# 食品中过敏原及其检测方法的研究进展

杨阳<sup>1,2</sup>,何欣蓉<sup>2</sup>,何少贵<sup>1</sup>,刘 萌<sup>2</sup>, 邹忠爱<sup>1</sup>,曹敏杰<sup>2</sup>,刘光明<sup>2\*</sup>

(1. 厦门华厦学院环境与公共健康学院,厦门 361024; 2. 集美大学食品与生物工程学院,水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心,厦门 361021)

**摘 要:** 食物过敏作为食品安全的热点问题在全球引起了广泛关注。目前食物过敏仍无有效的根治方法,严格避免摄入致敏食品仍是过敏性疾病防治的最有效方式。因此,食品中过敏原的识别鉴定、性质分析及检测方法的研究至关重要。本文针对八大类过敏食物,从分子结构、免疫学特性等方面介绍了常见食物过敏原的研究进展;归纳了现阶段用于食品中过敏原分析的常规检测方法,以及在此基础上发展而来的新兴检测方法,并比较分析了不同检测技术方法的优缺点。相比于植物源性过敏原,动物源性过敏原的相关研究有待深入,尤其是蛋白家族的确定及空间结构解析等是未来动物源性过敏原研究的重要方向;目前食品中常见过敏原的常规检测方法及新兴检测方法依然存在检测效率和准确性不高、成本昂贵等局限性,将不同技术方法相结合,建立高效、准确、低成本的过敏原检测方法仍是该研究领域发展的重要趋势。 关键词: 食物过敏; 过敏原; 蛋白家族; 检测技术

# Research progress of food allergens and its detection methods

YANG Yang<sup>1,2</sup>, HE Xin-Rong<sup>2</sup>, HE Shao-Gui<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>2</sup>, ZOU Zhong-Ai<sup>1</sup>, CAO Min-Jie<sup>2</sup>, LIU Guang-Ming<sup>2\*</sup>

(1. College of Environment and Public Health, Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, China; 2. College of Food and Biological Engineering, National and Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**ABSTRACT:** Food allergy is a front-burner issue for food safety, which has obtained widespread attention globally in recent years. There is no effective therapeutic method for food allergy, food avoidance is mainly in practice the only way to prevent hypersensitive consumers from ingesting allergens. Thus, it is imperative to provide complete information on food allergens and establish accurate allergen detection technology. This work introduced the research progress of food allergens from the aspects of molecular structure and immunological features; furthermore, main detection methods of food allergens and newly developed technologies were summarized, and the advantages, benefits and limitations of each approach were discussed. Compared to plant derived food allergen, the related research of animal allergens needs to be deepened, especially the determination of protein family and spatial structure analysis are the important directions of animal allergen research in the future; At present, the conventional detection

\*通信作者:刘光明,博士,教授,主要研究方向为水产食品加工与安全的应用基础研究。E-mail: gmliu@jmu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31901811、31871720)、中国博士后科学基金项目(2020M682075)、国家海洋公益性行业科研专项子课 题项目(DY135-B2-07、201505026-03)、福建省高校杰出青年科研人才培育计划项目(闽教科〔2018〕47号)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31901811, 31871720), China Postdoctoral Science Foundation (2020M682075), Marine Scientific Research Special Foundation for Public Sector Program (DY135-B2-07, 201505026-03), and the Outstanding Youth Scientific Research Cultivation Plan in Fujian Province University (minjiaoke (2018) 47)

<sup>\*</sup>Corresponding author: LIU Guang-Ming, Ph.D, Professor, College of Food and Biological Engineering, Jimei University, 43 Yindou Road, Xiamen 361021, China. E-mail: gmliu@jmu.edu.cn

methods and emerging detection methods of common allergens in food still have limitations such as low detection efficiency and accuracy, and high cost. Combining different technical methods to establish efficient, accurate and low-cost allergen detection methods is still an important trend in the development of this research field.

KEY WORDS: food allergy; allergen; protein family; detection technology

## 0 引 言

食物过敏是人体对食品中的抗原物质产生的由免疫 系统介导的不良反应,大多数食物过敏属于免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)E 介导的 I 型(速发型)超敏反应<sup>[1]</sup>。食 品中能够诱导机体产生 IgE 并与之结合,使抗体进一步诱 导效应细胞释放介质从而引起速发型过敏反应的成分称为 食物过敏原<sup>[1]</sup>。食物过敏原多为蛋白质,与其他种类的抗 原一样,要引起机体的免疫反应,食物过敏原必须是免疫 系统不能识别的外来大分子,因此食物过敏原大都是对食 品加工处理、人体消化等过程具有抗性的高稳定性蛋白分 子<sup>[2-3]</sup>。此外,过敏原必须在效应细胞表面与 IgE 结合后才 能促使机体产生过敏反应,一般而言,含有 2 个以上 IgE 结合位点的过敏原才能引发效应细胞的介质释放,这一过 程对过敏原的分子大小和空间结构则有了一定限制<sup>[4]</sup>。目 前已鉴定的大多数食物过敏原都是分子量在 10~100 kDa 之间的糖蛋白,且具有酸性等电点。

食物过敏的临床症状多种多样,最常见的是消化道 症状、皮肤黏膜症状和呼吸道症状,严重时会产生过敏性 休克甚至危及生命<sup>[5-6]</sup>。在过去的几十年中,过敏性疾病的 发病率在全球范围内显著而迅速地增加。美国国家过敏症 和传染病研究所的流行病学调查表明,食物过敏的发病率 逐年上升,而工业化和西化地区人口的发病率高于其他地 区,儿童的发病率普遍高于成人,目前约有 8%的儿童和 4%的成人对食物有过敏症状,部分地区食物过敏患者的 比例已达 10%<sup>[7]</sup>。但目前食物过敏仍无标准化的根治手段, 对致敏食品的禁食是控制食物过敏的最主要途径,食品中 过敏原的检测也因此受到关注。本文针对食物过敏原,阐 述其结构和免疫学特性,归纳过敏原的常规检测技术和新 兴检测技术,并在此基础上展望未来食品中过敏原检测方 法的发展方向,以期为过敏原检测方法的开发提供参考。

## 1 常见的食物过敏原

目前被报道能够引起过敏的食物已逾百种,而 90%以 上的食物过敏反应都是由花生、坚果、大豆、小麦、蛋类、 奶类、鱼类和甲壳类水产品这八类食物引起的<sup>[8]</sup>。其中前 4 种属于植物源性过敏食物,后 4 种属于动物源性过敏食物。

## 1.1 植物源性过敏食物

几乎所有的植物源性过敏原都属于贮存蛋白或防御

蛋白,而 65%以上的植物源性过敏原都可以按照结构特征 分为 4 个主要的蛋白家族: 醇溶谷蛋白超家族、Cupin 超家 族、抑制蛋白超家族和 Bet v-1 超家族<sup>[9]</sup>。

花生是西方国家引起食物过敏反应比例最高的食物 之一[10],其过敏原在西方国家已得到较为深入的研究。目 前已鉴定出的花生过敏原有16种,分别命名为Arah1~17, Arah4与Arah3的序列重复率高达90%,因此Arah4被 作为 Arah 3 的同分异构体而重新命名为 Arah 3.0201<sup>[11]</sup>。 花生过敏原中属于 Cupin 超家族的 Arah1 和 Arah3 及属 于醇溶谷蛋白家族的 Arah 2 和 Arah 6 被鉴定为主要过敏 原<sup>[12]</sup>,其中Arah1约占花生总蛋白的12%,是花生中丰度 最高的过敏原,且 90%的花生过敏患者血清中都能够检测 到 Arah1的特异性抗体,因此针对 Arah1的致敏性消减 方法探究成为开发低致敏性花生产品的重点<sup>[13]</sup>。而在花生 过敏的诊断中, KUKONEN 等<sup>[14]</sup>通过双盲对照实验证实 Arah2和Arah6敏感的患者更容易出现严重的临床症状, Arah 2和 Arah 6因此被广泛应用于食品中花生过敏原的 安全检测和花生过敏的组分诊断<sup>[15]</sup>。与 Ara h 2、Ara h 6 相反, Arah8敏感患者则多表现为较轻微的过敏症状<sup>[16]</sup>。 Arah7与Arah2、Arah6同属于醇溶谷蛋白家族的2S白 蛋白,但其丰度较低。HAYEN等<sup>[17]</sup>发现 Arah 7 的一种亚 型 Arah 7.0201 分子 C 端存在一段与 Arah 2、Arah 6 分子 C 端关键表位同源的序列, 这一序列在花生过敏组分诊断 中的应用也开始受到关注。尽管 Ara h 9 未被认为是花生 主要过敏原,但地中海地区的食物过敏流行病学调查结果 表明 Ara h 9 在该地区致敏比例最高<sup>[16]</sup>。Ara h 5、Ara h 10~15 是花生过敏患者识别比例较低的几种过敏原,因而 相关研究较少,但值得关注的是,由于这些过敏原的结构 特征, 它们在引起物种之间的免疫交叉反应中发挥着重要 作用[18]。

除花生外, 坚果类的榛子、腰果、核桃、杏仁和巴西 坚果等也是西方国家重要的过敏食物, 其过敏患者比例在 0.05%~7.3%, 且儿童患者的比例较成年人高<sup>[19-21]</sup>。坚果类 作为植物种子, 其蛋白质多为贮存蛋白或防御蛋白, 如醇 溶谷蛋白超家族的 2S 白蛋白、Cupin 超家族的 7S/11S 球 蛋 白 和 Bet v 1 超家族的病程相关蛋白-10 (pathogenesis-related protein 10, PR-10)等<sup>[19]</sup>。榛子 Cor a 14、腰果 Ana o 3、核桃 Jug r 1、巴西坚果 Ber e 1 和开心 果 Pis v 1 等都属于 2S 白蛋白家族, 该家族中的蛋白分子 量较小, 氨基酸序列中谷氨酰胺、精氨酸、天冬酰胺和半 胱氨酸含量较高,分子中的半胱氨酸能形成多对二硫键可 维持蛋白质三维结构的稳定性(图 1a),因而这些过敏原都 对热、极端 pH 和胃肠道消化酶有较高的耐受性<sup>[22]</sup>。7S/11S 豆球蛋白都为三聚体蛋白,不同的是 7S 球蛋白氨基酸序 列中不存在半胱氨酸,因此无法在其分子结构中形成维持 结构稳定的二硫键;11S 球蛋白的不同亚基之间则由二硫 键连接,其分子结构较 7S 球蛋白稳定(图 1b、c)<sup>[23]</sup>。坚果 过敏原中的榛子 Cor a 11、腰果 Ana o 1、核桃 Jug r 2 和花 生过敏原 Ara h 1 都属于 7S 球蛋白,而榛子 Cor a 9、腰果 Ana o 2、核桃 Jug r 4 及巴西坚果 Ber e 2 均为 11S 球蛋 白<sup>[23]</sup>。核桃过敏原 Jug r 5 与花生过敏原 Ara h 8 同属 PR-10 家族(图 1d), LYONS 等<sup>[24]</sup>通过对 521 位核桃过敏患者的过 敏原组分诊断发现超过 50%的核桃过敏患者血清中都能检 测出 Jug r 5 特异性 IgE,同时, Jug r 5 也是引起核桃与花粉 间免疫交叉反应性的重要过敏原<sup>[25]</sup>。

大豆引发的食物过敏发病率较花生和坚果稍低,但 作为重要的植物蛋白和油脂来源,大豆过敏原的研究也得 到了较高的重视。目前已鉴定的大豆过敏原已超过 40 种, 包括疏水蛋白(Gly m 1)、壳蛋白(Gly m 2)、抑制蛋白(Gly m 3)、SAM22 (Gly m 4)、β-伴大豆球蛋白(Gly m 5)、大豆球 蛋白(Gly m6)及胰蛋白酶抑制剂等<sup>[26]</sup>。Gly m 5 (7S 球蛋白) 和 Gly m 6 (11S 球蛋白)同属 Cupin 超家族,有较好的热稳 定性,在欧洲地区 30%~50%的大豆过敏是由这两种过敏 原引起,且大部分 Gly m 5 和 Gly m 6 敏感的患者都表现出 较严重的临床症状,因此 Gly m 5 和 Gly m 6 被认为是大豆 的主要过敏原<sup>[27]</sup>。不同于欧洲地区,亚洲地区 90%以上的 大豆过敏是由属于 PR-10 家族的 Gly m 4 引起<sup>[27]</sup>,同时 Gly m 4 与桦树花粉过敏原 Bet v 1 具有很高的序列同源性 和结构相似性,因而也是能够引起物种间免疫交叉反应性 的一种过敏原<sup>[26]</sup>。

小麦引起的食物过敏除表现出常见的消化道、皮肤及 呼吸道症状外,还可引起小麦依赖性运动诱发性过敏反应, 即患者在摄入小麦制品后的几小时内,运动可诱发严重过 敏反应症状,而不运动则不产生过敏反应<sup>[28]</sup>。小麦中的蛋 白可按照溶解度分为水溶性的白蛋白、盐溶性的球蛋白及 可溶于乙醇或酸的谷蛋白,而小麦中的过敏原多来自谷蛋 白<sup>[28]</sup>。目前已鉴定的小麦过敏原大都属于 *a*-淀粉酶/胰蛋 白酶抑制剂家族,共有18种:Tri a 12、Tri a 14、Tri a 17~21、 Tri a 25~28、Tri a 36~37 和 Tri a 41~45,其中 Tri a 19 和 Tri a 36 是小麦的主要过敏原,并且都是小麦中引起食物性运 动诱发性过敏反应的过敏原<sup>[29]</sup>。BAAR等<sup>[29]</sup>针对小麦过敏 等组分诊断结果表明 Tri a 19 和 Tri a 36 特异性 IgE 的检测 可用于小麦过敏的诊断。

## 1.2 动物源性过敏食物

与植物源性过敏原相比,动物源性过敏原在氨基酸

序列上没有明显的相似性,在结构上也没有高度相似的特征结构被发现,因而动物源性过敏原并非有规律地分布于 有限的蛋白质家族。



注: a: 2S 白蛋白(Ber e 1, PDB: 2LVF); b: 7S 球蛋白(Cor a 11, PDB: 6L4C); c: 11S 球蛋白(Ber e 2, PDB: 6B4S); d: PR-10 蛋白(Ara h 8, PDB: 6AWY)。 图 1 植物源性食物过敏原结构家族(部分) Fig.1 Representative structures of plant derived allergen

families (part)

东方国家的食物过敏多由鱼类和甲壳类水产品引起, MOONESINGHE 等<sup>[30]</sup>对水产食品过敏的统计结果表明, 鱼类、甲壳类水产品在世界范围内引起的食物过敏发病率 约为 5%, 而在亚洲地区其发病率高达 10.3%。小清蛋白 (protein data bank, PDB)是鱼类最主要的过敏原, 分子质量 为 10~13 kDa, 包括  $\alpha$  型和  $\beta$  型 2 种, 其中  $\alpha$  型小清蛋白致 敏性较弱, 鱼类过敏多由 β型小清蛋白引起<sup>[31]</sup>。β型小清 蛋白是一种 EF 手型的钙离子结合蛋白(图 2a),具有极高的 热稳定性, 且不同鱼类的 β 型小清蛋白具有很高的序列同 源性和结构保守性,因而 B 型小清蛋白也是存在于鱼类中 的一种泛过敏原<sup>[32]</sup>。除小清蛋白外,鱼类中还存在醛缩酶、 烯醇化酶、鱼卵β'组分、卵黄蛋白原和胶原蛋白等次要过 敏原<sup>[31,33-34]</sup>,而作为甲壳类水产品主要过敏原的原肌球蛋 白也被报道为鱼类的次要过敏原<sup>[35-36]</sup>。近年来随着鱼类过 敏性疾病的深入研究,不断有鱼类的新型过敏原被报道, 鱼类肌肉中有6种分子量在25~57 kDa之间的组分被证实 具有 IgE 结合活性, 其中 28 kDa 的磷酸丙糖异构酶和 57 kDa 的丙酮酸激酶已被鉴定, 但这些新型过敏原的致敏 性有待深入研究[37]。

目前甲壳类水产品中已有多种过敏原被鉴定出来。原 肌球蛋白是发现最早的甲壳类水产品主要过敏原,其空间 结构由 2 个 α 螺旋结构的亚基相互缠绕形成超螺旋(图 2b), 这种结构使原肌球蛋白具有很好的稳定性<sup>[38]</sup>。而后精氨酸 激酶也被鉴定为甲壳类水产品肌肉中的主要过敏原,其空 间结构较原肌球蛋白复杂(图 2c),研究表明精氨酸激酶空间结构的破坏能够导致其致敏性的降低<sup>[39]</sup>。精氨酸激酶和 原肌球蛋白不仅是甲壳类水产品的主要过敏原,也是存在 于无脊椎动物中的过敏原,能够引起节肢动物间广泛的免 疫交叉反应<sup>[40]</sup>。近期有研究发现鱼类原肌球蛋白能够与一 些过敏患者血清中的 IgE 发生特异性结合,因此原肌球蛋 白是否能引起鱼类与甲壳类水产品甚至节肢动物间的免疫 交叉反应开始受到关注<sup>[41]</sup>。甲壳类水产品肌肉中的新型过 敏原肌质钙结合蛋白与鱼类小清蛋白具有相似的 EF 手型 结构,并且也是一种钙离子结合蛋白<sup>[42]</sup>。近年来,一些新 型过敏原如肌球蛋白轻链、肌钙蛋白、磷酸丙糖异构酶和 细丝蛋白 c 也先后被分离鉴定出来<sup>[43-44]</sup>。

鸡蛋引起的食物过敏多见于学龄前儿童,且这种过 敏症状会随年龄的增长而逐渐消失<sup>[45]</sup>。目前鸡蛋中已鉴定 的过敏原有 6 种,包括蛋清中的卵类粘蛋白(Gal d 1)、卵清 蛋白(Gal d 2)、卵转铁蛋白(Gal d 3)、溶菌酶(Gal d 4)和卵 黄中的 a 卵黄球蛋白(Gal d 5)、卵黄糖蛋白(Gal d 6)<sup>[46]</sup>。蛋 清中的 4 种过敏原蛋白占蛋清总蛋白的近 80%,大部分的 鸡蛋过敏都是由蛋清中的过敏原,尤其是 Gal d 2 (图 2d)和 Gal d 3 (图 2e)引起<sup>[47]</sup>。尽管鸡蛋过敏原对热不稳定,但其 热加工后的终产物仍具有致敏性,不仅如此,有研究发现 通过煮制、焙烤等热加工方式使蛋清蛋白凝固可更好地保 持蛋清中过敏原的致敏性<sup>[48-49]</sup>。卵黄中的 Gal d 5 和 Gal d 6 致敏性较弱,相关的研究报道也较少,但 INOMATA 等<sup>[50]</sup> 发现 Gal d 5 在引起不同物种间的免疫交叉反应中发挥重 要作用。

牛奶及其制品是引起婴幼儿过敏的重要食品,其中的蛋白质主要是酪蛋白和乳清蛋白两类。乳清中的 $\alpha$ -乳白蛋白(Bos d 4)、 $\beta$ -乳球蛋白(Bos d 5)和酪蛋白(Bos d 8)是牛奶中研究较多的过敏原。Bos d 4 是分子量约为 14 kDa 的钙离子结合蛋白,其空间结构主要由 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠构成,且分子内有 4 对二硫键(图 2f),使其具有极高的结构稳定性<sup>[51]</sup>。Bos d 5 分子中含有两对二硫键和一个游离的半胱氨酸,因此通常可以通过形成分子间的二硫键形成二聚体,该结构使Bos d 5 对热加工和消化酶都有较好的耐受性(图 2g)<sup>[52-53]</sup>。酪蛋白可细分为 4 个亚型:  $\alpha$ S1 酪蛋白(Bos d 9)、 $\alpha$ S2 酪蛋白(Bos d 10)、 $\beta$  酪蛋白(Bos d 11)和  $\kappa$  酪蛋白(Bos d 12),与 Bos d 4 和 Bos d 5 不同,酪蛋白不耐蛋白酶的消化,因而目前对食品中酪蛋白的检测多针对其线性表位<sup>[54]</sup>。除此之外,牛乳中的 IgG (Bos d 7)和乳铁蛋白(Bos d LF)也被报道为过敏原,但其致敏性有待深入探究<sup>[51]</sup>。

## 2 食物过敏原的检测方法

目前对于食品中过敏原的检测方法主要可分为蛋白 质水平的检测和基因水平的检测。基于蛋白质水平的检测 又可分为免疫学方法和质谱技术。其中免疫学检测方法包 括酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹、免疫层析法及在此基础上发展起来的 生物传感器技术、蛋白质芯片等。基于基因水平的过敏原 检测方法主要是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及基于 PCR 发展而来的实时荧光定量 PCR (real time PCR, RT-PCR)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)及基因芯片等<sup>[55]</sup>(图 3)。



注: a~c: 水产品过敏原; a: β型小清蛋白(PDB: 5ZH6); b: 原肌球 蛋白(PDB: 1C1G); c: 精氨酸激酶(PDB: 5ZHQ); d~e: 鸡蛋过敏原; d: Gal d 2 (PDB: 1UHG); e: Gal d 3 (PDB: 1OVT); f~g: 牛乳过敏 原; f: Bos d 4 (PDB: 1F6S); g: Bos d 5 (PDB: 1AKQ)。 图 2 动物源性食物过敏原结构

Fig.2 Representative structures of animal derived allergens



图 3 常见的食品过敏原检测方法 Fig.3 Outline of the current methods to analyze food-borne allergen detections

## 2.1 基于蛋白质水平的检测方法

2.1.1 免疫学方法 ELISA 是目前食品中过敏原检测中应用最广泛的一 种标准方法,其基本原理是将抗原抗体免疫反应的特异性 和酶的高效催化作用相结合,通过酶作用于底物后显色度 的深浅对样品中待测过敏原进行定性和定量分析<sup>[56]</sup>。根据 检测原理的差异. 食品中过敏原的 ELISA 检测方法又可分 为双抗夹心 ELISA 和竞争性 ELISA<sup>[57]</sup>。现阶段已有许多 商品化的双抗夹心 ELISA 检测试剂盒问世, LIU 等<sup>[58]</sup>对某 一以单克隆抗体作为捕获抗体和检测抗体的商品化核桃过 敏原 ELISA 检测试剂盒进行评估,发现该试剂盒的检出限 为 0.5 ug/mL, 而定量限可达到 1.5 ug/mL。HE 等<sup>[59]</sup>以基于 过氧化氢酶介导的双氧水敏感型量子点替代传统的酶对检 测抗体进行标记,从而将 β-乳球蛋白的检测灵敏度提高至 传统方法的 16 倍。CASTILLO 等<sup>[60]</sup>利用 β 酪蛋白的特异 性单克隆抗体建立牛乳过敏原检测的竞争性 ELISA 法, 在 复杂食品基质中  $\beta$  酪蛋白的检出限为 0.29  $\mu$ g/mL。 SEGURA-GIL 等<sup>[61]</sup>对 2 种 ELISA 检测方法进行比较后发 现,双抗夹心ELISA法较竞争性ELISA具有更高的灵敏度, 并指出这种高灵敏度主要源于双抗夹心 ELISA 法中捕获 抗体和检测抗体的高特异性。

免疫印迹是先通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同蛋白 组分按照分子量大小进行分离后转移至硝酸纤维素膜等固 相载体,再利用酶标记或放射性标记的抗体对固相载体上 的过敏原进行检测。相比于 ELISA, 免疫印迹方法检测的 灵敏度较低, 且只能对样品中的过敏原进行定性或半定量 检测,但通过该方法能够追踪食物不同加工阶段的产物中 所有蛋白和肽段图谱<sup>[62]</sup>。免疫印迹检测方法的这一特点存 在诸多优势: (1)根据食品加工产物的蛋白和肽段图谱有助 于针对食品中的致敏组分设计最适的特异性检测抗体; (2) 在检测前先采用电泳的方式分离食品中的不同蛋白组分, 可有效避免由于蛋白抑制剂的存在导致检测结果出现假阴 性的现象<sup>[63]</sup>。免疫层析法是基于 ELISA 原理发展而来的过 敏原快速检测方法。该方法首先将抗体预包被于硝化纤维 膜,待测样品通过毛细作用涌动到预包被抗体区域时被捕 获,通过酶标或胶体金作为示踪标志物,可得到直观的可 视化结果, 通过纤维膜上显色条带及其颜色的深浅等实现 定性或定量检测<sup>[64]</sup>。WANG 等<sup>[65]</sup>以量子点作为荧光标记 材料,建立了基于量子点荧光标记的免疫层析方法,采用 该方法食品中的原肌球蛋白进行检测可在 30 min 内观察 到检测结果,且最低可视化检测浓度可达 0.5 μg/mL。

食品加工过程中的过敏原分子结构变化、样品前处理中的有机溶剂残留及免疫反应中的温度条件等都会在一定程度上影响抗体与抗原的结合活性,为解决这些问题,具有低分子质量、高稳定性且易于大量生产的纳米抗体(nanobody, Nb)开始受到关注<sup>[66]</sup>。来源于骆驼科和鲨鱼的抗体天然缺失轻链,但具有完整的抗体功能,被命名为重链抗体(heavy chain antibody, HCAb),对HCAb的可变区进行克隆表达,可得到只由重链可变区组成的分子量仅 15 kDa

的单结构域抗体,也被称为纳米抗体<sup>[67]</sup>。相比于传统的多 克隆抗体,Nb主要由抗体可变区构成,具有更高的特异性, 同时其空间结构较为简单,因而对于温度、有机溶剂等具 有更高的稳定性;而其独特的立体结构和小尺寸,能够深 入到抗原结构中,识别包裹于分子内部较为隐蔽的位 点<sup>[67]</sup>。GARCÍA-GARCÍA等<sup>[68]</sup>利用谷蛋白特异性 Nb 建立 间接 ELISA,用于食品中小麦过敏原的检测,其检出限为 0.12 μg/mL。尽管目前基于 Nb 建立的 ELISA 检测方法尚 未标准化和商品化,但 Nb 可利用真核或原核表达系统进 行批量表达,相对于单克隆抗体具成本低、易于大量生产 等优势,在食物过敏原的检测中具有重要的应用价值<sup>[66]</sup>。 2.1.2 生物传感器检测方法

生物传感器检测方法主要通过将目标分析物与识别 元件进行特异性结合,组成生物识别元件,生物识别元件 对食品中的过敏原识别并产生响应,再由换能器转化为可 定量的光电信号来实现检测,具有快速、高灵敏度、高度 自动化、实时监控等优点<sup>[69]</sup>。采用生物传感器技术检测食 品中的过敏原,多以过敏原的特异性单克隆抗体、多克隆 抗体或适配体作为其生物识别元件, 当待测物中有过敏原 被生物识别元件捕获并发生结合时,分子间的相互作用产 生的化学信号被换能器接收并转换为光电信号, 而光电信 号被信号处理系统进一步放大,从而实现对过敏原的定性 和定量分析<sup>[70]</sup>。在这一过程中,生物识别元件是选择性检 测的基础, 而换能器则决定了检测的灵敏度。目前对生物 传感器的分类也是根据其转换器的类别,可分为光学生物 传感器、电化学生物传感器、压电免疫生物传感器等<sup>[69]</sup>。 基于表面等离子共振的光学生物传感器灵敏度高, 检测时 无需标识,且能够实时监测抗原抗体间的相互作用,因而 被开发用于食品中β-乳球蛋白、α酪蛋白、原肌球蛋白等 过敏原的检测[55]。为进一步提升生物传感器等性能,具有 大比较面积、高电导性能的纳米材料开始被应用于生物传 感器。SUN 等<sup>[71]</sup>利用纳米颗粒增强传感信号,结合表面等 离子共振传感器检测豆类凝集素,其检出限可达 0.023 μg/mL。目前 Nb 也开始作为生物传感器的识别与元 件用于食品安全检测。Nb 的稳定性可为生物识别元件的稳 定性和使用寿命提供保障,同时 Nb 的小尺寸可使识别元 件表面包被更高密度的抗体,但该方法在过敏原检测中的 应用尚有待深入探究<sup>[72]</sup>。

2.1.3 蛋白质芯片

蛋白质芯片是将特异性抗原等蛋白质探针的微小液 滴高密度地分配在固体基底表面,形成蛋白阵列,蛋白质 芯片的最高密度达 2500 点/cm<sup>2</sup>,可实现高通量检测<sup>[73]</sup>。 BADRAN 等<sup>[74]</sup>将醇溶蛋白、酪蛋白、β-乳球蛋白和卵清蛋 白的特异性抗体分配于固体基底表面制成蛋白质芯片,并 利用生物传感器检测蛋白质芯片中抗原抗体的相互作用信 号,从而实现婴幼儿食品、果汁、啤酒等食品中多种过敏 原的同时检测,蛋白质芯片与生物传感器的串联使得该方 法兼具高通量和高灵敏度的特点。目前蛋白质芯片主要用 于临床上过敏性疾病的诊断,而在食品中过敏原的检测方 面应用并不广泛,但高效的特点使其在检测领域具有广阔 的应用前景<sup>[73,75]</sup>。

2.1.4 质谱检测方法

近年来质谱技术快速发展并不断完善,在食品中过 敏原检测领域也占据日趋重要的地位。质谱技术的基本原 理是使试样在离子源中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 的作用分离不同质核比(m/z)的离子并计算分子量,进而对 蛋白质或肽段进行鉴定分析[76]。为实现灵敏、准确的检测, 质谱技术往往与液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法 等高效的分离纯化技术相结合,在过敏原检测中,目前应 用最多的是液相色谱-串联质谱法(liquid chromatographytandem mass spectrometry, LC-MS/MS)。SUN 等[77]通过对 过敏原的胰蛋白酶消化条件和色谱参数的优化建立了 B 型 小清蛋白的 LC-MS/MS 定量检测方法,该方法对复杂食品 基质中β型小清蛋白的定量限为0.1 μg/g。MA等<sup>[78]</sup>针对7 种芝麻过敏原的特征肽段建立了 LC-MS/MS 检测方法,其 检测限和定量限分别可达到 0.1~140.0 fmol/µL 和 0.4~ 400 fmol/µL。此外, LC-MS/MS 已广泛应用于食品中大麦、 玉米、燕麦、大米、黑麦和小麦等过敏原的检测<sup>[79]</sup>。质谱 技术是针对蛋白质的一级结构或肽段的检测方法,能够对 蛋白质和肽段进行明确鉴定和定量。因此,相比于依赖抗 原抗体相互作用的免疫学方法,质谱检测技术既克服了食 品加工后过敏原结构变化影响抗原抗体结合能力所导致的 假阴性问题,也避免了由于食品中同源蛋白与抗体结合所 产生的假阳性<sup>[80]</sup>。

## 2.2 基于基因水平的检测方法

## 2.2.1 聚合酶链式反应

普通 PCR 是建立较早的一种针对过敏原 DNA 的检测方法,该方法需结合 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳, 根据目的片段分子量大小进行定性分析,而对目的片段 光密度的分析可实现对待测样品的半定量分析<sup>[81]</sup>。相比 基于蛋白质水平的检测方法,基因水平检测的优势在于 DNA 分子经食品加后仍可有效提取且稳定性较好,但传 统的普通 PCR 检测效率较低,随着分子生物学检验技术 的不断发展,能够同时检测多种过敏原的多重 PCR 方法 开始发展起来<sup>[74]</sup>。多重 PCR 检测是针对体系中的多种目 的基因分别设计引物,从而达到在一个反应体系中同时 扩增多个基因的目的<sup>[82]</sup>。加工食品中往往同时存在多种 过敏原,采用多重 PCR 检测相比传统 PCR 方法具有显著 的高效性,目前在食品中过敏原的检测中已得到广泛应 用<sup>[83]</sup>。多重 PCR 检测方法的不足之处在于,多对引物在 同一体系中对不同目的片段进行扩增时,目的片段的准 确扩增依赖于 PCR 过程中引物设计、反应温度、离子强 度等诸多条件的严格控制<sup>[55]</sup>。

HIGUCHI 等<sup>[84]</sup>在1992年提出实时 PCR, 通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光基团产生的荧光信号 变化动态监测 PCR 反应的全过程, 故也称为实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)。RT-PCR 过程 中,通过荧光信号的不断放大,低丰度的目的基因也能够 被检出并且进行精确定量<sup>[84]</sup>。COSTA等<sup>[85]</sup>通过在 PCR 反 应体系中引入荧光水解探针,建立检测肉制品中大豆蛋白 等 RT-PCR 检测方法,利用该方法检测猪肉制品中的大豆 蛋白, 其检出限为 10 mg/kg。COSTA 等<sup>[85]</sup>采用建立的方法 同时对 25 种市售肉制品进行检测, 其定量的准确性可达 到 90%。PUENTE-LELIEVRE 等<sup>[86]</sup>根据植物细胞中都含有 叶绿素编码基因这一原理, 以花生的叶绿素基因作为标记 物, 建立 RT-PCR 方法检测食品中的花生过敏原, 通过条 件优化可同时检测样品中的 3 种关联基因 matK、fpl16 和 trnH-psbA,从而大大提高了检测方法的灵敏度和准确性, 在含有番茄酱和巧克力的焙烤食品中对花生过敏原的检出 限达 1 µg/mL。与常规 PCR 和多重 PCR 检测方法相比, RT-PCR 不仅具有更强的特异性,也实现了对复杂食品及 之中过敏原的精确定量,已成为食品安全、临床医学等领 域的重要检测手段[55]。

## 2.2.2 环介导等温扩增

环介导等温扩增是 2000 年由 NOTOMI 提出的一种新 型核酸扩增技术,通过针对靶基因的6个区域设计4种特异 引物, 在链置换 DNA 聚合酶的作用下以 60~65 ℃恒温扩增, 短时间内即可实现目的基因的大量扩增<sup>[55]</sup>。此外, LAMP 检 测的结果无需通过电泳或检测器,可直接通过反应体系中 样品颜色等变化进行判断<sup>[87]</sup>。相比于传统的 PCR 和 RT-PCR 检测方法, LAMP 具有诸多优势: 扩增在恒温下进行, 反应 时间短、检测结果可通过肉眼判断等.因而是快速现场检测 过敏原的理想手段。该方法最主要的限制因素是引物的设计, 引物设计成功与否直接决定了检测方法的准确性<sup>[88]</sup>。SHEU 等<sup>[88]</sup>设计并筛选了花生 ITS1 和 ara h1 基因的特异性引物, 建立了 LAMP 方法对花牛过敏原进行检测,结果表明该方 法对花生过敏原具有极高的特异性, 在仅含 0.1%花生的混 合坚果体系中能特异性地检出花生成分并与其他坚果成分 不存在交叉反应。ALLGÖWER 等<sup>[89]</sup>建立了 LAMP 与层析 技术相结合的大豆过敏原检测方法,该方法不仅具有高灵 敏度和准确性的优点,操作也更加简便。

#### 2.2.3 基因芯片

基因芯片检测是利用核酸分子杂交的原理,将已知 序列核酸单链作为探针,标记后高密度地固化于芯片基质 表面,检测时待测样品中的核酸通过碱基互补配对与芯片 基质表面的探针进行杂交<sup>[55]</sup>。近期 YUAN 等<sup>[90]</sup>将基因芯 片、LAMP 与生物传感器相结合,该方法首先将 LAMP 所 需引物高密地分配于固体基质表面,并在反应体系中加入 酸碱指示剂 NueRed 染料,当待测物中有目标基因被扩增 时,扩增反应中随着氢离子的生产体系pH发生变化,导致 NueRed 染料由棕色变为粉色,而这种颜色变化进一步由 生物传感器检测并放大。这一方法可同时检测复杂食品基 质中的榛子、花生和大豆过敏原,其检出限达 0.4 μg/mL。 与蛋白质芯片相比,基因芯片是一种反向杂交技术,以生 物芯片检测过敏原最突出的优点是其检测的大规模、高通 量、和高效性,但目前基因芯片在食品过敏原检测中的应 用尚有待推广。

综上,基于蛋白质水平和基因水平的检测方法各有 其优缺点。ELISA 可针对总蛋白或某一特定蛋白质进行检 测,其结果直接反应了目的蛋白在样品中的含量,并且随 着抗体制备技术的成熟, ELISA 检测方法实现了标准化和 商品化,可用于工业化生产中的大批量检测<sup>[91]</sup>。但 ELISA 检测易受多种因素干扰,如食品加工过程中过敏原结构的 变化、样品前处理中有机溶剂对抗原-抗体相互作用的影响 及复杂食品基质的干扰等,都可能导致检测结果的偏 差[92]。质谱检测技术不仅可避免过敏原结构变化所导致的 假阴性问题,也避免了由于食品中同源蛋白导致的假阳性 结果<sup>[72]</sup>, 生物传感器技术在过敏原检测中的应用大大提高 了检测方法的灵敏度,但质谱检测和生物传感器检测方法 对设备和操作技术要求较高,因而尚未实现批量化。相比 于蛋白水平的检测, 基因水平的检测既克服了过敏原结构 对检测结果的影响, 在成本上也较质谱方法低廉, 但基因 水平的检测只针对编码目的蛋白的基因序列,因而无法直 接反应过敏原蛋白的存在与否<sup>[92]</sup>。因此,针对复杂食品基 质中的过敏原,如何建立简便、准确、灵敏、低成本的检 测方法依然备受关注。

## 3 结束语

目前过敏性疾病在全球,尤其是发展中国家的发病 率迅速上升,而食物过敏尚无有效的根治手段,对食物过 敏的控制仍需以预防为主,因此明确食品中的过敏原并建 立有效的检测方法尤为重要。过去的几十年里全世界对过 敏性疾病的关注使食物过敏原的研究得以迅速发展,食品 中过敏原的检测方法也在不断更新,但该领域的发展仍面 临诸多挑战,例如,相比于植物源性过敏原蛋白家族系 统、完整的分类,动物源性过敏原蛋白家族的确定和空间 结构解析等问题都是今后有待深入的方向;基于过敏原蛋 白质水平和基因水平的检测方法因高成本或对技术、设 备的高要求而无法广泛应用,因此在未来过敏原检测方法 的开发中,如何在将不同的技术相结合,实现优势互补, 保证其准确性性、灵敏度和高通量的同时兼具低成本、易 操作也是检测方法发展的重要方向。

#### 参考文献

- SAMPSON HA, O'MAHONY L, BURKS AW, et al. Mechanism of food allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1): 11–19.
- [2] TORCELLO-GÓMEZ A, DUPONT D, JARDIN J, et al. The pattern of peptides released from dairy and egg proteins is highly dependent on the simulated digestion scenario [J]. Food Funct, 2020, 11(6): 5240–5256.
- [3] PEKAR J, RET D, UNTERSMAYR E. Stability of allergens [J]. Mol Immunol, 2018, 100: 14–20.
- [4] VOLPICELLA M, LEONI C, DILEO MCG, et al. Progress in the analysis of food allergens through molecular biology approaches [J]. Cell, 2019, 8(9): 1073.
- [5] BROUGH HA, LIU AH, SICHERER S, et al. A topic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(1): 164–170.
- [6] GALAND C, LEYVA-CASTILLO JM, YOON J, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(5): 1356–1366.
- [7] SICHERER SH, SAMPSON HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management [J]. Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1): 41–58.
- [8] SAMPSON HA. Food allergy: Past, present and future [J]. Allergol Int, 2016, 65(4): 363–369.
- [9] CABANILLAS B, JAPPE U, NOVAK N. Allergy to peanut, soybean, and other legumes: Recent advances in allergen characterization, stability to processing and IgE cross-reactivity [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(1): DOI: 10.1002/mnfr.201700446
- [10] SMEEKENS JM, BAGLEY K, KULIS M. Tree nut allergies: Allergen homology, cross-reactivity, and implications for therapy [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(7): 762–772.
- [11] 黄玉霞,梁金玲,WANG L,等.食品中花生过敏原及其检测方法的研究进展[J].食品工业科技,2018,39(22):314-318.
  HUANG YX, LIANG JL, WANG L, *et al.* Research progress of peanut allergen and its detection methods [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(22):314-318.
- [12] PETERS RL, KRAWIEC M, SANTOS AF, et al. Update on food allergy
   [J]. Pediat Allerg Imm-UK, 2021, DOI: 10.1111/pai.13443
- [13] TIAN Y, LIU C, XUE W, et al. Crosslinked recombinant-Ara h 1 catalyzed by microbial transglutaminase: Preparation, structural characterization and allergic assessment [J]. Foods, 2020, 9(10): 1508.
- [14] KUKKONEN AK, PELKONEN AS, MÄKINEN-KILJUNEN S, et al. Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: A double-blind placebo-controlled study [J]. Allergy, 2015, 70(10): 1239–1245.
- [15] SANTOS AF, BARBOSA-MORAIS NL, HURLBURT BK, et al. IgE to epitopes of Ara h 2 enhance the diagnostic accuracy of Ara h 2-specific IgE [J]. Allergy, 2020, 75(9): 2309–2318.
- [16] PI X, WAN Y, YANG Y, et al. Research progress in peanut allergens and their allergenicity reduction [J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 93: 212–220.
- [17] HAYEN SM, EHLERS AM, DEN HJC, et al. 2S protein Ara h 7.0201 has unique epitopes compared to other Ara h 7 isoforms and is comparable to 2S proteins Ara h 2 and 6 in basophil degranulation capacity [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(7): 890–897.

- [18] BUBLIN M, BREITENEDER H. Cross-reactivity of peanut allergens [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2014, 14(4): 426.
- [19] WEINBERGER T, SICHERER S. Current perspectives on tree nut allergy: A review [J]. J Asthma Allergy, 2018, 11: 41–51.
- [20] SASAKI M, KOPLIN JJ, DHARMAGE SC, et al. Prevalence of clinic-defined food allergy in early adolescence: The school nuts study [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1): 391–398.
- [21] KIM M, LEE JY, JEON HY, et al. Prevalence of immediate-type food allergy in Korean schoolchildren in 2015: A nationwide, population-based study [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2017, 9(5): 410–416.
- [22] SOUZA PFN. The forgotten 2S albumin proteins: Importance, structure, and biotechnological application in agriculture and human health [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 4638–4649.
- [23] KESARI P, NEETU, SHARMA A, et al. Structural, functional and evolutionary aspects of seed globulins [J]. Protein Pept Lett, 2017, 24(3): 267–277.
- [24] LYONS SA, DATEMA MR, LE TM, et al. Walnut allergy across Europe: Distribution of allergen sensitization patterns and prediction of severity [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2021, 9(1): 225–235.
- [25] WANGORSCH A, JAMIN A, LIDHOLM J, et al. Identification and implication of an allergenic PR-10 protein from walnut in birch pollen associated walnut allergy [J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(4): 1600902.
- [26] MUTHUKUMAR J, SELVASEKARAN P, LOKANADHAM M, et al. Food and food products associated with food allergy and food intolerance-An overview [J]. Food Res Int, 2020, 138(Pt B): 109780.
- [27] CABANILLAS B, JAPPE U, NOVAK N. Allergy to peanut, soybean, and other legumes: Recent advances in allergen characterization, stability to processing and IgE cross-reactivity [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(1): 1700446.
- [28] TREUDLER R, FRANKE A, SCHMIEDEKNECHT A, et al. BASALIT trial: Double-blind placebo-controlled allergen immunotherapy with rBet v 1-FV in birch-related soya allergy [J]. Allergy, 2017, 72(8): 1243–1253.
- [29] BAAR A, PAHR S, CONSTANTIN C, et al. Specific IgE reactivity to Tri a 36 in children with wheat food allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(2): 585–587.
- [30] MOONESINGHE H, MACKENZIE H, VENTER C, et al. Prevalence of fish and shellfish allergy: A systematic review [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2016, 117(3): 264–272.
- [31] DIJKEMA D, EMONS JAM, VAN DE VEN AAJM, et al. Fish allergy: Fishing for novel diagnostic and therapeutic options [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2020, 5. DOI: 10.1007/s12016-020-08806-5
- [32] RUETHERS T, RAITH M, SHARP MF, et al. Characterization of Ras k 1 a novel major allergen in Indian mackerel and identification of parvalbumin as the major fish allergen in 33 Asia-Pacific fish species [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(4): 452–463.
- [33] KOBAYASHI Y, AKIYAMA H, HUGE J, et al. Fish collagen is an important panallergen in the Japanese population [J]. Allergy, 2016, 71(5): 720–723.
- [34] KYOSAKA I, FUJITA S, SHIMIZU Y, *et al.* Digestibility in the gastrointestinal tract and migration to blood of beta'-component (Onk k 5), a major salmon roe IgE-binding protein [J]. Food Chem, 2019, 289: 694–700.
- [35] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ J, ALGUACIL-GUILLÉN M, CUÉLLAR C,

et al. Possible allergenic role of tropomyosin in patients with adverse reactions after fish intake [J]. Immunol Investig, 2018, 47(4): 416–429.

- [36] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ J, VELEIRO B, DASCHNER A, et al. Are fish tropomyosins allergens [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2016, 116(1): 74–76.
- [37] VALVERDE-MONGE M, PASTOR-VARGAS C, RODRÍGUEZ DRP, et al. Anaphylaxis by exclusive allergy to swordfish and identification of a new fish allergen [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2018, 29(5): 563–565.
- [38] LIU M, HUAN F, LI MS, et al. Mapping and IgE-binding capacity analysis of heat/digested stable epitopes of mud crab allergens [J]. Food Chem, 2021, 344: 128735.
- [39] YANG Y, LIU GY, YANG H, et al. Crystal structure determination of Scylla paramamosain arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates [J]. Food Chem, 2019, 271: 597–605.
- [40] WAI CYY, LEUNG NYH, CHU KH, et al. Overcoming shellfish allergy: How far have we come [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2234.
- [41] KESHAVARZ B, RAO Q, JIANG X, et al. Immunochemical analysis of pepsin-digested fish tropomyosin [J]. Food Control, 2020, 118: 107427.
- [42] HAN TJ, LIU M, HUAN F, et al. Identification and cross-reactivity analysis of sarcoplasmic-calcium-binding protein: A novel allergen in *Crassostrea angulate* [J]. J Agr Food Chem, 2020, 68(18): 5221–5231.
- [43] HE XR, CHEN YM, YANG Y, et al. Cloning, expression and comparison of the properties of Scy p 9, a Scylla paramamosain allergen [J]. Food Funct, 2020, 11(4): 3006–3019.
- [44] FABER MA, PASCAL M, EL KHARBOUCHI O, et al. Shellfish allergens: Tropomyosin and beyond [J]. Allergy, 2017, 72(6): 842–848.
- [45] 肖静, 邹萍萍, 田琳, 等. 动物性食品过敏导致的食品安全风险及其控制措施[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 245–249.
   XIAO J, ZOU PP, TIAN L, *et al.* Food safety risks caused by animal food allergies and the control measures [J]. Food Ind, 2020, 41(5): 245–249.
- [46] DONA DW, SUPHIOGLU C. Egg allergy: Diagnosis and immunotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 5010.
- [47] DANG TD, PETERS RL, KOPLIN JJ, et al. Egg allergen specific IgE diversity predicts resolution of egg allergy in the population cohort health nuts [J]. Allergy, 2019, 74: 318–326.
- [48] LAMBERT R, GRIMSHAW KEC, ELLIS B, et al. Evidence that eating baked egg or milk influences egg or milk allergy resolution: A systematic review [J]. Clin Exp Allergy, 2017, 47(6): 829–837.
- [49] ONODA Y, AOKI Y, NAGAI A, et al. A case of hen's egg-dependent exercise-induced immediate-type allergy [J]. Allergol Int, 2020, 69(3): 476–477.
- [50] INOMATA N, KAWANO K, AIHARA M. Bird-egg syndrome induced by a-livetin sensitization in a budgerigar keeper: Successful induction of tolerance by avoiding exposure to avians [J]. Allergol Int, 2019, 68(2): 282–284.
- [51] LINHART B, FREIDL R, ELISYUTINA O, et al. Molecular approaches for diagnosis, therapy and prevention of cow's milk allergy [J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1492.
- [52] VILLA C, COSTA J, OLIVEIRA MBP, et al. Bovine milk allergens: A comprehensive review [J]. Comp Rev Food Sci Food Saf, 2018, 17: 137–164.
- [53] 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: 22-23.

- [54] 党慧杰,刘振民,郑远荣,等.牛乳主要过敏原及其检测技术研究进展
  [J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(3):765-770.
  DANG HJ, LIU ZM, ZHENG YR, *et al.* Research progress of cow milk allergens and their detection techniques [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(3): 765-770.
- [55] SENA-TORRALBA A, PALLAS-TAMARIT Y, MORAIS S, et al. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2020, 132: 116050.
- [56] MADRID R, GARCIA-GARCIA A, CABRERA P, et al. Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two ELISA methods and real time PCR [J]. Foods, 2021, 10(2): 440.
- [57] TRANQUET O, LUPI R, ECHASSERIEAU-LAPORTE V, et al. Characterization of antibodies and development of an indirect competitive immunoassay for detection of deamidated gluten [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(22): 5403–5409.
- [58] LIU C, ZAFFRANA VD, GUPTA S, et al. Pecan (Carya illinoinensis) detection using a monoclonal antibody-based direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. LWT-Food Sci Technol, 2019, 116: 108516.
- [59] HE S, LI X, GAO J, et al. Development of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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.
- [60] CASTILLO DS, CASSOLA A. Novel sensitive monoclonal antibody based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of raw and processed bovine beta-casein [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0182447.
- [61] SEGURA-GIL I, BLAZQUEZ-SORO A, GALAN-MALO P, et al. Development of sandwich and competitive ELISA formats to determine b-conglycinin: Evaluation of their performance to detect soy in processed food [J]. Food Control, 2019, 103: 78–85.
- [62] PANDA R, GARBER EAE. Western blot analysis of fermentedhydrolyzed foods utilizing gluten-specific antibodies employed in a novel multiplex competitive ELISA [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(20): 5159–5174.
- [63] COURTOIS J, BERTHOLET C, TOLLENAERE S, et al. Detection of wheat allergens using 2D Western blot and mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 178: 112907.
- [64] GALAN-MALO P, LOPEZ M, ORTIZ JC, et al. Detection of egg and milk residues on working surfaces by ELISA and lateral flow immunoassay tests [J]. Food Control, 2017, 74: 45–53.
- [65] WANG Y, LI Z, LIN H, et al. Quantum-dot-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of crustacean major allergen tropomyosin [J]. Food Control, 2019, 106: 106714.
- [66] GONZALEZ-SAPIENZA G, ROSSOTTI MA, ROSA ST. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications [J]. Front Immunol, 2017, 8: 977.
- [67] CHEN F, MA H, LI Y, et al. Screening of nanobody specific for peanut major allergen Ara h 3 by phage display [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(40): 11219–11229.
- [68] GARCÍA-GARCÍA A, MADRID R, GARCIA-CALVO E, *et al.* Production of a recombinant single-domain antibody for gluten detection

in foods using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Foods, 2020, 9(12): 1838.

- [69] 叶茂,李欣,武涌,等. 生物传感器检测食物过敏原的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080167
   YE M, LI X, WU Y, *et al.* Research progress of biosensors in detecting food allergens [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080167
- [70] AQUINO A, CONTE-JUNIOR CA. A Systematic review of food allergy: Nanobiosensor and food allergen detection [J]. Biosensors Basel, 2020, 10(12): 194.
- [71] SUN X, YE Y, HE S, et al. A novel oriented antibody immobilization based voltammetric immunosensor for allergenic activity detection of lectin in kidney bean by using AuNPs-PEI-MWCNTs modified electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 143: 111607.
- [72] FLICKER S, ZETTL I, TILLIB SV. Nanobodies-useful tools for allergy treatment [J]. Front Immunol, 2020, 11: 576255.
- [73] SIEVERS S, CRETICH M, GAGNI P, et al. Performance of a polymer coated silicon microarray for simultaneous detection of food allergen-specific IgE and IgG(4) [J]. Clin Exp Allergy, 2017, 47(8): 1057–1068.
- [74] BADRAN AA, MORAIS S, MAQUIEIRA Á. Simultaneous determination of four food allergens using compact disc immunoassaying technology [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(9): 2261–2268.
- [75] 翟康乐,周俊雄,李新新,等. 桃过敏原组分检测蛋白质芯片的制备及 验证[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(11): 1507–1512.
  ZHAI KL, ZHOU JX, LI XX, *et al.* Preparation and identification of protein chip for detecting components of peach allergen [J]. Basic Clin Med, 2017, 37(11): 1507–1512.
- [76] KAUPPILA TJ, SYAGE JA, BENTER T. Recent developments in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2017, 36(3): 423–449.
- [77] SUN L, LIN H, LI Z, et al. Development of a method for the quantification of fish major allergen parvalbumin in food matrix via liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring [J]. Food Chem, 2019, 276: 358–365.
- [78] MA X, LI H, ZHANG J, et al. Comprehensive quantification of sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Control, 2020, 107: 106744.
- [79] STELLA R, SETTE G, MORESSA A, et al. LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products [J]. Food Chem, 2020, 331: 127276.
- [80] 宁晖, 房芳, 邵亮亮, 等. 食品过敏法规及其检测技术现状[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3768–3772.
  NING H, FANG F, SHAO LL, *et al.* Regulations and current detection technology of food allergen [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(12): 3768–3772.
- [81] MIAO G, ZHANG L, ZHANG J, et al. Free convective PCR: From principle study to commercial applications-A critical review [J]. Anal Chim Acta, 2020, 108: 177–197.
- [82] RADER TS, STEVENS MP, BEARMAN G. Syndromic multiplex polymerase chain reaction (mPCR) testing and antimicrobial stewardship: Current practice and future directions [J]. Curr Infect Dis Rep, 2021, 23(4): 5.

- [83] SUH SM, KIM MJ, KIM HI, et al. A multiplex PCR assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of tropomyosin allergens from oyster, mussel, abalone, and clam mollusk species [J]. Food Chem, 2020, 317: 126451.
- [84] KANG TS. Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 91: 574–585.
- [85] COSTA J, AMARAL JS, GRAZINA L, et al. Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing [J]. Food Chem, 2017, 221: 1843–1850.
- [86] PUENTE-LELIEVRE C, EISCHEID AC. Development and evaluation of a real-time PCR multiplex assay for the detection of allergenic peanut using chloroplast DNA markers [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(32): 8623–8629.
- [87] 张懿翔, 于媛媛, 宋春宏, 等. 环介导等温扩增技术快速检测食品过敏 原牡蛎成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1804–1810.
  ZHANG YX, YU YY, SONG CH, *et al.* Rapid detection of food allergen oysters by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1804–1810.
- [88] SHEU SC, TSOU PC, LIEN YY, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid detection of allergic peanut in processed food [J]. Food Chem, 2018, 257: 67–74.
- [89] ALLGÖWER SM, HARTMANN CA, HOLZHAUSER T. The Development of highly specific and sensitive primers for the detection of potentially allergenic soybean (*Glycine max*) using loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD)

[J]. Foods, 2020, 9(4): 423.

- [90] YUAN D, KONG J, LI X, et al. Colorimetric LAMP microfluidic chip for detecting three allergens: peanut, sesame and soybean [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8682.
- [91] 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 Nutri, 2016, 56: 2511–2542.
- [92] EISCHEID AC, STADIG SR, RALLABHANDI P. Comparison of real-time PCR and ELISA for the detection of crustacean shellfish allergens [J]. Food Addit Contam A, 2021, 38(4): 563–572.

(责任编辑: 于梦娇 王欣)

## 作者简介



杨 阳, 讲师, 主要研究方向为食品 质量与安全。 E-mail: yangy@hxxy.edu.cn



刘光明,博士,教授,主要研究方向为 水产食品加工与安全的应用基础研究。 E-mail:gmliu@jmu.edu.cn