

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022704

引用格式:苏琰,李融.基于核酸的分子生物学技术在食品过敏原检测中的应用进展[J].食品与发酵工业,2020,46(12):306-311. SU Yan, LI Rong. Application of molecular biological technology based on nucleic acid in food allergen analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(12): 306-311.

基于核酸的分子生物学技术在食品过敏原检测中的应用进展

苏琰^{1*}, 李融²

1(合肥职业技术学院, 安徽 合肥, 238000) 2(巢湖学院, 安徽 合肥, 238000)

摘 要 食品过敏原是食物中包含的可能引发超敏反应性疾病的一类变应原。食品过敏原检测目前主要包括蛋白质检测与核酸检测两方面, 基于核酸的分子生物学技术包括核酸扩增技术和杂交技术, 能更加快捷、简便、高效地检测食品中的过敏原基因。该文简述了基于核酸的分子生物学检验技术的原理及方法类型, 对近年来国内外建立各类食品过敏原的核酸检测方法进行了综述, 并将蛋白质检测技术与核酸检测技术的优缺点进行了比较, 指出目前食品过敏原检测技术仍然存在的不足之处, 以期食品过敏原检测技术的进一步开发与研究提供参考。

关键词 食物过敏; 食品过敏原; 核酸; 核酸扩增技术; 核酸杂交技术

Application of molecular biological technology based on nucleic acid in food allergen analysis

SU Yan^{1*}, LI Rong²

1(Hefei Technology College, Hefei 238000, China) 2(Chaohu University, Hefei 238000, China)

ABSTRACT Food allergens are contained in food and may cause hypersensitivity. The detection technology of food allergens includes protein detection and nucleic acid detection. Molecular biological detection technology based on nucleic acid, which includes amplification techniques and hybridization techniques, detects allergen genes in food more quickly, easily and effectively. To provide references for the further development and research of food allergen detection technology, this paper briefly introduces the principles and methods of molecular biology technology based on nucleic acid, summarizes the nucleic acid detection methods for food allergens established at home and abroad in recent years, and compares the advantages and disadvantages of protein detection technology and nucleic acid detection technology so as to point out the shortcomings of the current food allergen detection technology.

Key words food allergy; food allergen; nucleic acid; nucleic acid amplification techniques; nucleic acid hybridization

变态反应(allergy)是PIRQUET于1906年基于其传染病学和免疫学领域的临床研究提出的^[1],指机体免疫防御功能亢进引起的一种异常免疫应答。过敏原(allergen)即引起超敏反应的抗原。超敏反应的临床表现多种多样,其中食物过敏(food allergy)是由食物某些成分的诱导而产生以特异性IgE为主的

病理性免疫应答,其症状不仅表现在消化道方面,也包括皮肤、神经系统及呼吸系统等。

2015年我国婴幼儿过敏流行病学调查结果表明,大约40.9%婴幼儿(2岁以下)家长报告婴幼儿有过敏性疾病发生^[2]。食品中过敏原的体外检测主要包括蛋白质检测与核酸检测两方面^[3]。其中基于

第一作者:硕士,副教授(本文通讯作者, E-mail: sy@htc.edu.cn)

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学重点研究项目(KJ2019A1125);安徽省教育厅青年拔尖人才项目(gxyq2017231);合肥职业技术学院校级科研机构(KYJG201806Z)

收稿日期:2019-11-04, 改回日期:2020-03-09

蛋白质检测方法主要包括酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和色谱分析 (chromatography) 等, 传统的基于蛋白质的过敏原检测方法因食物在生产加工过程中蛋白质易变性和降解而导致假阴性结果; 基于核酸水平检测包括针对过敏原基因的扩增技术和杂交技术等, 近年来核酸检测技术尤其是 PCR 技术不断建立并推广应用。本文主要从食品过敏原的核酸扩增检测技术和核酸杂交检测技术两方面, 综述了过敏原的核酸检验技术的研究进展。

1 常见过敏原

国际食品法典委员会是联合国粮食及农业组织和世界卫生组织于 1963 年共同设立的国际组织并制定了具有重要指导意义的食品国际标准, 其公布的《预包装食品标签通用标准》中对食品中可能存在的致敏成分应予以说明。国家食品发典委员会中规定的八类过敏原有: 谷类 (含麸质蛋白); 甲壳纲类动物及甲壳类制品, 如蟹、虾等; 蛋类及蛋类制品, 如鸡蛋等; 鱼类及其鱼类制品, 如鲈鱼、鳕鱼等; 花生、大豆及其制品; 乳及乳制品 (包括乳糖); 坚果及其制品, 如杏仁、腰果、核桃等; 浓度大于等于 10 mg/kg 的亚硫酸盐^[4]。

我国相关食品标签法规对八大类过敏原及其他过敏原种类做出了强制或推荐标识的相关规定^[5]。日本自 2015 年发布了《食品标识基准》对相关食品标签作出规定^[6], 韩国也对须标注的一些食品过敏原作出强制标注的规定。欧盟除强制标注八大类过敏原以外, 还增加了芹菜及其制品等, 将强制性标注过敏原种类增加到 14 类^[7-8]。

2 基于核酸的分子检验技术在食品过敏原检测中的应用

2.1 核酸扩增技术检测过敏原

1985 年 MULLIS^[9] 发明了聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), 最初的 PCR 技术采用的是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段, 缺点是不耐热, SAIKI 等^[10] 于 1988 提取了水生嗜热杆菌的耐热的 DNA 聚合酶, 提高了扩增特异性和灵敏度, 极大推动分子生物学的发展。由普通 PCR 的定性或半定量检测逐步发展到实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 的定量检测^[11], 检测准确度不断提高, 可扩增目的基因片段逐渐增大, 引物设计也多样化^[12]。近年来衍

生出 RT-PCR、巢式-PCR、DPO-PCR、实时荧光定量 PCR、多重 PCR、数字 PCR、PCR 芯片和菌落 PCR 等, 广泛应用于食品安全检测、基因分型、临床检验和环境监测等各领域。实时荧光定量 PCR 实时测定探针标记的靶基因的荧光信号, 通过信号强度、Ct 值和靶基因的起始浓度之间的关系计算其扩增拷贝数或表达水平。与第一代 PCR 相比, 该技术实现了定量检测, 然而其检测灵敏度也受到模板浓度等的影响。数字 PCR 是近几年来迅速发展的新型 PCR 检测技术, 被称为第三代 PCR 技术, 在克服了前两代 PCR 缺点的基础上, 数字 PCR 具有对样本需求量大、灵敏度高和绝对定量等优点^[13]。

2.1.1 普通 PCR 检测过敏原

与蛋白质检测方法相比, 核酸检测的优势在于: 热变性条件下 DNA 仍可有效提取且稳定性较好。普通 PCR 检测过敏原基因的方法建立较早, 如 YANO 等^[14] 在 2007 年就针对核桃 *matK* 基因设计了 WAL-F/WAL-R 引物对, 建立了普通 PCR 方法对食品中的微量核桃进行定性检测。然而最初的传统 PCR 检测技术仅能定性或半定量检测食品中某一种过敏原基因, 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或者准确度更高的 PCR 方法被不断设计出。

2.1.2 多重 PCR 检测过敏原

多重 PCR (multiplex polymerase chain reaction, MPCR) 是 1988 年由 CHAMBERLAIN 等提出^[15], 与普通 PCR 相比, 其原理及结果分析与普通 PCR 一致, 不同点在于设计 2 对或多对引物在同一反应体系扩增出 2 个或多个相应基因片段。多重 PCR 既拥有传统 PCR 较高特异性和灵敏度等特点, 也体现出同时扩增多种目的基因的高效性。由于多对引物在同一体系内扩增, 为了准确扩增出目的条带而不受其他因素干扰, 对扩增条件要求较高, 对引物设计、循环条件优化等方面要求较严格。目前该技术已广泛应用于食品安全检测, 转基因检测及医学检验等领域^[16-17]。加工食品中可能会同时含有多种过敏原, 单一成分过敏原检测费时费力, 可同时检测多种过敏原成分的多重 PCR 检测技术的高效性则显得尤为重要, 食品过敏原的多重 PCR 检测应用见表 1。

2.1.3 荧光定量 PCR 检测过敏原

1996 年美国 Applied Biosystems 公司推出实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR), 可分为两类: 一类是 DNA 结合染料如 SYBR Green I 等以提高

表1 基于多重PCR的食品过敏原检测方法

Table 1 Multiplex PCR based methods for food allergens

食品	目的基因	灵敏度 (LOD)	参考文献
西红柿	<i>Cyp</i>	0.08 ng	[18]
苹果	<i>Mdl 1</i>		
桃	<i>Pru p 2.01A</i>		
猕猴桃	<i>Adpmei-1</i>		
芥末	<i>Sin a 1</i>	100 pg	[19]
羽扇豆	<i>ITS (18S-26S)</i>		
胡桃	<i>Jug r 2</i>		
榛果	<i>Oleasin</i>		
芹菜	<i>Mtd</i>	100 pg	[20]
杏仁	<i>Pru dul</i>		
燕麦	<i>Avenin</i>		
芝麻	<i>2S albumin mRNA</i>		
大豆	<i>Lectin</i>	10 pg/ μ L	[21]
花生	<i>Ara h 3</i>		
腰果	<i>Ana o 3</i>		
小麦	<i>Gladin</i>		
牛	<i>mitochondrion DNA</i>	10 pg/ μ L	[22]
鸡	<i>mitochondrion DNA</i>		
鱼	<i>16S rRNA</i>		
虾	<i>16S rRNA</i>		
榛子	<i>Cor a 1</i>	0.005%	[23]
开心果	<i>2S albumin</i>		
燕麦	<i>Avenin</i>		
芝麻	<i>2S albumin</i>		
花生	<i>Ara h 2</i>	0.005%	[24]
腰果	<i>Ana o 3</i>		
大麦	<i>B1 hordein</i>		
小麦	<i>Gladin</i>		
大豆	<i>Gly m Bd 28K</i>	11 S-1	[25]
美洲山核桃	<i>11 S-1</i>		

荧光强度进行检测;另一类特异性检测方法是 Taqman 法,即在 PCR 体系中引入 Taqman 探针,DNA 聚合酶延伸至于探针所在位置将其水解产生荧光信号进行检测。该技术的出现使分子检验技术领域发生重大的变化,目前已广泛地应用于临床医学检验、动植物病原体感染以及食品安全如过敏原检测等定量检验检测等领域^[22-23]。实时荧光定量 PCR 较上述几种 PCR 技术灵敏度高,可定量检测分析。也可将实时荧光定量 PCR 与多重 PCR 相结合,建立更为快捷准确的检测体系。近年来建立多种食源性过敏原的 qPCR 检测方法,详见表 2。

2.1.4 数字 PCR 检测过敏原

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是将待检核酸样本分成多份,随机分布于大量的独立扩增体系中,尽可能使每扩增体系只包含单个拷贝模板,并对其反应信号进行检测和统计学分析,从而实现绝对定量检测。数字 PCR 于 1999 年由 VOGELSTEIN 等提出,并

表2 基于实时荧光定量PCR的食品过敏原检测方法

Table 2 Quantitative real-time PCR based methods

for food allergens

食品	目的基因	灵敏度 (LOD)	参考文献
芸豆	<i>psbe2</i>	1 pg/ μ L	[24]
美洲山核桃	<i>ITS 1</i>	0.1 mg/kg	[25]
核桃	<i>Jug r 1,3,4</i>	100 mg/kg (<i>Jug r 3</i>)	[26]
杏仁	<i>ITS 1</i>	0.1 mg/kg	[27]
腰果	<i>Ana o 1</i>	10 mg/kg	[28]
虾	<i>Lit v 1</i>	3.2 pg	[29]
猕猴桃	<i>Act c 2</i>	25 mg/kg	[30]
桃	<i>Pru p 2.01B</i>	20 mg/kg	
苹果	<i>Mal d 1</i>	50 mg/kg	[31]
大豆	<i>atp A</i>	0.01%	
芹菜	<i>mtd</i>	0.01%	[32]
花生			
榛子		0.1 mg/kg	[33]
开心果			
杏仁	<i>ITS</i>	0.1 mg/kg	[34]
腰果			
澳洲坚果		1%	[35]
核桃			
美洲山核桃		1%	[36]
小麦	<i>CM16</i>		
榛子	<i>Cor a 1</i>	1%	[37]

在 96 孔和 384 孔微量反应孔中进行致癌突变基因 *ras* 定量分析^[34]。

与 qPCR 相比,数字 PCR 无需依赖标准品或建立标准曲线,检测结果不受扩增效率的影响,最终的检测结果通过对阳性和阴性反应单元数统计分析以及泊松分布修正,从而实现绝对定量分析。且随着微纳制造等相关技术和产业化发展,实现了数以万计甚至更多的 PCR 独立反应单元的制备,全球各大生物仪器公司纷纷开发出各类商业化的数字 PCR 检测系统^[11]。

根据反应单元的划分,目前商业化数字 PCR 平台主要分为芯片式和微液滴式。微孔芯片 dPCR 系统指的是样本分布在微容量固体反应单元中进行目的基因扩增并对每单元进行实时或终点荧光检测分析。如 Life Technologies 公司的 Open Array dPCR 系统、QuantStudio™ 12K Flex dPCR 系统和 QuantStudio™ 3D dPCR 系统等。微液滴式 dPCR 系统指的是将样本分散在独立的“油包水”微小液滴反应单元中进行目的基因扩增,并对每单元扩增结果进行实时或终点荧光检测分析。如 Bio-Rad 公司开发的 QX200™ dPCR 系统和 RainDance 公司的 RainDrop™ dPCR 系统^[35]。目前,基于上述芯片式 dPCR 系统或微滴式 dPCR 系统商业检测平台已较多应用于转基因

因、食品安全检测以及临床医学检验等各领域^[36-37]。

利用数字 PCR 系统检验食品过敏原的方法研究近年来也逐步开展和建立。PIERBONI 等^[38]建立了食品中大豆和花生的数字 PCR 检测方法,针对大豆的 *Glym30*、*Glym5*、*Lectin* 基因和花生的 *Arah1*、*Arah2* 基因设计引物,利用 dPCR 检测大豆和花生,并同时 dPCR 与 qPCR 及 ELISA 等作对比研究。MAYER 等^[39]针对大豆的叶绿体 DNA 的 *ndhH* 基因设计数字 PCR 引物检测大豆成分,灵敏度达到 0.16 mg/kg。

2.1.5 环介导的核酸等温扩增技术检测过敏原

NOTOMI 等开发了环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[40],根据 6 对特异序列设计 2 对内外引物:2 条较长的内引物和 2 条较短的外引物,通过链置换 DNA 聚合酶在约 60~65℃ 等温下完成基因的循环扩增,最终形成不同的梯度结构^[41]。LAMP 的焦磷酸镁沉淀产物肉眼即可观察其浑浊变化程度从而判断来是否有目的基因扩增。除此以外,也可观察凝胶电泳是否为梯形条带;或将荧光染料掺入反应产物中,用紫外灯照射直接观察其颜色的变化以判断检验结果^[42];或通过比浊法检测焦磷酸镁沉淀。LAMP 与普通 PCR 相比,检测速度更快,不需要进行模板的变性、循环及电泳等过程,是一种新型的简单、快速、特异性强、检验成本较低且可以不需要依赖精密仪器设备的分子生物学检验技术。LAMP 目前已经应用于动植物病毒、细菌、真菌毒素、医学检验以及食品安全监测等各领域^[43-44],具有较为广阔的应用前景。环介导等温扩增与其他扩增技术相比,更为简单快捷,可不依靠精密仪器等优点,在食源性过敏原的快速检测领域也逐渐受到关注(表 3)。

表 3 基于环介导等温扩增技术的食品过敏原检测方法

Table 3 Loop-mediated isothermal amplification based methods for food allergens

食品	目的基因	灵敏度 (LOD)	参考文献
花生	<i>Ara h 6</i>		
芝麻	<i>2S albumin</i>	0.4 ng/μL	[45]
大豆	<i>Glym Bd 28K</i>		
开心果	<i>Pis v 1</i>	10 mg/kg	[46]
胡萝卜	<i>ITS1-5.8SRNA-ITS2</i>	4 pg	[47]
小麦	<i>GAG56D</i>	0.01%	[48]
澳洲坚果	<i>AMP2</i>	0.5%	[49]
芥末	<i>Sin A1</i>	0.5%	[50]

2.2 核酸分子杂交技术检测过敏原

基于核酸的分子杂交技术有固相、液相和原位杂

交等。固相核酸杂交技术将待检 DNA/RNA 转移并固定在固相膜上,对应的互补探针在载体膜上与待检靶序列杂交反应,并检测杂交的探针信号。该技术的优点是高灵敏度、高效及高通量等,也已应用于动、植物等病毒检测、食品安全检测以及基因的鉴定及定性分析等^[51]。液相反应系统如悬浮芯片技术(suspension array technology, SAT)是用特殊编码的微球颗粒作为载体来固定探针,是一种集编码、流式细胞技术和电子信息技术等于一体的检测技术。该技术在食品过敏原检测也有应用,CHRISTOPOULOU 等人设计了探针微球同时检测加工食品中所含榛子、花生和核桃 3 种过敏原,最低检出限可达 0.01%^[52]。

2.2.1 基于 DNA 的芯片检测技术检测过敏原

基于核酸的生物芯片检测技术是利用核酸分子杂交的原理,将其中已知序列核酸链(探针)标记后固化于芯片基质表面,与待测样本核酸(靶序列)利用碱基互补配对原则进行分子杂交检测,通过杂交信号检测完成对靶序列的定性或定量检测,分析待测样本靶基因的有无或其表达的变化^[53]。因此,与传统的核酸印迹杂交技术如 DNA 印迹(southern blotting)或 RNA 印迹(northern blotting)等不同,基因芯片技术采用的是一种反向杂交。其突出优点是能够大规模、高通量、准确快速地同步分析待检基因。

2.2.2 基于 DNA 的生物传感器检测技术检测过敏原

基于 DNA 的生物传感器是将核酸杂交信号通过转换器转换为光电等物理信号并对此进行定量检测,将高度特异性的核酸杂交与高度敏感性的物理信号转导相互协作^[54],具有准确、高效、自动化、专一性强,可连续重复利用以及操作简便等优点。

核酸杂交检测技术在过敏原检测领域具有突出优势,通过开发精密检测仪器不断提高检测的准确度,多种过敏原的相关鉴定方法相继建立(表 4)。

3 展望

随着食品加工技术的多元化发展,加工食品的功能和特性均得到了提升改善,但亦可能在生产过程中引入多种过敏原,从而增加了过敏风险,因此建立高效准确的食源性过敏原的检测方法具有重要意义。

目前过敏原检测仍然以蛋白质检测为主,其中应用较为广泛的是免疫学检验技术,如酶联免疫吸附试验和化学发光免疫分析等,具有特异性强和准确率高等优点,但检测耗时较长。市场上大部分商业化的

表4 基于核酸杂交技术的食品过敏原检测方法

Table 4 Nucleic acid hybridization based methods for food allergens

检测方法	食品	目的基因	灵敏度 (LOD)	参考文献
光学薄膜 基因芯片	芥末	<i>Sin a 1</i>	0.001%	[55]
	羽扇豆	<i>ITS (18S-26S)</i>		
	核桃	<i>Jug r 2</i>		
	榛子	<i>Oleolin</i>		
	芹菜	<i>Mtd</i>		
	杏仁	<i>Pru du1</i>		
	燕麦	<i>Avenin</i>		
光学薄膜 生物传感器芯片	芝麻	<i>2S albumin mRNA</i>	0.001%	[56]
	大豆	<i>Lectin</i>		
	花生	<i>Ara h 3</i>		
	小麦	<i>Gliadin</i>		
	腰果	<i>Ana o 3</i>		
	鸡肉	<i>mitochondrion DNA</i>		
	牛肉	<i>mitochondrion DNA</i>		
多层石墨烯-金纳米 复合材料修饰的 DNA 生物传感器	鱼肉	<i>16S rRNA</i>	0.041 fmol/L	[57]
	虾	<i>16S rRNA</i>		
	花生	<i>Ara h 1</i>		
	榛子	<i>Cor a 9</i>		
基于磁珠的可抛型 电化学 DNA 传感器	榛子	<i>Cor a 1</i>	0.72 pmol/L	[58]
	花生	<i>Ara h 2</i>		
	大豆	<i>Lectin</i>		
基于 DVD 技术 的微阵列	榛子	<i>Cor a 1</i>	1 $\mu\text{g/g}$	[59]
	花生	<i>Ara h 2</i>		
	大豆	<i>Lectin</i>		

试剂盒仍然是针对食品中单一过敏原成分进行检测,不能同时检测多种蛋白过敏原,且在痕量检测方面略显不足。近年来也相继建立起多种过敏原的质谱检测体系^[60],需注意的是不同样本处理方法对结果影响较大且成本较高。

与蛋白质检测相比,基于核酸的分子生物学检测技术能够更加简便、快捷、高灵敏度地检测食品中存在的过敏原基因。基于基因扩增的 PCR 技术从定性检测发展到定量检测,其检测精确度不断提高,引物设计越来越多样化,可检测范围逐渐扩大。核酸杂交技术可在同时、短时间内分析多种过敏原基因,使得过敏原基因检测更加简便快速,实现了高通量和自动化检测。然而核酸检测技术也存在一些缺点,比如对仪器设备要求高,检测步骤较为繁琐以及检测时间较长,检测对象为核酸而非致敏蛋白等。

综上所述,现阶段的检测手段仍不能完全满足实际检测工作的需求。对于过敏原的核酸检测技术,今后一方面需对核酸检测技术的条件进行优化和改进,

不断提高其特异性和灵敏度;另一方面则需要研发更为先进便携的检测设备,为实现快速高效的现场核酸检测提供方便。此外,蛋白质检测和核酸检测各具优点,可将多种检测技术相互结合以满足实际检测工作中的多元化要求。

参 考 文 献

- [1] HUBER B. 100 Jahre allergie; Clemens von pirquet-sein allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende krankheitsverständnis[J]. Wiener Klinische Wochenschrift, 2006, 118(19-20): 573-579.
- [2] 葛静静, 刘秀梅, 矫晓玲, 等. 婴儿早期不同程度过敏风险高危因素大样本调查[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(7): 820-824.
- [3] 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.
- [4] Codex Alimentarius Commission. General standard for the labelling of prepackaged foods (codex stan 1-1985, amendment. 7-2010) [S]. 2010.
- [5] GB 7718—2011 食品安全国家标准预包装食品标签通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [6] 日本内阁府. 《食品标识基准》[S]. 2015-03-20.
- [7] 闫瑞. 消费者食品过敏原标签的认知现状与对策研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [8] 王梦娟, 李江华, 郭林宇, 等. 欧盟食品中过敏原标识的管理及对我国的启示[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 273-277.
- [9] MULLIS K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction [J]. Scientific American, 1990, 262(4): 64-65.
- [10] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science (Washington D C), 1988, 239(4839): 487-491.
- [11] 彭年才. 数字 PCR: 原理、技术及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [12] SU Yan, LI Rong. Development of dual priming oligonucleotide-polymerase chain reaction (DPO-PCR) for detection of wheat component in foods[J]. Cellular and Molecular Biology, 2019, 65(6): 80-84.
- [13] 林佳琪, 苏国成, 苏文金, 等. 数字 PCR 技术及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 170-177.
- [14] YANO T, SAKAI Y, UCHIDA K, et al. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71(7): 1793-1796.
- [15] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RAINER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(23): 11141-11156.
- [16] 翟立公, 杨剑婷, 李永泉, 等. 德尔卑沙门氏菌血清型分子检测靶点筛选及多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 269-275.
- [17] 梁华, 王少辉, 吴晓君, 等. 禽大肠杆菌、肠炎、鼠伤寒、鸡白痢及鸡伤寒沙门菌多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 960-966.
- [18] SUH S M, PARK S B, KIM M J, et al. Simultaneous detection of fruit allergen-coding genes in tomato, apple, peach and kiwi through multiplex PCR[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 10(6): 1-6.
- [19] 王玮, 韩建勋, 吴亚君, 等. 芥末等 8 种食物过敏原的多重 PCR 检测技术[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 156-160.
- [20] 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.
- [21] CHENG Fang, WU Jiajie, ZHANG Jin, et al. Development and inter-

- laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens[J]. Food Chemistry, 2016, 199: 799–808.
- [22] 周丽军. 副猪嗜血杆菌及巴氏杆菌双重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(5): 489–494.
- [23] EISCHEID A C, STADIG S R. A group-specific, quantitative real-time PCR assay for detection of crab, a crustacean shellfish allergen, in complex food matrices[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 224–231.
- [24] 孙良广, 黄文婧. 实时荧光 PCR 技术快速检测莲蓉制品中芸豆成分[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 337–341.
- [25] LOPEZ-CALLEJA I M, CRUZ S D L, GONZALEA I, et al. Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR[J]. Food Chemistry, 2015, 177: 111–119.
- [26] LINACERO R, BALLESTROS I, SANCHIZ A, et al. Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods[J]. Food Chemistry, 2016, 202: 334–340.
- [27] LOPEZ-CALLEJA I M, CRUZ S D L, PEGELS N, et al. Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(1): 31–39.
- [28] SANCHIZ A, BALLESTROS I, MARQUES E, et al. Evaluation of locked nucleic acid and TaqMan probes for specific detection of cashew nut in processed food by real time PCR[J]. Food Control, 2018, 89: 227–234.
- [29] KIM M J, KIM H I, KIM J H, et al. Rapid on-site detection of shrimp allergen tropomyosin using a novel ultrafast PCR system[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(2): 591–597.
- [30] GRAZIANO S, GULLI M, MARMIROLI N. Detection of allergen coding sequences of kiwi, peach, and apple in processed food by qPCR. [J]. J Sci Food Agric, 2017, 98(8): 3 129–3 139.
- [31] 汪永信, 程潇, 安虹, 等. 实时荧光 PCR 法同时检测食物中大豆和芹菜致敏原成分[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 69–73.
- [32] GARCIA A, MADRID R, GARCIA T, et al. Detection of food allergens by taqman real-time PCR methodology[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1 592: 95–108.
- [33] 尚柯, 张彪, 段庆梓, 等. 小麦和榛子过敏原成分检测的实时荧光 PCR 方法[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 234–240.
- [34] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9 236–9 241.
- [35] 冯兆民, 舒跃龙. 数字 PCR 技术及其应用进展[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 103–107.
- [36] KOPPEL R, GANESHAN A, WEBER S, et al. Duplex digital PCR for the determination of meat proportions of sausages containing meat from chicken, turkey, horse, cow, pig and sheep[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(4): 853–862.
- [37] 缪青梅, 汪小福, 陈笑芸, 等. 基于双重微滴数字 PCR 精准定量转基因水稻 G6H1 的方法研究[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(1): 163–173.
- [38] PIERBONI E, RONDINI C, TORRICELLI M, et al. Digital PCR for analysis of peanut and soybean allergens in foods[J]. Food Control, 2018, 92: 128–136.
- [39] MAYER W, SCHULLER M, VIEHAUSER M C, et al. Quantification of the allergen soy (*Glycine max*) in food using digital droplet PCR (ddPCR) [J]. European Food Research and Technology, 2018, 245(2): 499–509.
- [40] NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [41] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223–229.
- [42] YANG Q, DOMESLE K J, GE B. Loop-mediated isothermal amplification for salmonella detection in food and feed: Current applications and future directions[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(6): 309–331.
- [43] ANANDAKUMAR L, BAGYALAKSHMI K, NITHYA K, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in sugarcane[J]. Sugar Tech, 2018, 20(6): 708–716.
- [44] 赵远洋, 王瑾, 林丽萍, 等. 基于实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中的大肠杆菌 O157:H[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 287–294.
- [45] YUAN Dan, KONG Jilie, LI Xinxin, et al. Colorimetric LAMP microfluidic chip for detecting three allergens: Peanut, sesame and soybean[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8 682–8 688.
- [46] MAO Ruifeng, XIE Kaiwen, ZHAO Menghuan, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of pistachio (*pistacia vera*) in food samples[J]. Food Analytical Methods, 2020, 13: 658–666.
- [47] SUN Min, GAO Hongwei, XIAO Xizhi, et al. A novel loop-mediated isothermal amplification method for detection of the carrot materials in foods[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(2): 295–302.
- [48] 蒋静, 湛鸿超, 樊彦莉, 等. 小麦成分环介导等温扩增现场快速检测方法的建立和应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 103–109.
- [49] 刘津, 张隽, 李婷, 等. 食品过敏原澳洲坚果环介导等温扩增检测方法的建立与应用[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 226–232.
- [50] 程晋霞, 周熙诚, 马丹, 等. 食品中芥末过敏原成分 LAMP 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 148–152.
- [51] 马新秀, 胡文忠, 冯可, 等. 生物芯片在微生物检测中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 273–277.
- [52] CHRISTOPOULOU S, KARAIKOU S, KALOGIANNI D P. Microbead-based simultaneous fluorometric detection of three nut allergens[J]. Microchimica Acta, 2018, 185(13): 1–8.
- [53] PASQUARELLI A. Biochips: Technologies and applications[J]. Materials Science & Engineering C, 2008, 28(4): 495–508.
- [54] ABI A, MOHAMMADPOUR Z, ZUO X, et al. Nucleic acid-based electrochemical nanobiosensors[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 102: 479–489.
- [55] WANG Wei, LI Yuanyuan, ZHAO Fangyuan, et al. Optical thin-film biochips for multiplex detection of eight allergens in food[J]. Food Research International, 2011, 44(10): 3 229–3 234.
- [56] WANG Wei, HAN Jianxun, WU Yajun, et al. Simultaneous detection of eight food allergens using optical thinfilm biosensor chips[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(13): 6 889–6 894.
- [57] SUN Xiulan, JIA Min, GUAN Lu, et al. Multilayer graphene–gold nanocomposite modified stem-loop DNA biosensor for peanut allergen-Ara h1 detection[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 335–342.
- [58] MONTIEL V R V, TORRENTE-RODRIGUEZ R M, RIVERA G G D, et al. Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 245: 895–902.
- [59] TOTAJADA-GENARO L A, SANTIAGO-FELIPE S, MORAIS S, et al. Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(1): 36–43.
- [60] 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.