

# 花生过敏原检测方法研究进展

韩远龙, 吴志华\*, 闫飞, 陈红兵

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 花生是重要食物过敏原之一, 能引起严重的过敏反应。目前尚没有花生过敏的特效疗法, 严格避免食入含花生的食物是花生过敏患者的最佳选择, 所以食物中花生的检测就显得尤为重要。本文对花生主要过敏原及其过敏反应研究进展进行简要介绍, 重点介绍花生过敏原的主要检测方法的新发展, 包括传统的酶联免疫吸附实验(ELISA)、免疫印迹法、聚合酶链式反应(PCR)等, ELISA和免疫印迹法都是应用较为普遍的检验方法, PCR方法应用较少, 但它能从DNA/RNA方面检测花生过敏原的存在; 新兴检测方法主要包括生物传感器和质谱法, 这两种方法在花生检测方面具有可观的前景。未来的这些检测方法将朝着快速、灵敏、简便的方向发展。

**关键词:** 花生过敏; ELISA; 免疫印迹法; PCR; 生物传感器; 质谱法

## Research Progress in Peanut Allergen Detection

HAN Yuan-long, WU Zhi-hua\*, YAN Fei, CHEN Hong-bing

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Peanut is one of the major allergenic foods, which can cause severe allergic reactions. Currently, there are no effective therapeutic strategies for peanut allergy. For peanut allergic patients, avoiding intake of the foods containing peanuts is the best choice. Meanwhile, the detection of peanuts in foods is becoming particularly important. Herein, major peanut allergens and research progress in peanut allergen detection are introduced. Traditional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blotting and polymerase chain reaction (PCR) are summarized. ELISA and western blotting are extensively used in the detection of peanut allergens. However, the application of PCR based on DNA or RNA is not common. Moreover, some newly developed detection methods such as biosensor and mass spectrometry are discussed. Both of them are characteristics of faster, easier and more sensitive detection have promising prospects in the detection of peanut allergens.

**Key words:** peanut allergy; ELISA; western blotting; PCR; biosensors; mass spectrometry (MS)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0305-04

花生是重要的过敏食物。2010年, 加拿大第一个全国性的调查证实花生过敏症的患病率为0.61%<sup>[1]</sup>。2008年, 美国儿童花生过敏症患病率由2002年的0.8%增长到了1.4%<sup>[2]</sup>。法国的一项调查表明, 食物过敏患者中花生过敏的人数占28%<sup>[3]</sup>。中国协和医科大学变态反应科调查表明, 北京地区约有4%的食物过敏患者对花生过敏<sup>[4]</sup>。随着国民饮食结构的变化, 花生消费量的不断增加, 花生过敏发病率呈上升的趋势。通常花生过敏是终身的, 只有约10%的过敏儿童会随年龄的增长产生耐受性<sup>[5]</sup>。而且不同的花生过敏病人, 其花生致敏组分有所不同<sup>[6]</sup>。目前, 花生过敏作为世界各地普遍存在的一个公众性健康问题, 得到了广泛关注。

花生过敏属于IgE介导的超敏反应, 其机制主要为I型超敏反应机理<sup>[7]</sup>, 一定量的过敏原可诱导易感个体产生足量的IgE, IgE与膜表面特定的受体结合, 从而使机体处于致敏状态。当再次接触含相同或相似过敏原成分时, 过敏原分子特异性识别致敏细胞膜表面的IgE, 诱导细胞脱颗粒释放炎症介质而触发花生过敏症。与牛奶、鸡蛋过敏相比, 花生过敏一般不随年龄增长而消失<sup>[8]</sup>, 而且目前还没有特效疗法, 严格避免食入含花生的食物是目前的最佳选择。

## 1 花生过敏原的检测

由于避免食入含花生的食品是避免花生过敏的最佳

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 江西省科技支撑计划重点项目(2009BNA08100)

作者简介: 韩远龙(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物加工过程。E-mail: hanyuanlong0337@qq.com

\* 通信作者: 吴志华(1976—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品纳米加工。E-mail: wuzhihua@ncu.edu.cn

选择,所以食品中花生的含量检测就显得尤为重要。花生过敏原的检测方法有很多种,除免疫学检测方法外,还有许多其他新检测方法。免疫学方法主要包括酶联免疫吸附实验(ELISA)、印迹法、聚合酶链式反应(PCR)等,其他检测方法如生物传感器、质谱法等。

### 1.1 传统检测方法

#### 1.1.1 ELISA

酶联免疫吸附实验采用单克隆或多克隆抗体技术检测过敏原,是花生过敏原最常用方法之一,最早出现于20世纪70年代,其优点是特异性高、敏感性强、简单迅速,不需要昂贵仪器设备。一般,ELISA的检测限在0.1~1mg/kg之间。Yeung等<sup>[9]</sup>首次成功的采用酶联免疫吸附实验检测食品中的各种微量的花生过敏原,得出抑制率为12ng/mL,检出限为400 $\mu$ g/kg,回收率为68%~90%,由于使用不同提取缓冲液和不同ELISA方法之间缺乏可比性,2010年,Zeleny等<sup>[10]</sup>对ELISA改进,采用一个合适的质量控制材料(QCM),对材料特性进行了评价,为找到合适的认证的参考材料迈出了第一步。

目前,用于花生过敏原的检测方法有双抗夹心ELISA和竞争ELISA。

双抗夹心ELISA是一种常见的检测方法,此法既可以测抗体,又可测抗原。Kiening等<sup>[11]</sup>就采用了双抗夹心检测食物中花生含量,检测限为0.2~1.2mg/kg,回收率为86%~127%,时间为30min,能快速检测花生过敏原。吉坤美等<sup>[12]</sup>用夹心ELISA法同时检测15种食品中的花生蛋白成分,检出限为8ng/mL。而且现在市面上已经有针对花生过敏原的ELISA试剂盒多采用此法检测花生过敏原。比如:R-Biopharm公司的Ridascreen快速花生检测试剂盒,它的检测下限:定性检测为1.5mg/kg,定量检测下限为2.5mg/kg,而Neogen公司花生过敏原检测试剂盒,同样分为定性检测和定量检测两种,其中定性检测为5mg/kg,定量检测范围为2.5~25mg/kg,ELISA试剂盒简化了操作步骤和过程,进而缩短了检测时间,并且方便。Whitaker等<sup>[13]</sup>对市面上的4种ELISA检测试剂盒进行了评估,发现Neogen公司的试剂盒有最好的准确度,R-Biopharm公司的试剂盒则具有最好的精度。Park等<sup>[14]</sup>也采用了3种市售的ELISA试剂盒检测食品中花生的含量,均能在含量为5 $\mu$ g/g的食物样品中成功检测出花生。

竞争ELISA先将特异性抗原与固相载体联结,形成固相抗原,用样本中的抗体和一定量的酶标抗体竞争性与固相抗原结合。当样本中抗体量越多,结合在固相上的酶标抗体则越少,因此阳性反应呈色浅于阴性反应,显色后可测定抗体。该法同样可用来测抗原。Schmitt等<sup>[15]</sup>就采用竞争抑制ELISA法检测了花生中的主要

过敏原Ara h 1和Ara h 2,检测灵敏度分别为12ng/mL和0.5ng/mL,该方法简便、快速,只需要一个过敏原特异性抗体。邵景东等<sup>[16]</sup>用间接竞争ELISA法检测花生过敏原,得出花生抗原在0.01~30ng/mL范围内具有较好的线性关系,IC<sub>50</sub>为34.28ng/mL,检出限为0.1ng/mL。这为花生过敏原的ELISA检测方法的构建提供了强有力的支撑。

ELISA技术发展较为成熟,在花生的检测得到广泛应用,是目前花生过敏检测最主要的方法。ELISA与其他方法相结合,其灵敏度得到大幅提高,而消耗则大幅减小。例如Speroni等<sup>[17]</sup>将磁性粒子与ELISA结合用于检测Ara h 3/4,与ELISA试剂盒比较,能大大降低试剂和样品消耗,灵敏度也提高了3倍,相对标准差在3.4%~10%之间,重现性在(84 $\pm$ 5)%~(114 $\pm$ 6)%之间,结果显示出良好的精密度和重现性。因为磁性粒子能帮助抗体更好地与固相载体固定,并能使更多抗原抗体进行免疫反应,重复性也很好。ELISA方法的不足在于其特异性取决于抗原的制备,这限制了其应用范围,有待改进。

#### 1.1.2 印迹法

印迹法(blotting)是指将样品转移到固相载体上,而后利用相应的探测反应来检测样品的一种方法。用于花生蛋白检测的印迹方法主要是斑点印迹和免疫印迹,通常是将两种方法结合起来,共同检测,相互印证。

斑点印迹,将待测核酸或蛋白点样于固相载体上,以同位素或非同位素标记探针与之杂交,通过显影或显色而进行检测。

免疫印迹(Western blotting)和ELISA一样,都属于免疫标记技术,是常用的蛋白质分析技术。采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,即SDS-PAGE,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗,先将待测蛋白通过SDS-PAGE电泳分离开来,然后再利用电场力的作用将胶上的蛋白转移到固相载体,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体发生免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体起反应,经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。其优点在于:分辨率高、特异性强、灵敏度高。Koch等<sup>[18]</sup>分别用斑点印迹和免疫印迹法,半定量和定量检测市售花生过敏原并进行比较分析,用斑点印迹估算花生蛋白的数量,再用免疫印迹进一步确定特异性的花生蛋白,且斑点印迹在检测花生和烘烤花生时,生花生的反应强度是等量烘烤花生的3~4倍。Schäppi等<sup>[19]</sup>也采用斑点印迹和免疫印迹法检测隐藏在食品中的花生过敏原,选定的46个样品中检测出了其中19个含有花生但配料中未注明。

### 1.1.3 PCR法

PCR是一种以DNA/RNA为基础的检测方法,由高温变性、低温退火及适温延伸等几步反应组成一个周期,循环进行,使目的DNA得以迅速扩增,具有特异性强、灵敏度高、操作简便、省时等特点。Stephan等<sup>[20]</sup>采用了双抗夹心ELISA和RT-PCR对食品中花生的含量进行了检测,对33个当地食品样品检测中发现,有2个样品中含有花生但没有提示标签,而且结果显示这两种方法具有良好的相关性,是检测隐藏在加工食品过敏原的敏感性和特异性的检测工具。Hirao等<sup>[21]</sup>利用内转录间隔区定性PCR检测了食物中主要过敏原(花生、大豆、小麦),由于PCR需要设计用于检测花生PCR靶基因序列的引物,而且实验过程中DNA可能部分降解,甚至完全降解,从而导致PCR产物没有得到预期的结果,然而食品仍可能含有过敏原最终检测不出。此外,食品中其他物质可能会干扰。另外,吉坤美等<sup>[22]</sup>采用实时定量PCR技术检测食品中花生过敏原Ara h 1基因成分,检测8种食品中过敏原基因,其结果与食品标注一致,为检测食品中花生过敏原DNA成分的试剂奠定了技术基础。

多重连接探针扩增法(MLPA)是在PCR基础上发展起来的,是近几年发展起来的一种针对待检DNA序列进行定性和半定量分析的新技术,每个MLPA探针包括两个荧光标记的寡核苷酸片段,这两个寡核苷酸片段都与靶序列进行杂交,之后使用连接酶连接两部分探针。连接反应完成后,用一对通用引物扩增连接好的探针,每个探针的扩增产物的长度都是唯一的,通过毛细管电泳分离扩增产物,软件分析,得出结论。该方法灵敏度较高,比定量PCR敏感,Mustorp等<sup>[23]</sup>用此法检测8种主要食物过敏原(包括花生),虽然没有检测出这些过敏原,但在恶劣的条件也能有效地提取DNA。而且它是模块化的,因此可以很容易被删除或添加探针用于其他特殊用途,此法可用作对传统的基于蛋白质的补充方法。

## 1.2 其他新型检测方法

### 1.2.1 生物传感器

生物传感器的种类很多,原理也多种多样,而免疫传感器和光传感器就是其中的两种。免疫传感器是利用抗原与抗体专一性结合而导致检测装置信号变化设计而成的一种传感器。具有高灵敏度,选择性高,降低了检出下限;检测时间短,通常只需要几分钟或几十分钟,而且免疫传感器成本低,易于推广;免疫传感器轻巧方便,可随身携带,操作简便,不需专业培训。Singn等<sup>[24]</sup>就用纳米生物传感器成功检测了花生过敏原Ara h 1,并发现传感器孔径越小越敏感,在15nm波长处能检测最低质量浓度(0.04 μg/mL)。传感器检测同时也

存在不足,敏感膜上抗原或抗体的固定量以及固定分子的活性都很难控制,导致传感器使用的一致性和可靠性差,使用寿命短。而且生物敏感膜的制备工艺复杂,批量生产还有一些问题需要解决,所以还有待进一步完善。

光纤表面等离子共振(SPR)生物传感器是基于SPR原理,当入射光在金属膜表面发生全内反射,产生消逝波,一定条件下消逝波激发金属表面自由电子使之成为等离子体。而当表面等离子体与消逝波的频率、波数相等,此时将发生共振,出现共振峰。如果金属表面的样品折射率改变,共振峰的位置随之变化,建立起折射率与共振峰位置的对应关系。通过对分子间相互作用的动力学参数大小来评价生物分子间的相互作用。因而可以实时观察生物分子间的相互作用,检测两种分子结合的特异性,确定两种分子的结合强度,了解生物分子的结合过程、结合/解离速度的快慢、结合位点和结合顺序。Polleta等<sup>[25]</sup>就采用光学纤维SPR生物传感器与纳米磁珠抗体结合成功地快速准确检测了花生过敏原Ara h 1,并将检测限精确在0.09 μg/mL。与ELISA相比,快速灵敏、高通量、无需标记、可再生、定量效果好、能实时检测生物分子结合解离的过程等,因此具有良好的发展前景。

### 1.2.2 质谱法(MS)

无论是筛选还是确证检测技术,质谱这项技术已用于检测花生过敏原,它具有灵敏度高,样品用量少,分析速度快,分离和鉴定同时进行等优点而被广泛应用。但是对样品的要求高,操作要求高,设备相对昂贵等限制了它在这方面的应用。目前已用于花生检测的主要有两种:LC-MS/MS和ICP-MS。

液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)是将复杂样品经过液相色谱分离后,再用质谱仪检测的技术。即将色谱的分离能力与质谱的定性功能结合起来,实现对复杂混合物更准确的定量和定性分析。而且也简化了样品的前处理过程,使样品分析更简便。花生蛋白成分复杂,可用此法检测并分析,质谱的检测方法一般用四极杆-飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS)。Chassaigne等<sup>[26]</sup>就采用了此法检测花生中的主要过敏原蛋白Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3/4。Shefcheck等<sup>[27]</sup>也采用先消化,再从巧克力中提蛋白,最后LC-MS/MS检测的方法,成功定性检测Ara h 1,该方法检测限可提高到 $2 \times 10^{-6}$ 。而且很容易进行修改并用于检测其他过敏原。

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)通过高频装置使氩气电离,而氩离子和电子在电磁场作用下又会与其他氩原子碰撞产生更多的离子和电子,形成涡流。强大的电流产生高温,瞬间形成等离子焰炬。样品由载气带入等离子体焰炬会发生蒸发、分解、激发和电离,辅

助气用来维持等离子体,在配合质谱进行检测,是花生过敏原检测的一种新方法,Careri等<sup>[28]</sup>采用此法与LC-MS/MS法检测Ara h 2和Ara h 3/4,检测限分别为2.2 μg/g和5 μg/g,回收率分别为(86 ± 18)%和(110 ± 4)%,都能很好的检验出花生过敏原,ICP-MS与LC-MS/MS相比,ICP-MS的灵敏度较好,而LC-MS/MS相对较差,但ICP-MS仍有一定的局限性,还有待改进。

## 2 结 语

由于花生能引发严重的过敏反应,花生过敏受到全世界的广泛关注,对花生过敏原蛋白的研究也日渐深入。避免食入含花生的食物目前仍是花生过敏患者的最佳选择,对食物中花生过敏原的检测显得尤为重要。传统的检测方法,包括ELISA法和印迹法等被广泛用于过敏原检测的同时,也在不断被改进,灵敏度得到提高,样品消耗减小。一些新技术,如生物传感器、质谱法等也被用于过敏原的检测,并逐渐成熟起来,具有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] BEN-SHOSHAN M, HARRINGTON D W, SOLLER L, et al. A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish and sesame allergy prevalence in Canada[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(6): 1327-1335.
- [2] SICHERER S H, MUÑOZ-FURLONG A, GODBOID J H, et al. Prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2010, 125: 1322-1326.
- [3] LI Xiumin. Beyond allergen avoidance: update on developing therapies for peanut allergy[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005, 5: 287-292.
- [4] 李宏. 花生变应原研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000.
- [5] 从艳君. 花生主要过敏原致敏机理及其脱敏方法的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [6] 李宏, 张宏誉. 花生过敏原致敏组分分析[J]. *中华微生物学和免疫学*, 2001, 21(增刊 1): 12-15.
- [7] SAMPSON H A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1999, 103: 717-728.
- [8] SAMPSON H A. Update on food allergy[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2004, 113: 805-819.
- [9] YEUNG J M, COLLINS P G. Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products[J]. *AOAC Int*, 1996, 79(6): 1411-1416.
- [10] ZELENY R, SCHIMMEL H. Towards comparability of ELISA results for peanut proteins in food: a feasibility study[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123: 1343-1351.
- [11] KIENING M, NIESSNAR R, DRS E, et al. Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3321-3327.
- [12] 吉坤美, 陈家杰, 汤慕瑾, 等. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中花生过敏原蛋白成分[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(6): 110-114.
- [13] WHITAKER T B, WILLIAMS K M, TRUCKSESS M W, et al. Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods[J]. *AOAC Int*, 2005, 88(1): 161-174.
- [14] PARK D L, COATES S, BREWER V A, et al. Performance Tested Method<sup>SM</sup> multiple laboratory validation study of ELISA-based assays for the detection of peanuts in food[J]. *AOAC Int*, 2005, 88(1): 156-160.
- [15] SCHMITT D A, CHENG H, MALEKI S J, et al. Competitive inhibition ELISA for quantification of Ara h 1 and Ara h 2, the major allergens of peanuts[J]. *AOAC Int*, 2004, 87(6): 1492-1497.
- [16] 邵景东, 孙秀兰, 张银志, 等. 酶联免疫吸附分析法检测花生过敏原的研究[J]. *分析科学学报*, 2011, 27(1): 89-92.
- [17] SPERONI F, ELVIRI L, CARERI M, et al. Magnetic particles functionalized with PAMAM-dendrimers and antibodies: a new system for an ELISA method able to detect Ara h 3/4 peanut allergen in foods[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 3035-3042.
- [18] KOCH P, SCHAPPI G F, POMS R E, et al. Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods[J]. *Food Addit Contam*, 2003, 20(9): 797-803.
- [19] SCHÄPPI G F, KONRAD V, IMHOF D, et al. Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures[J]. *Allergy*, 2001, 56(12): 1216-1220.
- [20] STEPHAN O, VIETHS S. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3754-3760.
- [21] HIRAO T, WATANABE S, TEMMEI Y, et al. Qualitative polymerase chain reaction methods for detecting major food allergens (peanut, soybean, and wheat) by using internal transcribed spacer region[J]. *AOAC international*, 2009, 5(2): 1464-1471.
- [22] 吉坤美, 陈家杰, 王海燕, 等. 实时定量 PCR 技术检测食品中花生过敏原 Ara h 1 基因成分[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(12): 188-193.
- [23] MUSTORP S L, DROMTORP S M, HOLCK A L, et al. Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food[J]. *J. Agric Food Chem*, 2011, 59: 5231-5239.
- [24] SINGH R, SHARMA P P, BALTUS R E, et al. Nanopore immunosensor for peanut protein Ara h 1[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 145: 98-103.
- [25] POLLETA J, DELPORPA F, JANSSEN K P F, et al. Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor[J]. *Talanta*, 2011, 83: 1436-1441.
- [26] CHASSAIGNE H, TRÉGOAT V, NØRGAARD J V, et al. Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, Western blotting and Q-TOF mass spectrometry[J]. *Journal of Proteomics*, 2009, 72: 511-526.
- [27] SHEFCHICK K J, CALLAHAN J H, MUSSER S M. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. *Food Chem*, 2006, 54(21): 7953-7959.
- [28] CARERI M, ELVIRI L, MAFFINI M, et al. Determination of peanut allergens in cereal-chocolate-based snacks: metal-tag inductively coupled plasma mass spectrometry immunoassay versus liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 807-811.