

水产品过敏原及其检测技术概述

刘红¹, 陈一瑜², 刘庆梅¹, 张凌晶¹, 曹敏杰¹, 刘光明^{1*}

(¹集美大学海洋食品与生物工程学院 厦门市海洋功能食品重点实验室

福建省海洋功能食品工程技术研究中心 福建厦门 361021

²华侨大学材料科学与工程学院 福建厦门 361009)

摘要 水产品因鲜美的味道和丰富的营养而深受消费者青睐。水产品属于联合国粮农组织和世界卫生组织认定的过敏食物,其在加工、运输、贮藏过程中有可能受到外来过敏原的污染,由此引起的食品安全问题日益严峻,严重制约了行业的发展。明确水产食品中的过敏原,并利用适当的检测技术进行检测、监控,有利于预防水产食物过敏疾病的发生。本文概述水产食品中的主要过敏原,以及基于基因水平的核酸检测技术、蛋白水平的免疫检测技术及质谱检测技术研究进展,为丰富水产品过敏原及其检测手段提供理论依据。

关键词 水产品; 过敏原; 核酸检测; 免疫检测; 质谱检测

文章编号 1009-7848(2024)02-0454-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.02.041

水产品因鲜美的味道和丰富的营养而深受消费者青睐。其中,鱼和甲壳类水产品属于联合国粮农组织和世界卫生组织认定的过敏食物^[1]。流行病学及食物过敏调查发现,水产品是我国过敏人群的主要致敏物^[2-4]。近年来我国水产养殖业和水产食品加工工业发展迅猛,2021 年我国水产品总产量达到 6 693 万 t,食用消费量 2 965 万 t,加工消费达到 2 783 万 t,消费总量 6 888 万 t^[5]。随着水产品消费量出现的大幅度增长,随之引发的水产品过敏问题也日益严峻。除了水产品本身外,其作为原料或配料被广泛添加到各类食品中,由此扩大了含有水产品致敏成分的食物种类,导致出现许多潜在的水产品过敏原组分^[6-7]。截至 2021 年 3 月,世界卫生组织和国际免疫学会联合会过敏原命名小组已命名 1 036 种过敏原^[8],同时指出应在产品标签中提示过敏原信息;我国也颁布预包装食品标签通则,增加了致敏物质的标识^[9]。事实上水产食品在加工、运输、贮藏过程中有可能受到外来过敏原的污染,标签中难以对交叉污染产生的过敏原进行标注。消费者仅根据明确的标签标识,难以

预防对过敏原的摄入^[10]。由此水产食物过敏引起的食品安全问题日益严峻,严重制约了行业的发展。明确水产食品中的过敏原,利用适当的检测技术对水产品及其加工、运输、贮藏过程中所含过敏原进行检测、监控,有利于评估水产品过敏的潜在风险,预防过敏疾病的发生。根据近年的研究报道,本文概述水产品过敏原及其检测技术。

1 水产品过敏原概述

水产品过敏原,来自水产品中的蛋白质,能够诱导人体产生特异性 IgE 抗体应答的抗原性物质^[11],一般分子质量为 10~100 ku,且相对分子质量越高,结构越复杂,其致敏性越强。其多为酸性糖蛋白,具有酸性等电点。由于过敏原的糖基化作用可能在一定程度上使其维持更为稳定的结构,因此普遍具有较好的耐酸碱和热稳定性,耐胃肠液中消化。在食品加工处理和人体消化过程中过敏原不易被破坏,相关过敏人群一旦食用,极易引发水产食物过敏性疾病,发病症状也趋于复杂化和严重化,在皮肤、胃肠系统、呼吸系统方面会出现不同程度的过敏症状,严重时甚至昏厥、休克^[12]。不同水产过敏原可能存在相同的抗原决定簇,从而发生免疫交叉反应,使过敏患者在食用不同的水产品时均发生过敏反应,且因个体差异,最低食用量各异,过敏症状通常伴随终身^[13-15]。

水产品富含蛋白质,其中只有极少数蛋白质

收稿日期: 2023-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072336,318717203,32001695);国家重点研发计划项目(2019YFD0901703);福建省科技计划项目(2021L3013)

第一作者: 刘红,女,硕士,实验师

通信作者: 刘光明 E-mail: gmliu@jmu.edu.cn

能够引发过敏反应。通常将能诱发 50% 过敏患者产生过敏反应的蛋白质称为主要过敏原, 而次要过敏原即其它引起过敏反应的蛋白质。目前已发现并鉴定的鱼类过敏原有小清蛋白(Parvalbumin, PV)、鱼类胶原蛋白(Collagen, CO)、 β -烯醇酶(β -Enolase)、醛缩酶 A (Aldolase A)、鱼卵中的 β' -组分(β' -Component, β' -c)及鱼精蛋白(Protamine)等; 甲壳类水产品过敏原有原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)、精氨酸激酶(Arginine ki-

nase, AK), 肌质钙结合蛋白(Sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)、磷酸丙糖异构酶(Triosephosphate isomerase, TIM)、肌球蛋白轻链(Myosin light chain, MLC)、细丝蛋白 c(Filamin C, FLN c)、肌钙蛋白 C (Troponin C, TnC) 和血蓝蛋白(Hemocyanin, HMC)等^[6], 其理化性质和生物学功能详见表 1。目前, 关于水产品过敏原的检测类研究主要集中在鱼类主要过敏原 PV、甲壳类及软体类动物泛过敏原 TM 中。

表 1 水产品过敏原的理化性质和生物学功能

Table 1 Physicochemical properties and biological functions of aquatic products allergens

过敏原名称	主要来源	蛋白种类	分子量/ku	等电点	稳定性	结构	生物学功能
小清蛋白 ^[17-18]	鱼类	钙结合蛋白	10~14	3.9~5.5	对温度、pH 值、变性剂有较好的耐受性	具有约 30 个氨基酸残基组成的螺旋-环-螺旋蛋白结构区, 即 EF 手图像	肌肉中的钙结合蛋白, 参与肌肉的收缩
胶原蛋白 ^[19-20]	鱼类	结构蛋白	100	6.5~6.8 7.5~7.8	耐消化性及免疫原性, 热稳定性比较低	由 2 条 $\alpha 1$ 亚基和 1 条 $\alpha 2$ 亚基组成三股螺旋结构	鱼类的皮、骨和鳞等部位结缔组织中主要成分
醛缩酶 A ^[21]	鱼类	糖酵解酶	40	-	对热处理敏感	-	富含于肌肉组织中, 参与糖酵解代谢过程
β -烯醇酶 ^[21-22]	鱼类	糖酵解酶	47~50	-	对热处理敏感	-	富含于肌肉组织中, 参与糖酵解代谢过程
β' -组分 ^[23-24]	鱼类鱼卵	糖蛋白	16	6.8	耐酸碱且具有良好的热稳定性, 耐胃肠液消化	-	存在卵黄蛋白中, 为幼体发育提供了关键的营养基础
鱼精蛋白 ^[25]	鱼类成熟精子	强碱性蛋白糖蛋白	4~8	11.0~13.0	在酸碱条件下高度稳定, 具有较好的热稳定性	富含精氨酸的多聚阳离子肽, 大多与 DNA 以非共价键结合成核精蛋白	鱼类成熟精子细胞核中作为和 DNA 结合的核精蛋白存在, 有维持压缩 DNA 的作用
原肌球蛋白 ^[26-31]	甲壳类及软体类动物	结构蛋白	32~40	5.1	对蛋白酶、酸和热均有一定的耐受性, 稳定性较高且耐消化	两个相同的 α 螺旋结构的亚基相互缠绕而成的超螺旋结构	细肌丝中与肌动蛋白的结合蛋白
精氨酸激酶 ^[32-35]	甲壳类动物	能量代谢	40~42	6.0~6.5	热加工和酸碱处理能够降低其致敏性	一个 N 端的球形结构域 (α -螺旋组成) 和一个 C 端结构域 (7 个 α -螺旋环绕 8 个反平行 β -折叠组成) 组成	存在于无脊椎动物的神经和肌肉组织中, 主要参与肌肉收缩, 调节细胞磷酸精氨酸与 ATP 间能量平衡的重要酶类

(续表 1)

过敏原名称	主要来源	蛋白种类	分子量/ku	等电点	稳定性	结构	生物学功能
肌质钙结合蛋白 ^[36-39]	甲壳类及软体类动物	钙结合蛋白	20~22	4.5~4.6	具有很好的耐热性,酸碱稳定性,耐胃液消化	5个螺旋-转角-螺旋结构区,即EF-手型结构区,并在其中两个手型结构区形成2个钙离子结合位点	存在于无脊椎动物肌肉和神经组织的钙离子结合蛋白,对肌肉中的胞质钙离子起到缓冲的作用
磷酸丙糖异构酶 ^[40-41]	甲壳类及软体类动物	糖酵解酶	28	5.8	虽然具有很好的酸碱稳定性和耐消化性,但热稳定较差	以稳定的二聚体形式存在,其肽链有规律地折叠成8个 β/α -barrel结构	存在于肌浆蛋白中,糖酵解过程中重要的催化酶
肌球蛋白轻链 ^[42-43]	甲壳类及软体类动物	结构蛋白	17~20	-	耐高温、耐酸碱并耐消化	是EF手性的钙离子结合蛋白,肌球蛋白轻链必须缠绕在重链上才能保持其天然的活性构象	调控链,是组成肌小节粗肌丝的成分,控制包括物质运输、肌肉收缩和细胞分裂等多种生理过程
细丝蛋白c ^[44]	甲壳类及软体类动物	细胞骨架蛋白	90	6.3	对热不稳定,耐碱,不耐酸	以同源二聚体形式存在,二级结构以 β 折叠及无规则卷曲为主,含有9个结构域,其三级结构呈免疫球蛋白样折叠	3种肌动蛋白交联蛋白
肌钙蛋白C ^[45-46]	甲壳类及软体类动物	结构蛋白	17~21	4.2	-	EF手性的钙离子结合蛋白,肌钙蛋白的钙结合亚基,存在潜在的4个 Ca^{2+} 结合区域	参与肌肉收缩,参与细胞内的 Ca^{2+} 信号传导
血蓝蛋白 ^[47-49]	甲壳类及软体类动物	功能蛋白	50~90	4.6~6.4	热稳定性,耐胰液消化	6个高度螺旋的异源亚基构成的六聚体	存在于血淋巴中,与机体内的输氧、能量贮存、渗透压的维持有关

2 水产品过敏原检测技术

水产品过敏原的检测技术是基于生物标志物(DNA或蛋白质)开发的^[50-51],主要有基于基因水平的核酸检测技术和基于蛋白水平的免疫检测技术及质谱检测技术。核酸检测技术是通过测定扩增的过敏原DNA片段来实现,主要包括聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光PCR技术、环介导等温扩增(LAMP)技术等。免疫检测技术是通过抗原和抗体的特异性结合产生的变化来实现,主要包括酶联免疫吸附(ELISA)技术、免疫印迹技术、免疫层

析技术、免疫传感器技术等。质谱检测技术是通过测定过敏原完整蛋白或酶解肽段的离子质荷化来实现,主要包括自上而下(Top-down)分析策略、自下而上(Bottom-up)分析策略。

2.1 基于基因水平的核酸检测技术

2.1.1 PCR技术 根据编码过敏原的DNA序列,设计特异性引物,使用DNA聚合酶进行变性-退火-延伸多次循环扩增,利用扩增后的核酸产物进行测定,从而实现水产品过敏原的定性分析。该技术的特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸

引物。Phan 等^[52]设计了特异性引物 Tropo-F 和 Tropo-R,建立了用于检测虾源主要过敏原 *TM* 基因的 PCR 检测方法,可以成功识别加工食品中的 *TM* 基因。常规 PCR 技术主要对单一过敏原进行定性检测,若在同一 PCR 反应体系中加上多对特异性引物,即可实现多重 PCR 反应,可对水产品中多种过敏原进行定性检测^[53]。Suh 等^[54]利用多重 PCR 技术并与毛细管电泳技术相结合,对牡蛎、贻贝、鲍鱼、蛤蜊 *TM* 基因进行测定,DNA 的检测限(LOD)为 16 pg/mL。然而,多重 PCR 易受引物间竞争扩增的影响,方法体系优化相对复杂。PCR 技术不会严格要求模板 DNA 的纯度及其完整性,所需 PCR 仪造价较便宜,然而后续的基因分析还需借助电泳、荧光检测或测序技术才能实现最终检测任务,检测流程繁琐,不能准确定量,而且极微量的污染即可造成假阳性。

2.1.2 实时荧光 PCR 技术 通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光检测系统实时监测累积的荧光强度,从而实现对水产品中过敏原的定性、定量分析。其中特异性的荧光探针 Taqman 探针法和非特异性的 SYBR Green I 荧光染料法是常用的荧光标记方法。Sun 等^[55]建立了一种基于 TaqMan 标记探针技术的实时荧光 PCR 检测鱼类主要过敏原 PV 的方法,DNA 的灵敏度达 5 pg/mL。Prado 等^[56]建立了同时检测鲭鱼和金枪鱼 DNA 的实时荧光 PCR 方法,灵敏度高达 5 pg/mL。该技术把核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测技术结合在一起,实现了从定性到定量的飞跃,自动化程度更高,避免了交叉污染,省去了后续染色及荧光检测等步骤,节省人力,准确度更高,然而需要实时荧光定量 PCR 仪,设备成本相对较高。

2.1.3 LAMP 技术 LAMP 技术是一种新型的核酸扩增技术,针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异性引物,等温条件下在链置换型 DNA 聚合酶作用下,可将目标基因在 15~60 min 内扩增 9~10 倍,根据产物浑浊度或绿色荧光等的指标,实现水产品中过敏原的定性、定量分析。Sheu 等^[57]利用 LAMP 技术 30 min 内可以检测出含有 0.01% 的虾类 DNA,与螃蟹、龙虾等其它甲壳类动物的 DNA 无交叉反应,可用于对食品中虾类过敏原的鉴定。张懿翔等^[58]利用 LAMP 技术检测出含牡蛎过敏

分 0.1%,DNA 质量浓度为 0.01 pg/mL 的样品。该技术缩短了检测时间,可在微量体系下完成,对仪器、设备的要求降低,只需水浴锅或恒温箱就能实现反应,产物易检测,简便、快捷,适合基层快速诊断,然而引物设计难度较大,较高的扩增效率也易引起环引物间的非特异性配对,导致假阳性的结果。

2.2 基于蛋白水平的免疫技术

2.2.1 ELISA 技术 ELISA 技术是将免疫反应的特异性和酶的高效催化作用相结合的检测技术。将已知的抗原或抗体吸附在聚苯乙烯微量反应板表面,利用酶标记抗体与之发生特异性结合,并以酶作用底物后的显色深浅来实现对水产品中过敏原的定性、定量分析。主要有竞争法、双抗体夹心法、间接法等。Cai 等^[59]制备了鲑鱼细小蛋白单克隆抗体,建立了一种竞争 ELISA 法测定鲑鱼体内 PV,LOD 为 0.04 μg/mL。Koppelman 等^[60]用大西洋蛤和海洋圆蛤混合蛋白免疫兔和绵羊,制得包被抗体和二抗,建立双抗体夹心 ELISA 检测食品中蛤蜊过敏原,LOD 为 2.5 mg/kg。双抗体夹心 ELISA 法灵敏度和特异性更高,被广泛用于水产品过敏原的筛选和常规检测领域,然而所检测的抗原必须拥有两个以上的抗体结合部位,制备抗体比较困难。ELISA 技术目前只能针对一种过敏原的分析,无法进行多残留检测,对具有抗原决定簇类似结构的过敏原存在一定的交叉反应。目前,快速和高通量的过敏原 ELISA 检测试剂盒已商业化^[61]。只需 1 台酶标仪即可大批量检测样品,方法简便,易于推广,然而受样本基质、试剂以及试验操作等因素影响较大。

2.2.2 免疫印迹(Western blot)技术 免疫印迹技术是将特异的固相免疫和高分辨率的凝胶电泳相结合的检测技术,通过单向或二维凝胶电泳技术将需要测定的蛋白转移到硝酸纤维素膜等固相载体上,利用抗原和抗体在固定相上发生免疫反应,再与酶标记的抗体反应,并通过底物显色完成水产品中过敏原的定性或半定量分析。汪宁等^[62]应用抗蛙 PV 单克隆抗体,利用 Western blot 分析 5 种鱼、2 种鱼糜制品和 3 种鱼罐头中 PV,结果显示该方法能有效确定鱼类制品中的 PV。该技术主要用于发现和鉴定新的过敏原,通常与斑点免

疫印迹法(Dot blot)相结合进行联合确认。Dot-blot 样品不需通过电泳转膜,直接点在固相载体上,根据斑点的强度实现水产食品中过敏原的半定量检测。Han 等^[60]对葡萄牙牡蛎 SCP 的过敏原性研究,采用 Western blot 及 Dot blot 联合分析 SCP 的免疫结合活性。Western blot 技术先利用电泳的方式可分离不同分子质量的蛋白质组分,再进行过敏原的确认,可有效避免蛋白质抑制剂存在的影响。对于复杂的样品,可采用双向电泳实现更程度的分离。免疫印迹技术对试剂需求量少,分析容量大,检测流程繁琐,分析时间长,易受水产品基质的影响。

2.2.3 免疫层析技术 免疫层析技术是将免疫技术和色谱层析相结合的检测技术,将抗体固定于硝酸纤维素膜的某一区带,把干燥的一端浸入待测物后,样品沿膜向前运动达到检测区,与标记的抗体捕获物特异结合而聚集显色,从而实现水产品中过敏原的定性分析。检测的关键在于着色标记物的灵敏度,常用免疫胶体金或免疫酶染色作为标记物,一些新型材料如超顺磁性纳米微球具有较高的灵敏度。Zhang 等^[63]以 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 纳米微球为标记物,制备的免疫层析试纸条可在 15 min 内检测鱼过敏原 PV,具有良好的检测特异性及稳定性,LOD 为 2 ng/mL。利用该技术制备的检测试纸,对待测物进行快速、准确显色,不需要其它仪器、设备和专业临检人员,用于现场快速检测,操作简单,携带方便,基层可以开展,然而检测结果靠肉眼判断,存在灵敏度较低,难于量化的局限,同时标记物制作成本较高。

2.2.4 免疫传感器技术 免疫传感器技术是将免疫反应的特异性与传感技术的高灵敏度相结合的检测技术,将抗体作为识别元件,利用抗原-抗体发生的特异性结合所产生的物理、化学信号的变化来实现水产品中过敏原的定性或定量分析^[64]。Angulo 等^[65]将丝网印刷电极结合羧甲基化磁珠作为抗体固相,将辣根过氧化物酶标记二抗构建在磁珠上,并与电化学传感系统耦合,研制出一种用于微量检测虾 TM 电化学免疫传感器,3 h 内的 LOD 为 47 pg/mL,磁珠的使用提高了捕获抗原的效率,利用磁珠修饰丝网印刷电极提高了电极的导电率。Zhou 等^[66]将抗 TM 单克隆抗体固定在纳

米金薄膜传感器芯片表面,建立表面等离子共振免疫传感器技术,实现贝类样品中 TM 的实时检测,LOD 为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。免疫传感器技术利用传感器记录、检测和分析抗原抗体反应的结果,简化了分析过程,减少了分析时间,降低了检测下限,提高了灵敏度,具有设备小型化,测量过程自动化的特点,然而生物传感器制作较为复杂,费用较高。

2.3 基于蛋白水平的质谱技术

2.3.1 Top-down 分析策略 Top-down 分析策略是将完整蛋白碎裂后进行全局分析。该分析策略样品制备相对简单,无需进行蛋白质酶解,也不依赖抗原抗体的制备,试验耗时减少,具有高分辨率、高灵敏度、蛋白序列覆盖率高等优点。该策略主要用于完整过敏原蛋白的定性确认,定量分析应用较少。Top-down 定性确认策略通常将完整的过敏原离子化后引入到质谱,通过碎片裂解技术最终得到完整蛋白和碎片离子的质荷比信息,最后采用生物信息检索推演多肽序列和修饰位点,可以鉴定出相关的蛋白质亚型和翻译后修饰位点,实现水产品中过敏原的定性鉴定。一般利用分离技术(如液相色谱或 2-D 凝胶电泳)从复杂样品中分离出完整的过敏蛋白,选择高分辨率和精确质量的质谱仪进行分析,如傅里叶变化离子回旋共振质谱仪(FTICR-MS)或静电场轨道离子阱质谱仪(Orbitrap-MS)。常见的离子化技术有:电喷雾电离(ESI)、基质辅助激光解吸电离(MALDI)等。常见的碎片离子裂解技术主要有:碰撞诱导解离(CID)、电子捕获解离、高能碰撞引入解离、紫外光解离等^[67]。Carrera 等^[68]通过 ESI-FTICR-MS 对鳕鱼过敏原小清蛋白 PV 直接测定,多重电荷态分布显示了具有不同的 PV 亚型,并对所有 PV 亚型进行准确分子量测定。Top-down 定性确认可获得蛋白质的完整形态特征,检测具有二硫键的四级结构,以及蛋白质翻译后修饰位点和修饰模式之间的关系数据。然而该策略存在得到的信息相对有限、分析通量相对较低等缺点,样品需高度纯化,且较难分析大分子量的蛋白质,灵敏度通常因为蛋白质带电量不同而受限。

2.3.2 Bottom-up 分析策略 Bottom-up 分析策略是通过分析酶解肽段来解析蛋白序列,该分析策略具有高自动化、高分辨率、高灵敏度、样品用量

少、分析速度快、高特异性、高通量、分离和鉴定同时进行等优点,也是目前蛋白质组学分析最常用的分析方法。该策略可用于过敏原酶解肽段的定性确认和特征肽段的定量检测。

Bottom-up 定性确认策略利用特异性酶将过敏原酶解成多肽片段的混合物,根据一级质谱或串联质谱检测到的各种多肽的准分子、离子或碎片离子信息,与已知蛋白数据库进行检索匹配,结合匹配度打分及错配过滤,利用得到肽段的确切序列拼接出各蛋白的完整序列,从而实现水产品中过敏原的定性鉴定。定性鉴定方法常采用肽质量指纹图谱(PMF)和肽片段指纹图谱(PFF)。PMF是肽段进行一级质谱分析后与数据库匹配的最佳结果,适用于单一蛋白质分析。混合蛋白质酶解后可能存在相同的肽段,会增加分析的复杂性,质量相似的肽段亦会增加匹配的难度。PMF分析常使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS),如 Liu 等^[69]对淡水鱼团头鲂中主要存在的过敏原进行分离后,通过双向电泳胶内酶切结合 MALD 鉴定出过敏原 AK 和烯醇酶。PFF 是肽段进行二级碎裂质谱分析后与数据库匹配的最佳结果,通过串联质谱碎裂分析可以获得丰富的肽段碎片离子信息,可用于表征多个蛋白酶解的混合物,对于质量相似的肽段确认更准确,极大地增加了数据库检索结果的可靠性。PFF 多使用具备 CID 功能的质谱,如潘晓东等^[70]采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱仪(UPLC-Q-Orbitrap-MS)鉴定了沼虾中的 4 种过敏原,分别为 TM、AK、SCP 和 HMC,肽段覆盖率分别为 53%、36%、12% 和 12%。由于样品经过酶解,Bottom-up 定性确认不仅增加了检测时间,还会破坏蛋白质不稳定结构,导致无法识别蛋白质变异,无法正确分析蛋白质翻译后修饰之间的关系,蛋白序列覆盖率相对较低。

Bottom-up 定量分析策略常使用稳定同位素标记法,根据定性检测结果结合相关蛋白质组学软件挑选 1 条或多条特征肽段,将同位素标记的特征肽段作为内标,酶解肽段混合物经超高效液相色谱(UPLC)分离,利用串联质谱的选择反应监测/多反应监测/平行反应监测(SRM/MRM/PRM)模式对目标特征肽指定离子对强度进行监测,从

而实现水产品中多种过敏原的同时定量分析^[71]。Stella 等^[72]筛选 TM 两个特征肽,分别为限定肽和量化肽,采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 在 PRM 模式下检测甲壳类水产品的 TM,LOD 为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Fan 等^[73]选择灵敏度高的 ANIQLVEK 作为定量标记肽,利用高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-QqQ-MS)在 MRM 模式下检测虾、蟹中 TM 的 LOD 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。孟佳等^[74]利用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 实现了南美白对虾、大闸蟹、青蟹、金枪鱼、大西洋鲑鱼的 7 种过敏原蛋白的快速筛查,并选取 30 个特征肽,利用 UPLC-QqQ-MS 建立 MRM 定量检测方法,LOD 为 2.0~3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Bottom-up 定量分析利用液相色谱的高效分离和质谱的高分辨率,通过对所选的特征肽段进行检测,有效避免其它肽段的干扰,提高重现性、灵敏度和特异性。使用稳定同位素标记的特征肽可解决基质效应,建立的方法更加准确可靠。

2.4 水产品过敏原检测技术的比较

过敏原检测手段多样,各种检测技术的分析要求、所需设备、优缺点各异^[75],详见表 2。基于基因水平的核酸检测技术不易受热处理和压力等作用的影响,更加灵敏可靠,且对于缺乏特异性单抗的过敏原,可利用已知过敏原的基因序列进行检测。由于核酸检测技术属于间接性检测,检测对象是 DNA 非致敏蛋白,因此不能真正反映水产品过敏原的致敏性。基于蛋白水平的免疫检测技术特异性高、操作简便、无需复杂的试验操作,然而制备抗体比较困难,且水产品在实际加工生产中,各种加工处理会破坏致敏蛋白的结构,从而破坏其抗原决定簇,导致分析准确度降低,并且因样本、试剂及操作等因素而造成检测结果的偏差,稳定性较差^[76]。基于蛋白水平的质谱检测技术具有高自动化、高分辨率、高灵敏度、高特异性、高通量、样品用量少、分析速度快、分离和鉴定同时进行等优点,是分析水产品过敏原的有力工具,既克服了核酸检测技术不能直接分析致敏蛋白的缺点,又改善了免疫检测技术存在的检测低通量和交叉干扰的弊端。质谱检测在鉴定过敏原蛋白中起重要作用,无需制备抗原抗体,尤其在复杂基质中多种过敏原的定量检测方面具有很大的优势,依赖的特征肽段几乎不受加工影响,稳定性高,可以满足

直接检测目标蛋白和变性蛋白的要求^[77-78]。然而，了该技术的广泛应用。质谱检测技术需要昂贵的设备和专业技能，限制

表2 水产品过敏原检测方法比较

Table 2 Comparison of allergen detection methods for aquatic products

技术分类	检测方法	定性定量	仪器、设备	优点	缺点
核酸检测技术	PCR技术 ^[52-54]	定性	PCR扩增仪 凝胶电泳仪	特异性强、高通量、低成本,纯度要求低	不能准确定量,检测流程繁琐,易产生交叉污染出现假阳性,多重时还易受引物间竞争扩增的影响
	实时荧光定量PCR ^[55-56]	定性、定量	实时荧光定量PCR仪	实时性、灵敏度高、特异性强、准确度高、操作简单、自动化程度高,不易被污染	需要特殊的热循环仪器和试剂,检测成本较高
	环介导等温扩增技术 ^[57-58]	定性、定量	水浴锅或恒温箱	特异性强、灵敏度高,操作简单,检测时间短,产物易检测,设备要求简单、结果易于辨别	引物设计要求比较高,假阳性问题比较严重
免疫检测技术	酶联免疫吸附技术 ^[59-60]	定性、半定量	酶标仪	特异性强、灵敏度高、操作简单、应用广泛,可大批量检测样品,对仪器要求不高,方法简便,易于推广等特点	对试剂的选择性高,制备抗体比较困难,无法进行多残留检测,易受样品基质、试验操作和交叉反应的影响
	免疫印迹技术 ^[62]	定性、半定量	凝胶电泳仪	特异性强、灵敏度高、分辨率高,试剂需求量少,分析容量大	检测流程繁琐,分析时间长,易受样品基质影响
	免疫层析技术 ^[63]	定性	-	操作简单,快速高效,特异性强,样品所需量少,不需要其它仪器、设备,携带方便,基层可开展	标记物制作成本高,检测灵敏度低、难于量化
	免疫传感器技术 ^[65-66]	定性、定量	免疫传感器	特异性强、灵敏度高,高通量、样品要求低、操作简便、分析速度较快,设备小型化、实时动态监测	生物传感器制作较为复杂,费用较高
质谱检测技术	自上而下分析策略 ^[68]	定性	高分辨率质谱仪	样品制备相对简单,无需蛋白质消化,直接检测过敏蛋白的分子质量,大量信息得以保留,耗时减少,具有高自动化、高分辨率、高灵敏度等优点	信息相对有限、分析通量相对较低,样品需高度纯化,且较难分析大分子质量的蛋白,灵敏度通常因蛋白质带电量不同而受限,专业质谱设备的成本很高
	自下而上分析策略 ^[69-74]	定性、定量	高效液相色谱高分辨率质谱仪	样品用量少,分析速度快,具有高自动化、高分辨率、高灵敏度、高通量、分离和鉴定同时进行等优点,可同时分析多种过敏原	样品的制备要求高,存在丢失信息,操作程序较为繁琐,需筛选特征肽段,进行同位素标记,专业质谱设备成本很高,需要专业的人员

3 结语

水产品过敏原种类繁多,过敏原检测手段多样,单一检测方法很难做到普遍适用性。利用适当的技术来对水产过敏原进行准确检测、监控,结合

试验条件和成本,选用经济、可靠又快速、明确的识别与定量的方法,准确检测水产食品中隐藏的过敏原,降低生产过程中的交叉污染,有利于评估水产品过敏的潜在风险,预防水产食物过敏疾病

的发生。

现有过敏原的检测集中在少数主要过敏原中,针对新型或次要过敏原的检测有待进一步探究。未来水产品中过敏原检测将向更加准确、快速、经济、普遍适用、高自动化、高通量、高灵敏性的方向发展。同时,多种方法联用将在水产品中的过敏原甚至是潜在过敏原的高效检测中发挥更重要的作用,以更好的保障过敏人群的生命健康。

参 考 文 献

- [1] RUETHERS T, TAKI A C, JOHNSTON E B, et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens [J]. *Molecular Immunology*, 2018, 100: 28–57.
- [2] KIM J S, OUYANG F, PONGRACIC J A, et al. Dissociation between the prevalence of atopy and allergic disease in rural china among children and adults[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 122(5): 929–935.
- [3] SICHERER S H, WARREN C M, DANT C, et al. CME Exam: Food allergy from infancy through adulthood [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice*, 2020, 8(6): 1854–1864.
- [4] KAMDAR T A, PETERSON S, LAU C H, et al. Prevalence and characteristics of adult-onset food allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 3(1): 114–115.
- [5] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业年鉴统计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 1–181.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs Bureau of Fisheries, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery yearbook statistics [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 1–181.
- [6] BAHNA S L, BURKHARDT J G. The dilemma of allergy to food additives[J]. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2018, 39(1): 3–8.
- [7] PASCAL M, KAMATH S D, FABER M. Diagnosis and management of shellfish allergy: Current approach and future needs[J]. *Current Treatment Options in Allergy*, 2018, 5(4): 470–486.
- [8] SUDHARSON S, KALIC T, HAFNER C, et al. Newly defined allergens in the WHO/IUIS allergen nomenclature database during 01/2019–03/2021 [J]. *Allergy*, 2021, 76(11): 3359–3373.
- [9] 食品安全国家标准审评委员会. 食品安全国家标准预包装食品标签通则: GB 7718–2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1–2.
National Food Safety Standards Review Committee. National food safety standards, general rules for pre-packaged food labeling: GB7718–2011[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2011: 1–2.
- [10] MFUENI E, GAMA A P, KABAMBE P, et al. Food allergen labeling in developing countries: Insights based on current allergen labeling practices in malawi[J]. *Food Control*, 2018, 84: 263–267.
- [11] MONACI L, PILOLLI R, DE ANGELIS E, et al. Food allergens: Classification, molecular properties, characterization, and detection in food sources [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2020, 93: 113–146.
- [12] MOONESINGHE H, MACKENZIE H, VENTER C, et al. Prevalence of fish and shellfish allergy: A systematic review [J]. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 2016, 117(3): 264–272.
- [13] BARRE A, SIMPLICIEN M, CASSAN G, et al. Food allergen families common to different arthropods (mites, insects, crustaceans), mollusks and nematods: Cross-reactivity and potential cross-allergenicity[J]. *Revue Française d'Allergologie*, 2018, 58(8): 581–593.
- [14] XU L L, CHEN J, SUN L R, et al. Analysis of the allergenicity and B cell epitopes in tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and correlation to cross-reactivity based on epitopes with fish (*Larimichthys crocea*) and clam (*Ruditapes philippinarum*) [J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126763.
- [15] KOBAYASHI Y, HUGE J, IMAMURA S, et al. Study of the cross-reactivity of fish allergens based on a questionnaire and blood testing[J]. *Allergology International*, 2016, 65(3): 272–279.
- [16] 李晓晨, 卢瑛, 李晓晖. 动物性水产品过敏原及其消减技术研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 325–333.
LI X C, LU Y, LI X H. Research progress on allergens and their reduction techniques in animal aquatic products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(10): 325–

- 333.
- [17] YANG R Q, CHEN Y L, CHEN F, et al. Purification, characterization, and crystal structure of parvalbumins, the major allergens in *Mustelus griseus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(30): 8150–8159.
- [18] 孙礼瑞, 林洪, 李振兴, 等. 牙鲆中不同亚型小清蛋白的提纯与鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 308–314.
- SUN L R, LIN H, LI Z X, et al. Purification and characterization of parvalbumin isotypes from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Food Science, 2019, 40(12): 308–314.
- [19] 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.
- [20] 刘光明, 钟永嘉, 曹敏杰, 等. 鲤鱼过敏原(胶原蛋白)的体外模拟消化[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2010, 15(4): 267–271.
- LIU G M, ZHONG Y J, CAO M J, et al. The *in vitro* simulated digestion of carp allergens Collagen[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2010, 15(4): 267–271.
- [21] KUEHN A, HILGER C, LEHNERS-WEBER C, et al. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: Component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens [J]. Clinical Experimental Allergy, 2013, 43(7): 811–822.
- [22] 谈思怡, 黄建芳, 孙一帆, 等. 凡纳滨对虾新过敏原烯醇化酶的鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(6): 808–811.
- TAN S Y, HUANG J F, SUN Y F, et al. Identification of a new shrimp allergen enolase from *Litopenaeus vannamei* [J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32(6): 808–811.
- [23] LIU Y Y, CAO M J, ZHANG M L, et al. Purification, characterization and immunoreactivity of β' -component, a major allergen from the roe of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Food & Chemical Toxicology, 2014, 72: 111–121.
- [24] LI Z, SHIMIZU Y, SAEKI H. Grey mullet roe contains yolk protein having IgE cross-reactivity to chum salmon roe major allergen (Onc k 5)[J]. Fisheries Science, 2017, 83(2): 301–308.
- [25] LIU Y Y, CHEN X F, HU J W, et al. Purification and characterization of protamine, the allergen from the milt of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), and its components[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(9): 1999–2011.
- [26] CHENG J H, WANG H F, SUN D W. An overview of tropomyosin as an important seafood allergen: Structure, cross-reactivity, epitopes, allergenicity, and processing modifications [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 21(1): 127–147.
- [27] ZHANG J T, LIU W Y, FANG L, et al. Effect of acid and *in vitro* digestion on conformation and IgE-binding capacity of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin)[J]. Allergologia et Immunopathologia, 2019, 48(1): 26–33.
- [28] KAMATH S D, SCHEIBLHOFER S, JOHNSON C M, et al. Effect of structural stability on endolysosomal degradation and T-cell reactivity of major shrimp allergen tropomyosin[J]. Allergy, 2020, 75(11): 2909–2919.
- [29] LIU M, HAN T J, HUAN F, et al. Effects of thermal processing on the allergenicity, structure, and critical epitope amino acids of crab tropomyosin [J]. Food Function, 2021, 12(5): 2032–2043.
- [30] 刘甫, 李军普, 李绍深, 等. 原肌球蛋白的重组表达、鉴定及与免疫球蛋白 E 结合能力分析[J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(3): 256–260.
- LIU F, LI J P, LI S S, et al. Recombinant expression, identification and immunoglobulin E binding analysis of tropomyosin pen a 1[J]. Journal of Tianjin Medical University, 2020, 26(3): 256–260.
- [31] 程华峰, 王福田, 朱亚军, 等. 不同热加工处理方式对中华绒螯蟹原肌球蛋白的消化稳定性和致敏性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8303–8311.
- CHEN H F, WANG F T, ZHU Y J, et al. Effects of different thermal processing methods on digestibility and allergenicity of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* tropomyosin[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2020, 11(22): 8303–8311.
- [32] BRASSEA-ESTARDANTE H A, MARTÍNEZ-CRUZ O, CÁRDENAS-LÓPEZ J L, et al. Identification of arginine kinase as an allergen of brown crab, *Callinectes bellicosus*, and *in silico* analysis of IgE-binding epitopes [J]. Molecular Immunology, 2022,

- 143; 147-156.
- [33] YANG Y, LIU G Y, YANG H, et al. Crystal structure determination of *Scylla paramamosain* arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 597-605.
- [34] HUAN F, HAN T J, LIU M, et al. Identification and characterization of *Crassostrea angulata* arginine kinase, a novel allergen that causes cross-reactivity among shellfish [J]. Food & Function, 2021, 12 (20): 9866-9879.
- [35] 孙一帆, 黄建芳, 向军俭, 等. 凡纳滨对虾过敏原精氨酸激酶的质谱鉴定及其免疫交叉反应研究[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 170-173.
- SUN Y F, HUANG J F, XIANG J J, et al. Proteomics and immunological analysis of arginine kinase, an important shrimp allergen from *Litopenaeus vannamei*[J]. Food Science, 2015, 36(1): 170-173.
- [36] HAN T J, LIU M, HUAN F, et al. Identification and cross-reactivity analysis of sarcoplasmic-calcium-binding protein: A novel allergen in *Crassostrea angulata*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(18): 5221-5231.
- [37] HU M J, LIU G Y, YANG Y, et al. Cloning, expression, and the effects of processing on sarcoplasmic-calcium-binding protein, an important allergen in mud crab[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65 (30): 6247-6257.
- [38] CHENG Q L, FENG X W, ZHAO X H, et al. Physicochemical characterization and identification of major linear epitopes of sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) allergen from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 102(9): 3551-3562.
- [39] 毛海燕, 蔡娜, 陈亨莉, 等. 拟穴青蟹新型过敏原肌质钙结合蛋白的纯化、鉴定及分子克隆[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 122-127.
- MAO H Y, CAI N, CHEN H L, et al. Purification, identification and cloning of a novel crab allergen, sarcoplasmic calcium binding protein, from *Scylla paramamosain*[J]. Food Science, 2014, 35 (3): 122-127.
- [40] XIA F, LI M S, LIU Q M, et al. Crystal structure analysis and conformational epitope mutation of triosephosphate isomerase, a mud crab allergen[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(46): 12918-12926.
- [41] YANG Y, CHEN Z W, HURLBURT B K, et al. Identification of triosephosphate isomerase as a novel allergen in *Octopus fangsiao*[J]. Molecular Immunology, 2017, 85(2): 35-46.
- [42] ZHANG Y X, CHEN H L, MALEKI S J, et al. Purification, characterization, and analysis of the allergenic properties of myosin light chain in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(27): 6271-6282.
- [43] LI M S, XIA F, LIU M, et al. Cloning, expression, and epitope identification of myosin light chain 1: A novel allergen in mud crab[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67 (37): 10458-10469.
- [44] HE X R, YANG Y, KANG S, et al. Crystal structure analysis and IgE epitope mapping of allergic predominant region in *Scylla paramamosain* filamin c, scy p 9[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(4): 1282-1292.
- [45] WAI C Y, LEUNG N Y, LEUNG A, et al. Troponin C is the major shrimp allergen among Chinese patients with shellfish allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2019, 143(2): AB270.
- [46] KALYANASUNDARAM A, SANTIAGO T C. Identification and characterization of new allergen troponin C (Pen m 6.0101) from Indian black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. European Food Research & Technology, 2015, 240(3): 509-515.
- [47] ZHANG Y Y, ZHU L N, LI S S, et al. Identification of the major allergenic epitopes of *Eriocheir sinensis* roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses [J]. Molecular Immunology, 2016, 74: 125-132.
- [48] 陈亨莉, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 克氏原螯虾新型过敏原血蓝蛋白的鉴定及性质研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 240-247.
- CHEN H L, CAO M J, CAI Q F, et al. Identification and characterization of hemocyanin, a novel allergen of *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Journal of Food Science, 2014, 14(2): 240-247.
- [49] 张盈莹, 朱黎娜, 李韶深, 等. 血蓝蛋白是中华绒螯蟹重要的高分子量过敏原[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(10): 1375-1379, 1388.
- ZHANG Y Y, ZHU L N, LI S S, et al. Hemocyanin is an important high-molecular-weight aller-

- gen of *Eriocheir sinensis*[J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(10): 1375–1379, 1388.
- [50] PRADO M, ORTEA I, VIAL S, et al. Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2016, 56(15): 2511–2542.
- [51] SENYUVA H Z, JONES I B, SYKES M, et al. A critical review of the specifications and performance of antibody and DNA-based methods for detection and quantification of allergens in foods[J]. Food Additives & Contaminants, 2019, 36(4): 507–547.
- [52] PHAN N H D, NGUYEN T T, TRA T B H, et al. Exploring the PCR assay for detecting tropomyosin: Major allergen in shrimp-derived ingredient in food [J]. Pharmacophore, 2020, 11(2): 53–57.
- [53] 王玮, 韩建勋, 袁飞, 等. 多重 PCR 同时检测常见 8 种食物过敏原[J]. 中国食品学报, 2011, 11(6): 152–157.
- WANG W, HAN J X, YUAN F, et al. Detection of eight food allergens with multiplex PCR[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(6): 152–157.
- [54] SUH S M, KIM M J, KIM H I, 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 Chemistry, 2020, 317: 126451.
- [55] SUN M, LIANG C Z, GAO H W, et al. Detection of parvalbumin, a common fish allergen gene in food, by real-time polymerase chain reaction [J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(1): 234–240.
- [56] PRADO M, BOIX A, HOLST C V. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel[J]. Food Control, 2013, 34(1): 19–23.
- [57] SHEU S C, YU M T, LIEN Y Y, et al. Development of a specific isothermal nucleic acid amplification for the rapid and sensitive detection of shrimp allergens in processed food[J]. Food Chemistry, 2020, 332(6): 127389.
- [58] 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 Y X, YU Y Y, SONG C H, et al. Rapid detection of food allergen oysters by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2019, 10(7): 1804–1810.
- [59] CAI Q F, WANG X C, LIU G M, et al. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA) for quantification of silver carp parvalbumin [J]. Food Control, 2013, 29(1): 241–247.
- [60] KOPPELMAN S J, LARDIZABAL A L, NIEMANN L, et al. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of clam residues in food products[J]. BioMed Research International, 2021, 2021(1): 1–9.
- [61] RUETHERS T, TAKI A C, KHANGURHA J, et al. Commercial fish ELISA kits have a limited capacity to detect different fish species and their products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(12): 4353–4363.
- [62] 汪宁, 王锡昌, 蔡秋凤, 等. 鱼类肌肉中过敏蛋白的检测与分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(S2): 141–145.
- WANG N, WANG X C, CAI Q F, et al. Detection and analysis of parvalbumin in fish muscle[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2008, 47(S2): 141–145.
- [63] ZHANG M K, LI M Y, ZHAO Y, et al. Novel monoclonal antibody-sandwich immune-chromatographic assay based on Fe₃O₄/Au nanoparticles for rapid detection of fish allergen parvalbumin[J]. Food Research International, 2021, 142: 110102.1–110102.8.
- [64] 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, 2021, 42(18): 397–406.
- YE M, LI X, WU Y, et al. Research progress of biosensors in detecting food allergens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 397–406.
- [65] ANGULO A, ELETXIGERRA U, LASHERAS X, et al. Electrochemical tropomyosin allergen immunosensor for complex food matrix analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1079: 94–102.
- [66] ZHOU J R, QI, Q Q, WANG Y, et al. Quantification of shellfish major allergen tropomyosin by SPR biosensor with gold patterned Biochips[J]. Food Control, 2019, 142: 11449.
- [67] 周敏, 石莹莹, 张凯林, 等. 一种用于“自顶向下”

- 质谱数据分析的软件及其在蛋白质光解离质谱中的应用[J]. 分析化学, 2019, 47(8): 1153-1161.
- ZHOU M, SHI Y Y, ZHANG K L, et al. A software for top-down mass spectrometric data analysis and its application in photodissociation mass spectrometry of protein ions [J]. Analytical Chemistry, 2019, 47(8): 1153-1161.
- [68] CARRERA M, CAÑAS B, VÁZQUEZ J, et al. Extensive de novo sequencing of new parvalbumin isoforms using a novel combination of bottom-up proteomics, accurate molecular mass measurement by FTICR-MS, and selected MS/MS ion monitoring[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(9): 4393-4406.
- [69] LIU R, KRISHNAN H B, XUE W T, et al. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(1): 458-463.
- [70] 潘晓东, 黄百芬, 蔡增轩, 等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱分析沼虾过敏原蛋白[J]. 预防医学, 2020, 32(10): 1010-1012, 1017.
- PAN X D, HUANG B F, CAI Z X, et al. Analysis of allergen protein in *Macrobrachium* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. Preventive Medicine, 2020, 32(10): 1010-1012, 1017.
- [71] 蒋易蓉, 任一平, 陆柏益. 靶向蛋白质组学质谱技术在食物过敏原定量检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 302-310.
- JIANG Y R, REN Y P, LU B Y. Application of targeted proteomics in accurate quantitation of food allergens [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 302-310.
- [72] 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 Chemistry, 2020, 331: 127276.
- [73] FAN S F, MA J M, LI C S. Determination of tropomyosin in shrimp and crab by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on immunoaffinity purification [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 848294-848294.
- [74] 孟佳, 古淑青, 方真, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定肉制品和调味料中7种水产品过敏原[J]. 色谱, 2019, 37(7): 712-722.
- MENG J, GU S Q, FANG Z, et al. Determination of seven kinds of aquatic product allergens in meat products and seasoning by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Colour Spectrum, 2019, 37(7): 712-722.
- [75] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 319-328.
- NING Y W, YANG Z, MA M G, et al. Progress in common food allergens and technologies for their detection[J]. Food Science, 2021, 42(15): 319-328.
- [76] 胡晓飞, 王耀, 邓瑞广, 等. 免疫学技术在食品过敏原检测中的应用[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 1-5.
- HU X F, WANG Y, DENG R G, et al. Application of immunological techniques in detection of food allergens: A review[J]. Food Science, 2014, 35(8): 1-5.
- [77] 古淑青, 赵超敏, 程甲, 等. 基于质谱技术的食品过敏原检测方法研究进展[J]. 色谱, 2016, 34(7): 639-646.
- GU S Q, ZHAO C M, CHENG J, et al. Review on application of mass spectrometry-based techniques in food allergen analysis[J]. Colour Spectrum, 2016, 34(7): 639-646.
- [78] 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 L J, TONG P, XIAO N, et al. Progress in detection of food allergens based on liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Food Science, 2014, 35(21): 274-278.

Overview of Aquatic Products Allergens and Their Detection Techniques

Liu Hong¹, Chen Yiyu², Liu Qingmei¹, Zhang Lingjing¹, Cao Minjie¹, Liu Guangming^{1*}

(¹College of Ocean Food and Bioscience Engineering, Jimei University, Key Laboratory of Marine Functional Food in Xiamen, Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, Fujian

²College of Materials Science and Engineering Huaqiao University, Xiamen 361009, Fujian)

Abstract Aquatic products are favored by consumers because of their delicious taste and rich nutrition, which belong to the allergic food recognized by the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization, and they may be contaminated by foreign allergens during processing, transportation and storage, resulting in increasingly serious food safety problems caused by aquatic food allergy, which seriously restricts the development of the aquatic industry. Therefore, identifying the allergens in aquatic food and using appropriate detection techniques to detect and monitor them are conducive to preventing the occurrence of aquatic food allergies and diseases. In this paper, the main allergens in aquatic food, as well as the research progress of nucleic acid detection technology based on gene level, immunoassay technology based on protein level and mass spectrometry detection technology were summarized, which provided a theoretical basis for enriching the comprehensive understanding of aquatic allergens and their detection methods.

Keywords aquatic products; allergens; nucleic acid detection; immunological detection; mass spectrometry detection