

南极磷虾过敏原的超高效液相色谱-飞行时间质谱方法检测

李紫薇¹, 张晓梅², 胡玲萍¹, 李兆杰¹, 张鸿伟², 薛长湖¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

(2. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山东青岛 266002)

摘要: 本研究建立了一种基于高分辨质谱的南极磷虾过敏原检测方法: 使用 Folin-酚法测定蛋白浓度, 采用测序级胰蛋白酶对南极磷虾蛋白进行酶解, 经超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 对肽段进行分离检测, 结合 NCBI 蛋白数据库和计算机检索对酶解产物进行鉴定, 并利用 Skyline 生物信息学软件进行虚拟酶解, 结合三重四极杆质谱对酶解肽段进行验证, 鉴定出了南极磷虾中两种主要的过敏原即原肌球蛋白和精氨酸激酶, 对应肽段分别为 74 和 44 条。该方法灵敏度高, 准确度高, 操作简便。与传统生物学方法 ELISA 和 PCR 法鉴定过敏原相比大大降低了假阳性结果, 直接对过敏原蛋白进行鉴定, 提高了检测效率, 为食品中过敏原的检测提供了更为有力的手段, 也为日后过敏原的消减提供了一定的理论基础。

关键词: 南极磷虾; 过敏原; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 三重四极杆

文章编号: 1673-9078(2018)09-222-227

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.031

Determination of Allergens of Antarctic Krill by Ultra-high Performance Liquid Chromatography Coupled with High Resolution Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer

LI Zi-wei¹, ZHANG Xiao-mei², HU Ling-ping¹, LI Zhao-jie¹, ZHANG Hong-wei², XUE Chang-hu¹

(1. Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

(2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: A method was established in this study to determine allergen of Antarctic krill based on high resolution mass spectrometry. The protein of *Euphausia superba* is determined by Foline-Phenol and digested by sequence-grade trypsin. The allergens are identified by NCBI protein database and computer retrieval, and validated by using Skyline software combined with triple quadrupole mass spectrometry. Two main kinds of allergens were detected from trypsin digested peptides of *Euphausia superba*, from which tropomyosin and arginine kinase could be identified. And the corresponding codes of identified peptides of protein allergens were 74 and 44 respectively. As compared with ELISA and PCR, the method is more sensitive, accurate and easy to operate, which may provide a strategy to reduce allergens in foods.

Key words: Antarctic krill; allergens; UPLC-Q-TOF-MS; triple quadrupole mass

南极磷虾 (*Euphausia superba*), 又称大磷虾或南极大磷虾^[1], 属节肢动物门甲壳亚门磷虾目磷虾科, 广泛分布于环南极海域, 在南极生态系统中起到了十分重要的作用。南极磷虾的资源蕴藏量巨大, 据估计在 6.5~10 亿吨之间^[2], 至今渔获总量已超过 600 万吨

收稿日期: 2018-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31330060); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目 (2016IK204)

作者简介: 李紫薇 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 薛长湖 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产化学与水产品加工技术

^[3]。有学者称, 若以生物质能来算, 南极磷虾可被誉为“世界上最成功的物种”^[4]。因其生物量巨大, 南极磷虾是人类重要的食物资源宝库, 其不仅是人类目前发现的蛋白质含量最高的生物 (蛋白质含量高达 50% 以上)^[4], 含有 7 种人体必需氨基酸, 同时还富含以 EPA 和 DHA 为代表的 ω -3 系不饱和脂肪酸^[5]。此外, 磷虾肉质细嫩鲜美, 具有抗动脉粥样硬化和抗胃溃疡的药用价值^[6]。十九大以来, 我国致力于打造蓝色海洋强国, 大力开发海洋资源, 南极磷虾作为南极海域中资源量最大的生物物种, 其开发利用前景十分广阔。

进入 21 世纪以来, 过敏疾病的发病率越来越高,

且由过敏导致的死亡率也呈逐年上升的趋势^[7], 调查显示一些西方国家有 2.5% 的成年人和 6%~8% 的儿童会有过敏疾病^[8], 其中在美国每年平均有 100~125 例因食品过敏而死亡的病例^[9], 因此世界卫生组织 (WTO) 已将过敏疾病认定为当今世界性的重大问题之一^[10]。在中国, 也约有 6% 的人群患有过敏疾病^[11]。虾和蟹等甲壳动物在联合国粮农组织提出的八大类致敏食物中是极其重要的一类^[12], 虾过敏后临床症状最常见的是皮肤反应, 如荨麻疹和血管性红肿。其次为消化道反应, 常表现为恶心、呕吐和腹泻等, 而严重的过敏可至休克甚至死亡^[13]。目前国内外也有众多关于过敏原检测的研究, Zhang 等^[14]利用 ELISA 法建立了无脊椎水产动物中原肌球蛋白的检测方法, Li 等^[15]建立了基于 PCR 的虾类原肌球蛋白的高通量检测方法。这种常规方法为过敏原的控制提供了一定的技术基础, 但由于近年来, 随着水产品市场的需求不断扩大, 开发一种更加快速准确, 操作简便的技术来对过敏原蛋白进行检测十分重要。

飞行时间质谱 (Q-TOF-MS) 是一种基于高效离子淌度技术的高性能质谱^[16], 选择性和灵敏度很高, 可以快速进行筛查鉴定。超高效液相色谱 (UPLC) 与常规高效液相色谱 (HPLC) 相比, 有着更高的分离效率、分辨率、灵敏度和峰容量^[17], 目前在代谢产物高通量筛选, 痕量物质分析以及复杂生物样本分析中有着广泛应用^[18-20]。超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS) 在复杂化合物的分析鉴定中有着巨大作用, 在过敏原检测上的应用十分广泛。三重四级杆质谱有着高的灵敏度和重现性, 也为过敏原蛋白的鉴定提供了重要的手段。本研究利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术和三重四级杆质谱对南极磷虾中过敏原进行检测, 以期食品中过敏原的检测提供一种快速简便的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

南极磷虾, 辽宁省大连海洋渔业集团; 测序级胰蛋白酶 (比活 18523 U/mg), 美国 Promega 公司; 色谱级甲酸, 美国 Sigma 公司; 色谱级乙腈, 美国 Fisher 公司; 碘代乙酰胺, 美国 Sigma 公司; Folin-酚乙液, 北京索莱宝科技有限公司; 二硫苏糖醇、尿素、碳酸氢铵、碳酸钠、氢氧化钠、酒石酸钾钠、五水硫酸铜、牛血清蛋白, 均为分析纯国药集团化学试剂有限公司; Nexera X2 30A 超高效液相色谱仪, 日本岛津公司; AB SCIEX Triple TOF® 5600 质谱仪, 美国 AB SCIEX

公司; Triple Quad™ 5500 三重四级杆质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司; MQS50001 型超纯水系统, 美国 Millipore 公司; AB135-S 型精密电子分析天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; A11 分析研磨机, 德国 IKA 公司; CR21G II 高速冷冻离心机, 日本 CHTACHI 公司; 超滤离心管 UFC501008, 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 南极磷虾蛋白提取

用液氮将冷冻南极磷虾肌肉研磨至粉末状。称取虾粉 1.00 g, 加入 10.00 mL 蛋白提取液 (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L NH_4HCO_3), 垂直震荡 30 min, 4 °C, 15000 r/min 低温高速离心 20 min, 取上清, 待下步测定蛋白含量。

1.2.2 Folin-酚法测定提取液蛋白含量

Folin-酚甲液由 A 液和 B 液 5:1 混合而成, 临用时现配 (A 液: 10.00 g 碳酸氢钠, 2.00 g 氢氧化钠, 0.25 g 酒石酸钾钠溶于 500 mL 蒸馏水; B 液: 0.25 g 五水硫酸铜溶于 100 mL 蒸馏水中), 乙液为商品化试剂。标准曲线绘制: 取 6 支试管, 分别加入 0、200、400、600、800、1000 μL mg/mL 的 BSA 溶液, 用蒸馏水补足到 1.00 mL。每管加入 Folin-酚甲液 5.00 mL, 摇匀, 于 25 °C 静置 10 min。每管加入 Folin-酚乙液 0.50 mL, 迅速摇匀, 30 °C 静置 30 min, 以蒸馏水为空白, 在 650 nm 处比色测吸光值。样品蛋白含量测定如标曲配制, 取样量为 1.00 mL, 分别为原液和梯度稀释 10 倍、100 倍、1000 倍的样品。

1.2.3 胰蛋白酶酶解蛋白提取液

将上述蛋白提取液分为三份, 均各取 100 μL 上清, 分别加入 2 μL 1 mol/L 二硫苏糖醇, 60 °C 条件下反应 1 h。取 5.00 μL 、1 mol/L 碘代乙酰胺 (现配), 加入至已冷却至室温的上述反应液中, 避光室温反应 1 h。采用 10 K 超滤离心管在 15000 r/min 离心超滤 20 min 后, 用 200 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液洗涤膜上层蛋白, 共洗涤三次。将胰蛋白酶溶液按酶底比 1:50 加入至上述蛋白溶液中, 37 °C 酶解 16 h, 使酶解彻底。再用超滤离心管 15000 r/min 离心超滤 20 min, 收集下层肽段。

1.2.4 南极磷虾中过敏原的分离和检测

采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-QTOF-MS) 对南极磷虾中的过敏原分离和检测。液相色谱和质谱条件色谱柱: 安捷伦 AdvanceBio Peptide Map column (150 mm×2.10 mm, 130 Å, 2.70 μm); 柱温: 40 °C。流动相 A: 0.10% 甲酸-乙腈, 流动相 B: 0.10% 甲酸-水; 流速: 0.25 mL/min; 进样量:

30 μL ; 梯度洗脱时间: 46.00 min; 流动相梯度: 0~2.00 min (95%B), 2.00~17.00 min (95%~80%B), 27.00~37.00 min(85%~65%B), 37.00~39.00 min (65%~20%B), 39.00~42.00 min (20%~95%B), 42.00~46.00 min(95%B)。质谱扫描范围: 350~1500 u, 正离子反应模式, 雾化气 GS1: 35 psi, 辅助加热器 GS2: 45 psi, 气帘气压 35 psi, 喷雾电压 5500 eV, 离子源温度: 500 $^{\circ}\text{C}$, 解簇电压: 100 V, 碰撞能量: 10 eV, 信号强度阈值: $2\text{e}4$ 。高效液相色谱-三重四级杆质谱 (HPLC-QQQ-MS), 液相色谱条件: 色谱柱及流动相同 UPLC-QTOF-MS; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$, 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 20 μL ; 流动相梯度: 0~0.50 min, 5%B; 0.50~17.00 min, 5%~35%B; 17.00~17.50 min, 35%~95%B; 17.50~20.00 min, 95%B; 20.00~20.10 min, 95%~5%B; 20.10~25.00 min, 5%B。正离子模式, 喷雾电压为 5500 V, 雾化气为 35 psi, 离子源温度为 575 $^{\circ}\text{C}$ 。解簇电压和碰撞能量由 Skyline 软件来优化, 驻留时间设为 5.00 ms。

1.3 数据处理

将计算机采集的肽段质荷比、保留时间和响应强度等数据转成 wiff 文件, 导入 Protein PilotTM Software, 选用 NCBI 的南极磷虾数据库 (NCBI-Euphausia superba.fasta) 进行数据检索。Protein Pilot 软件参数设置如下: 搜库方法: Paragon method; 消化: Trypsin; 仪器: TripleTOF 5600; 物种: None; ID Focus: Amino acid Substitutions, Biological modifications; Search Effort: Thorough ID; 检测蛋白质阈值 (Unused Protscore (conf)): >0.05% (10.00%); 提交错误发现率 (False Discovery rate analysis, FDR) 分析报告。

2 结果与讨论

2.1 南极磷虾提取液蛋白含量的测定

2.1.1 标准曲线的建立

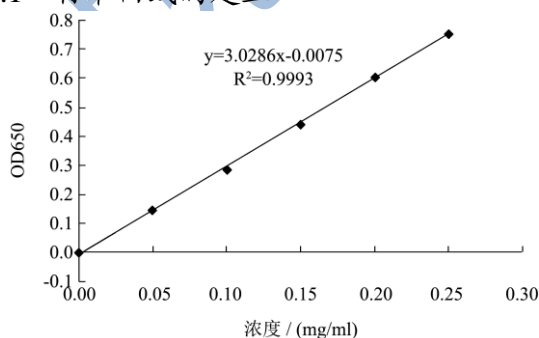


图1 蛋白含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of Protein content

以蛋白含量为横坐标, 650 nm 处吸光值为纵坐标, 线性回归方程为: $y=3.0286x-0.0075$ ($R^2=0.9993$), 绘制的标准曲线如图 1 所示。

2.1.2 南极磷虾提取液中蛋白含量计算

为了准确测定南极磷虾提取液的蛋白含量, 必须使吸光度在线性范围内, 因此采用了稀释 100 倍的样品 (稀释一百倍的误差, 是非常大的, 要给出误差范围), 测得 650 nm 处的吸光值为 0.718, 换算成提取液蛋白含量为 24 mg/mL。

2.2 南极磷虾蛋白提取液胰蛋白酶降解产物的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

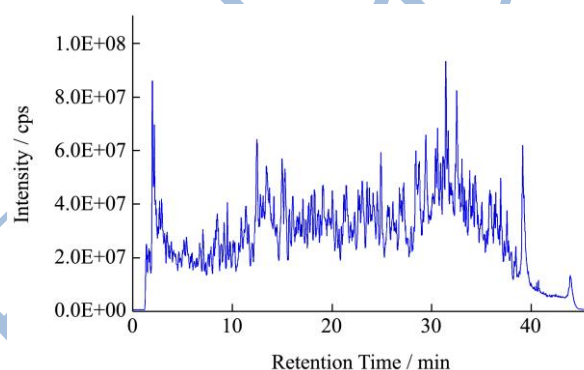


图2 南极磷虾胰蛋白酶降解产物的 UPLC-Q-TOF-MS 代表性总离子流色谱图

Fig.2 Representative total ion current (TIC) chromatogram of UPLC-Q-TOF-MS of trypsin digested peptides of Antarctic krill

按上述 1.2.4 项下色谱及质谱条件所得的南极磷虾胰蛋白酶降解产物的有代表性的总离子流色谱图见图 2。

由图 2 可见, 使用 UPLC-QTOF 对南极磷虾蛋白提取液胰蛋白酶降解产物进行分析检测, 其得到的谱图峰型对称, 谱峰尖锐, 数据采集状况良好, 谱图重现性好。

2.3 南极磷虾过敏原及主要肽段的鉴定

南极磷虾胰蛋白酶降解产物经 UPLC-Q-TOF-MS 检测的数据在 ProteinPilot 软件中用 NCBI 南极磷虾蛋白数据库进行搜库。

在 95% 的置信度下, 南极磷虾酶解产物中共鉴定到 222 条多肽, 对应的蛋白种类为 28 种, 表 1 列举了鉴定得到的代表性蛋白信息和相应肽段数目。其中原肌球蛋白和精氨酸激酶为南极磷虾中两种常见的过敏原, 对应的肽段条数分别为 74 和 44。表 2 列出了南极磷虾中两种主要过敏原对应的响应强度最高的 6 条肽段。

表 1 南极磷虾中鉴定的主要蛋白及肽段数目

Table 1 Primary protein and peptide amount of Antarctic krill

蛋白序列号	蛋白质名称	南极磷虾冻 虾肽段数
gi 162286973	原肌球蛋白	74
gi 588481755	精氨酸激酶	44
gi 690385035	热激蛋白 70B	17
gi 690385025	热激蛋白 70A	16
gi 690385055	热激蛋白 70C	10
gi 690385045	热激蛋白 70E	11
gi 690385065	热激蛋白 70D	6
RRRRRgi 690385025	逆热激蛋白 70A	4
RRRRRgi 690385035	逆热激蛋白 70B	5
RRRRRgi 690385065	逆热激蛋白 70D	4
RRRRRgi 690385055	逆热激蛋白 70C	2
gi 225875100	隐花色素	7

表 2 南极磷虾中的过敏原及代表性肽段

Table 2 Allergens of Antarctic krill and representative peptides

蛋白名称	原肌球蛋白	精氨酸激酶
蛋白序列号	gi 162286973	gi 588481755
	代表性肽段	
1	IVELEEELR	TFLVWVNEEDQLR
2	IQLLEEDLER	GNINEGVPVHSVR
3	LQTLLENDLDQVSEALLK	SIDGYGLSPGITK
4	ALQNAEGEVAALNR	SVDSLVAK
5	ANTQLVEK	IISMEK
6	SLEVSEEK	GIFHNEAK

2.4 南极磷虾主要过敏原代表性肽段的三重四级杆验证

为进一步准确验证过敏原肽段，提高结果重现性和稳定性，本实验利用三重四极杆多反应监测(MRM)模式对代表性肽段进行验证。使用生物信息学软件Skyline对每个过敏原响应强度最高的6个肽段进行模拟酶解，产生传输离子对，对其进行检测鉴定肽段并表征过敏原蛋白。

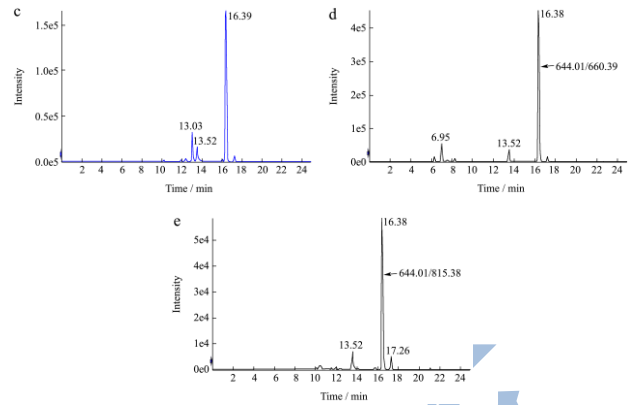
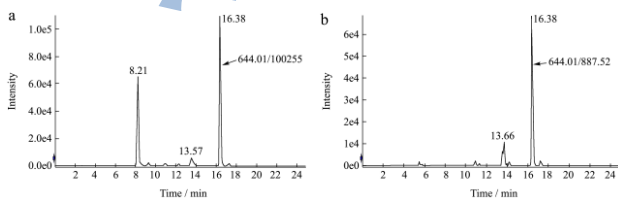


图 3 肽段 LQTLLENDLDQVSEALLK 的提取离子色谱图

Fig.3 Representative extracted ion chromatogram (XIC) scan spectra of peptide LQTLLENDLDQVSEALLK

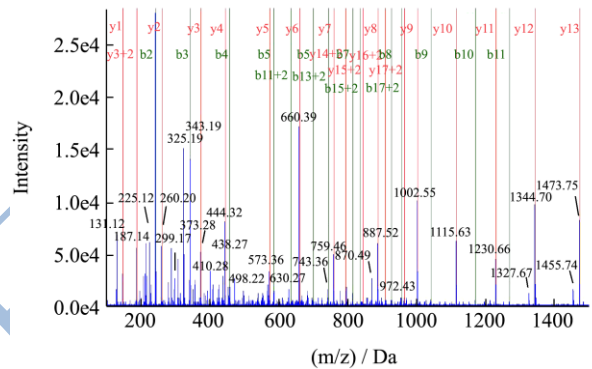


图 4 肽段 LQTLLENDLDQVSEALLK 的二级质谱图

Fig.4 Secondary ion mass spectrometry (SIMS) of peptide LQTLLENDLDQVSEALLK

表 3 列出了南极磷虾主要过敏原代表性肽段的传输离子对及对应的碰撞能量 (CE) 和解簇电压 (DP) 值，选取两个代表性肽段作为例证。

图 3 和图 4 分别为南极磷虾过敏原代表性肽段 LQTLLENDLDQVSEALLK 的提取离子色谱图和二级质谱图，母离子为 644.01，子离子分别为 1002.55、887.52、759.46、660.39、815.38，其保留时间为 16.38 min。TropomyosinSEQ ID:

MDAIKKKMQAMKMEKDSAMDRSDALEAQN
KETNAKADKADDEVHNLQKRLQTLLENDLDQVS
EALLKANTQLVEKDKALQNAEGEVAALNRRIQLL
EEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADSERMRKV
LENRSMLEERMDALESQKLEARLLAEEADRKY
DEVARKLAMVEADLERAEERAEAGENKIVELEEE
LRVVGNNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKHLTH
KLKTAEARAEFAERSVQKLQKEVDRLDELVNEK
EKYKGITDELQTFNELSGY

表 3 Skyline 预测的南极磷虾过敏原代表性肽段解簇电压和碰撞能量

Table 3 The declustering potential and collision energy values of representative peptide of Antarctic krill predicted by Skyline

母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间	代表性肽段	碰撞能量	解簇电压
644.01	1002.55	5.00	peptides1.LQTLNLDQVSEALLK.+3y9.light	78.10	32.60
644.01	887.52	5.00	peptides1.LQTLNLDQVSEALLK.+3y8.light	78.10	32.60
644.01	759.46	5.00	peptides1.LQTLNLDQVSEALLK.+3y7.light	78.10	32.60
644.01	660.39	5.00	peptides1.LQTLNLDQVSEALLK.+3y6.light	78.10	32.60
644.01	815.38	5.00	peptides1.LQTLNLDQVSEALLK.+3b7.light	78.10	32.60
703.87	1122.59	5.00	peptides2.GNINEGVPVHSVR.+2y10.light	82.40	34.20
703.87	1007.56	5.00	peptides2.GNINEGVPVHSVR.+2y9.light	82.40	34.20
703.87	361.22	5.00	peptides2.GNINEGVPVHSVR.+2y3.light	82.40	34.20
703.87	285.16	5.00	peptides2.GNINEGVPVHSVR.+2b3.light	82.40	34.20
703.87	400.18	5.00	peptides2.GNINEGVPVHSVR.+2b4.light	82.40	34.20

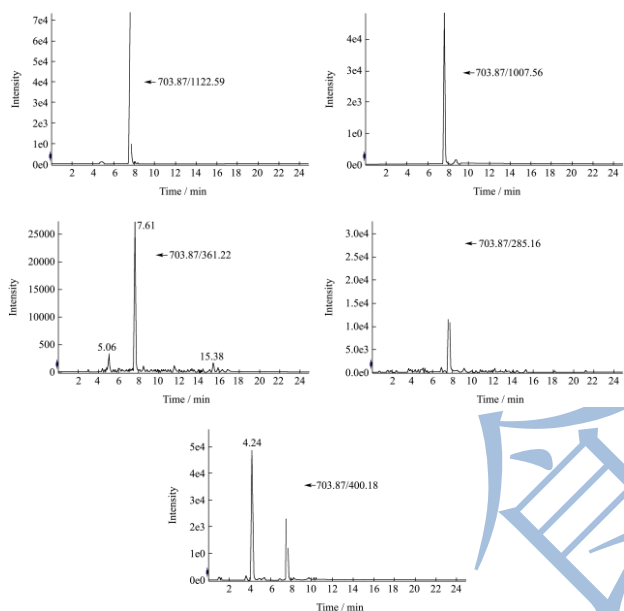


图 5 肽段 GNINEGVPVHSVR 的提取离子色谱图

Fig.5 Representative extracted ion chromatogram (XIC) scan spectra of peptide GNINEGVPVHSVR

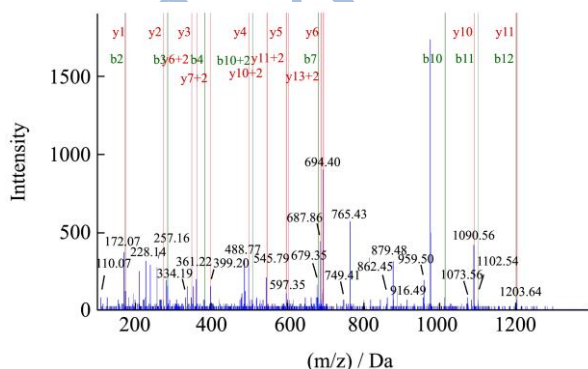


图 6 肽段 GNINEGVPVHSVR 的二级质谱图

Fig.6 Secondary ion mass spectrometry (SIMS) of peptide GNINEGVPVHSVR

图 5 和图 6 分别为南极磷虾过敏原代表性肽段 GNINEGVPVHSVR 的提取离子色谱图和二级质谱

图, 其母离子为 703.87, 子离子分别为 1122.59、1007.56、361.22、285.16、400.18, 其保留时间为 7.63 min。

Arginine kinase SEQ ID:

MGYSEVELIQQMIAAINKLGVEDTVLQPKYRI
ADIPPYPEIKSVDSLVAKYVSQKVVWSKLAGHKTKT
SGFTLSQAIACAVEFDNQHCIGYAGDWDSYKDF
DIFDPLIQEYHGLEPNAVHTTDMASKIKGNINEG
VPVHSVRIRVGRSIDGYGLSPGITKEQRLAVEEMM
KNGFTKLKGDLAGNYYPLSDMDEKVRQQLVDDH
FLFMSGDPNLQVAGMERDWPEGRGIFHNEAKTFL
VWVNEEDQLRIISMEKGGNVKGVFERLASGIRAV
GDSVWTECGKEFACDPKYGYIHSCPTNLGTGMRA
SVHVDLPGWAKEGMDALKKRCEELKVQPRGTKG
ESGGVTGHTFDISNKHRLGYSEVELVQCMIDGVN
TLHAEDMELQKKHGAGA

3 结论

本研究利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术对南极磷虾过敏原进行检测, 鉴定出了南极磷虾体内两种主要过敏原即原肌球蛋白和精氨酸激酶, 对应的肽段条数分别为 74 和 44 条, 并通过 Skyline 生物信息学软件对其进行模拟酶切, 在三重四极杆多反应监测模式下对其进行验证。这种方法快速简便, 灵敏度高, 重现性好。突破了传统生物检测技术操作复杂, 费时冗长, 成本较高的障碍, 为食品安全和水产品市场提供了有利的检测技术, 也为后期过敏原的消减提供了理论基础, 为我国国民健康提供了有效的帮助。

参考文献

[1] 阮超. 南极磷虾渔场时空分布规律及其影响因子的研究

- [D].上海:上海海洋大学,2017
- RUAN Chao. Study on the temporal and spatial distribution of antarctic krill fishery and its influencing factors [D]. Shanghai: Ocean University of Shanghai, 2017
- [2] Everson I, Miller G M. Krill mesoscale distribution and abundance: results and implications of research during the BIOMASS programme [M]. In: Southern Ocean Ecology: The BIOMASS Perspective (EI-SayedSZ. ed). UK: Cambridge University Press, 1994
- [3] 黄洪亮,陈雪忠,冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析[J]. 渔业现代化,2007,34(1):48-51
- HUANG Hong-liang, CHEN Xue-zhong, FENG Chun-lei. Analysis of the status of antarctic krill resources development [J]. Fishery Modernization, 2007, 34(1): 48-51
- [4] 欢休. 地球上最成功的生物物种-南极磷虾[J]. 海洋世界, 2013,12:40-43
- HUAN Xiu. The most successful species on earth - Antarctic krill [J]. Ocean World, 2013, 12: 40-43
- [5] 沈晓盛,韩小龙,张海燕,等. 我国对南极磷虾的开发研究及其产业化利用现状[J]. 现代食品科技,2013,5:1181-1184
- SHEN Xiao-sheng, HAN Xiao-long, ZHANG Hai-yan, et al. Development and research of antarctic krill and its industrialization utilization in China [J]. Modern Food Technology, 2013, 5: 1181-1184
- [6] 江尧森. 南极磷虾的加工食用[J]. 食品科学,1980,12:45-47
- JIANG Yao-sen. Antarctic krill processing and consumption [J]. Food Science, 1980, 12: 45-47
- [7] Geha R S. Nature versus nurture in allergy hypersensitivity [J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(6): 603-608
- [8] Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy [J]. Allergy, 2001, 56(12): 1172-1179
- [9] Sampson H A, Mendelson L, Rosen J P. Fatal and near-fatal anaphylactic reaction to food in children and adolescents [J]. The New England Journal of Medicine, 1992, 327(6): 380-384
- [10] 罗奕铭. 虾过敏原酶联免疫快速检测方法的研究[D]. 广州: 华南农业大学,2011
- LUO Yi-ming. Study on rapid detection of shrimp allergen by enzyme-linked immunosorbent assay [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2011
- [11] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. 中国食品卫生杂志,2005,17(2):119-121
- LV Xiang-zheng, LIU Xiu-mei, YANG Xiao-guang. A preliminary survey of food allergies in healthy people [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2005, 17(2): 119-121
- [12] 吴海明,胡志和. 海虾过敏原的研究进展[J]. 食品研究与开发,2010,31(7):167-173
- WU Hai-ming, HU Zhi-he. Research progress of sea shrimp allergens [J]. Food Research and Development, 2010, 31(7): 167-173
- [13] Sampson H A. Food hypersensitivity: manifeston, diagnosis, and natural history [J]. Food Technology, 1992, 5(2): 141-145
- [14] Zhang H, Lu Y, Ushio H, et al. Development of sandwich ELISA for detection and quantification of invertebrate major allergen tropomyosin by a monoclonal antibody [J]. Food Chemistry, 2014, 150(5): 151-157
- [15] Li Z, Zhang Y, Hong L, et al. Quantitative analysis of shrimp allergen in food matrices using a protein chip based on sandwich immunoassay [J]. European Food Research & Technology, 2010, 231(1): 47-54
- [16] Wang Z W, Jia W, Yap S L. Modern Instruments [J]. 2010, 5: 20
- [17] Shim Y S, Kim K J, Seo D, et al. Rapid method for the determination of vitamins A and E in foods using ultra-high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Aoac International, 2012, 95(2)
- [18] Plumb R S, Granger J H, Stumpf C L, et al. A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and oa-TOF mass spectrometry: application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice [J]. The Analyst, 2005, 130(6): 844-849
- [19] Lai C M, Li S P, Yu H, et al. A rapid HPLC-ESI-MS/MS for qualitative and quantitative analysis of saponins in "XUESETONG" injection [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2006, 40(3): 669-678
- [20] 黄挺,张伟,刘军,等. 高效液相色谱法-同位素稀释质谱联用法对奶粉中维生素 A 含量的检测[J]. 分析测试学报,2008, 27(s1):195-196
- HUANG Ting, ZHANG Wei, LIU Jun, et al. Determination of vitamin a in milk powder by high performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry [J]. Analysis and Test Journal, 2008, 27(s1): 195-196