

水产品中过敏原检测的研究进展

左春倩, 许瑞瑞, 毕红燕
(上海海洋大学食品学院, 上海 200120)

摘要 食物过敏是机体免疫系统对某些食物的异常反应, 在世界范围内引起了广泛关注. 食物过敏通常是由免疫球蛋白E或免疫细胞介导的. 食品中所包含的致敏蛋白(过敏原)是导致食物过敏的主要因素之一, 对过敏原的检测和鉴定对于确保食品安全至关重要. 水产品作为人类重要的蛋白质来源, 是人们日常饮食中不可或缺的一部分, 对水产品中过敏原的检测非常必要. 本综述简述了近年来鱼类和贝类等水产品中过敏原检测的研究进展, 对常见的过敏原、过敏原检测方法和技术、当前研究中存在的挑战及未来的发展趋势进行了总结和展望. 目前, 食品中常见过敏原的检测方法依然存在检测效率和准确性低、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 水产品; 食物过敏; 过敏原; 检测; 研究进展

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240073

Research Progress of Allergen Detection in Aquatic Products

ZUO Chunqian, XU Ruirui, BI Hongyan*
(College of Food Science and Engineering, Shanghai Ocean University,
Shanghai 200120, China)

Abstract Food allergy is an abnormal reaction of the body's immune system to certain foods. It is a health problem that has gained widespread attention around the world. Food allergies commonly occur as a result of the immune system's response to specific foods, often mediated by immunoglobulin E or immune cells. Allergens play a key role in triggering these reactions, underscoring the importance of detecting and identifying allergens to maintain food safety. As an important source of protein, aquatic products are an indispensable part of people's daily diet, the detection of allergens in aquatic products is highly necessary. This review briefly describes the research progress of allergen detection in aquatic products such as fish and shellfish in recent years, and summarizes common allergens, detection methods and technologies, as well as challenges in current research and future development trends. At present, the detection methods for common food allergens currently face challenges, including limitations associated with low detection efficiency, reduced accuracy and high overall costs. These constraints underscore the need for ongoing research and innovation in this area to address these shortcomings. Combining different technical methods to establish efficient, accurate and low-cost allergen detection methods is still an important aspect in the development of this research field.

Keywords Aquatic products; Food allergy; Allergen; Detection; Research progress

据世界卫生组织的数据, 全球约有30%~40%的人患过敏性疾病, 且患病率在逐年上升, 已成为全球六大慢性疾病之一^[1,2]. 其中, 食物过敏是一个引起世界范围广泛关注的健康问题^[3].

收稿日期: 2024-02-10. 网络首发日期: 2024-04-17.

联系人简介: 毕红燕, 女, 博士, 副研究员, 主要从事将质谱、微流控等技术应用于(水产)食品质量与安全分析方面的研究.

E-mail: hybi@shou.edu.cn

基金项目: 上海市科学与技术委员会项目(批准号: 18050502200)资助.

Supported by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, China(No.18050502200).

食物过敏是机体免疫系统对某些食物的异常反应。如图1所示,某些食物蛋白会引起免疫系统的异常反应,通常由免疫球蛋白E(IgE)或免疫细胞介导。而由IgE介导引起的过敏反应也叫即时反应,即过敏症状通常会在过敏患者接触过敏原后2 h内发生。其中,针对特定抗原即过敏原产生IgE抗体是IgE介导的过敏反应^[4]。当人体摄入某些食物中的蛋白质后,免疫系统会将其识别为外来物质并产生免疫反应,释放出大量的IgE抗体。IgE抗体会与肥大细胞和嗜酸性粒细胞表面的受体结合,当再次受到过敏原刺激时,会激活这些细胞并释放出组胺、白细胞介素等介质,引发过敏反应^[5,6]。其中,组胺会导致血管扩张和平滑肌收缩,引起各种过敏症状,是最常见的过敏介质之一。

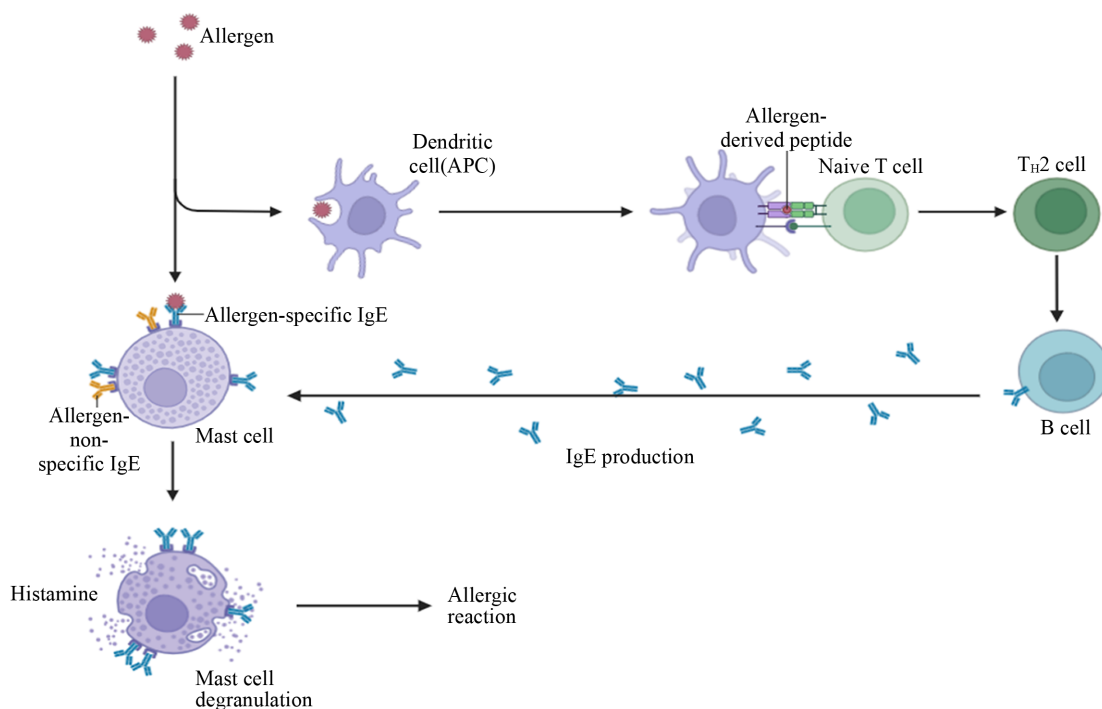


Fig. 1 IgE-mediated food allergy

联合国粮食及农业组织(FAO)公布的引起过敏反应的食物中,90%的食物是牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类动物、花生、大豆、坚果或小麦及其制品^[7]。此外,芝麻已经被美国列为第九大类致敏食物。

水产品食物作为重要的蛋白质来源,是人们日常饮食中不可或缺的一部分,在海鲜消费的背景下,鱼类过敏的患病率约为1%,贝类过敏的患病率高于鱼类过敏,在成年人中高达3%^[8]。目前,水产品过敏在世界范围内的患病率不断上升^[9],对公众健康构成巨大威胁。因此,对水产品中过敏原的快速、准确检测不仅对过敏人群的饮食安全至关重要,也有助于确保整个食品供应链的质量和安

全。本综述总结了近年来水产品中过敏原检测研究领域取得的进展,概述了水产品中常见的过敏原、检测方法与技术、现有挑战及未来发展方向,希望能对未来水产品过敏研究有所启发。

1 常见的水产品过敏原

鱼类和贝类是目前人类最常食用的水产品。下文介绍鱼、贝类中常见的过敏原,每个物种的主要过敏原如表1所示。

在水产品中,鱼类是一种极易引起过敏的食物^[10],研究发现鱼类中含有小清蛋白、 β -烯醇酶、醛缩酶、原肌球蛋白、胶原蛋白及肌酸激酶等多种过敏原,其过敏原蛋白分子质量主要分布在10~15 kDa, 20~25 kDa和37~50 kDa范围内。小清蛋白(Parvalbumin, PV)是一种存在于细胞内的水溶性钙结合蛋白质,耐高温,其相对分子量为10000~15000,等电点(PI)约为3.5~5。小清蛋白是鱼类的主要过敏原,已在97%的鱼类中被发现,且存在多个亚型;I型胶原蛋白(Collagen-I)是仅次于小清蛋白的鱼类过敏

Table 1 Common allergens found in some common aquatic products

Commonly consumed aquatic product	Major allergen	Commonly consumed aquatic product	Major allergen
Fish	Parvalbumin(PV)	Crab	Tropomyosin(TM)
	Collagen-I		Arginine kinase(AK)
	Enolase		Sarcoplasmic calcium-binding protein(SCP)
	Aldolase		Triose phosphate isomerase
	Aldehyde phosphate dehydrogenase(APDH)		Filament protein C
Shrimp	Tropomyosin(TM)	Scallops	Tropomyosin(TM)
	Arginine kinase(AK)	Oysters	Tropomyosin(TM)
	Myosin light chain(MLC)		Arginine kinase(AK)
	Sarcoplasmic calcium-binding protein(SCP)	Conch	Sarcoplasmic calcium-binding protein(SCP)
	Pyruvate kinase		Tropomyosin(TM)
	Hemocyanin		Paramyosin(PM)

原,分子量约为360 kDa,广泛存在于动物皮肤和骨骼中;其它鱼类过敏原包括烯醇酶(Enolase)、醛缩酶(Aldolase)和磷酸醛脱氢酶(APDH)等。目前,对鱼类过敏原的研究最为深入的是小清蛋白,而对于其它过敏原来说,目前的研究仍相对较少。

贝类是另一种极易引起过敏的水产品,贝类包括甲壳类和软体动物,如虾、龙虾、螃蟹、牡蛎、扇贝和海螺等。目前,贝类过敏影响着全球约2%的人口,其中,大多数贝类过敏患者终生都会受到影响^[11]。贝类与其它无脊椎动物的过敏原蛋白相似^[12],因此,检测贝类过敏(尤其是虾过敏)存在紧迫性。目前研究发现,虾中主要致敏蛋白包括原肌球蛋白(TM)、精氨酸激酶(AK)、肌球蛋白轻链、肌质钙结合蛋白(SCP)、丙酮酸激酶和血蓝蛋白等^[13];蟹类过敏原包括TM、AK、SCP、磷酸丙糖异构酶、细丝蛋白c等;扇贝的主要过敏原是TM;牡蛎的主要过敏原包括TM、AK和SCP等。其中, TM是肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质,其分子质量为38000~42000,是一种热稳定性蛋白,在加工过程中不易被降解。原肌球蛋白是贝类的主要过敏原,约60%~80%的贝类过敏患者会对这种蛋白产生反应。目前,原肌球蛋白已被证明是贝类严重临床反应的良好生物标志物。AK参与无脊椎动物的能量代谢,其相对分子量为40000,也是一种重要的甲壳类过敏原。在软体动物中,海螺的主要过敏原包括TM和副肌球蛋白(Paramyosin, PM)。其中, PM是软体动物的一种新型蛋白过敏原,分子量为99000,是海中软体动物的重要结构蛋白^[12]。

由鱼类或贝类中的过敏原引发的过敏反应有多种临床表现,包括消化系统紊乱(腹痛、腹泻)、皮肤刺激(皮炎、荨麻疹)或更严重的过敏症状(血管性水肿、休克及死亡)^[14,15]。对水产品中过敏原进行及时检测和鉴定尤为重要。

2 水产品中过敏原的检测方法

目前,对于水产品中过敏原的检测方法主要分为基因水平的检测、蛋白质水平的检测以及联合方法(图2)。其中,基于基因水平的检测方法主要是聚合酶链式反应(PCR)及环介导等温扩增(LAMP)等。基于蛋白质水平的检测可分为免疫学方法和质谱法,其中,免疫学检测方法主要包括酶联免疫吸附试验(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等^[16]。此外,还有基于多种技术的联合检测方法。下文将介绍这些技术在水产品过敏原检测中的应用。

2.1 基于基因技术的水产品中过敏原检测

2.1.1 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应(PCR)是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术,可看作是生物体外的特殊DNA复制,其最大特点是能将微量的DNA大幅增加。PCR技术灵敏度高、特异性强,可实现多物种的同时检测,检测时间通常与ELISA所需时间相当,但比质谱(MS)分析更快。由于PCR不直接检测蛋白质,其灵敏度和特异性在很大程度上取决于目标检测物中的DNA片

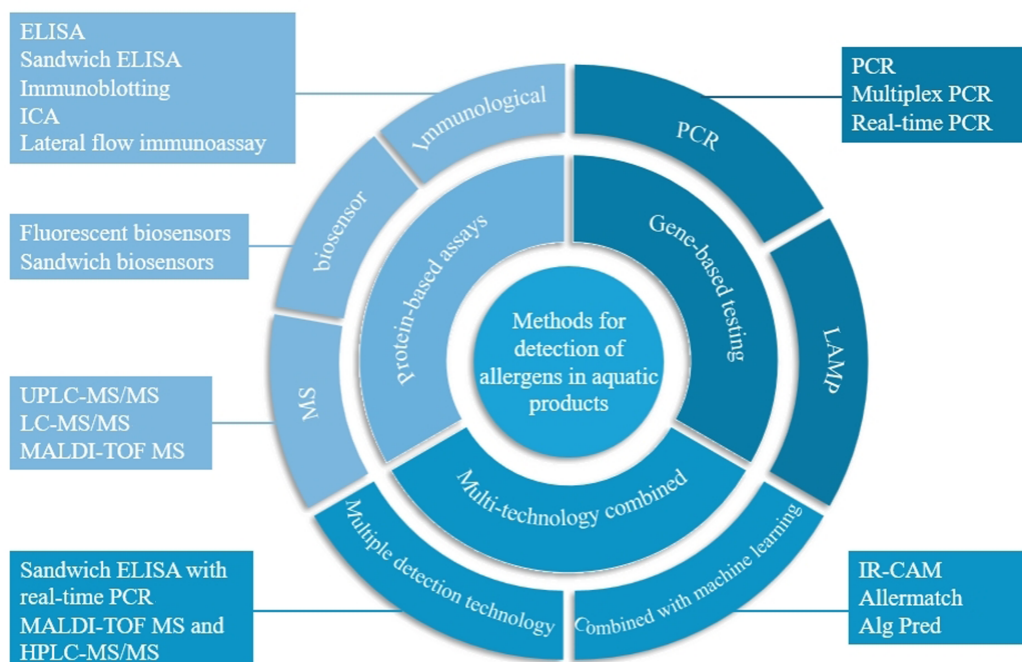


Fig. 2 Methods used for the detection of allergens in aquatic products

段^[17], 因此存在一些局限性. 目前, PCR 技术已被用于水产品中过敏原的检测. Suh 等^[18]开发了一种结合毛细管电泳的多重 PCR 检测方法, 可用于检测牡蛎、贻贝、鲍鱼和蛤蜊的肌球蛋白基因以及真核生物的 18S rRNA 基因, 这种多重 PCR 检测方法被用于监测商业加工海鲜产品, 成功用于检测韩国 19 种海鲜产品中的肌球蛋白基因. Blaschke 等^[19]开发了一种高度特异性的双重 PCR 方法, 用于检测食品中大多数商业相关的甲壳类动物, 基于该方法交叉测试了 100 多种不同的动植物物种, 包括 25 种甲壳动物和 8 种养殖昆虫, 并测试 8 种不同的甲壳类食品, 其食品基质中的检出限(LOD)为 1 pg 的甲壳类 DNA 或 10 ppm(mg/kg)的甲壳类样本, 确保了方法的实际适用性. Blaschke 等^[20]还开发了一种高特异性的实时荧光定量 PCR 方法, 用于全面检测食品基质中所有与商业相关的头足类和腹足类(大蜗牛科、蛾螺科和骨螺科), 通过该方法交叉检测了 100 多种动物和植物, 其 LOD 为 1 pg 的头足类和腹足类 DNA 或 10 mg/kg 的素食产品, 对样品进行烹饪和高压灭菌后的测定结果也显示出方法的实际适用性以及特异性. Kim 等^[21]探索了一种用于现场检测虾 DNA 的实时 PCR 系统, LOD 约为 3.2 pg 虾的 DNA, 该检测方法可量化检测生食和加工食品中的虾 DNA, 从制备到结果分析需要不到 30 min 的时间, 该技术的高灵敏度、快速反应和高效率表明 DNA 方法在各种食品中的过敏原的现场检测的潜力.

2.1.2 环介导等温扩增技术 环介导等温扩增技术(LAMP)是一种在等温(60~65 °C)条件下, 短时间(通常是 1 h 内)内对核酸进行扩增的基因扩增方法. LAMP 技术可分为 3 个阶段: 反应起始材料的生产、循环扩增和结合双链化的延伸^[22], 环介导等温扩增是一种比较新颖的等温条件下基因扩增方法, 具有快速、简便和特异性高等特点^[23]. 目前, LAMP 已被开发用于食品中水产成分检测. Sheu 等^[24]将 LAMP 用于检测虾的 DNA, 结果显示使用 LAMP 引物后对虾的 DNA 进行鉴定, 既特异又快速(30 min 内可实现检测), 与其它甲壳类动物(包括螃蟹和龙虾)的 DNA 不存在交叉反应, 可对测试样本中低至 0.01% 的甲壳类动物的 DNA 进行检测. Zhang 等^[25]建立一种利用 LAMP 法快速检测食物过敏原牡蛎成分的方法, 根据国家生物技术信息中心提供的牡蛎线粒体序列, 使用 Primer Explorer 5.0 版软件设计引物, 选择 LAMP 特异性扩增引物, 然后对反应体系进行优化, 验证所开发方法的灵敏度、特异性和稳定性, 共检测 10 种牡蛎阳性样品、14 种阴性样品和 4 种牡蛎相关食品, 结果显示可检测牡蛎含量为 0.1%、DNA 浓度为 0.01 μg/mL 的样品.

2.2 基于蛋白质技术的水产品中过敏原检测

2.2.1 酶联免疫吸附法 酶联免疫吸附法(ELISA)是最常用的过敏原检测和定量技术. ELISA 将抗原

抗体的特异性免疫反应与酶催化相结合,通过酶催化底物后颜色的深浅来进行食物中过敏原的定性和定量分析^[26]. ELISA 总体相对简单,可通过受过训练的实验室人员使用相对便宜的设备进行,几小时内即可完成数据分析. 目前已有多种市售的基于 ELISA 的过敏原检测试剂盒,其检测对象涵盖了大多数主要的食物过敏原. 然而,由于 ELISA 依赖于抗体与抗原之间的特异性相互作用,导致抗体与其它食物中的蛋白质发生交叉反应. 因此,抗体和靶蛋白的选择至关重要. 另外,其中的抗体也会随批次变化,而对于不同制造商,其抗体和校准标准品也各不相同,通常都会导致不同试剂盒的不同检测结果. 此外,基质效应的干扰以及蛋白质对食品加工变性效应的敏感性,使得不同食品来源样品的性能和定量都有所不同^[17].

ELISA 被广泛用于水产品中过敏原检测. Ruethers 等^[27]评估了 3 种市售 ELISA 试剂盒检测各种硬骨鱼和软骨鱼及其制品的能力,对 57 种骨鱼的过敏原进行了检测,检出率为 26%~61%. 其中,欧洲和北美常见鱼类(包括鲤鱼、鳕鱼和鲑鱼)的检出率高于亚太地区的鱼类(包括鲑鱼、几种鲭鱼和金枪鱼),而在 17 种硬骨鱼类罐头产品中,只有 65%~86% 的产品被检出,其中金枪鱼的检出率最低,软骨鱼(9 种)、其它脊椎动物(8 种)和贝类(5 种)均未检出,结果表明这 3 种商用鱼类 ELISA 试剂盒检测鱼类及其制品中的过敏原的能力有限. Liang 等^[28]开发了酶联免疫吸附测定法(ELISA)用于检测加工食品中的南半球鱼类残留物,该方法具有更广泛的物种特异性,在测试的 37 种商业鱼类中检测到 28 种含有南半球鱼类残留物,检出率为 76%,使用缓冲添加剂优化样品提取后,蛋白质回收率为 87.2%~117.3%. Tsai 等^[29]开发了一种夹心酶联免疫吸附测定法(sELISA)用于分析生食和加热的 32 种食用软体动物的致敏性,发现它们不会与非软体动物发生交叉反应,通过该方法检测了不同加工方式处理的样品,发现检出限不同,加热软体动物的检出限为 0.1 mg/kg,未加工的软体动物的检出限为 0.1~0.5 mg/kg,该方法可用于分析蒸、煮、烤、炸和高压灭菌的软体动物样品及所有受测的软体动物商业产品. Dasanayaka 等^[30]开发了一种敏感的三明治-ELISA 检测方法以检测食物中的鱼类过敏原,该方法检测的鱼蛋白灵敏度高,定量限较低(0.5 ng/mL),且具有良好的重复性和重现性,能够检测该研究所有受测的重要商业鱼类.

2.2.2 免疫印迹法 免疫印迹法(Immunoblotting)是将凝胶电泳与免疫化学技术结合的免疫学方法,能够在从细胞或组织中提取的复杂蛋白质混合物中检测或半定量化单个蛋白质^[31]. 目前,免疫印迹法已被用于水产品过敏研究. Cosme 等^[32]利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)免疫印迹法对过敏患者病因进行分析,证实患者血清中存在鲑鱼子过敏原特异性 IgE(sIgE). Nihei 等^[33]基于免疫印迹法检测由鲍鱼引起的食物依赖性运动过敏性休克,结果显示,可检测到分子量为 33000 的 TM. Ruethers 等^[34]通过免疫印迹法评估鲑鱼和鲑鱼原始蛋白质提取物和加热蛋白质提取物的过敏原库,通过质谱分析发现与鲑鱼相比,鲑鱼的粗提取物和加热提取物均显示出较高的 IgE 结合率(77% vs. 70% 和 64% vs. 53%),其中,主要的鱼类过敏原小清蛋白表现出最高的 IgE 结合能力(10%~49%),其次是磷酸丙糖异构酶(TPI, 19%~34%). Ruethers 等^[35]采用 SDS-PAGE 和免疫印迹法对 26 种市售鱼提取物中的鱼蛋白浓度和体外 IgE 反应性进行测定,提取出 12 份蛋白粗提取物用于质谱检测,以分析蛋白质的组成. 通过 SDS-PAGE 和免疫印迹法检测到 4 种鱼类过敏原:小清蛋白、原肌球蛋白、醛缩酶和胶原蛋白. 其中,免疫印迹法在 6/26 份提取物中未检测到主要鱼类过敏原小清蛋白;在 7/12 份提取物中,质谱法检测到 5 种已知的鱼类过敏原:胶原蛋白、原肌球蛋白、醛缩酶、 β -烯醇酶和小清蛋白. Nugraha 等^[36]使用免疫印迹法检测了 21 名牡蛎致敏患者对太平洋牡蛎的生提取物和加热提取物的 IgE 致敏谱,并通过质谱分析评估了重组牡蛎过敏原对改善诊断的相关性,对太平洋牡蛎 TM 基因进行克隆、全序列分析以及重组表达,发现重组 TM 与已发表的太平洋牡蛎的 TM(BAH10152.1)的氨基酸序列有 97% 的相似性.

2.2.3 免疫层析法 免疫层析法(ICA)是一种新型的免疫分析方式,它是在免疫渗滤(IFA)基础上建立的一种简单快速的免疫学检测技术,已被用于水产品中过敏原检测. Zhang 等^[37]开发了一种快速夹心免疫层析(ICA)方法检测鱼中的小清蛋白,结果显示定性检出限(LOD)和定量检出限(LOQ)分别为

2 ng/mL和0.70 ng/mL,检测时间可控制在15 min内,回收率为104.0%~117.4%,该方法在不同鱼类物种中表现出较高的过敏交叉反应性. Li等^[38]建立了一种小清蛋白金磁免疫层析检测方法,用划膜仪将单抗在硝酸纤维素(NC)膜上距结合垫约5 mm处划线作为检测线(T线),用羊抗鼠IgG(2 mg/mL)在距T线约4 mm处划线作为质控线(C线),将T线与C线信号值的比值作为特征值,实验结果表明该金磁免疫层析试纸条具有良好的定性功能,可视化检测的最低检测浓度为4 ng/mL,检测特异性及检测稳定性良好. 该检测通过建立T/C比值线的定量方法提高金磁免疫层析试纸条的检测灵敏度;同时比较了7种鱼肉样品前处理方法的优缺点,在此基础上建立了鱼肉中小清蛋白的快速检测方法.

2.2.4 侧流免疫分析法 侧流免疫层析法(LFIA)基于特异性抗体与目标分子之间相互作用的原理,通过将抗体固定在特定的固相载体上,使其能够捕获和检测样品中的目标分子. LFIA基于抗体包被的有色颗粒传递视觉信号,通过视觉信号来指示测试结果,其中最常用的形式是测试条,通常由样品垫、测试线(T线)和对照线(C线)组成. 测试条上的T线指示样品中存在特定过敏原^[39]. LFIA主要用于检测蛋白质、抗体等生物大分子. 目前,LFIA法已被用于检测加工食品中的水产品过敏原. Li等^[40]开发了一种基于量子点的夹心荧光侧流免疫分析法,用于检测加工食品中的原肌球蛋白. 该方法的视觉检出限(VDL)和仪器检出限(IDL)分别为0.05和0.01 $\mu\text{g/mL}$,且与除虾以外的其它物种不存在过敏交叉反应性. Huang等^[41]开发了一种基于量子点的多重侧流免疫分析法(xLFIA),可同时检测甲壳类过敏原TM和SCP. 其中,卵清蛋白和TM的肉眼检出限和仪器检出限(LOD)一致,分别为0.05和0.5 $\mu\text{g/mL}$;而SCP的肉眼检出限为0.1 $\mu\text{g/mL}$,仪器检出限为0.05 $\mu\text{g/mL}$. 使用xLFIA法进行检测,在3种模式食品中能够检测到低至含量为0.10%的蟹粉、0.01%的蛋白粉和0.05%的虾粉;在28种商业食品中,有23种的xLFIA检测结果与配料标签一致. Wu等^[42]选取3种常见的食品基质[鱼、肉制品(香肠)和酱料]作为研究对象,以肌球蛋白为检测目标,基于荧光侧流免疫分析法从量子点的荧光探针和免疫识别反应等方面分析了影响途径和改进措施,结果显示基质的干扰会降低荧光强度,检测结果也会受到抗原与抗体结合反应的干扰.

2.2.5 生物传感技术 生物传感器(Biosensor)是一种对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号或化学物理信号进行检测的仪器,为快速、简单、经济和高特异性的过敏原检测提供了选择. 传感器可分为电化学传感器和光学传感器两大类. 此外,细胞作为一种新型的敏感受体,近年来也被用于过敏原检测^[40]. 因此,基于抗体的生物传感器能综合传感技术的高灵敏性,也具有抗体的高选择性和特异性等多重优点. 生物传感器技术用于食物过敏检测时,利用特异免疫反应监测抗原-抗体特异识别,使得抗体在食物过敏原的生物传感检测中发挥着关键作用.

生物传感器已被应用于水产加工食品中的过敏原检测. Angulo-Ibáñez等^[43]构建了免疫传感器用于检测复杂食物基质中的虾原肌球蛋白. 原肌球蛋白被固定在MB上的小鼠抗原肌球蛋白抗体捕获,随后与兔抗原肌球蛋白抗体结合,再被辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗兔抗体进一步识别,HRP通过催化 H_2O_2 与对苯二酚的氧化还原反应产生微电流信号,将MB耦合到一次性丝网印刷电极上以感测电流信号,从而实现原肌球蛋白的检测. 该免疫传感器在含有1%BSA的PBST溶液中的检出限为 4.7×10^{-5} mg/mL,可在4 h内检测原料和加工食品中的原肌球蛋白. Zhou等^[44]开发了开关转换比率荧光生物传感器,使用TM特异性适配体作为识别探针,可用于检测复杂食物系统中的TM,LOD为1.8 $\mu\text{g/mL}$,LOQ为5.4 $\mu\text{g/mL}$;利用7种不同的贝类样品验证了此拟合传感器在复杂食品样品中的适用性. Wang等^[45]开发了夹心生物传感器,利用合理压印的磁性颗粒和灵敏剂修饰的碳点来检测海鲜产品中的TM,采用多点引发的聚多巴胺作为分子印迹聚合物印迹在磁性微粒上,并对其表面进行防污改性,以达到有效分离TM的目的. 该方法对TM具有极高的特异性,准确度也很高,可进一步用于定量分析5种虾和5种虾加工产品中的TM. Zhang等^[46]开发了一种基于磁性辅助无标记适配体的肌钙蛋白荧光检测方法. 将原肌球蛋白适配体结合在功能化磁性纳米颗粒(MNP)表面构建适配体-MNP复合物作为检测受体,当复合物与食物基质中的原肌球蛋白相互作用时复合物发生构象变化,导致MNP表面的适配体被释放,通过释放的适配体与OliGreen染料反应产生的特异性荧光来反映样品中的原肌球蛋白

浓度. 该传感器可用于番茄酱、蛋黄酱和虾酱中原肌球蛋白的检测, 检出限为 77 ng/mL, 检测时间为 3 h.

2.2.6 质谱法 质谱法(MS)是在电场和磁场的作用下将运动的离子按其质荷比分离后进行检测的方法, 该方法通过检测离子的准确质量来确定其化合物的组成. 不同于传统的抗体检测法, MS能够以高灵敏度和高选择性对复杂基质中的多种过敏原蛋白进行分析, 通过检测氨基酸序列明确识别过敏原, 从而避免复杂基质和由于热处理引起的二级/三级结构变化导致的假阳性结果^[47]. 对于食品过敏原的检测和定量, MS通常将蛋白质的肽段作为选择标记物, 一般使用选择性蛋白酶将食物基质中的蛋白质分解成代表性肽, 然而, 要达到准确定量可能需要数小时的提取和消化步骤, 并且得到的肽段样品可能因样品类型/基质不同而有很大差异. 因此, 使用质谱法检测食物过敏原还要考虑蛋白酶消化过程中肽的稳定性^[17].

目前, MS已广泛用于水产品中过敏原的鉴定、表征和测定. Wu等^[48]报道了一种在复杂食物基质中使用全长同位素标记重组肌球蛋白(TM-I)作为内标, 并借助超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对虾过敏原肌球蛋白精确定量检测的方法, 结果表明基于细胞培养条件下稳定同位素标记技术(SILAC)表达的TM-I具有较高的同位素标记率(>99%)和纯度, 其序列与天然序列保持一致. Chen等^[49]通过液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)确定了精氨酸激酶(AK)为皮皮虾(*Oratosquilla oratoria*)的过敏原, 并通过血清学分析获得AK的相关结构信息(包括356个氨基酸). 在质谱技术中, 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)电离产生的碎片较少, 可以在 m/z 20~200000 范围内对大分子物质进行分析. Zhao等^[50]开发了一种结合免疫磁分离(IMS)和MALDI-TOF MS检测海产品过敏原的方法, 采用具有抗人IgE抗体功能化的商业磁珠(MBs)对血液样本中的IgE进行免疫磁分离, 然后从海鲜蛋白提取物中捕获过敏原进行过敏分析, 分别通过MALDI-TOF MS和HPLC-MS/MS对捕获的过敏原进行鉴定, 结果显示该方法用于过敏试验的假阳性率为0. Zhao等^[51]使用微流控芯片, 结合MALDI-TOF MS对鱼类之间的交叉反应进行了评估, 使用抗人IgE抗体功能化磁珠对血液样品中的IgEs进行免疫磁分离(IMS), 在单直微流控通道中分别捕获到7种不同鱼样品蛋白提取物中的过敏原, 并将捕获的过敏原进行了胰蛋白酶酶解, 通过MALDI-TOF MS和高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)进行联合鉴定, 结果显示其中5种鱼的小清蛋白序列的相似性>64%, 表明所分析鱼种之间存在过敏交叉反应. 通过酶联免疫吸附实验(ELISA)对实验结果进行验证, 结果与所开发的方法结果一致. Wang等^[52]建立了一种在微流控芯片上分析海产品基质肌原纤维蛋白中过敏原的方法, 以大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和黑虎虾(*Penaeus monodon*)为模型海产品, 对其肌原纤维蛋白中的过敏原进行芯片通道上的免疫磁分离, 对捕获到的过敏原进行胰蛋白酶酶切, 之后借助MALDI-TOF MS进行分析, 在大黄鱼的肌原纤维蛋白中鉴定到6种过敏原, 经ELISA验证表明该方法的假阳性率为0, 有望实现对单滴血进行食物过敏检测, 并应用于其它生物体中潜在过敏原的鉴定. Lin等^[53]采用MALDI-TOF MS评估鱼肌肉渗出物中的潜在过敏原, 以大黄鱼为海鲜模型, 使用IgE抗体修饰的磁珠(MBs)来分离渗出液样品中存在的过敏原, 从大黄鱼鱼肌渗出物中检测到8种过敏原: 小白蛋白 β 、小白蛋白、蛋白S100、组蛋白H4、细胞色素c、脂肪酸结合蛋白3(FABP3)、微粒体谷氨酸S-转移3(MGST21)和C-C基序趋化因子21(CCL21).

2.3 基于多种技术的水产品过敏原检测

目前, 已开发多种技术联合用于水产品中过敏原的检测. Radomirovic等^[54]将夹心酶联免疫吸附法与标记DNA的实时PCR扩增技术结合, 开发了一种超灵敏的免疫PCR方法, 可用于定量检测食品中的甲壳动物肌球蛋白. 该方法对甲壳动物中肌球蛋白的检测具有高度的特异性, 且在较宽的浓度范围内非常精确, 可对商业食品中的甲壳动物中肌球蛋白进行定量检测. Zhao等^[51]利用MALDI-TOF MS和HPLC-MS/MS法对捕获的过敏原进行消化和鉴定, 并通过酶联免疫吸附测定进行验证. 当进行相同的致敏性实验时, 检测结果与商业ELISA实验结果一致.

此外, 顺应大数据时代的潮流, 机器学习技术已用于高效地处理大数据. Luan等^[55]将红外光谱与

主成分分析和聚类分析结合,建立了一种红外光谱化学计量分析模型(IR-CAM),通过比较5种蛋白质、14种甲壳类和贝类肌球蛋白(TM)的二阶导红外光谱(SD-IR),发现蟹、虾和贝类在酰胺III区域有8个共享峰和独特的指纹峰.发酵水产品TM($n=60$)验证表明,该模型可同时准确识别和区分甲壳类和贝类中的TM,可在无抗体的基础上应用于水产品过敏原检测和溯源. Bowler等^[56]将近红外光谱仪与机器学习模型结合,以尽早发现由于人为失误而在生产线上添加错误的农业食品粉末导致的最终产品中含有过敏原这一问题. Srisomsap等^[57]对虾样品中的蛋白质进行鸟枪法蛋白质组学(Shotgun proteomics)和计算机模拟分析,以鉴定和表征加工和未加工形式的磷虾(*Acetes spp.*)和南美白对虾(*Litope-naeus vannamei*)中的蛋白质组和潜在过敏原,使用LC-MS/MS对样品进行分析,并对鉴定出的蛋白质进行蛋白质-蛋白质相互作用和基因本体分析,通过Allermatch系统分析出潜在过敏原,并用Alg Pred系统预测出IgE表位. Zhang等^[58]在卷积神经网络(IRN)建模的基础上,利用机器学习对16种鱼中的过敏原小清蛋白红外光谱进行训练和学习,建立快速识别鱼类过敏原小清蛋白的IRN、支持向量机(SVM)和随机森林(RF)模型,并采用SDS-PAGE和ELISA对该新方法进行验证,确定其在识别各种海鲜基质中过敏原的准确性.

3 发展趋势

表2总结和比较了上文所述检测方法的优劣势. 其中,ELISA作为新检测技术的验证测试之一,可用于检测总蛋白或特定蛋白质,实现目标蛋白的定量检测,并且随着抗体制备技术的成熟,ELISA已经得到了良好的开发和商业化^[39]. 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及复杂食品基质的干扰等都可能造成检测结果的偏差^[59]. 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,还可避免同源蛋白导致的假阳性结果^[60],但是由于检测的复杂度,进行检测时通常需要有专业人员操作. 生物传感器技术提高了检测的灵敏度,但质谱和生物传感器对设备和技术要求较高,尚未实现批量化检测. 相比之下,基因水平的检测可避免蛋白水平的检测中过敏原结构对检测的影响,在成本上较质谱方法低廉,但基因水平的检测无法直接反映过敏原蛋白的存在与否^[61]. 此外,多种技术联合有利于进一步确证实验结果,评估新开发方法的准确性和可靠性. 借助机

Table 2 Comparison of allergen detection methods in various aquatic products

Technique	Advantage	Disadvantage	LOD
DNA-based methods	High accuracy and sensitivity, possibility to achieve on-site detection, multiplicity	Sensitivity and specificity depend significantly on DNA fragments of target allergenic foods, indirect detection	Shrimp allergen tropomyosin 3.2 pg (DNA) ^[21]
			Crustaceans 1 pg(DNA) or 10 mg/kg ^[19]
ELISA	High sensibility, commercialization, validation test	Matrix interference, sensitive to some processing condition, relatively low efficiency	Raw mollusk 0.1—0.5 ^[29] Thermal processing mollusk 0.1 mg/kg ^[29] Fish allergen 0.5 ng/mL ^[30]
Immunological methods	High specificity, high sensitivity, simple operation, low cost	Interference by antigen-antibody binding reactions, difficulty in antibody preparation, cross-reactivity	Fish parvalbumin 2 ng/mL ^[37]
			Ovalbumin 0.05 μ g/mL ^[41]
			Protomyosin 0.5 μ g/mL ^[41] sarcoplasmic calcium-binding protein 0.05 μ g/mL ^[41]
Biosensor	Quick response, high-throughput, portability, avoidance of cross-contamination	Slow response, extrinsic biological interference, high cost	Tropomyosin 1.8 μ g/mL ^[44] Protomyosin 77 ng/mL ^[46]
Mass Spectroscopy	Multiplex detection, high accuracy and reproducibility, no cross-reactivity problems	Requirements for specialized personnel	—
Multi technology integration	High sensitivity, high efficiency	High cost, high technical requirements for operation	—

机器学习方法处理数据成为一种趋势。机器学习为数据输入和解释提供了一种高效工具,可将大数据转化为具有生物医学意义的结果,应用于生物分析,通过深度学习可实现过敏原的预测。机器学习方法的使用,可以显著提高预测模型的灵敏度和特异性,以 Alg Pred 2.0 软件为例,其灵敏度达到 93.1%,特异性达到 95.4%^[61]。

尽管目前针对水产品中过敏原的检测技术已取得了一些显著进展,但仍然存在一些挑战。例如,检测的灵敏度需要进一步提高,对混合样品的检测准确性亦需要优化。研究人员可以进一步改进和优化现有的检测技术,提高其检测灵敏度和准确度。新的检测技术的开发也是未来研究的重点之一,如基于纳米技术的检测方法、快速通量的检测平台等,新型表面修饰、纳米技术和制备技术的发展为设计具有更高灵敏度和选择性的电化学生物传感器平台提供了最有价值的可能性^[62]。

4 结论与展望

目前,过敏性疾病在全球的发病率迅速上升,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。水产品中过敏原的检测技术的持续进步为确保水产品的安全和健康提供了更加有效的手段。未来,研究人员有望根据现有技术的优势和局限性,进一步发展新型检测手段,不断提升其检测的灵敏度和准确度,以及结合机器学习的方法实现对过敏原的预测等,以更好地应对食品过敏问题,确保食品安全和公众健康,提升患者及其家庭成员的生活质量,降低疾病经济负担。

参 考 文 献

- [1] Ni J., Friedman H., Boyd B. C., McGurn A., Babinski P., Markossian T., Dugas L. R., *BMC Pediatr.*, **2019**, *19* (1), 1—8
- [2] Paramesh H., *Indian J. Pediatr.*, **2018**, *85*(4), 284—294
- [3] Monaci L., De Angelis E., Montemurro N., Pilolli R., *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **2018**, *106*, 21—36
- [4] Yu W., Freeland D. M. H., Nadeau K. C., *Nat. Rev. Immunol.*, **2016**, *16*(12), 751—765
- [5] Sampson A. H., O'Mahony L., Burks W. A., Plaut M., Lack G., Akdis C. A., *J. Allerg. Clin. Immunol.*, **2018**, *141*(1), 11—19
- [6] Crespo J. F., Beatriz C., *Food Chem.*, **2023**, *411*, 135500—135500
- [7] Zhang M., Wu P., Wu J., Ping J., Wu J., *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **2019**, *114*, 278—292
- [8] Davis C. M., Gupta R. S., Aktas O. N., Diaz V., Kamath S. D., Lopata A. L., *J. Allerg. Cl. Imm-Pract.*, **2020**, *8*(1), 37—44
- [9] Xu J., Ye Y., Ji J., Sun J., Sun X., *Crit. Rev. Food Sci.*, **2022**, *62*(25), 6887—6907
- [10] Eischeid A. C., *J. Sci. Food Agr.*, **2019**, *99*(5), 2641—2645
- [11] Dubiela P., Kabasser S., Smargiasso N., Geiselhart S., Bublin M., Hafner C., Mazzucchelli G., *Sci. Rep.*, **2018**, *8*(1), 11366
- [12] Nugraha R., Kamath S. D., Johnston E., Karnaneedi S., Ruethers T., Lopata A. L., *Front. Immunol.*, **2019**, *10*, 2676
- [13] Johnston E. B., Kamath S. D., Iyer S. P., Pratap K., Karnaneedi S., Taki A. C., Nugraha R., Schaeffer P. M., Rolland J. M., O'Hehir R. E., *Mol. Immunol.*, **2019**, *112*, 330—337
- [14] Wai H. M., Middelvelld R., Thörnqvist V., Ballardini N., Nilsson E., Strömquist J., Nilsson L., Ahlstedt S., Protudjer J. L. P., *World Allergy Organ.*, **2019**, *12*(9), 100061
- [15] Ekezie F. G. C., Cheng J. H., Sun D. W., *Trends Food Sci. Tech.*, **2018**, *74*, 12—25
- [16] Sena-Torralba A., Pallás-Tamarit Y., Morais S., Maqueira Á., *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **2020**, *132*, 116050
- [17] Holzhauser T., Johnson P., Hindley J. P., O'Connor G., Chan C. H., Costa J., Fæste C. K., Hirst B. J., Lambertini F., Miani M., Robert M. C., Röder M., Ronsmans S., Bugyi Z., Tömösközi S., Flanagan S. D., *Food Chem. Toxicol.*, **2020**, *145*, 111709
- [18] Suh S. M., Kim M. J., Kim H. I., Kim H. J., Kim H. Y., *Food Chem.*, **2020**, *317*, 126451
- [19] Blaschke V. M., Tran T. U., Naneh M., Zagon J., Winkel M., *Food Control*, **2023**, *146*, 109517.
- [20] Blaschke V., Berten A., Sprenger H., Zagon J., Winkel M., *J. Agric. Food Chem.*, **2023**, *71*(31), 12029—12042
- [21] Kim M. J., Kim H. I., Kim J. H., Suh S. M., Kim H. Y., *Food Sci. Biotechnol.*, **2019**, *28*(2), 591—597
- [22] Soroka M., Wasowicz B. A. O., Rymaszewska A. A. O., *Electronic.*, **2021**, 2073—4409
- [23] Huang T., Li L., Liu X., Chen Q., Fang X., Kong J., Draz M. S., Cao H., *Anal. Methods*, **2020**, *12*(46), 5551—5561
- [24] Sheu S. C., Yu M. T., Lien Y. Y., Lee M. S., *Food Chem.*, **2020**, *332*, 127389
- [25] Zhang Y., Yu Y., Song C., Li Y., Xiong W., Ge Y., *J. Food Saf. Food Qual.*, **2019**, *10* (7), 1804—1810
- [26] Madrid R., García-García A., Cabrera P., González I., Martín R., García T., *Foods*, **2021**, *10*(2), 440
- [27] Ruethers T., Taki A. C., Khangurha J., Roberts J., Buddhadasa S., Clarke D., Hedges C. E., Campbell D. E., Kamath S. D., Lopata A. L., *J. Sci. Food Agr.*, **2020**, *100*(12), 4353—4363

- [28] Liang J., Taylor S. L., Baumert J., Lee N. A., *Food Chem.*, **2022**, *396*, 133656
- [29] Tsai C. L., Chen I. N., Chen Y. T., *Food Chem.*, **2023**, *427*, 136732
- [30] Dasanayaka B. P., Zhao J., Zhang J., Huang Y., Khan M. U., Lin H., Li Z., *Anal. Biochem.*, **2021**, *635*, 114448
- [31] Sule R., Rivera G., Gomes A. V., *BioTechniques*, **2023**, *75* (3), 99—114
- [32] Cosme J., Spínola-Santos A., Bartolomé B., Pastor-Vargas C., Branco-Ferreira M., Pereira-Santos M., Pereira-Barbosa M., *J. investig. allergol. clin. immunol.*, **2019**, *29*(2), 139—141
- [33] Nihei M., Nakajima Y., Horino S., Kondo Y., Miura K., *Pediatr. Int.*, **2022**, *64* (1), e15163
- [34] Ruethers T., Taki A. C., Karnaneedi S., Nie S., Kalic T., Dai D., Daduang S., Leeming M., Williamson N. A., Breiteneder H., Mehr S. S., Kamath S. D., Campbell D. E., Lopata A. L., *Allergy*, **2020**, *76*(5), 1443—1453
- [35] Ruethers T., Taki A. C., Nugraha R., Cao T. T., Koeberl M., Kamath S. D., Williamson N. A., O'Callaghan S., Nie S., Mehr S. S., Campbell D. E., Lopata A. L., *Allergy*, **2019**, *74*(7), 1352—1363
- [36] Nugraha R., Ruethers T., Taki A. C., Johnston E. B., Karnaneedi S., Kamath S. D., Lopata A. L., *Foods*, **2022**, *11*(3), 404
- [37] Zhang M., Li M., Zhao Y., Xu N., Peng L., Wang Y., Wei X., *Food Res. Int.*, **2021**, *142*, 110102
- [38] Li M. Y., *Development of Gold Magnetic Immunochromatographic Test Strips for Small Albumin, a Major Allergen in Fish*, Shanghai Normal University, Shanghai, **2019**(李梦银. 鱼类主要过敏原小清蛋白金磁免疫层析试纸条的研制. 上海: 上海师范大学, **2019**)
- [39] Xu J., Ye Y., Ji J., Sun J., Sun X., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2022**, *62*(25), 6887—6907
- [40] Li R., Zhang Y., Zhao J., Wang Y., Wang H., Zhang Z., Lin H., Li Z., *J. Food Compos. Anal.*, **2022**, *114*, 104776
- [41] Huang Y., Li R., Zhu W., Zhao J., Wang H., Zhang Z., Lin H., Li W., Li Z., *Food Chem.*, **2024**, *440*, 138275
- [42] Wu Y., Wang Y., Wang H., Li Y., Li Z., *J. Food Saf. Qual.*, **2020**, *11*(12), 3783—3788
- [43] Angulo-Ibáñez A., Eletxigerra U., Lasheras X., Campuzano S., Merino S., *Anal. Chim. Acta*, **2019**, *1079*, 94—102
- [44] Zhou J., Wang Y., Zhou C., Zheng L., Fu L., *Food Control*, **2023**, *144*, 109380
- [45] Wang Y., Li L., Li H., Peng Y., Fu L., *Food Control*, **2022**, *132*, 108552
- [46] Zhang Y. X., Wu Q. P., Sun M., Zhang J. M., Mo S. P., Wang J., Wei X. H., Bai J. L., *Sensor. Actuat. B: Chem.*, **2018**, *263*, 43—49
- [47] Bianco M., Ventura G., Calvano C. D., Losito I., Cataldi T. R. I., *Proteomics* **2023**, *23*(23/24), e2200427
- [48] Wu Y., Yao K., Yang Y., Wu X., Zhang J., Jin, Y., Xing Y., Niu Y., Jiang Q., Dai C., *Food Chem.* **2024**, *439*, 138170
- [49] Chen Y. X., He X. R., Yang S. Q., Huan F., Li D. X., Yang Y., Chen G. X., Liu G. M., *J. Agr. Food Chem.*, **2023**, *71*(24), 9508—9518
- [50] Zhao X., Lu J., Long S., Soko W. C., Qin Q., Qiao L., Bi H., *J. Agr. Food Chem.*, **2021**, *69*(43), 12909—12918
- [51] Zhao X., Bi H., *J. Agr. Food Chem.*, **2022**, *70*(24), 7525—7534
- [52] Wang L., Bi H., *Anal.*, **2022**, *147*(18), 4063—4072
- [53] Lin F., Soko W. C., Xie J., Bi H., *J. Agr. Food Chem.*, **2023**, *71*(36), 13546—13553
- [54] Radomirović M., Gligorićević N., Stanić-Vučinić D., Rajković A., Ćirković Veličković T., *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, *24*(20), 15410
- [55] Luan H., Lu J., Li Y., Xu C., Shi W., Lu Y., *Food Chem.*, **2023**, *414*, 135686
- [56] Bowler A. L., Ozturk S., Rady A., Watson N., *Sensors*, **2022**, *22*(19), 7239
- [57] Srisomsap C., Nonthawong K., Chokchaichamnankit D., Svasti J., Phiriyangkul P., *Food Biosci.*, **2023**, *54*, 102803
- [58] Zhang X., Li Y., Tao Y., Wang Y., Xu C., Lu Y., *Food Chem.*, **2021**, *337*, 127986
- [59] Eischeid A. C., Stadig S. R., Rallabhandi P., *Food Addit. Contam. Part A*, **2021**, *38*(4), 563—572
- [60] Flicker S., Zettl I., Tillib S. V., *Front. Immunol.*, **2020**, *11*, 576255
- [61] Sharma N., Patiyal S., Dhall A., Pande A., Arora C., Raghava G. P. S., *Brief. Bioinform.*, **2021**, *22*(4), 1—12
- [62] Sheng K., Jiang H., Fang Y., Wang L., Jiang D., *Trends Food Sci. Tech.*, **2022**, *121*, 93—104

(Ed.: N, K)