

基于微滴数字 PCR 技术检测致敏原芒果成分

李恩静^{1,2} 王 丹^{1,2} 李 龙^{1,2} 李赫婧^{1,2} 杨红莲^{1,2}

(1. 北京市食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心), 北京 100094;

2. 国家市场监管重点实验室(食品安全重大综合保障关键技术), 北京 100094)

摘要: [目的] 建立微滴数字 PCR 技术检测致敏原芒果成分的方法。[方法] 选取叶绿体 *trnH-psbA* 基因作为致敏原芒果成分检测的靶基因, 设计特异性引物探针, 对微滴数字 PCR 方法反应条件进行优化, 对方法的灵敏度和稳定性进行验证, 并应用于 10 批次食品样品中致敏原芒果成分检测。[结果] 试验建立的微滴 PCR 方法特异性较好, 不与芒果以外 10 种其他水果交叉反应, 在上、下游引物和探针浓度分别为 200, 200, 100 nmol/L, 退火温度为 52 °C 的最适微滴 PCR 反应条件下, 方法的核酸水平检测灵敏度为 5 pg/μL, 芒果质量含量检测灵敏度为 5 mg/kg, 方法变异系数 < 25%, 重复性好, 应用于 10 批次食品样品检测结果与食品标签一致。[结论] 该方法具有快速、特异性、灵敏度高的优点, 适用于致敏原芒果成分的检测。

关键词: 微滴数字 PCR; 芒果; 致敏原检测

Detection of allergen mango components by using droplet digital PCR technology

LI Enjing^{1,2} WANG Dan^{1,2} LI Long^{1,2} LI Hejing^{1,2} YANG Honglian^{1,2}

(1. Beijing Institute of Food Inspection and Research (Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Beijing 100094, China; 2. Laboratory of Key Technologies of Major Comprehensive Guarantee of Food Safety for State Market Regulation, Beijing 100094, China)

Abstract: [Objective] A droplet digital PCR method for detect allergen mango components was established in this study. [Methods] Firstly, the chloroplast *trnH-psbA* gene was selected as the target gene for detect allergen mango components. Secondly, specific primers and probe were designed. Finally, the reaction conditions of droplet digital PCR was optimized to verify the sensitivity and stability of the method. [Results] This method had been applied to detect allergen mango components in 10 batches of food samples. The results of establishment of droplet digital PCR method was showed good specificity and not cross-react with 10 kinds of other fruits except mango. Under the optimal ddPCR reaction conditions, which were to have the concentration of forward and reverse primers and probe set as 200, 200 and 100 nmol/L, respectively, and to have annealing temperature set as 52 °C, the detection sensitivity of nucleic acid level reached 5 pg/μL, and the detection sensitivity of mango content reached 5 mg/kg, the coefficient of variation of the method was less than 25%. The test results of 10 batches of food samples applied with the method were consistent with the food labels. [Conclusion] This method has the advantages of being fast, specific, and highly sensitive, making it suitable for the detection of allergenic mango components.

Keywords: droplet digital PCR; mango; allergen detection

芒果 (*Mangifera indica* L.) 属于漆树科芒果属, 其果肉芳香甜美, 营养丰富, 可鲜食, 也可加工成果汁、果脯、冰淇淋等食品^[1]。但部分人群在食用芒果后, 会出现不同程度的过敏反应, 包括咳嗽、呼吸困难^[2]、荨麻疹^[3]、水样腹

泻^[4]等症状, 严重时会威胁生命。中国致敏原调研^[5]显示, 2015—2020 年对上海 39 926 名 1 个月~18 岁过敏性疾病儿童进行致敏原检测发现, 在 3~6 岁的儿童对牛肉和芒果的过敏反应最高。Luo 等^[6]应用 Meta 分析的方法对中国

基金项目: 国家重点研发计划项目 (编号: 2019YFC1605001)

通信作者: 李恩静 (1983—), 女, 北京市食品检验研究院工程师, 硕士。E-mail: enjingli@126.com

收稿日期: 2023-11-14 **改回日期:** 2024-06-28

人群食物致敏原流行情况进行研究,结果显示,芒果过敏患者占总食物过敏患者的比例为 15%,高于西方国家常见的花生、坚果等食物致敏原。

过敏患者避免产生芒果过敏反应的最好方法是不食用芒果或含有芒果成分的食品^[7]。因此,对食品的致敏原标识管理显得尤为重要,而食品致敏原检测技术是监控手段的重要组成之一^[8]。现有食品致敏原检测技术主要有两类,一类是针对致敏物质蛋白质的检测,其中酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法被广泛应用于食品致敏原检测^[9]。德国拜发公司等^[10]开发的 ELISA 商品化试剂盒能检出 8 大类食物中的致敏原,但对芒果致敏原检测还未有 ELISA 商品化试剂盒。另一类是针对致敏物质的核酸检测,常用方法为实时荧光 PCR 方法(quantitative real-time PCR, qPCR)^[11]和 PCR 方法,中国已颁布了基于 qPCR 方法的进出口行业标准^[12];在日本和德国,PCR 方法已成为政府食品监管实验室检测致敏原的标准方法^[13]。国内外有关芒果过敏原成分的检测鲜有报道,SN/T 3729《出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法》中芒果成分检测方法为 qPCR 方法,Sheu 等^[14]应用环介导等温扩增技术建立食品中芒果成分检测方法,灵敏度与传统 PCR 方法相当。新兴的微滴数

字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)方法被认为是第三代核酸扩增技术,基于油包水的原理将含有一定浓度的 DNA 反应体系分布到数万个微滴中,经过单分子的扩增,最后对扩增信号结果进行统计学分析,可实现对低浓度核酸样品的精准检测^[15-16]。ddPCR 方法具有不依赖扩增效率、不受 PCR 抑制剂的影响及更高的灵敏度和重复性等优点^[17],近年来已被应用于食源性致病菌^[18-19]、转基因植物^[20-21]、动植物源性成分检测^[22-23]、食物致敏原检测^[24-26]等领域。目前还未有 ddPCR 方法应用于致敏原芒果成分检测的研究报道。研究拟采用 ddPCR 方法建立针对致敏原芒果成分快速检测的方法,以期对芒果致敏原检测方法提供新的思路及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

- 芒果、香蕉、葡萄、桔子、山楂、草莓、桃子、苹果、杏、木瓜、梨:市售;
- 食品样品:具体信息见表 1,市售;
- 植物基因组 DNA 提取试剂盒、深加工提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;
- ddPCR 反应体系有关试剂:美国 Bio-rad 公司;
- 引物、探针:生工生物工程(上海)股份有限公司。

表 1 食品样品信息
Table 1 The information of food samples

编号	样品名称	配料表主要成分
1	芒果混合汁	苹果汁、芒果浆、椰子水、黄胡萝卜汁
2	风味酸牛奶(芝士+芒果西番莲)	生牛乳、白砂糖、芒果西番莲果酱、稀奶油、乳清蛋白粉、再制干酪、蛋黄粉
3	芒果汁软糖	葡萄糖浆、白砂糖、浓缩芒果汁、卡拉胶、柠檬酸、食用香精
4	杨枝甘露味低卡蒟蒻果冻	芒果浆、果葡糖浆、西柚浓缩汁、芒果浓缩汁、果冻粉、灭菌型发酵果蔬汁、魔芋粉
5	蒟蒻果冻(芒果味)	芒果原浆+苹果汁、果葡糖浆、魔芋粉、食品添加剂
6	巴旦木奶糕(奶香芒芒)	芒果干(芒果、白砂糖、麦芽糖浆、柠檬酸、焦亚硫酸钠、食用香精)、巴旦木仁、腰果仁、全脂乳粉、黄油、调制乳粉
7	麻薯冰淇淋(杨枝甘露鸡尾酒风味)	麻薯、西米味苹果果味酱、稀奶油、乳粉、芒果原浆、乳清粉、食品添加剂
8	莓桃复合果蔬汁	桃原浆、浓缩苹果汁、草莓原浆、苹果浆、红甜菜汁
9	坚果牛轧奶芙	小麦粉、白砂糖、黄油、食品添加剂、扁桃仁、蔓越莓、南瓜子、麦芽糖浆
10	苹果醋软糖	麦芽糖醇液、明胶、酸处理淀粉、苹果原醋、食用香精、胡萝卜汁饮料

1.2 主要仪器设备

- ddPCR 检测系统:Q×200 型,美国 Bio-rad 公司;
- 实时荧光 PCR 仪:QS12K 型,美国 Thermo Fisher 公司;
- 高速离心机:5424 型,德国 Eppendorf 公司;
- 加热混匀仪:MIXC 型,德国 Eppendorf 公司;
- 电子天平:ME204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

- (1) 植物样本:将新鲜芒果、香蕉、葡萄、桔子、山楂、草莓、桃子、苹果、杏、木瓜、梨样品经过流水冲洗,去除果皮表面的污渍,去皮后取果肉部分,称取 100 mg 样品用于后续植物基因组 DNA 的提取。
- (2) 芒果不同质量含量样品:将新鲜芒果分解成粒径 1 cm 左右小块,于 70 ℃烘干 4 h,称取 100 mg 样品于 2 mL 离心管,加入 1 mL 去离子水和 10 粒左右钢珠,置于组织破碎仪

上进行破碎。仪器参数:频率 30 次/s;时间 2 min,共破碎 10 min,使芒果样品破碎成均匀液体。将该样品制成不同稀释度的芒果样品,用于芒果致敏原质量含量检测灵敏度测试。

1.3.2 核酸提取

(1) 植物样本核酸提取:采用植物基因组 DNA 提取试剂盒,按照说明书提取植物样本核酸。采用分光光度计测定提取 DNA 的质量浓度和纯度,当 DNA 质量浓度为 10~100 ng/ μ L,纯度 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 为 1.8~2.0 时,即可用于后续试验。

(2) 食品样品核酸提取:称取食品样品 100 mg,按照 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

1.3.3 荧光 PCR 检测 配制实时荧光 PCR 反应体系:2 $\times$ Taqman probes 荧光 PCR 缓冲液 10 μ L,将上、下游引物和探针稀释至 100 nmol/L,加入 0.5 μ L 上、下游引物,0.3 μ L 探针和 1~3 μ L 模板,用去离子水补足至 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,45 个循环,55 $^{\circ}$ C 收集荧光信号。检测结果的 Ct 值由实时荧光 PCR 仪的软件自动确定。

1.3.4 ddPCR 检测 配制 ddPCR 反应体系:取 10 μ L 2 $\times$ probes(No dUTP)ddPCR 预混液,将上、下游引物和探针稀释到 200 nmol/L,加入 0.5 μ L 上、下游引物、0.3 μ L 探针和 1~3 μ L 模板,用去离子水补足至 20 μ L。将混匀的 ddPCR 反应体系加入到微滴制备卡中间一排孔中,将 70 μ L 微滴制备油移至微滴制备卡最下一排孔中,将微滴制备卡放入微滴制备器中。将生成的 40 μ L 微滴液小心移至 96 孔数字 PCR 反应板中,用封膜仪对 96 孔板进行封膜,进行后续 ddPCR 反应试验。反应程序:95 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,45 个循环;98 $^{\circ}$ C 10 min。同时将 PCR 仪的升降温速度调至 $\leq$ 2.5 $^{\circ}$ C/s。ddPCR 反应程序结束后,将 96 孔板放入微滴读取仪中,录入样品信息,根据仪器配套软件计算出最终的检测结果。

1.3.5 芒果致敏原特异性引物探针设计及筛选 参照文献[27]选择叶绿体基因 *trnH-psbA* 为致敏原芒果成分目标基因,应用 Primer Premier 6.0 设计芒果特异性引物探针,使用 BLAST 在线比对工具,设计出 4 对特异性引物及 1 条探针,引物序列见表 2,探针 5'端标记 FAM,3'端标记 BHQ。以芒果 DNA 为模板,4 对引物分别与设计的特异性探针 PM1 (FAM-5'-TGGTACCTTACTTATCAATCTCGAAATG-3'-BHQ1) 进行实时荧光 PCR 检测,根据荧光 PCR 仪结果筛选出芒果致敏原特异性引物探针。

1.3.6 芒果致敏原引物探针特异性验证 以芒果 DNA 作为目标物种,选取香蕉、葡萄、桔子、山楂、草莓、桃子、苹果、杏、木瓜、梨 10 种非目标水果物种应用微滴数字 PCR 技术进行引物探针特异性验证。

1.3.7 ddPCR 反应条件优化

(1) 引物探针浓度优化:设置 4 组 ddPCR 反应需要优

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of primer		
组别	引物	序列(5'→3')
第 1 组	FM1	ATTTTGGATCATTCTCCTTTTTTTA
	RM1	CGTTTGGTTGTTTGTGTTTTCA
第 2 组	FM2	CGTTTGGTTGTTTGTGTTTTCA
	RM2	TGGTACCTTACTTATCAATCTCGAAATG
第 3 组	FM3	GATCATTCTCCTTTTGTATGGTAC
	RM3	CGTTTCGTTTGGTTGTTTGT
第 4 组	FM4	TATGGTACCTTACTTATCAATCTCG
	RM4	TACGTTTCGTTTGGTTGTTTGT

化的引物及探针浓度(见表 3),以芒果 DNA 为模板,参照 1.3.4 的方法,使用 1.3.6 筛选得到的一对芒果特异性引物探针,对 4 组样品分别进行 ddPCR 检测,根据微滴检测仪配套软件生成的 ddPCR 微滴散点图,筛选出最佳的 ddPCR 反应引物探针浓度。

表 3 引物探针浓度

Table 3 Four groups of primer and probe concentration				
引物探针	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组
FM2	200	200	200	100
RM2	200	200	200	100
PM1	100	75	50	60

(2) 退火温度优化:以芒果 DNA 为模板,1.3.4 的 ddPCR 反应体系为基础,应用筛选得到的一对芒果特异性引物探针及最佳反应浓度,对 ddPCR 扩增反应程序的退火温度进行优化。设置梯度退火温度分别为 51,52,53,54,55,56 $^{\circ}$ C,根据微滴检测仪配套软件生成的 ddPCR 微滴散点图,筛选出 ddPCR 反应最适合的退火温度。

1.3.8 ddPCR 方法灵敏度及稳定性验证

(1) 核酸水平检测:应用植物样本核酸提取方法对芒果 DNA 进行提取,芒果 DNA 质量浓度分别为 50,10,2,0.4,0.08,0.04,0.02,0.01,0.005,0.002,0.001 ng/ μ L。

(2) 芒果质量含量检测:按 1.3.1 得到的芒果溶液,用去离子水按比例稀释得到芒果质量浓度分别为 10 000,5 000,1 000,500,100,50,10,5,1 mg/kg 的稀释液,使用植物样本核酸方法提取不同质量含量的芒果 DNA,用已建立的致敏原芒果成分的 ddPCR 方法对其进行检测。

1.3.9 实际样品 ddPCR 检测 从市场购买 10 批次不同种类食品样品,按照食品样品核酸提取方法提取基因组 DNA,应用已建立的致敏原芒果成分 ddPCR 检测方法以及 SN/T 3729.4—2013 对实际样品的基因组 DNA 进行检测,验证所建方法对实际样品检测的适用性。

1.3.10 数据分析 ddPCR反应平行3次,借助SPSS 14.0软件进行数据分析,计算方法的平均值和变异系数。

2 结果与讨论

2.1 芒果致敏原特异性引物探针设计及筛选

由图1可知,4组引物探针的Ct值分别为37.10, 31.03, 36.21, 35.34,第2组引物探针的荧光PCR反应检测的Ct值最小,说明该组引物探针的扩增反应灵敏度最好,故选择第2组引物探针进行后续ddPCR检测试验。

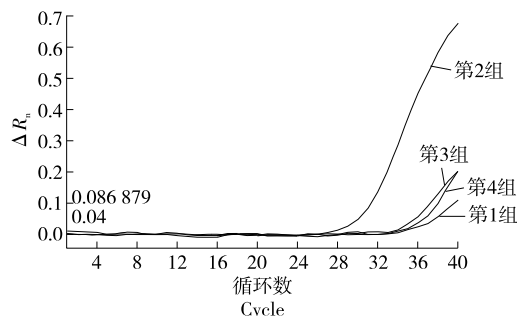
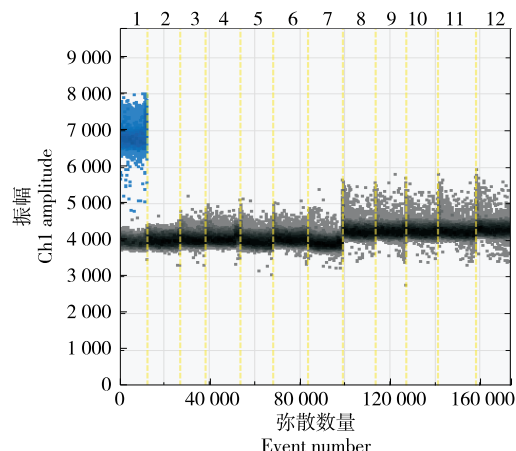


图1 引物探针筛选结果

Figure 1 Optimization results of primers and probe

2.2 芒果致敏原引物探针特异性验证

由图2可知,仅芒果DNA扩增呈现蓝色阳性油滴信号,其他10种水果DNA均未扩增,为灰色阴性油滴信号,说明设计并筛选出的引物探针特异性较好,能够满足致敏原芒果成分的特异性检测要求。



1. 芒果 2. 香蕉 3. 葡萄 4. 桔子 5. 山楂 6. 草莓 7. 桃子 8. 苹果 9. 杏 10. 木瓜 11. 梨 12. NTC

图2 引物探针特异性验证结果

Figure 2 Specificity verification results of primer and probe

2.3 ddPCR反应条件优化

2.3.1 退火温度 由图3可知,所有退火温度均有蓝色阳性油滴检出。当退火温度为54,55,56℃时,ddPCR扩增

的阳性和阴性油滴的分界不明显;当退火温度为51,52,53℃时,蓝色阳性和灰色阴性油滴之间有明显分界,且退火温度为52℃时ddPCR扩增结果的阳性、阴性油滴之间的振幅比其他温度的更大,且阳性和阴性油滴之间的油滴弥散数量适中,说明ddPCR反应的非特异性扩增较少,故选择52℃作为ddPCR反应的最适退火温度。

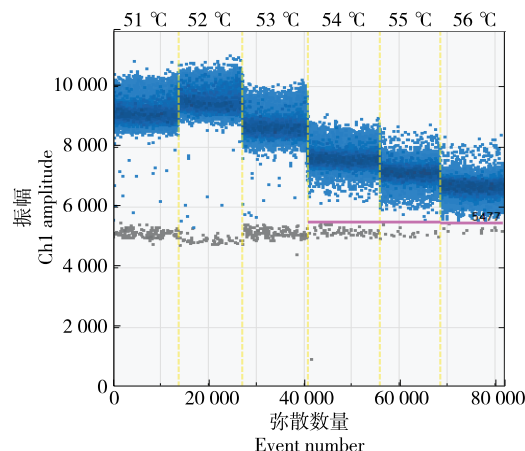


图3 退火温度优化结果

Figure 3 Optimization results of annealing

2.3.2 引物探针浓度 由图4可知,4组引物探针浓度的ddPCR反应均有扩增信号,但蓝色阳性和灰色阴性微滴之间的荧光信号振幅差异较明显,第1组引物探针浓度的荧光信号振幅最大,因此最佳的ddPCR反应引物探针浓度为第1组(200,200,100 nmol/L)。

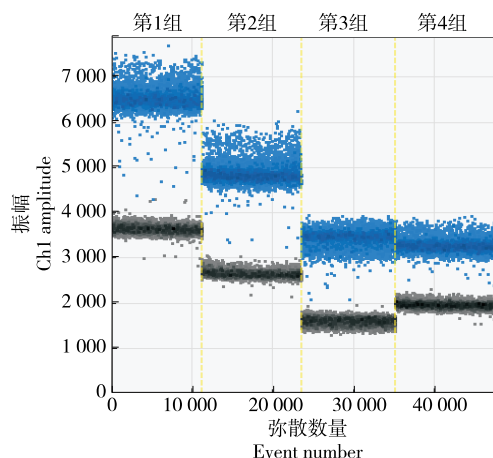


图4 引物探针浓度优化结果

Figure 4 Concentration optimization results of primer and probe

2.4 ddPCR方法灵敏度及稳定性验证

2.4.1 核酸水平检测 由表4可知,当DNA质量浓度为0.005~50 ng/μL时,ddPCR检测结果重复性较好,相对标

准偏差为 2.54%~12.00%, <25%^[28];当 DNA 质量浓度为 0.002 ng/μL 时, 相对标准偏差为 46.31%, >25%, 重复性较差;当 DNA 质量浓度为 0.001 ng/μL 时, ddPCR 扩增无阳性油滴扩增。因此, 确定方法灵敏度为 0.005 ng/μL。

表 4 梯度稀释芒果 DNA ddPCR 检测结果
Table 4 ddPCR detection results of mango DNA solution gradient

芒果 DNA 质量浓度/ (ng·μL ⁻¹)	拷贝数/ (copies·μL ⁻¹)			平均值/ (copies·μL ⁻¹)	相对标准 偏差/%
	1	2	3		
50	3 550.00	3 840.00	3 280.00	3 326.67	7.87
10	796.00	883.00	884.00	854.33	5.91
2	226.00	230.00	258.00	238.00	7.33
0.4	63.50	72.10	67.20	67.60	6.38
0.08	14.10	14.60	13.90	14.20	2.54
0.02	4.70	3.80	4.60	4.37	11.30
0.005	1.60	1.50	1.30	1.47	10.41
0.002	0.38	0.75	0.00	0.57	46.31

2.4.2 芒果质量含量检测 由图 5 可知, 芒果质量浓度为 5~10 000 mg/kg 的稀释液均能检测到蓝色阳性油滴和灰色阴性油滴, ddPCR 产生的阳性油滴数随着芒果质量浓度的增大而升高, 1 mg/kg 的芒果稀释液由于 DNA 模板浓度过低, 达到 ddPCR 方法检测下限, 无阳性油滴扩增, ddPCR 仪无法推算模板浓度。由表 5 可知, 芒果质量浓度为 5~10 000 mg/kg 的稀释液检测结果稳定性较好, 相对标准偏差为 2.10~12.15, <25%, ddPCR 方法重复性较好。因此, 确定方法灵敏度为 5 mg/kg。

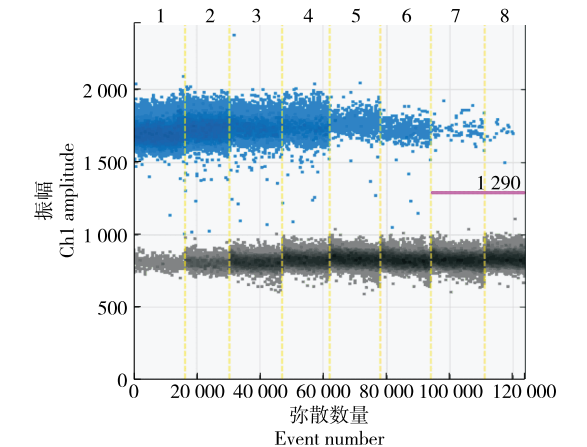


图 5 不同芒果质量浓度 ddPCR 扩增结果
Figure 5 ddPCR amplification results of mango content gradient

表 5 不同芒果质量浓度 ddPCR 检测结果

Table 5 ddPCR detection results of different mango content

芒果质量 浓度/ (mg·kg ⁻¹)	拷贝数/ (copies·μL ⁻¹)			平均值/ (copies·μL ⁻¹)	相对标准 偏差/%
	1	2	3		
10 000	4 410.01	4 410.02	3 640.04	4 153.36	10.70
5 000	1 863.00	2 027.00	2 118.00	2 002.86	6.45
1 000	562.00	602.00	592.00	585.66	3.56
500	331.00	345.00	338.00	338.50	2.08
100	46.30	41.50	44.90	44.28	5.56
50	31.30	32.50	31.40	31.76	2.03
10	6.10	6.10	4.90	5.71	12.18
5	1.20	1.10	1.00	1.13	9.02

2.5 实际样品 ddPCR 检测

由图 6 可知, 1~7 号样品有蓝色阳性油滴扩增, 表明有致敏原芒果成分; 8~10 号样品无蓝色阳性油滴扩增, 只有灰色阴性油滴, 表明无致敏原芒果成分。由图 7 可知, 1~7 号样品有阳性扩增曲线, 8~10 号样品无扩增曲线, 表明 ddPCR 检测结果与荧光 PCR 检测结果一致, 且与表 1 的食品标签信息相符。因此, 试验方法稳定可靠, 在食品样品的芒果致敏原检测中具有良好的应用价值。

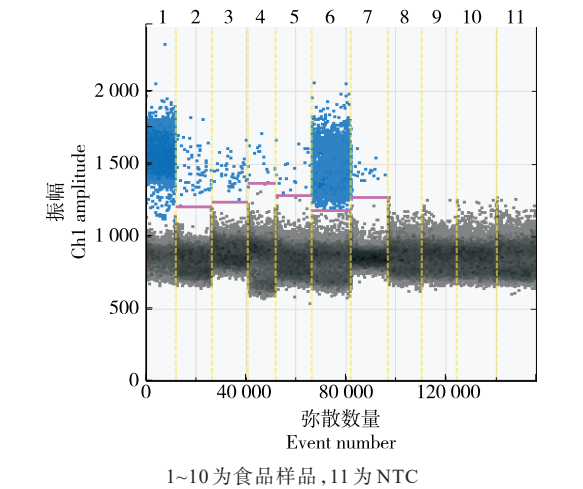


图 6 不同食品样品 ddPCR 扩增结果
Figure 6 ddPCR amplification results of food samples

3 结论

以叶绿体 *TrnH-psbA* 基因为致敏原芒果成分检测的靶基因设计引物探针, 对 ddPCR 方法反应条件进行优化, 建立了一种致敏原芒果成分 ddPCR 检测方法。结果表明, 该方法特异性较好, 不与 10 种非目标水果交叉反应; 通过对反应体系的优化显示, 阳性液滴 (含芒果 DNA) 和阴性液滴 (不含芒果 DNA) 之间有很好的分离, 表明该方法具有较好的检测能力; 该方法灵敏度较高, 核酸水平检

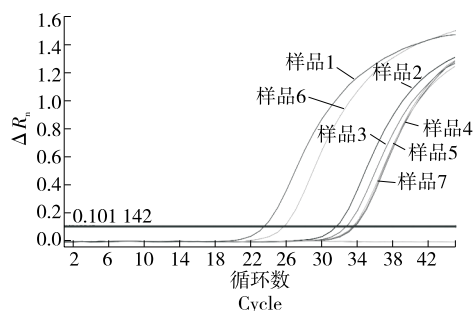


图7 不同食品样品的qPCR扩增结果

Figure 7 qPCR amplification results of food samples

测灵敏度达到 5 pg/μL。试验建立的 ddPCR 检测方法具有特异性强、灵敏度高、稳定性高等优点,为现有同类检测方法的有力补充。但由于 ddPCR 方法的验证实验是在无食品基质下的检测结果,后续需要增加应用于不同食品基质中致敏原芒果成分检测试验,使 ddPCR 检测方法在实际食品样品致敏原检测中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 闫慧清, 黄小龙, 马兆成. 食用芒果过敏的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 305-309.
YAN H Q, HUANG X L, MA Z C. Progress in understanding hypersensitivity reaction after ingestion of mango fruits[J]. Food Science, 2017, 38(3): 305-309.
- [2] SHAH A, GERA K. Immediate hypersensitivity reaction with mango[J]. Pneumonologia Alergologia Polska, 2014, 82(5): 445-453.
- [3] ORTEGA-MARTÍN L, SASTRE B, RODRIGO-MUÑOZ J, et al. Anaphylaxis after mango fruit intake: identification of new allergens[J]. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2022, 32(5): 401-403.
- [4] UKLEJA-SOKOŁOWSKA N, GAWROŃSKA-UKLEJA E, LIS K, et al. Anaphylactic reaction in patient allergic to mango [J]. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2018, 14(1): 1-7.
- [5] YING X L, QI X Y, WANG H M, et al. Allergensensitization among children with allergic diseases in Shanghai, China: age and sex difference[J]. Respiratory Research, 2022, 23(1): 95.
- [6] LUO J, ZHANG Q, GU Y, et al. Meta-analysis: prevalence of food allergy and food allergens-China, 2000—2021[J]. China CDC Weekly, 2022, 4(34): 766-770.
- [7] 舒二连, 钮冰, 陈沁. 超声处理对食物过敏原影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 216-223.
SHU E R, NIU B, CHEN Q. Recent studies on the effect of ultrasonic treatment on food allergens[J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 216-223.
- [8] 刘津, 张隽, 李志勇, 等. 澳洲坚果致敏原的恒温扩增检测引物、试剂盒及方法: CN104630333B[P]. 2018-05-01.
LIU J, ZHANG J, LI ZH Y, et al. Primers, kits and methods for loop-mediated isothermal amplification detection of macadamia

nut allergen: CN104630333B[P]. 2018-05-01.

- [9] 王耀, 陈曦, 武汉良, 等. 花生致敏蛋白 Ara h 1 双抗体夹心 ELISA 法的建立[J]. 食品与机械, 2020, 36(7): 59-62, 113.
WANG Y, CHEN X, WU H L, et al. Establishment of double antibody sandwich ELISA for peanut allergenic protein Ara h 1 [J]. Food & Machinery, 2020, 36(7): 59-62, 113.
- [10] 梁文文. 食物过敏原研究进展及我国应如何应对: 访拜发分析系统销售(北京)有限公司贺丽丽[J]. 食品安全导刊, 2018 (19): 36-41.
LIANG W W. Research progress of food allergens and how to respond in China: visit R-Biopharm (Beijing) Co Ltd HE L L [J]. China Food Safety Magazine, 2018(19): 36-41.
- [11] 金萍, 丁洪流, 张敏, 等. 双重实时荧光 PCR 法测定食品中大豆、小麦过敏原[J]. 食品与机械, 2022, 38(9): 59-63, 102.
JIN P, DING H L, ZHANG M, et al. Determination of soybean and wheat allergens in food by dual real-time fluorescence PCR [J]. Food & Machinery, 2022, 38(9): 59-63, 102.
- [12] 杨若婷, 戴智勇, 潘丽娜, 等. 食物致敏原检测标准及标识现状[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 1-10.
YANG R T, DAI Z Y, PAN L N, et al. Food allergen testing standards and labeling status[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 1-10.
- [13] HOLZHAUSER T. Protein or no protein? Opportunities for DNA-based detection of allergenic foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(38): 9 889-9 894.
- [14] SHEU S C, TSOU P C, LIEN Y Y, et al. Rapid and specific detection of mango (*Mangifera indica*) in processed food using an isothermal nucleic acid amplification assay[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246: 759-766.
- [15] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8 604-8 610.
- [16] DRAND D, GENUARDI E, DOGLIOTTI I, et al. Highly sensitive *MYD88*^{L265P} mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia [J]. Haematologica, 2018, 103(6): 1 029.
- [17] KOJABAD A A, FARZANEHPUR M, GALEH H E G, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. Journal of Medical Virology, 2021, 93(7): 4 182-4 197.
- [18] LI H, SIMPSON D J, GÄNZLE M G. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in food by droplet digital PCR to detect simultaneous virulence factors in a single genome[J]. Food Microbiology, 2020, 90: 103466.
- [19] DU M H, LI J W, LIU Q J, et al. Rapid detection of trace *Salmonella* in milk using an effective pretreatment combined with droplet digital polymerase chain reaction[J]. Microbiological Research, 2021, 251: 126838.

(下转第 115 页)

- 2020, 99: 323-336.
- [17] SANTHI D, KALAIKANNAN A, SURESHKUMAR S. Factors influencing meat emulsion properties and product texture: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(10): 2 021-2 027.
- [18] AHMAD A, KALEEM M. β -Glucan as a food ingredient[J]. Biopolymers for Food Design, 2018, 20: 351-381.
- [19] KAUR R, SHARMA M. Cereal polysaccharides as sources of functional ingredient for reformulation of meat products: a review[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 62: 103527.
- [20] 米红波, 王聪, 仪淑敏, 等. 淀粉在鱼糜制品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 291-295.
- MI H B, WANG C, YI S M, et al. Research progress on starch use in surimi seafood[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 291-295.
- [21] LIU X, ZHANG T, XUE Y, et al. Changes of structural and physical properties of semi-gel from Alaska pollock surimi during 4 °C storage[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 772-782.
- [22] DUŠEK M, KVASNIČKA F, LUKÁŠKOVÁ L, et al. Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products[J]. Meat Science, 2003, 65(2): 765-769.
- [23] 谭力, 周春霞, 洪鹏志. 淡水鱼鱼糜制品加工特性及品质影响因素[J]. 食品与机械, 2018, 34(8): 34-38.
- TAN L, ZHOU C X, HONG P Z. Research progresses on processing and utilization of freshwater fish surimi and surimi products[J]. Food & Machinery, 2018, 34(8): 34-38.
- [24] 任多多, 江伟, 孙印石, 等. 果胶的分类、功能及其在食品工业中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 438-446.
- REN D D, JIANG W, SUN Y S, et al. Research progress on the classification, function and application of pectin in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43 (3): 438-446.
- [25] LEE C H, CHIN K B. Changes in physicochemical properties of pork myofibrillar protein combined with corn starch and application to low-fat pork patties[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(1): 157-164.
- [26] AMAN H, NATIS M F, THAM Y, et al. Bacteria contamination analysis on the hands and bowls of meatball cart vendors: an observational descriptive study[J]. Gaceta Sanitaria, 2021, 35(4): 71-75.
- [27] 胡超, 白史旦, 游明鸿, 等. 菊苣多糖的研究进展[J]. 草业与畜牧, 2013(2): 44-48.
- HU C, BAI QI Q, YOU M H, et al. Research progress of polysaccharides in *Cichorium intybus* L. [J]. Prataculture & Animal Husbandry, 2013(2): 44-48.
- [28] MANJU S, JOSE L, SRINIVASA GOPAL T K, et al. Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlsport (*Europlus suratensis*) during chill storage[J]. Food Chemistry, 2007, 102(9): 27-35.
- [29] GHOLAMI H, SAHARKHIZ M J, FARD F R, et al. Humic acid and vermicompost increased bioactive components, antioxidant activity and herb yield of Chicory (*Cichorium intybus* L.) [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 14: 286-292.
- (上接第 55 页)
- [20] BOGOŽALEC K A, DEMŠAR T, ŠTEBIH D, et al. Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 73-78.
- [21] DEMEKE T, LEE S J, ENG M. Increasing the efficiency of canola and soybean GMO detection and quantification using multiplex droplet digital PCR[J]. Biology, 2022, 11(2): 201.
- [22] BASANISI M G, BELLA G L, NOBILI G, et al. Application of the novel droplet digital PCR technology for identification of meat species[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(3): 1 145-1 150.
- [23] 陈佳, 秦丽, 刘浩, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测欧洲甜樱桃中掺假苹果成分的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 349-355.
- CHEN J, QIN L, LIU H, et al. Quantitative detection of adulterated apple components in European sweet cherries by droplet digital PCR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 349-355.
- [24] 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, 2019, 245: 499-509.
- [25] CAU S, TILOCCA M G, SPANU C, et al. Detection of celery (*Apium graveolens*) allergen in foods of animal and plant origin by droplet digital PCR assay[J]. Food Control, 2021, 130: 108407.
- [26] DAGA C, CAU S, TILOCCA M G, et al. Detection of fish allergen by droplet digital PCR[J]. Italian Journal of Food Safety, 2018, 7(4): 7 264.
- [27] 陈佳. 樱桃制品中植物源性成分筛查及定量鉴别技术研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2020: 22-23.
- CHEN J. Study on screening and quantitative identification of plant-derived ingredients in cherry products[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2020: 22-23.
- [28] Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods: CAC/GL 74—2010 [S]. Rome: Codex Alimentarius, 2010: 10-11.