

质谱技术在食物过敏原检测中的研究进展

周红菲^{1,2}, 吴志华^{1,3*}, 陈红兵^{1,3}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学食品学院, 南昌 330031;
3. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047)

摘要: 食物过敏是当前食品安全领域比较突出的问题, 相应的过敏原检测方法研究也越来越受重视。相比于传统的免疫学检测方法, 质谱技术在检测加工后以及复杂基质中的食物过敏原中, 具有高通量和高灵敏度等优点, 被广泛应用于食物过敏原的检测。本文主要从定性和定量 2 方面介绍了质谱技术在食品过敏原检测中的研究进展。相关研究对牛乳、鸡蛋、小麦和榛子(坚果类)等主要食物过敏原均有涉及。在定性研究中, 以肽质量指纹图谱法和肽碎片离子鉴定法为主, 鉴定食物中的过敏原蛋白。在定量研究中, 通过标记/无标记技术, 也能够实现对微量的目标蛋白进行相对/绝对定量。质谱技术应用于食物过敏原检测中, 将有助于提升过敏原检测能力, 降低食物过敏安全风险。

关键词: 食物过敏; 质谱; 过敏原; 检测

Research progress on the detection of food allergens by mass spectrometry

ZHOU Hong-Fei^{1,2}, WU Zhi-Hua^{1,3*}, CHEN Hong-Bing^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. School of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330031, China;
3. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Food allergy is a prominent problem in the field of food safety, and more and more attention has been paid to the study of allergen detection methods. Compared with traditional immunological detection, mass spectrometry, which is widely used in the detection of food allergens, takes the advantages of high throughput and high sensitivity in detecting food allergens, especially in those processed samples and complex substrates. This paper mainly introduced the research progress of mass spectrometry in food allergen detection from the qualitative and quantitative aspects. These studies involved most of major food allergens, such as milk, eggs, wheat and hazelnuts. For qualitative analysis, peptide mass fingerprint method and peptide-fragment fingerprint method were applied to identify allergenic proteins in food. In quantitative research, relative/absolute quantification of trace target proteins can also be achieved through labeling/no-labeling technology. The application of mass spectrometry in food allergen detection would upgrade our ability of allergen detection and reduce the risk of food allergy.

KEY WORDS: food allergy; mass spectrometry; allergen; determination

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660446)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660446)

*通讯作者: 吴志华, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: wuzhuhua@ncu.edu.cn

*Corresponding author: WU Zhi-Hua, Ph.D, Professor, Sino-German Joint Research Institute, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, No.235 Nanjing Rd. East, Nanchang 330047, China. E-mail: wuzhuhua@ncu.edu.cn

1 引言

食物过敏被认为是当今社会一个重大的公共卫生问题,受影响的儿童与成年人数量快速增长,针对食物过敏的管理,目前更多地是依赖严格控制与过敏原接触^[1,2]。根据有效数据,大约 90%的食物过敏是由 8 类食物引起的,这 8 类食物通常被称为“八大食物过敏原”,包括鸡蛋、鱼、牛奶、花生、贝类、大豆、坚果和小麦,且同一过敏食物中可能存在多种能够引起过敏反应的蛋白^[3]。为了避免过敏人群摄入潜在致敏原,全球许多国家都颁布了相关法规,要求对食品中潜在的致敏成分进行正确的食品标签标注^[4]。在欧盟 2006/142/EC 号指令中,规定了 14 种不同过敏食物的标签标注。我国自 2012 年起实施的《预包装食品标签通则》中,也将“致敏物质”列入其中,要求在配料表邻近位置对其加以标示^[5]。在食品的生产、加工过程中也存在过敏原的交叉污染,这依然是引发高危人群过敏反应的重要危险因素。因此,建立灵敏可靠的检测方法体系,在一定置信水平上检测到食物中潜在的过敏原具有重大意义。

目前,已有多种技术方法应用于检测加工或未加工食物中多种潜在的过敏原。其中包括基于分子生物学方法的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),实时荧光定量 PCR 法(quantitative real-time PCR)以及环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[6];基于免疫学的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫印迹技术(Western blotting)等。ELISA 法作为一项常用快速检测食物过敏原的方法,可能受到复杂的食物基质成分的干扰,出现交叉反应现象,且在食物加工过程中也会对过敏原产生修饰,从而掩盖过敏原本身的抗原性,导致检测结果的偏差^[7-9]。现有的 PCR 法是通过间接检测食物过敏原,也受到过敏原蛋白物种、生长条件和 DNA 水平等因素影响^[10]。采用免疫学方法分析复杂体系中过敏原蛋白也有一定的局限性^[11],而质谱分析技术以高分辨率、高灵敏度、高通量等优势,在食物过敏原的识别与表征以及定量等研究领域可以发挥巨大的作用^[12]。

本文对质谱技术的工作原理进行了简单介绍,并对近年来这一技术在食物过敏原的定性和定量检测方面的应用和进展以及未来发展趋势作出了综述。

2 质谱技术

质谱法(mass spectrometry, MS)的基本原理是使试样电离,生成不同带电的分子或分子碎片,经加速电场的作用,进入质量分析器,借助电场和磁场的作用使得这些离子按照质荷比(m/z)的不同获得分离^[13]。离子源和质量分析器是构成质谱仪的核心部件^[14]。由于蛋白质和多肽大多具

有极性、不易挥发和热不稳定性,在早期质谱的应用中有所局限^[15]。随着软电离源的引入,基质辅助解吸电离(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)等技术应用于蛋白质和多肽分析,质谱技术在蛋白质组学研究中发挥越来越重要的作用^[16,17]。

质量分析器作为另一项重要的质谱分析组成元件,可以根据质量与电荷的比值存储离子并将其分离。离子阱(ion trap, IT)、轨道阱(orbitrap)和离子回旋共振(ion cyclotron resonance, ICR)质量分析器根据它们的 m/z 共振频率分离离子;四极杆(quadrupole, Q)质量分析器是使特定质荷比的离子在震荡电场中趋于稳定,进入检测器;飞行时间(time of flight, TOF)分析器则基于飞行时间来分离。每个质量分析器都有其独特的性能,如质量范围、分析速度、分辨率、灵敏度、离子传输和动态范围^[18,19]。轨道阱质谱仪灵敏度很高,质量准确度较稳定,适用于蛋白质组学研究;飞行时间质谱仪具有较大的质量分析范围,也适合蛋白质等大分子的分析。联用质谱仪是一种结合多种质谱分析器来满足分析过程中特定需要的仪器,如四极杆-飞行时间(quadrupole-time of flight, Q-TOF)质谱仪^[20]、四极杆-静电场轨道阱(quadrupole-orbitrap, Q-orbitrap)质谱仪等。MALDI-TOF-TOF 质谱仪可以同时实现肽质量指纹法和肽碎片离子鉴定法,进行蛋白质鉴定,TOF-TOF 还擅长高能碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)和高速扫描^[14]。随着质谱技术的不断发展,蛋白质组学研究取得了飞速的突破,这一技术也将在食物过敏原检测领域占据日趋重要的地位^[21]。

3 食物过敏原的质谱检测

食物过敏原一般能诱导机体产生 IgE,引起 I 型超敏反应,常见的食物过敏原有奶、蛋、鱼虾等食物蛋白或多肽^[22]。质谱技术应用于食物过敏原的检测,最主要的优势在于,它基于蛋白质的氨基酸序列或酶解产生的肽段,而不是蛋白质的高级结构,这可以避免各种加工处理检测结果造成的影响^[11]。此外,质谱法还具有自动化和标准化带来的良好灵敏性和稳定性^[23]。根据在食物过敏原检测领域的研究目的不同,质谱技术研究内容主要包括:鉴定潜在食物过敏原蛋白质种类(定性蛋白质组学)和探究过敏原蛋白表达量的变化(定量蛋白质组学)。

3.1 定性分析

蛋白质定性研究最常采用的 2 种方法:肽质量指纹图谱法(peptide mass fingerprinting, PMF)^[24]和肽碎片离子鉴定法(peptide-fragment fingerprint, PFF)^[25]。

PMF 法指的是用特殊的已知酶切位点的酶(常用胰蛋白酶),将蛋白质进行酶解,获得多肽混合物,经质谱检测

得到肽段的分子量。设定一定的误差范围,与数据库中蛋白质理论酶切分子量进行匹配,将匹配肽段的结果进行打分排序,最终确定蛋白质的种类。PMF 法主要依托于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的技术平台,肽段匹配的数据检索也可以借助一些软件来完成,如 MASCOT^[26]、SWISS-PROT 等。MALDI 是软电离源,较少产生碎片离子,便于解析图谱。由于蛋白质的氨基酸序列不同,酶解后产生肽段的分子量也不同,因此 PMF 法得到的图谱具有一定的特异性。Natale 等^[27]将脱脂牛乳进行 2D 电泳的初步分离,然后分别挖取蛋白点进行胶内酶切,之后将获取的肽段溶液进行 MALDI-TOF-MS 的分析,经过与数据库中理论肽段分子量的比对,确定各切胶斑块代表的蛋白质种类。Ceglie 等^[28]采用溶液内胰蛋白酶消化法对榛子油脂蛋白进行酶解,利用基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI)快速、灵敏地检测了油样中榛子蛋白的含量,并对不同提取工艺的提取蛋白进行了试验。最终获得数条稳定的榛子蛋白的特征肽段,可能成为今后测定其他加工食品中痕量榛子蛋白的标记物。不过,PMF 法也存在一定的局限性。由于样品的纯度不高,加工引起的蛋白质修饰以及肽段峰迁移,肽段的离子化程度不一致等,会导致谱图复杂难以解析,给肽段与数据库的匹配带来一定的难度^[29]。

PFF 法是建立在 PMF 的理论基础上,进一步获取更多的肽段信息。它是利用串联质谱,将特定的肽段进一步打碎,结合母离子峰,通过分析相邻的同类型的峰质量差确定肽段的相应氨基酸残基,从而推算出目标肽段的氨基酸序列^[14]。早在 2000 年,Medzihradzsky 等^[30]就介绍了一种新型基质辅助激光解吸/电离飞行时间/飞行时间高分辨串联质谱仪(MALDI-TOF-TOF-MS)用于多肽测序。该仪器结合了 MALDI 相关多肽分析的高灵敏度和高能碰撞诱导解离(CID)提供的综合碎片信息两大优点。不同于 MALDI-TOF 仪器广泛使用的后源衰减技术,即通常结合多达 10 个不同质量区域的独立光谱,而 MALDI-TOF-TOF 仪器在固定的反射管电压下一次采集可获得完整的片段离子光谱。它将蛋白质酶切后产生的多肽在串联质谱内轰撞成离子碎片,然后借助蛋白质多肽串联质谱数据库搜索匹配多肽信息,从而确定蛋白质种类。将四极杆和正交加速度飞行时间质量分析器耦合在一起,形成的 Q-TOF-MS 比 MALDI-TOF 质谱仪具有更高的质量准确性和分辨率,可以被用来确定过敏原特征肽段^[31]。Monaci 等^[32]通过毛细管液相色谱串联四级杆-飞行时间(liquid chromatogram-quadrupole-time of flight, LC-Q-TOF)质谱仪对热加工食品中牛奶过敏原进行检测,确定了牛奶过敏原的特异性多肽,为今后提供了预先筛选和/或验证目标过敏原的标记物依据。Stasio 等^[33]为了探究食物过敏原蛋白在消化系统中的水解稳定性,采用体外静态模型模拟包括

口腔、胃、十二指肠和肠道(刷状缘膜酶)阶段在内的胃肠道消化过程,利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)将消化前与消化后产物按照分子量进行初步分离,后采用四极杆静电场轨道阱质谱仪对各蛋白条带进行 MS/MS 分析,选择了一级质谱图谱中最强烈的 10 个离子峰进行破碎,最终依托仪器分析软件和 NCBI(National Center of Biotechnology Information)数据库将图谱信息转化为蛋白鉴定结果。

PMF 法作为早期蛋白质大规模鉴定的有效工具,主要适用于相对较纯的蛋白质,操作简便,但不能直接分析蛋白质混合物。而 PFF 法则是对选定肽段碰撞诱导解离产生的碎片离子进一步分析,可以获得较精准的肽段信息,用于混合蛋白质的鉴定。

3.2 定量分析

不断改进和发展的蛋白质组学技术,将蛋白质的定性分析向高精度与高通量的定量分析推进。定量分析对于深入了解蛋白质在生物系统中的功能和动态至关重要,基于质谱的定量蛋白质组学可分为相对定量和绝对定量(absolute quantification, AQUA)蛋白质组学^[34]。

相对定量蛋白质组学可以用稳定同位素标记法或无标记法对两个或多个样品进行比较^[35]。稳定同位素标记法包括:同位素编码亲和标记技术(isotope coded affinity tags, ICAT)^[36]、同位素编码的蛋白标记(isotope coded protein label, ICPL)^[37]、同位素差异结合能量转移标记(isotope-differentiated binding energy shift tags, IDBEST)^[38]、同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)、串联质谱标记(tandem mass tags, TMT)^[39]、同位素肽段末端标记(isobaric peptide termini labeling, IPTL)^[40]、细胞培养条件下稳定同位素标记(stable isotope labelling by amino acids in cell culture, SILAC)^[41,42]、无标记统计评估方法包括选择反应监测(selected reaction monitoring, SRM)技术和多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)等。ICATs 是生物素化的碘乙酰胺衍生物(或丙烯酰胺衍生物),可与变性多肽的半胱氨酸侧链上的巯基反应(这类试剂只能作用于蛋白质的部分半胱氨酸);ICPL 方法适用于不同类型的蛋白质样品,包括组织提取物和体液。与 ICAT 标记的原理类似,ICPL 试剂也有不同数目的氮原子的变体,以便进行多重定量分析;IDBEST 试剂在质谱离子源中产生具有高电离效率的正电荷,它将 ESI 或 MALDI 质谱技术与电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)相结合,成为一项元素特异性检测的互补技术。iTRAQ 是比较常见的商业化的同位素标记定量技术,最早是由 Applied Biosystems(现在的 AB Sciex)开

发的,最初设计用于同时对多达 4 个样本进行分析,但自 2007 年以来可以分析多达 8 个不同的样品^[43]。采用 TMT 标记对多肽定量,需要使用到四极杆-飞行时间(Q-TOF)、离子阱(IT)、飞行时间-飞行时间(TOF-TOF)或三重四极杆(triple quadrupole, QQQ)等质量分析器进行 MS/MS 碎片化。许多仪器方法说明也都建议使用高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD),来进行 TMT 标记样品的离子碎片分析;IPTL 适合复杂蛋白组学的分析。SILAC 技术在实验的早期,标记就已经被结合到肽段上,从而可以消除样品制备和纯化过程中的损失。此外,这项标记技术除了标记介质的制备以外,不需要任何化学反应。

在食物过敏原的定量检测中,无标记统计评估方法使用较为广泛^[44]。当目标肽段是来源于分析试样中存在的高丰度的蛋白时,数据依赖分析(data-dependent analysis, DDA)方法是最佳的获取模式。而采用数据独立分析(data-independent analysis, DIA)模式时,质谱仪中出现的所有肽段离子都会进行碎片化,不受指定目标肽段的限制,可以应用于未知蛋白质和大规模蛋白质的定量分析^[45, 46]。Monaci 等^[46]将高分辨率质谱和 DIA 模式结合,用于同时测定添加到商业白葡萄酒中作为澄清剂的潜在致敏牛奶(酪蛋白)和蛋清(溶菌酶和卵白蛋白)蛋白,最终对白葡萄酒中蛋清粉和酪蛋白酸盐的检测限为 0.4~1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由于近年来 MS 仪器的发展,基于 DIA 模式演变而来,对所有理论碎片离子进行顺序采集的连续窗口采集技术(sequential windowed acquisition of all theoretical fragmentation spectra, SWATH)^[47]也越来越受欢迎。当蛋白或者肽段已知时,可以采用选择反应监测(SRM)技术进行靶向蛋白质组学研究,这种模式对复杂、基质背景高的样品中排除噪音和干扰情况较好,因其高灵敏度和特异性被认为是蛋白质定量的金标准^[48]。质谱多反应监测(MRM)方法,是基于 SRM 技术发展而来的,是一种根据已知或假定的反应离子信息,有目的地进行选择性质谱信号采集,只将选定的特异性母离子进行碰撞诱导,去除其他子离子的干扰,只对选定的特异子离子进行质谱信号的采集,并通过统计数据分析从而获取质谱定量信息的技术。一般主要将三重四极杆质谱仪或四极杆离子阱质谱仪应用于选择性/多反应性监测(SRM/MRM)。它的显著优势在于通量高、重复性好且具有较高的灵敏度和特异性,能够在复杂的样品中对微量的目标蛋白进行精准测定。Martinez-esteso 等^[49]采用反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)对小麦面筋蛋白进行初步分离,并建立了一种基于选择反应监测(SRM)的液相色谱-质谱/质谱联用方法,最终由靶向筛选方法检测到了小麦面筋中具有代表性的特征肽段,许多最初依据传统的蛋白质组学的离子图谱结合数据库搜索而被鉴定为特异性谷蛋白肽段,在使用 SRM

时,表现为非特异性。因此,过度依赖单一方法不足以确定食物中蛋白的特征肽段。Pilolli 等^[50]设计了一种相对快速的超声辅助尺寸排阻色谱柱(size exclusion column, SEC)提取纯化的样品处理程序,并建立了多维色谱分析系统,形成了高效、精简的分析流程,利用 SRM 分析法在复杂食物基质中鉴定出了鸡蛋、牛奶、大豆、榛子和花生过敏原。在线固相萃取(solid phase extraction, SPE)的使用,使得在传统的反相分离之前,先富集并纯化了部分目标肽段,为最终的 SRM 检测提供了优势,从而在保持合理运行时间的同时提高了灵敏度。

绝对定量蛋白质组学的方法思路于 2003 年提出,可以认为是同位素稀释质谱法的一种改进,使用了合成标记肽作为内标。首先需要利用酶的消化,将蛋白完全裂解成肽段。从中选取一个目标肽作为蛋白质的定量标记,以化学合成的同位素标记肽作为内标来实现蛋白的绝对定量^[34]。该方法更适用于针对已知蛋白质的小范围靶向实验,而不是对大量未知蛋白质的定量。Houston 等^[51]对不同品种非转基因大豆中过敏原蛋白的表达量进行了研究。采用线性离子阱串联质谱仪对胰蛋白酶消化后的蛋白样品进行相对定量,鉴定出了 10 种大豆过敏原蛋白,接着通过以同位素标记的合成多肽为内标的多反应监测法,对其中 8 种大豆过敏原蛋白进行了绝对定量。结果表明,参与研究的 20 个大豆品种中过敏原总量基本一致。

不同的定量蛋白质组学技术的建立,使得不同性质、实验目的样品检测得以实现,也大大提高了食物过敏原定量分析的准确性,对过敏原的定量检测提供了有力的支持。

4 结语与展望

质谱技术在加工食品或复杂基质中检测过敏原的灵敏性和准确性都高于传统免疫学方法和 PCR 法,由于设备体积较大和检测门槛较高等原因,质谱技术主要用于实验室结果确证。质谱技术的不断革新,推动了食物过敏原检测技术的进步。目前在食物过敏原的质谱检测方面,重点关注的方向主要为:提高质谱样品前处理,包括样品提取和富集纯化的效率;提高自动化操作程度,减少人为造成结果差异。实现样品前处理的规范化、质谱分析的自动化,将为食物过敏原的检测和研究提供更加有力的支持。

参考文献

- [1] Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, *et al.* Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(6): 1191-1197.
- [2] Hebling CM, Ross MM, Callahan JH, *et al.* Size-selective fractionation and visual mapping of allergen protein chemistry in arachis hypogaea [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(11): 5384-5395.
- [3] Ho MHK, Wong WHS, Chang C. Clinical spectrum of food allergies: A

- comprehensive review [J]. *Clin Rev Allerg Immunol*, 2014, 46(3): 225–240.
- [4] Monaci L, Deangelis E, Montemurro N, *et al.* Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, (106): 21–36.
- [5] GB 7718-2011 食品安全国家标准 预包装食品标签通则[S].
GB 7718-2011 National food safety standard-General principles for labelling prepackaged food [S].
- [6] 余之蕴, 范安妮, 张娟, 等. 基于分子生物学技术检测食物过敏原的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(12): 4721–4725.
She ZY, Fan AN, Zhang J, *et al.* Research progress on food allergen detection based on molecular biology technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(12): 4721–4725.
- [7] Van-Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(1): 111–118.
- [8] Monaci L, Brohee M, Tregoeat V, *et al.* Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 669–675.
- [9] Sicherer SH, Wood RA, stablein D, *et al.* Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(6): 1191–1197.
- [10] 熊丽姬, 佟平, 肖娜, 等. 基于液相色谱-质谱联用技术检测食物过敏原研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(21): 274–278.
Xiong LJ, Tong P, Xiao N, *et al.* Progress in detection of food allergens based on liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2014, 35(21): 274–278.
- [11] Korte R, Oberleitner D, Brockmeyer J. Determination of food allergens by LC-MS: Impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification [J]. *J Proteom*, 2018, (11): 1874–3919.
- [12] Stasio DL, Picariello G, Mongiello M, *et al.* Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, (107): 88–98.
- [13] Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, *et al.* Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4): 734–740.
- [14] 陈念念, 方真, 陈佳娴, 等. 基于质谱技术的蛋白质组学在水产品鉴别中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(21): 5629–5636.
Chen NN, Fang Z, Chen JX, *et al.* Research progress of application of proteomics in the aquatic products authentication based on mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(21): 5629–5636.
- [15] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers [J]. *Anal Chem*, 1991, 63(24): 1193–1203.
- [16] Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009, 11(1): 49–79.
- [17] Cucu T, Meulenaer DB, Kerkaert B, *et al.* MALDI based identification of whey protein derived tryptic marker peptides that resist protein glycation [J]. *Food Res Int*, 2012, 47(1): 23–30.
- [18] Riley NM, Westphall MS, Hebert AS, *et al.* Implementation of activated ion electron transfer dissociation on a quadrupole-orbitrap-linear ion trap hybrid mass spectrometer [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(12): 6358–6366.
- [19] Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2008, 27(6): 661–699.
- [20] Montowska M, Fornal E. Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. *LWT*, 2018, (87): 310–317.
- [21] Angelis DE, Bavaro S, Forte G, *et al.* Heat and pressure treatments on almond protein stability and change in immunoreactivity after simulated human digestion [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1679.
- [22] Neethirajan S, Weng X, Tah A, *et al.* Nano-biosensor platforms for detecting food allergens-new trends [J]. *Sens Bio-Sensing Res*, 2018, (18): 13–30.
- [23] Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2015, 34(1): 2–23.
- [24] Santos OC, Mas S, Benede S, *et al.* A recombinant isoform of the Ole e 7 olive pollen allergen assembled by de novo mass spectrometry retains the allergenic ability of the natural allergen [J]. *J Proteom*, 2018, (187): 39–46.
- [25] Bogdanov B, Smith RD. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24(2): 168–200.
- [26] Fang L, Li G, Gu R, *et al.* Influence of thermal treatment on the characteristics of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin) [J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(14): 5322–5328.
- [27] Natale M, Bisson C, Monti G, *et al.* Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(5): 363–369.
- [28] Ceglie DC, Calvano CD, Zambonin CG. Determination of hidden hazelnut oil proteins in extra virgin olive oil by cold acetone precipitation followed by in-solution tryptic digestion and MALDI-TOF-MS analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(39): 9401–9409.
- [29] Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, *et al.* Peptide mass fingerprinting [J]. *Methods*, 2005, 35(3): 237–247.
- [30] Medzihradzky KF, Campbl JM, Baldwin MA, *et al.* The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(3): 552–558.
- [31] Bruno D, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis [J]. *Science*, 2006, 312(5771): 212–217.
- [32] Monaci L, NØrgaard JV, Hengel-Van AJ. Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix [J]. *Anal Methods-UK*, 2010, 2(7): 967.
- [33] Stasio DL, Picariello G, Mongiello M, *et al.* Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, (107): 88–98.
- [34] Gerber SA, Rush J, Stemman O, *et al.* Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 6940–6945.
- [35] Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics [J]. *J Pharm Biomed*, 2015, (113): 2–20.
- [36] Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, *et al.* Absolute SILAC for accurate

- quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(3): 1118–1130.
- [37] Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels [J]. *Proteomics*, 2005, 5(1): 4–15.
- [38] Hall MP, Ashrafi S, Obegi I, *et al.* Mass defecttags for biomolecular mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2003, 38(8): 809–816.
- [39] Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2015, (113): 2–20.
- [40] Koehler CJ, Strozynski M, Kozielski F, *et al.* Isobaric peptide termini labeling for MS/MS-based quantitative proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(9): 4333–4341.
- [41] Shao-En O, Matthias M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5): 252–262.
- [42] Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, *et al.* Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(3): 1118–1130.
- [43] Choe L, D'ascenzo M, Relkin NR, *et al.* 8-Plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease [J]. *Proteomics*, 2007, 7(20): 3651–3660.
- [44] Ortea I, O'connor G, Maquet A. Review on proteomics for food authentication [J]. *J Proteom*, 2016, (147): 212–225.
- [45] Egertson JD, Maclean B, Johnson R, *et al.* Multiplexed peptide analysis using data-independent acquisition and skyline [J]. *Nat Prot*, 2015, 10(6): 887–903.
- [46] Monaci L, Losito I, Angelis DE, *et al.* Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white wines by high-resolution mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(17): 2009–2018.
- [47] Gillet LC, Navarro P, Tate S, *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: A new concept for consistent and accurate proteome analysis [J]. *Mol Cell Proteom*, 2012, 11(6): 111–16717.
- [48] Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics [J]. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(3): 298–312.
- [49] Martinez-esteso MJ, NØrgaard J, Brohee M, *et al.* Defining the wheat gluten peptide fingerprint via a discovery and targeted proteomics approach [J]. *J Proteom*, 2016, (147): 156–168.
- [50] Pilolli R, Angelis DE, Monaci L. Streamlining the analytical workflow for multiplex MS/MS allergen detection in processed foods [J]. *Food Chem*, 2017, (221): 1747–1753.
- [51] Houston NL, Lee D, Stevenson SE, *et al.* Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 763–773.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



周红菲, 硕士, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: 2414397689@qq.com



吴志华, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: wuzhihua@ncu.edu.cn