31.25\sim 6.4\times 10^4$ ng/mL,对样品的检测结果与商业 sELISA 试剂盒及普通 sELISA 方法具有良好一致性,且该方法固定捕获抗体仅需 15 min,显著低于传统方法的孵育过夜,而且灵敏度高于普通 sELISA 方法^[30]。

虽然 cELISA 和 sELISA 均可用于食物过敏原的检测,但却各有其优缺点。首先,通常 sELISA 比 cELISA 更灵敏,线性关系也更好。例如,De-Luis 等^[31]建立并评价了 sELISA 和 cELISA 对模型加工食品和商业食品中 β -乳球蛋白含量的检测能力,2 种方法的线性检测范围分别为 $5\sim 100$ ng/mL($r^2>0.99$)和 $15\sim 50$ ng/mL($r^2>0.98$),前者的灵敏度、线性检测范围和线性关系均要优于后者,且前者对牛乳和非牛乳产品的区分性更好。其次,sELISA 的特异性更好。由于 cELISA 只需要一个过敏原特异性抗体,而 sELISA 则需要 2 个过敏原特异性抗体(捕获抗体和检测抗体),因此当检测基质中的其他蛋白与目标蛋白存在相似的氨基酸序列或空间结构时,cELISA 更容易发生交叉反应。再次,sELISA 需要结合 2 个表位,更适合检测过敏原致敏性残基,可间接评价食品中过敏原的潜在致敏性。多肽/蛋白质需要 2 个表位才能交联 IgE 分子和肥大细胞或嗜碱性粒细胞产生脱颗粒等免疫学反应^[32]。例如,在水解奶粉中,小于 3 kDa 的肽段不能交联 IgE,而大于 5 kDa 的肽段则可以诱导脱颗粒反应^[33]。最后,cELISA 更适合检测过敏原肽段或小分子。例如,De-Luis 等^[34]采用 sELISA 和 cELISA 对 11 种标示含“奶粉”或“牛奶蛋白”食品中的 β -乳球蛋白进行检测,2 种方法的检测结果均表明其中的 10 种食品中含 β -乳球蛋白,但后者的检测结果高于前者。其原因可能是在加工中,有部分 β -乳球蛋白被破坏成小片段,导致后者能识别这些

小肽段,而前者则不识别或亲和力更弱,导致检测结果存在差异。其他免疫学检测方法也存在同样的性质。

3.2 免疫层析技术

免疫层析技术(ICA)具有操作简单、快速检测、价格低廉、便于携带、现场检测等优点,已广泛应用于临床诊断、食品安全等领域的快速检测。在牛乳过敏原的检测中,Wu 等^[35]利用牛乳 β -乳球蛋白 IgG 表位单克隆抗体建立了夹心 ICA 方法,其检测灵敏度为 0.2 ng/mL,并对 110 种进出口食品中的 β -乳球蛋白进行检测,对 106 种食品的检测结果与其过敏原标识一致,而对另外 4 种食品的检测结果却与过敏原标识相反,结果表明该方法可以对食品中的 β -乳球蛋白进行半定量检测。

3.3 电化学免疫技术

电化学免疫技术是将免疫技术与电化学检测相结合的一种分析方法,拥有免疫学的高特异性和电化学的高灵敏性,用于痕量免疫性物质的检测分析。Ruiz-Valdepenas 等^[36]通过将 β -乳球蛋白抗体与纳米磁珠偶联作为捕获探针,HRP 标记 β -乳球蛋白抗体作为检测抗体,通过磁铁将免疫复合物固定在丝网印刷碳电极表面,建立夹心电化学免疫方法,对 β -乳球蛋白的线性检测范围为 2.8~100 ng/mL,LOD 为 0.8 ng/mL,对样品的检测结果与 β -乳球蛋白商业试剂盒检测结果具有良好一致性,表明该电化学免疫方法是准确可靠的,且该方法检测时间仅为 1 h,而试剂盒则需要 4 h。Eissa 等^[37]则在石墨烯修饰的丝网印刷碳电极表面电镀形成一层 4-氨基苯膜,然后将牛乳 β -乳球蛋白抗体共价固定在膜表面,建立夹心型伏安电化学免疫方法检测 β -乳球蛋白,其线性检测范围为 1 pg/mL~100 ng/mL,LOD 为 0.85 pg/mL,并用于检测蛋糕、奶酪等食品中 β -乳球蛋白的含量,检测结果与商业 ELISA 试剂盒具有良好的线性关系,证明该方法准确可靠。另外,除了传统的抗原-抗体反应外,核酸适配体也能与蛋白特异性结合,从而实现特异性蛋白的检测^[38]。例如,Eissa 等^[39]将核酸适配体固定在石墨烯电极表面,用于电化学检测牛乳 β -乳球蛋白,所选择的适配体对 β -乳球蛋白 A、B 亚型的解离常数分别为 82 和 80 nmol/L,且具有良好的特异性,其线性检测范围和 LOD 分别为 0.1~100 ng/mL 和 20 pg/mL,检测时间为 20 min,而且不需要标记。

3.4 蛋白微阵列技术

蛋白微阵列技术具有高通量、高灵敏性、高特异性、低成本和快速检测等优点。在对牛乳过敏原的检测中,Ricciardi 等^[40]首次通过微悬臂共振器阵列检测牛乳主要过敏原 β -乳球蛋白,首先将微悬臂梁进行硅烷化,然后固定 Protein G,用于结合捕获抗体,以 β -乳球蛋白多克隆抗体作为捕获抗体和检测抗体,建立夹心法检测 β -乳球蛋白,该方法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.04 和 0.1 μ g/mL,比

sELISA 试剂盒(0.19 和 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)更灵敏。而 Badran 等^[41]则将过敏原固定在 DVD 聚碳酸酯表面,建立同时检测麦醇溶蛋白、酪蛋白、 β -乳球蛋白和卵白蛋白的竞争型微阵列,金标特异性抗体作为检测探针,并通过纳米银增强检测信号,该微阵列对4种过敏原的检测灵敏度分别为0.04、0.4、0.08 和 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,线性检测范围分别为0.01~0.3、0.08~2、0.02~0.5 和 0.04~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,回收率为72%~117%。Pastor-Vargas 等^[42,43]利用牛乳酪蛋白、牛乳 β -乳球蛋白等10种主要过敏原的抗体构建了抗体微阵列,并对母乳和羊水(孕妇和产妇)中的食物过敏原进行检测,结果表明每个样品中的过敏原种类及含量均存在差异,主要含 β -乳球蛋白、卵白蛋白和麦醇溶蛋白等。

3.5 表面等离子体共振技术

表面等离子体共振技术(SPR)是最常用、最成熟的非标记光学物理传感检测技术,可用于检测各种食物过敏原^[44-46]。例如,Ashley 等^[47]将 β -乳球蛋白多克隆抗体固定在 SPR 芯片表面,用于直接检测 β -乳球蛋白,检测灵敏度为164 ng/mL。

4 发展方向

随着检测技术的不断发展,以及市场对检测要求的提高,未来检测方法将朝着检测速度快、灵敏度高、高通量、方便携带、经济、环保以及应用新型识别元件(如表位抗体、核酸适配体等)等方向发展。

在色谱学检测方法中,UPLC 比 HPLC 的检测速度更快,灵敏度更高。另外,MS 是检测过敏原的金标准,但该方法需要复杂的前处理,且样品消化也需要较长的时间,导致耗时较长。将 UPLC 与 MS 结合、采用新型酶水解方式等手段均可以提高检测速度和灵敏度^[48]。例如,Carrera 等^[49]利用高强度聚焦超声技术加速胰蛋白酶对鱼主要过敏原 β -小清蛋白的消化,该条件下消化样品仅需2 min,以 β -小清蛋白的19条特异性多肽为标志肽,通过线性离子阱质谱方法能够在2 h内完成对食品中 β -小清蛋白的检测。

在免疫学检测方法中,可以利用纳米磁珠、胶体金、量子点、石墨烯、碳纳米管等纳米材料,以及采用共价固定抗体等方法来加快检测速率、提高灵敏度^[50-52]。另外,传统检测方法需要昂贵的仪器,且不便携带,而手机具有易携带、能安装多种软件,可以通过网络进行数据传送,基于手机的检测方法具有低消耗、易携带、数据传输快等特点,将有可能发展成为下一代即时护理(point-of-care, POC)诊断平台,提供移动检测服务和个性化医疗^[53]。传统检测材料费用较高,易造成环境污染,而滤纸成分为纤维素,主要来源于木材、麦草等植物,属于可再生资源,具有价格便宜、吸水性强、易储存、易使用、具有高密度羟基、易修饰且生物兼容性强等特性,基于滤纸的电化学、微流

控等检测方法已开始用于分子诊断领域^[54]。

抗体是免疫学检测方法中的核心元件,抗体在一定程度上决定了免疫学检测方法的灵敏性和特异性。食品加工会使蛋白质结构和化学性质发生改变,导致用试剂盒检测过敏原含量时存在偏差。表位是引起过敏的物质基础,IgE 线性表位在食品加工中不易被破坏,稳定性较好,可以作为检测过敏原的有效标志物,还可以通过对表位残基的检测来初步预测食品的潜在致敏性^[30]。另外,核酸适配体是能与目标物质高特异性、高选择性结合的一段单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸,且具有分子量小、易修饰、稳定性好、合成费用低等特点,且对目标分子具有高亲和力,具有代替抗体用于过敏原检测的潜力^[55]。例如,Weng 等^[56]将鸡蛋溶菌酶、 β -羽扇豆球蛋白、冈田酸和双鞭甲藻毒素的特异性核酸适配体与量子点偶联作为检测探针,石墨烯作为荧光淬灭剂,建立基于滤纸的微流控检测方法,对这4种目标分子的 LOD 分别为343、2.5、0.4 和 0.56 ng/mL,灵敏度与 ELISA 试剂盒相似,且具有检测时间短、样品和试剂消耗少等优点。此外,还可以利用表位肽筛选到特异性识别 IgE 表位的适配体,用于过敏原致敏性残基的检测^[57]。因此,表位特异性抗体及核酸适配体将可能代替传统抗体用于过敏原的检测。

细胞是生命体生物活动的基本单位,传统免疫学检测方法是基于抗原抗体反应的分子水平,未能体现细胞对食品中过敏原做出的反应。随着电子传感器和体外细胞培养技术的发展,以活细胞为传感介质构建细胞传感器已成为生物传感器发展的新方向^[58]。根据细胞的兴奋动作电位和细胞力学的特殊性质,可将细胞用于定性或定量检测过敏原,从而实现过敏原的含量检测和致敏性评价。

5 小结与展望

随着社会环境和人们生活方式的改变,牛乳过敏患者人数呈上升趋势。且目前尚无有效的治疗方法,患者主要从食品包装上的过敏原标识来避免接触含牛乳蛋白的食品。 β -乳球蛋白是牛乳的重要过敏原,可以作为检测食品中是否含牛乳蛋白的有效标志物。建立灵敏、快速、可靠的 β -乳球蛋白检测方法有利于牛乳过敏原的标识。如上所述,LC-MS 不仅能检测天然蛋白和蛋白片段,还具有高灵敏的优点。ELISA 是检测牛乳 β -乳球蛋白的主要方法,具有高通量、操作简单、灵敏度高等优点。尽管如此,目前绝大多数色谱学和免疫学方法不能特异性检测牛乳 β -乳球蛋白致敏性残基,并缺乏快速、高灵敏、便携式的定量检测方法。

参考文献

- [1] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management [J]. J

- Aller Clin Immun, 2018, 141(1): 41–58.
- [2] Yang M, Tan M, Wu J, *et al.* Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in chinese infants: A population-based survey [J]. Jpn J Parent Enter Nutr, 2018. DOI: 10.1002/jpen.1472.
- [3] 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.
- Wand WZ, Wen HB, Jin SM, *et al.* Summary of food allergens and labelling in various countries [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(4): 419–422.
- [4] Spies JR. Milk allergy [J]. J Milk Food Technol, 1973, 36(4): 225–231.
- [5] Eischeid AC. A method to detect allergenic fish, specifically cod and pollock, using quantitative real-time PCR and COI DNA barcoding sequences [J]. J Sci Food Agric, 2018, DOI: 10.1002/jsfa.9466.
- [6] Ito M, Mizota T, Kitaguchi T, *et al.* Simultaneous detection of eight species of tree nut in foods using two tetraplex polymerase chain reaction assays [J]. Biosci Biotechnol Bioch, 2018, 82(11): 1985–1991.
- [7] Singh H, Cantoria MJ, Malave P, *et al.* Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 [J]. Food Chem, 2016, (194): 383–390.
- [8] Bobe G, Beitz DC, Freeman AE, *et al.* Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(2): 458–463.
- [9] Bordin G, Cordeiro-Raposo F, Dela CB, *et al.* Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2001, 928(1): 63–76.
- [10] Bonfatti V, Grigoletto L, Cecchinato A, *et al.* Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants [J]. J Chromatogr A, 2008, 1195(1–2): 101–106.
- [11] Bonfatti V, Giantin M, Rostellato R, *et al.* Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC [J]. Food Chem, 2013, 136(2): 364–367.
- [12] Damm I, Enger E, Chrubasik-Hausmann S, *et al.* Fast and comprehensive analysis of secondary metabolites in cocoa products using ultra high-performance liquid chromatography directly after pressurized liquid extraction [J]. J Sep Sci, 2016, 39(16): 3113–3122.
- [13] Boitz LI, Fiechter G, Seifried RK, *et al.* A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of beta-lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples [J]. J Chromatogr A, 2015, (1386): 98–102.
- [14] Czerwenka C, Maier I, Potočnik N, *et al.* Absolute quantitation of beta-lactoglobulin by protein liquid chromatography-mass spectrometry and its application to different milk products [J]. Anal Chem, 2007, 79(14): 5165–5172.
- [15] Sayers RL, Johnson PE, Marsh JT, *et al.* The effect of thermal processing on the behaviour of peanut allergen peptide targets used in multiple reaction monitoring mass spectrometry experiments [J]. Analyst, 2016, 141(13): 4130–4141.
- [16] 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.
- [17] Ansari P, Stoppacher N, Rudolf J, *et al.* Selection of possible marker peptides for the detection of major ruminant milk proteins in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 399(3): 1105–1115.
- [18] Sélo I, Clément G, Bernard H, *et al.* Allergy to bovine beta-lactoglobulin: Specificity of human IgE to tryptic peptides [J]. Clin Exp Aller, 1999, 29(8): 1055–1063.
- [19] Ji J, Zhu P, Pi FW, *et al.* Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens [J]. Food Control, 2017, (74): 79–88.
- [20] Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, *et al.* IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy [J]. Int Arch Aller Imm, 2001, 126(2): 111–118.
- [21] 张忠华. 牛乳 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- Zhang ZH. Immunosorbent Assay for Detecting α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cow' milk [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2009.
- [22] 袁水林, 鼎熊, 陈红兵, 等. 间接竞争 ELISA 法检测牛乳中 β -乳球蛋白含量的准确性评价[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 100–104.
- Yuan SL, Ding X, Chen HB, *et al.* Evaluation of the accuracy of indirect competitive ELISA used to detect milk β -lactoglobulin [J]. Food Sci, 2014, 35(18): 100–104.
- [23] Cabanillas B, Cuadrado C, Rodriguez J, *et al.* Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing [J]. Food Chem, 2015, (183): 18–25.
- [24] Negroni L, Bernard H, Clement G, *et al.* Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin [J]. J Immunol Methods, 1998, (220): 25–37.
- [25] 韩婷. 牛乳 β -乳球蛋白过敏原表位串联体的表达[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
- Han T. Expression of a tandem of epitopes on bovine beta-lactoglobulin allergen [D]. Nanchang: Nanchang University, 2010.
- [26] He SF, Li X, Gao JY, *et al.* Preparation, immunological characterization and polyclonal antibody development for recombinant epitope tandem derived from bovine β -lactoglobulin [J]. Food Agric Immunol, 2016, 27(6): 806–819.
- [27] He SF, Li X, Gao JY, *et al.* Development of sandwich ELISA for testing bovine β -lactoglobulin allergenic residues by specific polyclonal antibody against human IgE binding epitopes [J]. Food Chem, 2017, (227): 33–40.
- [28] He SF, Li X, Gao JY, *et al.* Development of sandwich ELISA for testing bovine β -lactoglobulin allergenic residues by specific polyclonal antibody against human IgE binding epitopes [J]. Food Chem, 2017, (227): 33–40.
- [29] He SF, Li X, Gao JY, *et al.* Development of a H₂O₂-sensitive quantum dots-based fluorescent sandwich ELISA for sensitive detection of bovine β -lactoglobulin by monoclonal antibody [J]. J Sci Food Agric, 2018, 98(2): 519–526.
- [30] He SF, Li X, Wu Y, *et al.* A novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay with covalently bound monoclonal antibody and gold probe for sensitive and rapid detection of bovine β -lactoglobulin [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(16): 3693–3703.
- [31] De-Luis R, 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): 643–647.
- [32] Knol EF. Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and

- basophils [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(7): 620–624.
- [33] Knipping K, Simons PJ, Buelens-Sleumer LS, *et al.* Development of β -lactoglobulin-specific chimeric human IgE κ monoclonal antibodies for *in vitro* safety assessment of whey hydrolysates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106025.
- [34] De-Luis R, Pérez MD, Sánchez L, *et al.* Development of two immunoassay formats to detect beta-lactoglobulin: Influence of heat treatment on beta-lactoglobulin immunoreactivity and assay applicability in processed food [J]. *J Food Protect*, 2007, 70(7): 1691–1697.
- [35] Wu XL, He WY, Ji KM, *et al.* A simple and fast detection method for bovine milk residues in foods: A 2-site monoclonal antibody immunochromatography assay [J]. *J Food Sci*, 2013, 78(3): 452–457.
- [36] Ruiz-Valdepenas MV, Campuzano S, Conzuelo F, *et al.* Electrochemical magnetoimmunosensing platform for determination of the milk allergen β -lactoglobulin [J]. *Talanta*, 2015, (131): 156–162.
- [37] Eissa S, Tlili C, L'hocine L, *et al.* Electrochemical immunosensor for the milk allergen beta-lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes [J]. *Biosens Bioelectro*, 2012, 38(1): 308–313.
- [38] Sun Y, Lu JZ. Chemiluminescence-based aptasensors for various target analytes [J]. *Luminescence*, 2018, 33(8): 1298–1305.
- [39] Eissa S, Zourob M. *In vitro* selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen [J]. *Biosens Bioelectro*, 2017, (91): 169–174.
- [40] Ricciardi C, Santoro K, Stassi S, *et al.* Microcantilever resonator arrays for immunodetection of β -lactoglobulin milk allergen [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, (254): 613–617.
- [41] Badran AA, Morais S, Maquieira Á. Simultaneous determination of four food allergens using compact disc immunoassaying technology [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, (409): 2261–2268.
- [42] Pastor-Vargas C, Maroto AS, Diaz-Perales A, *et al.* Sensitive detection of major food allergens in breast milk: First gateway for allergenic contact during breastfeeding [J]. *Allergy*, 2015, 70(8): 1024–1027.
- [43] Pastor-Vargas C, Maroto AS, Diaz-Perales A, *et al.* Detection of major food allergens in amniotic fluid: Initial allergenic encounter during pregnancy [J]. *Pediatr Aller Immunol*, 2016, 27(7): 716–720.
- [44] Wang W, Zhu X, Teng S, *et al.* Development and validation of a surface plasmon resonance biosensor for specific detection of porcine serum albumin in food [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(6): 1868–1872.
- [45] Ashley J, Piekarska M, Segers C, *et al.* An SPR based sensor for allergens detection [J]. *Biosens Bioelectro*, 2017, (88): 109–113.
- [46] Ashley J, Shukor Y, D'aurelio R, *et al.* Synthesis of molecularly imprinted polymer nanoparticles for α -casein detection using surface plasmon resonance as a milk allergen sensor [J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(2): 418–424.
- [47] Ashley J, D'aurelio R, Piekarska M, *et al.* Development of a beta-lactoglobulin sensor based on SPR for milk allergens detection [J]. *Biosensors*, 2018, 8(2): E32.
- [48] 宁亚维, 刘茁, 范素芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食品中鸡蛋过敏原卵白蛋白[J]. *食品科学*, 2018, 39(20): 332–336.
- Ning YW, Liu Z, Fan SF, *et al.* Detection of egg allergen ovalbumin in food by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2018, 39(20): 332–336.
- [49] Carrera M, Canas B, Gallardo JM. Rapid direct detection of the major fish allergen, parvalbumin, by selected MS/MS ion monitoring mass spectrometry [J]. *J Proteom*, 2012, 75(11): 3211–3220.
- [50] Jauset-Rubio M, Sabaté-Del-Río J, Mairal T, *et al.* Ultrasensitive and rapid detection of β -conglutinin combining aptamers and isothermal recombinase polymerase amplification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(1): 143–149.
- [51] Vashist SK, Luong JHT. A rapid and highly sensitive immunoassay format for human lipocalin-2 using multiwalled carbon nanotubes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, (93): 198–204.
- [52] Sanchez-Tirado E, Gonzalez-Cortes A, Yanez-Sedeno P, *et al.* Magnetic multiwalled carbon nanotubes as nanocarrier tags for sensitive determination of fetuin in saliva [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, (113): 88–94.
- [53] Ross GMS, Bremer M, Nielen MWF. Consumer-friendly food allergen detection: Moving towards smartphone-based immunoassays [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(22): 5353–5371.
- [54] Cincotto FH, Fava EL, Moraes FC, *et al.* A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers [J]. *Talanta*, 2019, (195): 62–68.
- [55] Boushell V, Pang S, He LL. Aptamer-based SERS detection of lysozyme on a food-handling surface [J]. *J Food Sci*, 2017, 82(1): 225–231.
- [56] Weng X, Neethirajan S. Paper-based microfluidic aptasensor for food safety [J]. *J Food Saf*, 2018, 38(1): e12412.
- [57] Low SY, Hill JE, Peccia J. A DNA aptamer recognizes the *Asp f 1* allergen of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(3): 544–548.
- [58] Jiang H, Jiang D, Zhu P, *et al.* A novel mast cell co-culture microfluidic chip for the electrochemical evaluation of food allergen [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, (83): 126–133.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



何圣发, 讲师, 主要研究方向为食品卫生与安全。
E-mail: heshengfa11@hormail.com



陈红兵, 教授, 主要研究方向为食物过敏。
E-mail: chenhongbing@ncu.edu.cn