**水产源致敏性蛋白快速检测 毛细管电泳法**

（征求意见稿）

# 编制说明

# 一、任务来源

本国家标准制定任务列入国家标准制修订项目，项目编号“20171815-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口。本标准起草工作由中国标准化研究院、浙江工商大学、绿城农科检测技术有限公司、河北省食品质量监督检验研究院等单位共同组成。

# 二、标准制定目的和意义

## 2.1保障消费者食用安全需要标准提供支持

水产品以其营养丰富且味道鲜美的特性深受消费青睐，我国水产养殖业位居世界榜首，水产食品加工业发展迅猛。但是水产动物源致敏蛋白引起的过敏反应问题也日益突出，其过敏发病率持续上升，据统计，亚洲儿童食物过敏患者中，甲壳类过敏率占39%，成人中甲壳类占33.8%。水产食品过敏可引发过敏性哮喘、荨麻疹、腹痛腹泻，甚至危及生命。目前，针对易感人群尚没有完善的治疗方法，水产品及其制品中典型致敏性蛋白标识和预警显得尤为重要。实际上这已经成为目前原料安全中重要的关注焦点，逐渐成为国内外研究热点。根据前期调研与分析，目前市场上的确存在水生动物源致敏性蛋白原料标注错误的现实情况，这势必会影响到过敏人群的健康，特别是作为食品原料已经成为食品安全的一大因患。因此，建立快速检测水生动物源致敏性蛋白含量的检测标准是保障消费者食用安全，保证食品安全的重要技术手段。

## 2.2建立完善的水生动物源致敏性蛋白检测标准已是形势发展之必然

近年来，食物过敏已经成为世界卫生组织（World Health Organization，WHO）和联合国粮农组织（Food and Agriculture Organization，FAO）关注的重大公共卫生学和食品安全问题。食品安全国家标准审评委员会发布了《食品安全国家标准预包装食品标签通则》，新标准明确规定“食品及其制品可能导致过敏反应，如果用作配料，应在配料表中使用易辨识的名称，或在配料表邻近位置加以提示”。其中，在我国标准中的过敏原食物中，水生动物占了两大类，分别为鱼类（包括海水鱼、淡水鱼）和甲壳类水生动物（虾、对虾、螃蟹、大小龙虾、蛤蜊等）。因此，为推进水产品过敏标签标识工作的顺利开展，建立完善的水生动物源致敏性蛋白检测标准已是形势发展之必然。

研发水生动物源典型致敏性蛋白含量检测的新方法，创建典型水生动物源致敏性蛋白如原肌球蛋白和小清蛋白等快速检测技术意义重大，旨在保障消费者的健康和安全以及促进相关水生动物源原料的快速可持续发展。对于发展我国具有独立自主知识产权的水生动物源致敏性蛋白标注产品具有重要意义，同时也是改善目前标注不确切和统一的现状，保障过敏人群健康安全的需要，对于美丽中国的建设同样具有重要的现实价值。

## 2.3水产品相关产业升级迫切需要标准提供技术支撑

随着世界经济全球化和贸易一体化，中国的食品安全和国际接轨是必然趋势。目前，过敏原风险控制在我国水产品食品企业尚未得到全面的重视，为了使企业更好地控制过敏原风险，应对出口贸易壁垒，建立水生动物致敏性蛋白质风险控制系统对我国水产品加工企业是非常有必要的。进行正确的过敏原标识，在保护了消费者的同时，也提高了企业自身的法规符合性，是对企业法规符合性和经济利益的保护。因此，建立水生动物源致敏性蛋白快速检测标准是必要的，能够帮助企业进行过敏原风险控制，为相关产业的升级提供技术支撑。

# 三、标准制定原则和依据

本标准是按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第一部分：标准的结构和编写规则》和GB/T20001.4-2001《标准编写规则第4部分化学分析方法》的要求，遵循先进性、科学性、实用性的原则对现行的有关标准进行修订。

# 四、主要工作过程

## 4.1 组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2017年12月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了《水生动物源典型致敏性蛋白含量的快速检测》初稿，对起草小组在标准起草过程中的一些思考及难点问题进行了深刻讨论，起草工作小组首先确立了标准制定的基本原则，各单位代表就标准的范围界定、内容等发表了各自的看法，确定了标准整体框架。

## 4.2 开展相关调研情况

为了更好地支撑标准实施，起草工作小组首先对国际和国内关于水生动物源典型致敏性蛋白含量的检测方法的相关标准和研究论文等资料进行了调研，重点收集分析了水生动物源典型致敏性蛋白含量检测的标准情况，完善了标准的框架结构及主要内容。

## 4.3 标准起草完善过程

在广泛调查研究的基础上，分析了当前水生动物源典型致敏性蛋白含量检测需求，结合方法的研究工作，依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则第4部分：试验方法标准》等标准编制要求，对《水生动物源典型致敏性蛋白含量的快速检测》标准开展了研制工作。通过大量的实验摸索、反复论证，确定了本标准方法设定的一系列重要参数：提取方式、仪器条件、方法检出限、回收率、精密度、线性范围等指标，开展了实际样品的检测，并对方法进行了验证。起草工作小组完成了《水生动物源典型致敏性蛋白含量的快速检测》国家标准（草案）。在2018年10月起草组组织专家对标准逐字逐句进行了讨论完善，形成了标准征求意见稿。

# 五、主要技术内容

## 5.1样品前处理

5.1.1 致敏蛋白的提取

采用两种致敏蛋白提取方法提取虾样品，通过考察原肌球蛋白（Tropomyosin，TM）的提取浓度确定最佳提取方法。

方法一：（1）用液氮研磨虾肉，直至粉末状；（2）提取液配制：8M尿素12 g，2M硫脲3.8 g，4％3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸1 g，用超纯水定容到25mL，于-80℃保存，临用前加入65 mM二硫苏糖醇、0.8%两性电解质（pH 3-10）；（3）称取0.1 g虾粉，添加1 mL的裂解液，于4℃冰箱中孵育2 h，其中每30 min斡旋震荡一次。之后4℃，10000 r/min下离心20min，吸取中间层的澄清液，分装保存于-80℃，应避免反复冻融。

方法二：（1）用液氮研磨虾肉，直至粉末状；（2）在预冷的1 mL Lysis Buffer中分别加入1 μL蛋白酶抑制剂、10 μL磷酸酶抑制剂及5 μL 100 mM PMSF，混匀后置冰上保存数分钟待用；（3）快速称取0.1 g虾粉置于1.5 mL预冷离心管中，加入1 mL上述混合液，混匀后4℃静置2 h；（4）10000 r/min，4℃离心5 min，取上清液，分装保存于-80℃，应避免反复冻融。

表1 不同提取方法提取同一虾样所得原肌球蛋白的浓度(n=6)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 方法 | 原肌球蛋白mg/mL | RSD(%) |
| 1 | 0.18 | 4.8 |
| 2 | 0.22 | 3.5 |

结果表明，方法2的原肌球蛋白提取浓度较高，因此采用该方法作为蛋白提取方法（表1）。

5.1.2蛋白质的纯化方法优化

由于食品基质的复杂性会影响毛细管电泳检测的灵敏度和选择性，蛋白质粗提后往往需要进一步的纯化和富集，本标准采用了阴离子交换层析法对提取的虾和鱼样品中的蛋白质进行纯化。

提取致敏蛋白后，采用DEAE Sepharose F.F.阴离子交换层析对虾蛋白浸液和鱼蛋白浸液进行分离纯化，步骤如下：

（1）开机：打开蛋白质纯化仪，同时打开软件，使计算机与仪器相连接；

（2）排气：将蛋白质纯化仪的A、B管置于经0.45 μm滤膜过滤、排气30 min的去离子水中，设置流速为 0.5 mL/min，流速稳定后用注射器分别对A1、A2、B1、B2四个流动泵进行排气；

（3）洗泵：对系统的A1泵、B1泵和系统管路进行清洗；

（4）上柱：设置流速为 0.5 mL/min，并设置柱压警报为0.5 mPa后打开柱连接器，先将DEAE Sepharose F.F. 1mL预装柱上口注满水然后快速拧紧柱连接器，同时快速打开柱下口螺母，待出水稳定后快速与柱连接器下方连接；

（5）洗柱：设置流速为 0.5 mL/min、柱压警报为0.5 mPa、用3倍柱体积的去离子水洗柱；

（6）将A，B管分别置于平衡缓冲液（10 mM Tris-HCl，pH7.5）与洗脱液中（0.5 mol/L NaCl溶液）。

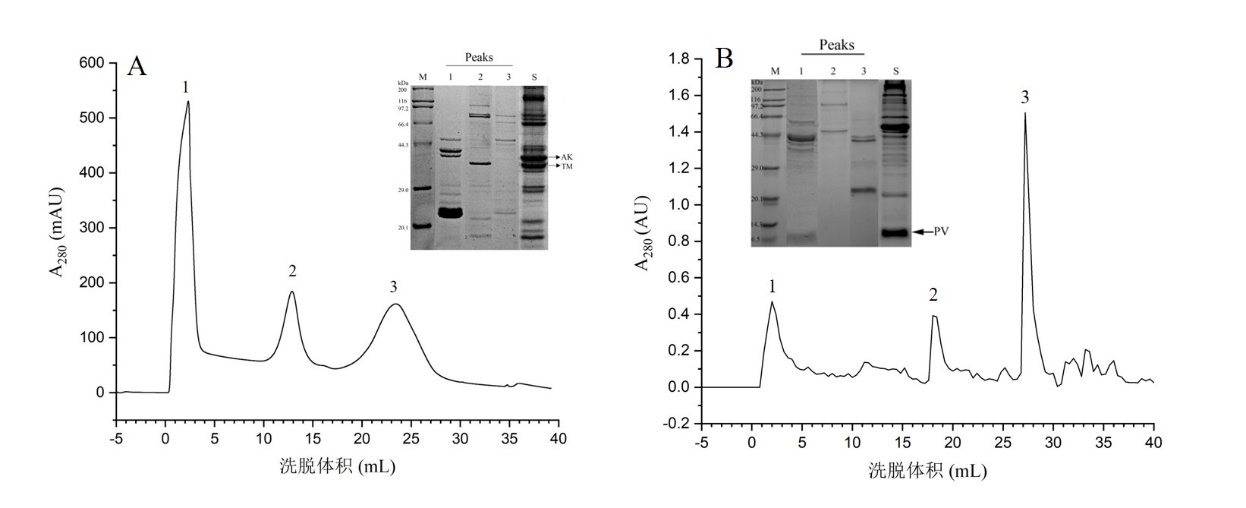
（7）上样：2 mL虾蛋白浸液和鱼蛋白浸液以0.5 mL/min的流速上样。

（8）设置紫外检测器检测波长为280 nm并运行实验方法，实验使用的其他DEAE Sepharose F.F.离子交换层析条件如表2所示。

表2 蛋白纯化仪DEAE Sepharose F.F.离子交换层析条件

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 洗脱状态 | 流动相 | 流速（mL/min） | | | 流动体积（CV） | 采集 |
| 柱平衡 | 100 % A | | 1.0 | 5 | | 否 |
| 上样 | 100 % A | | 1.0 | 3 | | 否 |
| 洗柱 | 100 % A | | 1.0 | 15 | | 否 |
| 线度洗脱 | 100 % B | | 1.0 | 40 | | 是 |
| 再平衡 | 100 % A | | 1.0 | 5 | | 否 |

（9）收集到的各洗脱峰溶液取部分用SDS-PAGE分析。所得样品冷藏备用（-80℃）。

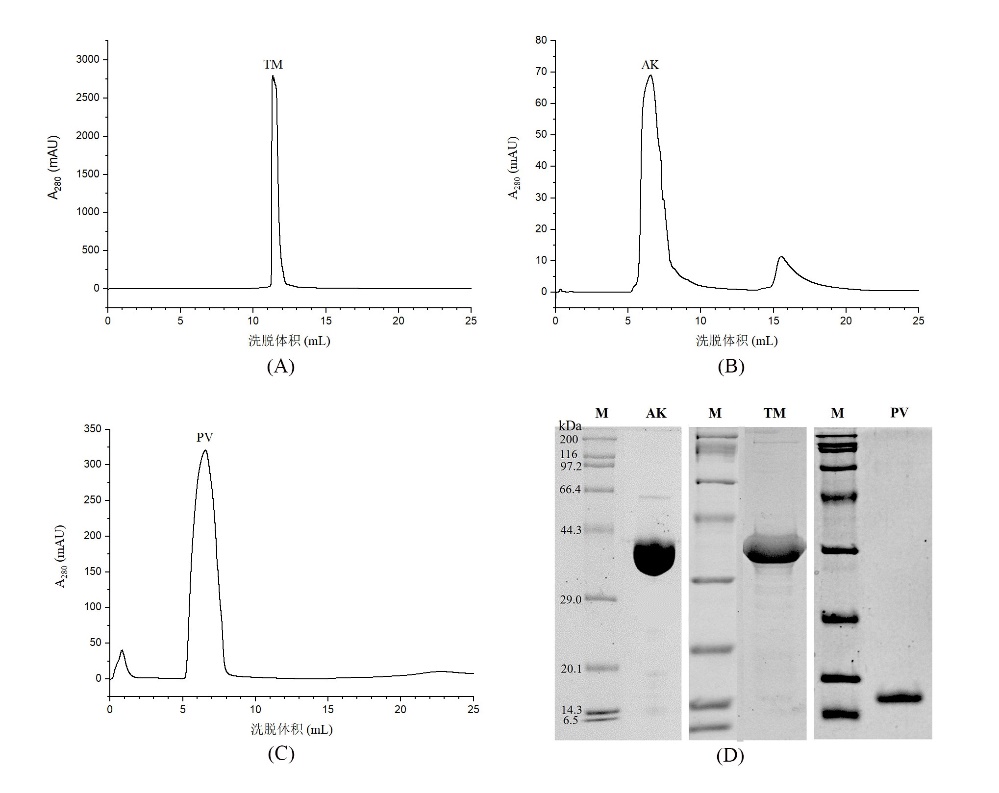
图1 DEAE Sepharose F.F.分离虾蛋白洗脱曲线和SDS-PAGE电泳图（A）；DEAE Sepharose F.F.分离鱼蛋白洗脱曲线和SDS-PAGE电泳图（B）

如图1所示，各泳道依次为：M、蛋白Marker ；S：原肌球蛋白粗提液；1、离子交换层析第1峰收集物；2、离子交换层析第2峰收集物；3、离子交换层析第3峰收集物。如图1A所示，精氨酸激酶（Arginine kinase，AK）在洗脱峰1中获得，收集管数为第1~5管；原肌球蛋白（Tropomyosin，TM）在洗脱峰2中获得，收集管数为第10~15管；小清蛋白（Parvalbumin，PV）在洗脱峰1中获得，收集管数为第1~5管。

5.1.3 样品前处理方法的回收率

表3致敏蛋白标品回收率 (n=6)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 洗脱前（mg） | 洗脱后（mg） | 回收率(%) |
| TM | 0.7716 | 0.7330 | 95% |
| AK | 0.0499 | 0.0474 | 95% |
| PV | 0.4338 | 0.4207 | 97% |

****图2DEAE Sepharose F.F.分离虾原肌球蛋白（A）、虾精氨酸激酶（B）、鱼小清蛋白（C）洗脱曲线和SDS-PAGE电泳图（D）

结果表明，经过DEAE Sepharose F.F.洗脱的TM、AK和TM均有较高的回收率，因此DEAE Sepharose F.F.可以作为样品预处理中致敏蛋白的纯化方法（表3）。

## 5.2 毛细管电泳条件的选择

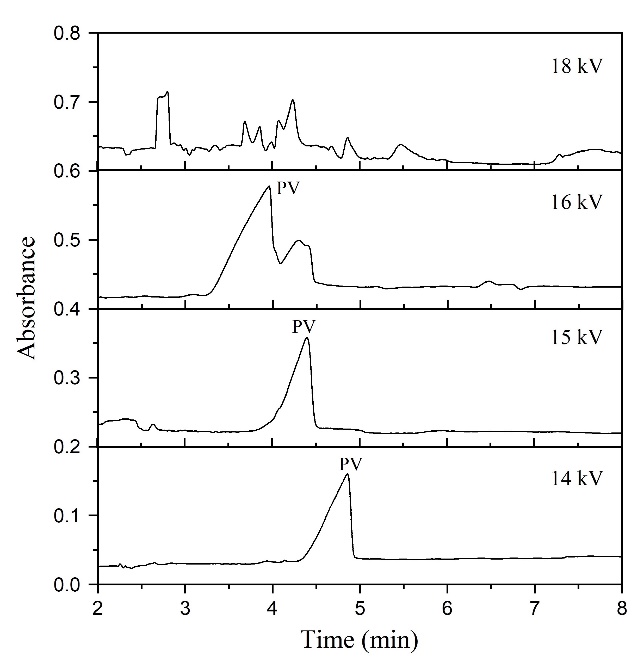
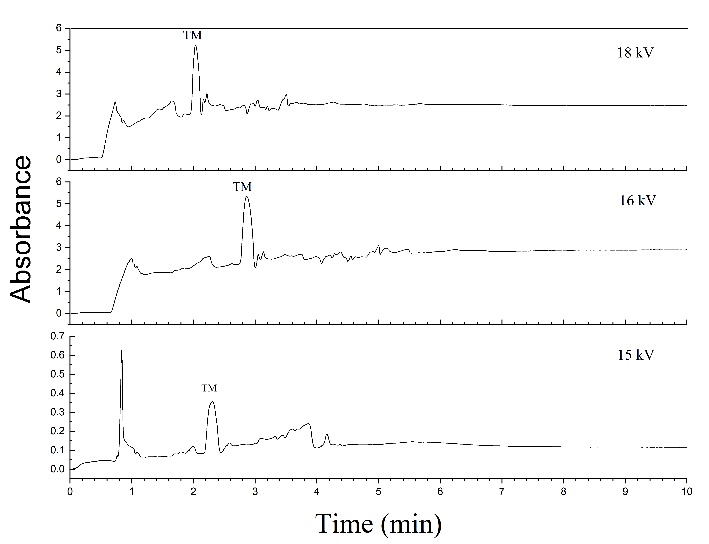
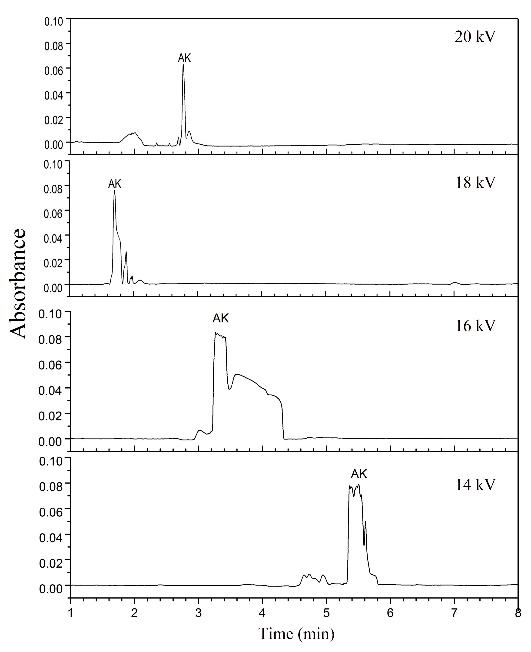
#### 5.2.1运行缓冲液的选择

运行缓冲液的种类、浓度和pH可以直接影响电渗流，从而影响样品的分离效果。因此，运行缓冲液的选择至关重要。由于三种致敏蛋白均为酸性蛋白，因此，应采用pH 7~10的缓冲体系，从而使蛋白带负电。同时，由于毛细管的表面也带负电荷，能有效减少毛细管壁对蛋白的吸附。在三种碱性缓冲液体系中，硼酸-硼砂缓冲液的分离能力优于Tris-HCl缓冲液和磷酸缓冲液，能得到较好的峰形和较短的迁移时间。此外，糖基化蛋白与硼酸根离子络合产生带负电的络离子，从而减小吸附[1]。因此本实验首选硼酸-硼砂缓冲液作为运行缓冲液。

5.2.2分离电压的选择

分离电压是影响毛细管电泳分离效果的重要因素。在低电压下，图谱表现为区带展宽且分离效果差，适当的升高电压可以使电渗流增加，峰形变锐，分析时间缩短。但是，在高电压下，电渗流的增大反而会导致区带展宽、分辨率和灵敏度下降[2]。为了验证分离电压对样品液中致敏蛋白分离效果的影响，本实验考察了14~20 kV分离电压下三种致敏蛋白的分离效果。

图3不同分离电压下虾精氨酸激酶（A）、鱼小清蛋白（B）和虾原肌球蛋白（C）的毛细管电泳图谱



(B)

(A)

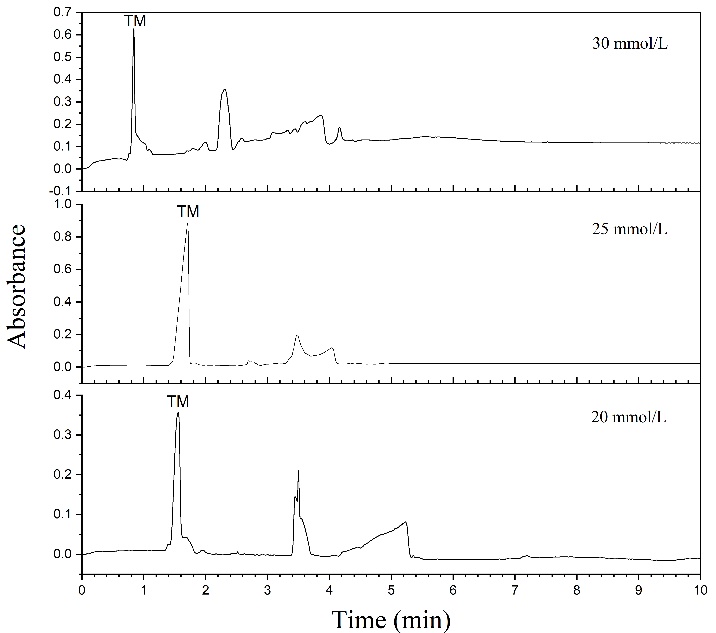
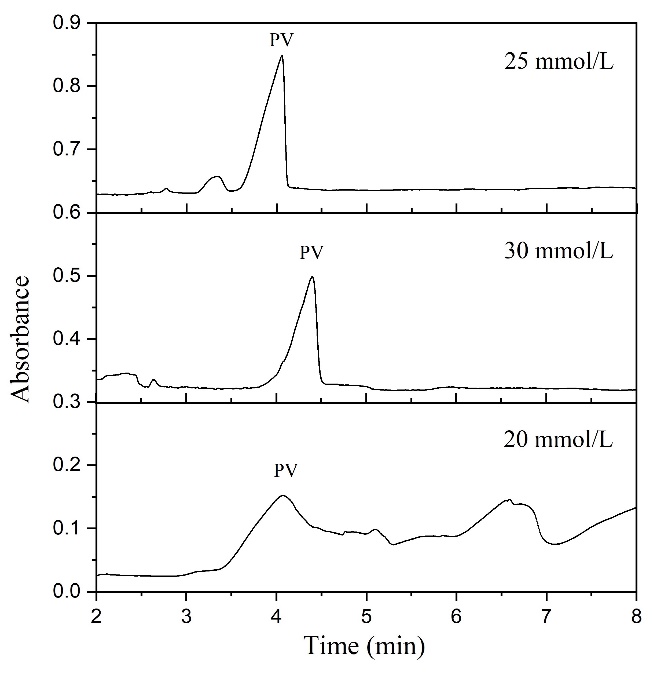
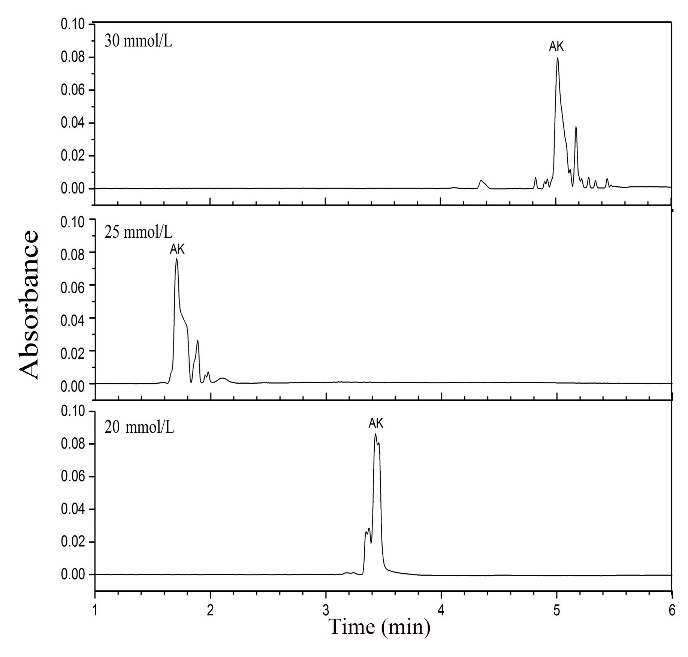
(C)

如图3所示，结果表明，分离电压为15 kV时，TM和PV表现为分辨率较高且分析时间较短。分离电压为18 kV时，AK表现为分辨率较高且分析时间较短。

#### 5.2.3运行缓冲液浓度的选择

缓冲溶液的浓度是影响电渗流的一个重要因素，它会直接影响电渗流的大小，从而影响分离度和灵敏度。随着缓冲液浓度的增加，图谱表现为峰形变锐，分辨率变大，灵敏度变高，但当缓冲液浓度超过一定限度后，过高的盐浓度会产生较大的电流强度，从而产生过多的焦耳热。表现为区带展宽、分离度下降，灵敏度变低[3]。为了验证缓冲液浓度对样品液中原肌球蛋白分离效果的影响，本实验保持分离电压为最佳分离电压不变，考察了硼酸-硼砂缓冲液浓度为20 mmol/L、25 mmol/L、30 mmol/L时，三种致敏蛋白的分离效果。

(A)



(B)

(C)

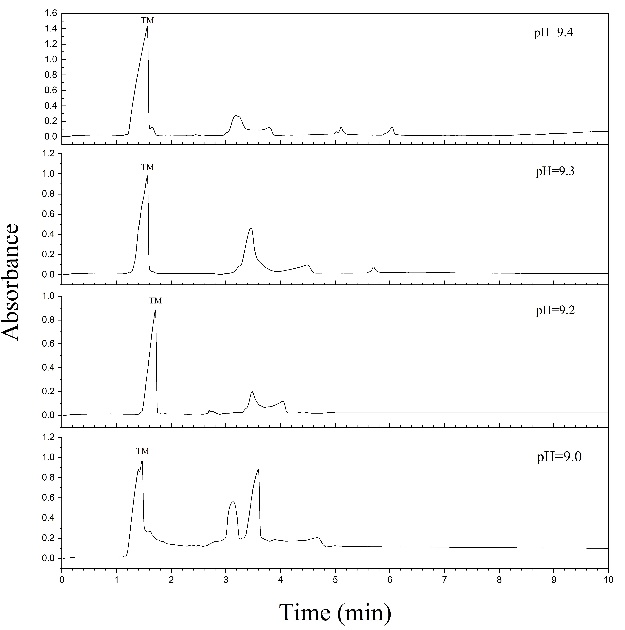
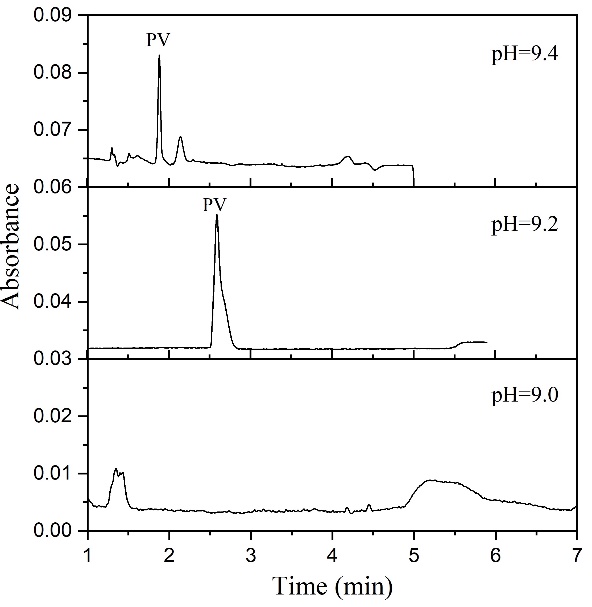
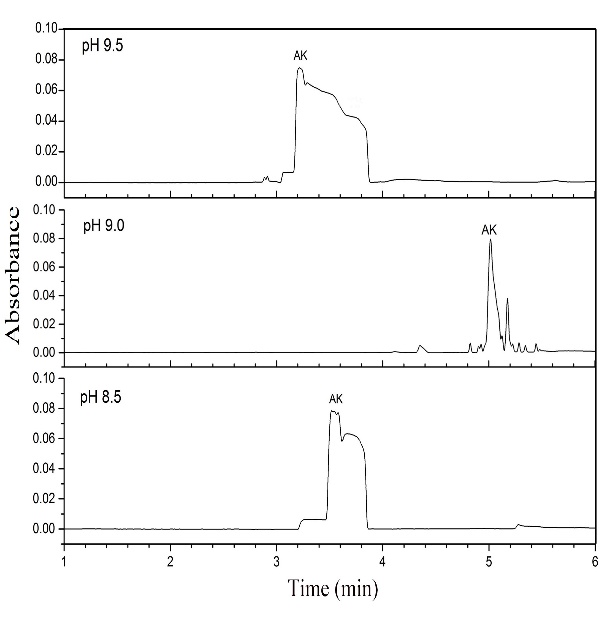
图4不同浓度缓冲溶液下的虾精氨酸激酶（A）、鱼小清蛋白（B）和虾原肌球蛋白（C）的毛细管电泳图谱

如图4所示，结果表明，随着硼酸-硼砂缓冲液浓度的增大，两峰间分离时间逐渐变长，且杂峰变少，分离效果明显。当硼酸-硼砂缓冲液的浓度为25 mmol/L时，AK、PV和TM的分离效果均达到最佳，表现为峰形较锐，分析时间较短。

#### 5.2.4 运行缓冲液pH的选择

缓冲溶液的pH值是毛细管电泳中影响原肌球蛋白迁移时间的重要因素，它不仅影响电渗流的大小，还会影响原肌球蛋白的电荷量。随着缓冲pH值的增大，图谱表现为电渗流增大、分析时间缩短、分辨率增大、灵敏度变高。但是，过高的pH值也会造成电渗流过大，从而使分辨率和灵敏度下降[4]。为了验证缓冲液浓度对样品液中原肌球蛋白分离效果的影响，本实验在保持运行缓冲液浓度为25 mmol/L、分离电压为最佳分离电压的实验条件下，考察了运行缓冲液pH为8.5~9.5时，三种致敏蛋白的分离效果。

(A)



(B)

(C)

图5不同pH缓冲溶液下的虾精氨酸激酶（A）、鱼小清蛋白（B）和虾原肌球蛋白（C）的毛细管电泳图谱

如图5所示，结果表明，当硼酸-硼砂缓冲液的pH为9.2时，PV和TM的图谱表现为峰形变锐、分辨率变高、杂峰变少、灵敏度增大；当硼酸-硼砂缓冲液的pH为9.0时，AK的图谱表现为峰形变锐、灵敏度增大。

综上所述，PV和TM的最佳分离条件为分离电压15 kV、运行缓冲液为25 mmol/L硼酸-硼砂缓冲液（pH=9.2）；AK的最佳分离条件为分离电压18 kV、运行缓冲液为25 mmol/L硼酸-硼砂缓冲液（pH=9.0）。

# 六、验证情况及结果分析

#### 6.1标准曲线、线性范围及检出限

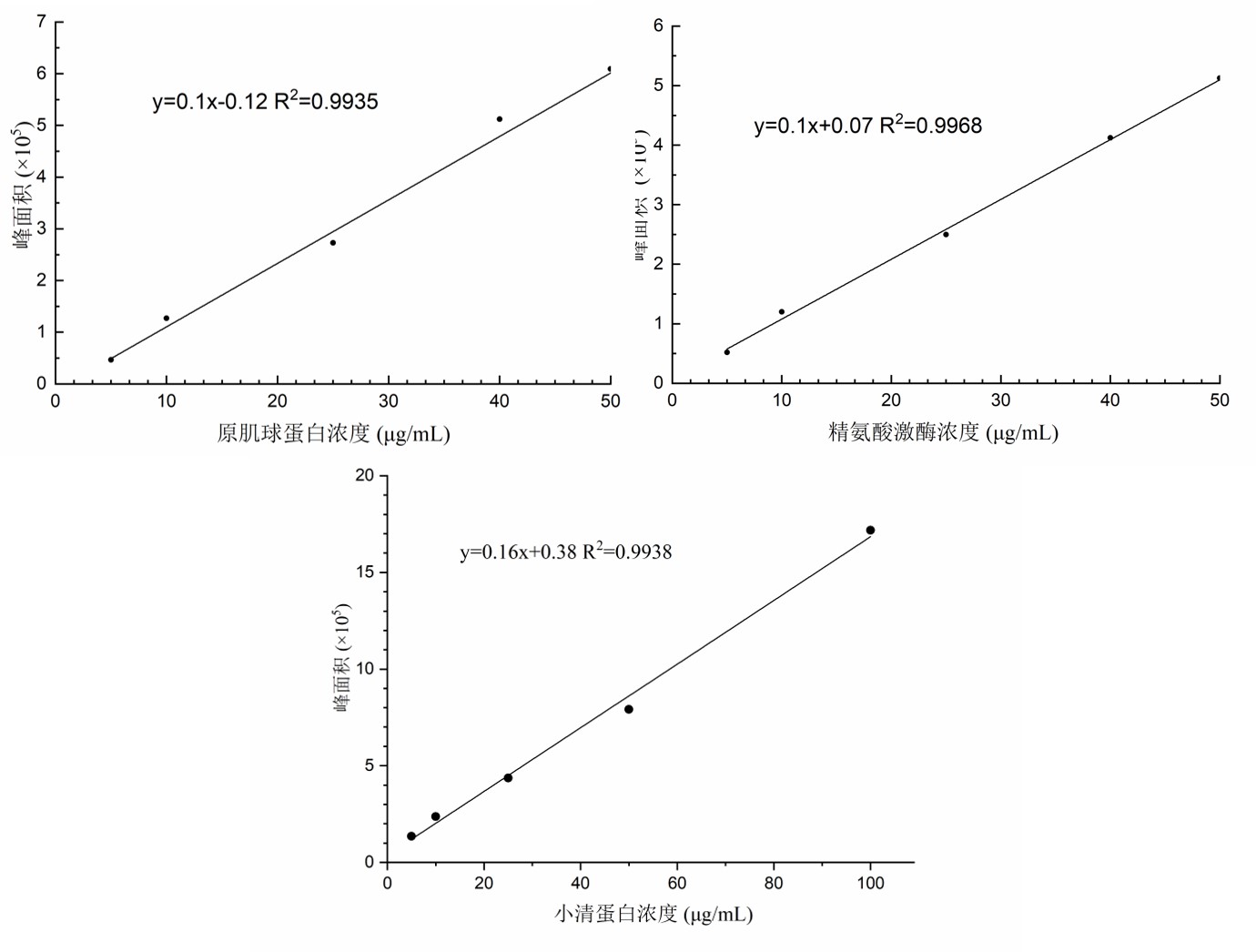
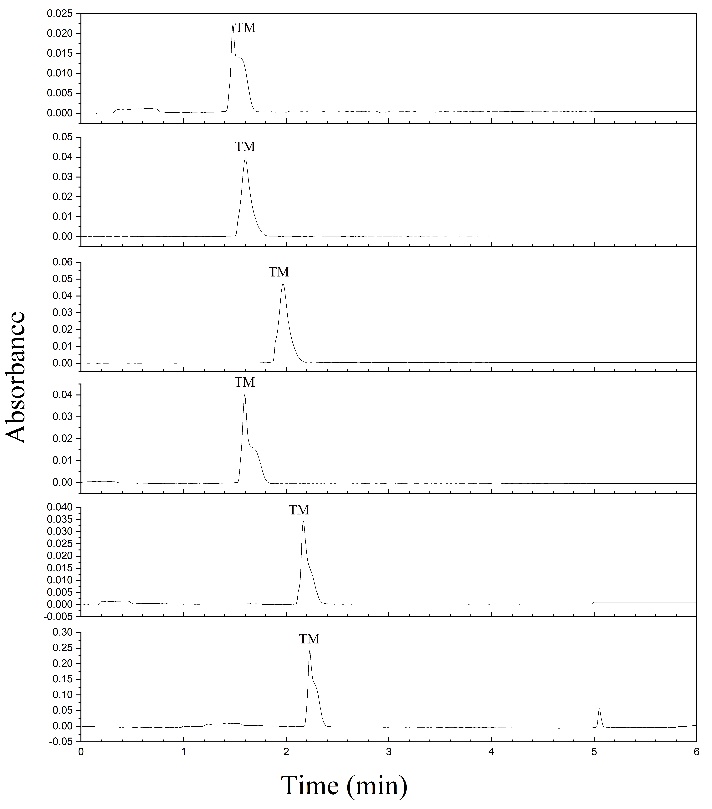
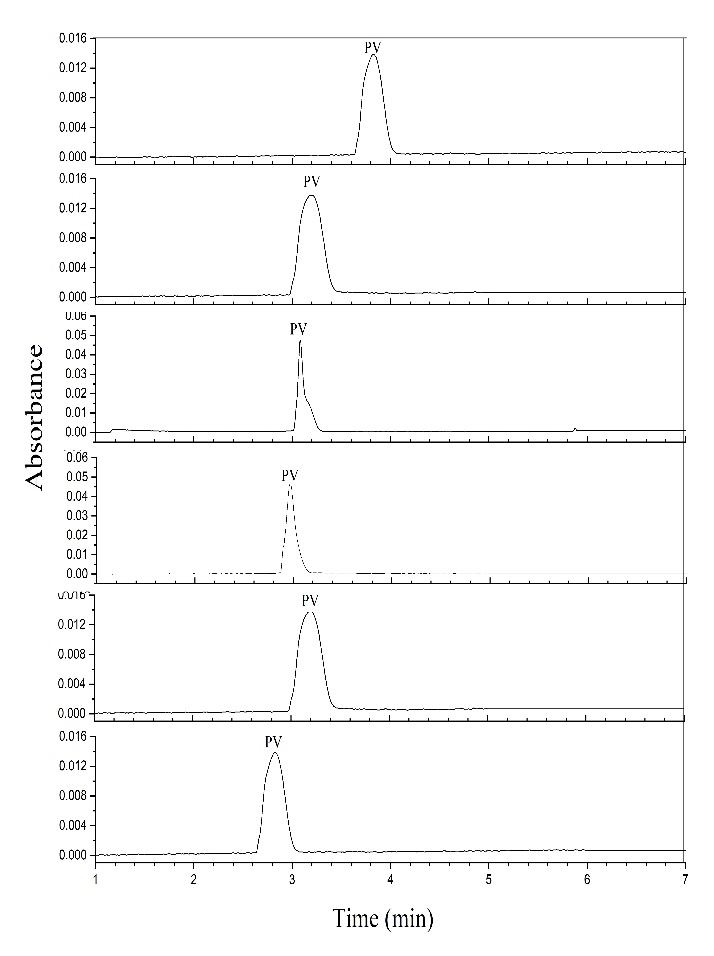
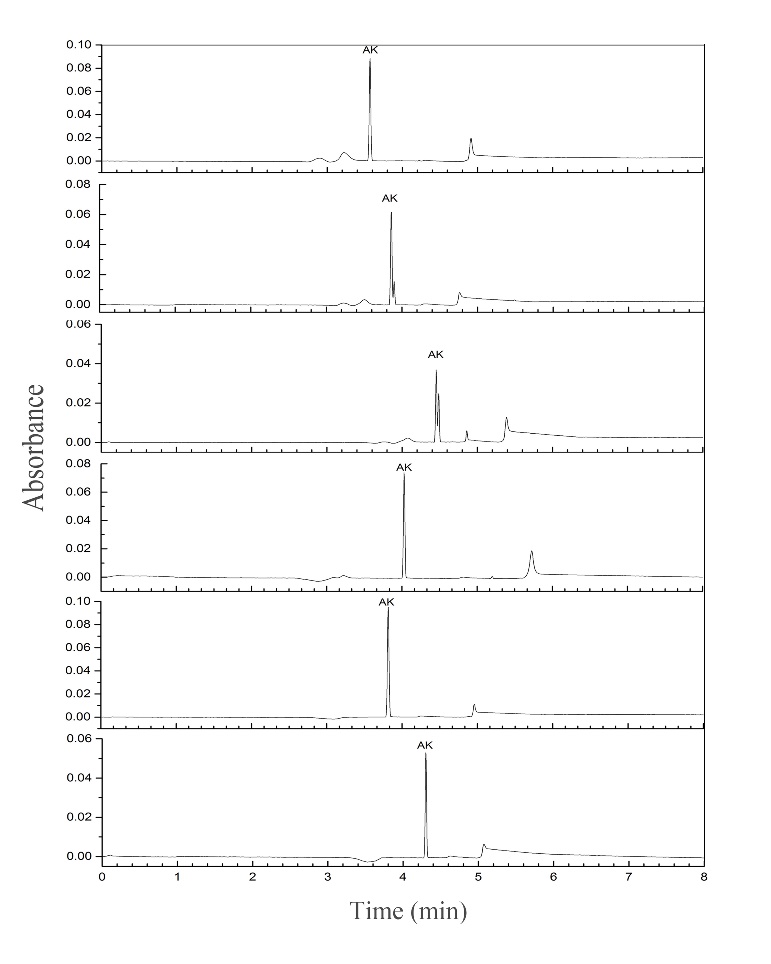
用0.01 M PBS（pH=7.4）精密配制TM和AK的标准溶液5、10、25、40、50μg/mL，以及PV的标准溶液5、10、25、50、100 μg/mL进样，在上述电泳条件下，每个样品重复3次，依次进样检测，外标法定量，以峰面积对浓度进行线性回归，校正峰面积（A）与质量浓度（ρ，μg/mL）具有良好线性关系。

图6致敏蛋白的标准曲线

如图6所示，线性范围为5~100 μg/mL，检出限（S/N=3）分别为1.2 μg/mL（AK）、1.1 μg/mL（TM）和0.71 μg/mL（PV）。

#### 6.2方法重现性和精密度

按上述样品预处理方法，平行处理6份样品，每一份含虾粉0.1 g，所得样品液连续6次进样，毛细管电泳图谱如图7所示，分析此方法的批内和批间差异，如表4所示。



(C)

(A)

(B)

图7最佳条件下虾精氨酸激酶（A）、鱼小清蛋白（B）和虾原肌球蛋白（C）的毛细管电泳图谱

表4方法的重现性

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 致敏蛋白 | 迁移时间 (min) | 批间 RSD (n=6) | | 批内 RSD (n=6) | |
| 迁移时间 | 峰面积 | 迁移时间 | 峰面积 |
| AK | 4.1 | 6.9% | 4.7% | 6.8% | 6.4% |
| TM | 1.9 | 6.3% | 5.7% | 7.6% | 4.8% |
| PV | 2.9 | 5.6% | 6.3% | 6.8% | 4.5% |

结果表明，经过对被测组分的含量考察后发现，此方法的相对标准偏差为4.5~6.9%。所以，此方法满足方法学的要求。

## 6.4样品分析和加标回收

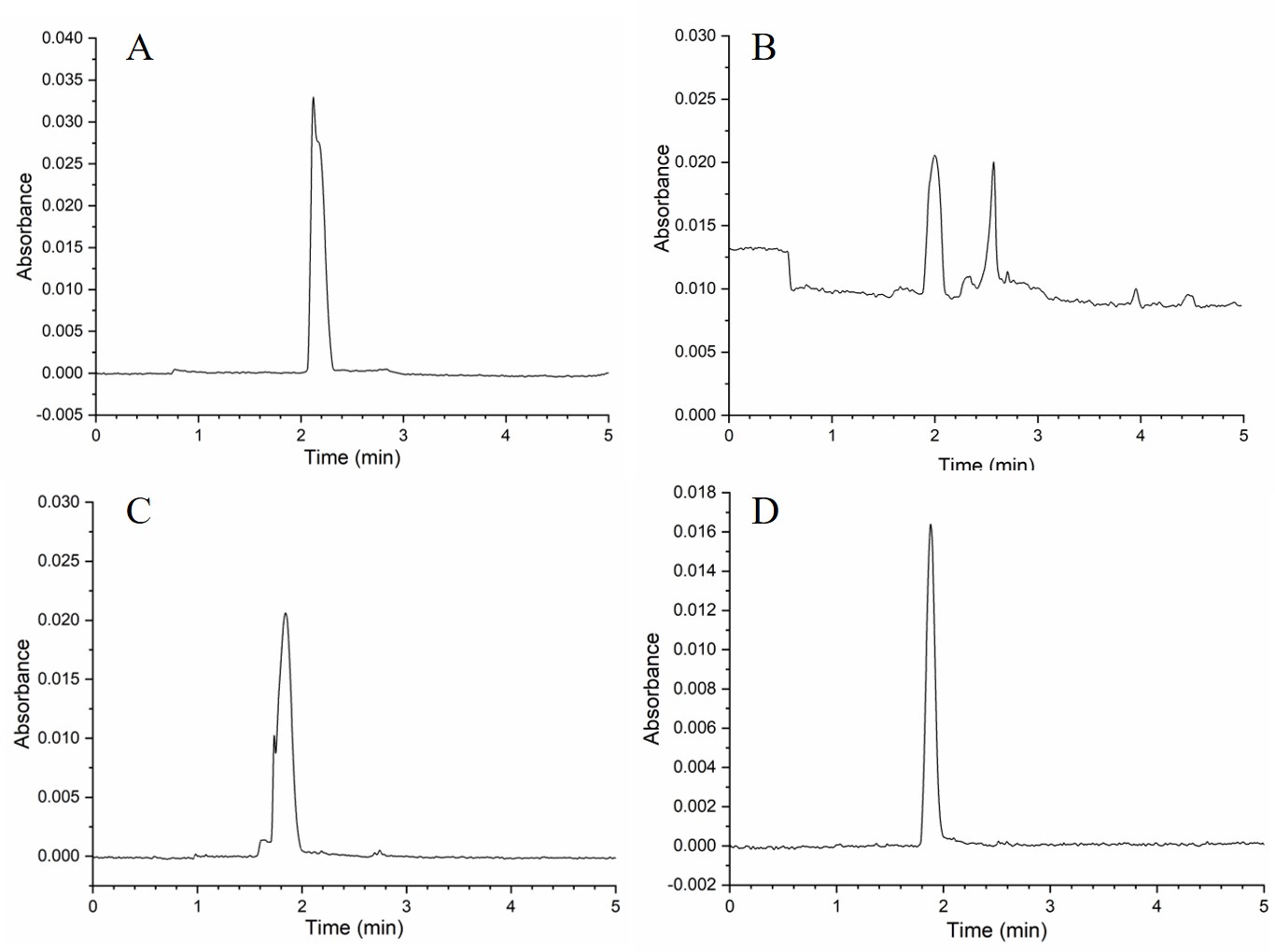
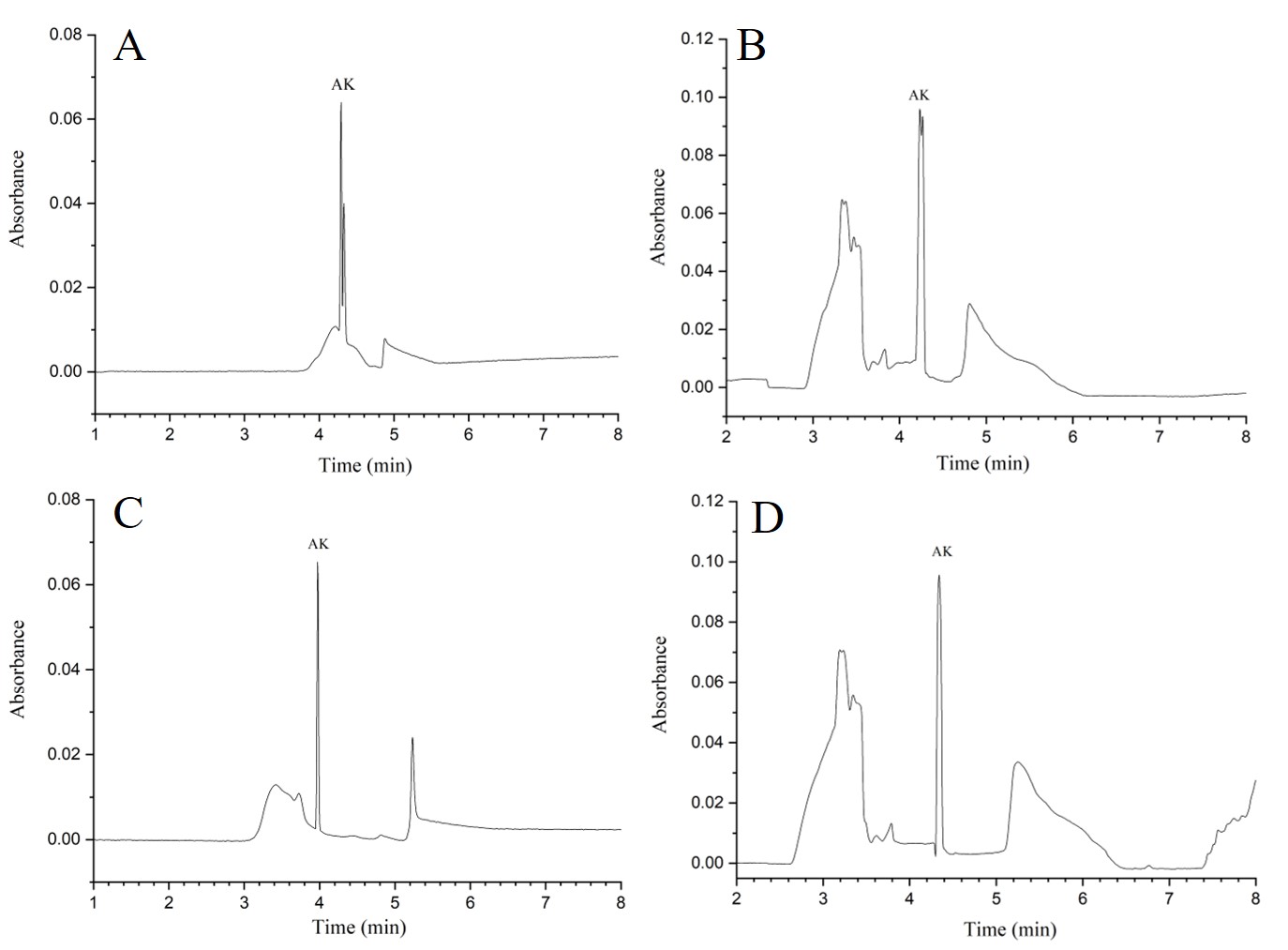
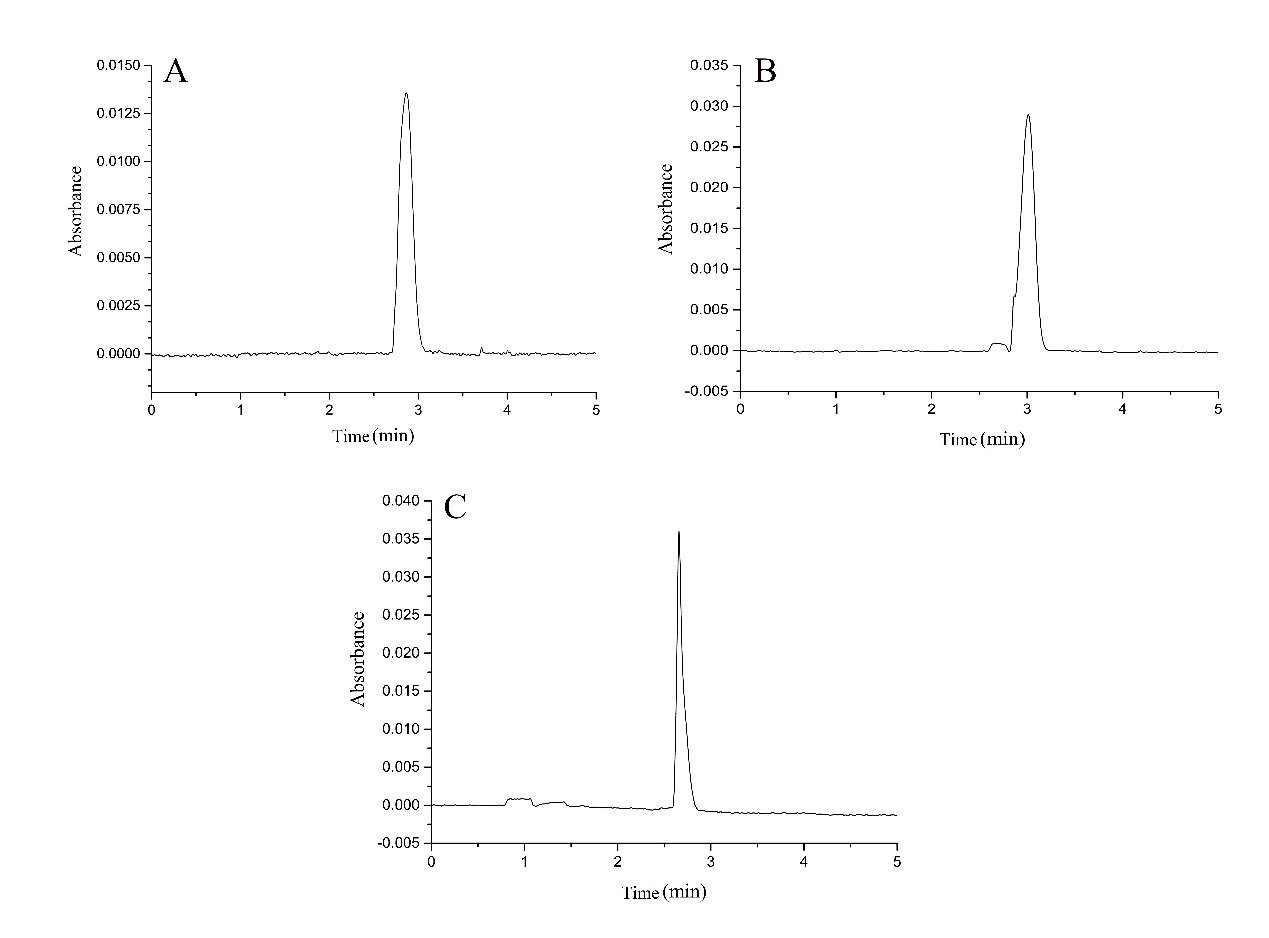


图8鹰爪虾（A）、中国对虾（B）、斑节对虾（C）、南美白对虾（D）样品的原肌球蛋白毛细管电泳图谱

图9鹰爪虾（A）、中国对虾（B）、斑节对虾（C）、南美白对虾（D）样品的精氨酸激酶毛细管电泳图谱

图10草鱼（A）、鲫鱼（B）、黑鱼（C）样品的小清蛋白的毛细管电泳图谱

按上述样品预处理方法分别对鹰爪虾、中国对虾、斑节对虾、南美白对虾、草鱼、鲫鱼和黑鱼进行处理，每种虾所取虾粉皆为0.2 g。在上述实验最优化条件下，分别对样品溶液进行测定，每个样品连续进样检测三次。毛细管电泳图谱如图8~10所示，计算得到样品含量如表5所示。

表5不同水生动物样品中致敏蛋白的含量（n=3）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 精氨酸激酶（AK） | 原肌球蛋白（TM） | 小清蛋白（PV） |
| 浓度  (μg/mL) ± SD | 浓度  (μg/mL) ± SD | 浓度  (μg/mL) ± SD |
| 鹰爪虾 | 11.60±1.40 | 15.75±0.90 | — |
| 中国对虾 | 13.10±1.85 | 12.70±1.40 | — |
| 斑节对虾 | 10.65±1.40 | 15.15±1.40 | — |
| 南美白对虾 | 9.80±1.80 | 10.00±0.25 | — |
| 草鱼 | — | — | 4.10±0.58 |
| 鲫鱼 | — | — | 9.30±0.85 |
| 黑鱼 | — | — | 7.20±0.40 |

在上述所测定的四种虾样品溶液中，等量加入10 μg/mL的致敏蛋白标准溶液，进行加标回收实验。实验结果如表6所示，结果表明，其加标回收率在91.5%~109.5%之间，说明方法的准确度较高。

表6精氨酸激酶加标回收率测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 本底值  （μg/mL） | 真实值  （μg/mL） | 测定值  （μg/mL） | 回收率  （%） |
| 鹰爪虾 | 11.60 | 10.80 | 11.45±1.30 | 106.1 |
| 中国对虾 | 13.10 | 11.55 | 12.24±1.60 | 105.7 |
| 斑节对虾 | 10.65 | 10.33 | 9.45±1.55 | 91.5 |
| 南美白对虾 | 9.80 | 9.90 | 10.39±1.20 | 104.9 |

表6原肌球蛋白加标回收率测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 本底值  （μg/mL） | 真实值  （μg/mL） | 测定值  （μg/mL） | 回收率  （%） |
| 鹰爪虾 | 15.75 | 12.87 | 12.36±0.85 | 96.2 |
| 中国对虾 | 12.70 | 11.35 | 12.37±0.66 | 109.5 |
| 斑节对虾 | 15.15 | 12.57 | 11.81±1.00 | 94 |
| 南美白对虾 | 10.00 | 10.00 | 10.71±0.45 | 107.8 |

表7小清蛋白加标回收率测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 本底值  （μg/mL） | 真实值  （μg/mL） | 测定值  （μg/mL） | 回收率  （%） |
| 草鱼 | 4.10 | 7.05 | 6.50±0.075 | 92.2 |
| 鲫鱼 | 9.30 | 9.65 | 10.10±0.95 | 104.7 |
| 黑鱼 | 7.20 | 8.60 | 8.10±0.088 | 93.8 |

## 6.5实验室间验证

本方法按照有关要求选取了有代表性的样品进行实验室间验证实验。为验证此方法的稳定性，平行处理6份虾糜样品，每一水平平行测定6次，采用毛细管电泳法检测原肌球蛋白和精氨酸激酶的含量，方法的批间RSD为4.3%~5.4%；平行处理6份鱼糜样品，每一水平平行测定6次，采用毛细管电泳法检测小清蛋白的含量方法的批间RSD为3.7%~6.5%。

## 6.6 结论

本标准建立了水生动物源典型致敏蛋白原肌球蛋白和小清蛋白的毛细管电泳测定和确证方法。本方法参照相关标准和文献的基础上，通过对实验各项参数优化，找出最佳的提取和净化条件。室内准确度和精密度实验表明，分别以鹰爪虾、中国对虾、斑节对虾、南美白对虾为添加基质，方法的平均回收率范围为92.1%~109.5%，相对标准偏差（RSD）均在10%以内。

# 七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

## 7.1 食物过敏

食物过敏又称变态反应，是指机体受到抗原刺激后，产生相应的抗体或致敏淋巴细胞，当再次接触到同一抗原后在机体内激活人体细胞，诱导产生特异性抗体应答，由此导致组织损伤或机体生理机能障碍。引起食物过敏的抗原被称为食品过敏原，一般来说，食品过敏原为分子量介于10 kDa-70 kDa之间的蛋白或糖蛋白。据报道，有8类食物经常引起过敏反应，占总过敏案例90％以上，它们分别为：蛋、牛奶、鱼类、甲壳类动物、花生、大豆、核果类食物及小麦。在世界卫生组织报告指出威胁人类健康的因素中，食物过敏排在第4位。在近年来国内外食品有关的警示通报中过敏原问题数量排名第2，仅次于微生物污染，成为国际政府和公众广泛关注的食品安全问题之一。

从目前研究情况来看，避免接触含有过敏原的食品或食物成分是降低食物过敏发生的有效措施，而通过对食品标签内容进行适当标注被认为是有效的商业措施。国外许多国家都加强了对食品过敏原的标识管理，完善了食品中过敏原管理的法规和标准体系，并于近年来开始实际运用于食品相关行业中。欧盟2003/89/EC指令对食品生产和经销者进行监管，欧盟2006/142/EC指令则列出了14种必须明确标注的食品过敏原。美国《2004年食物致敏原标签和消费者保护法》将牛奶、鸡蛋、鱼类、甲壳贝类动物、坚果、小麦、花生和大豆列为需要强制性标识的主要致敏原。与发达国家相比，我国对食品过敏原的研究和关注水平存在较大差距，食品过敏原问题也是目前我国食品出口企业被外方通报的最主要问题。我国食品中过敏原标识的管理还处于起步阶段，最早与食品中过敏原标识相关的管理标准为2008年北京奥运会期间颁布的《奥运会食品安全食品过敏原标识标注》，并于奥运会结束后废止。2009年，我国为加强食品中过敏原的管理，颁布了推荐性的国家标准GBT23779-2009《预包装食品中的过敏原成分》，该标准对过敏原进行了定义，并列举了8 类推荐性标识的食物过敏原。2012年，GB7718-2011 《预包装食品标签通则》的颁布首次正式将食品中过敏原的标识问题纳入标签管理的范畴。2018年，我国新颁布了《食品安全国家标准预包装食品标签通则》，该标准明确规定食物过敏原成分应使用易辨识的名称加以提示。

目前最常使用的检测过敏原的分析方法是基于抗体的酶联免疫吸附测定（ELISA）方法和基于DNA的聚合酶链式反应（PCR）方法。但是，ELISA 方法的特异性取决于抗体的制备，这限制了其应用范围，并且容易存在交叉反应或者产生假阳性结果，其次，食物在加工过程中存在过敏原降解和结构改变的现象，从而产生假阴性结果。PCR方法虽然可以实现多种目标物同步检测，但是PCR方法是通过检测食物过敏原蛋白的特异性DNA从而测定过敏原蛋白，无法检测DNA尚不清楚的过敏原蛋白，并且容易出现假阳性结果。两种方法都难以适用于当今各种复杂食品的检测。因此，建立一个能直接检测致敏蛋白的检测方法用于食品中的敏原的定量测定无疑是非常必要的。毛细管电泳技术集凝胶电泳和液相色谱应用于一身，对极性或非极性的小分子和大分子皆可分离，具有高灵敏度、高分辨率和相对较低成本的特点。研究表明，毛细管电泳法还具有操作时间短、分离效率高、样品用量少等特点，在操作过程中不使用有机溶剂，操作安全性高，已经逐渐成为当代分析科学中最具活力、经济、绿色的研究手段和仪器。同时，研究发现，毛细管的柱效与分子的扩散系数呈反比，而蛋白质恰好具有扩散系数小的特点，这就意味着毛细管电泳非常适合蛋白质含量的分析，有着其他方法无法比拟的优势。目前毛细管电泳在其他蛋白质含量的检测中已经逐渐体现这种优势，成为目前国内外研究和分析中的有力工具，也逐渐被使用者认可并被大多数的蛋白质分析实验室配备。研究学者也逐渐意识到，利用毛细管电泳的特色，建立相应的快速检测方法是开展标准和规范制定的前提条件和技术支撑。随着现代分析手段的进步和毛细管电泳技术的快速发展，毛细管电泳已经逐渐配备到实验室中，成为一种常规的检测仪器设备。本标准利用高校毛细管电泳，选择水生动物中主要过敏原蛋白为研究对象，建立检测食物中过敏原的快速准确检测方法。

## 7.2 相关检测标准及方法汇总

目前，国内现行的涉及食品过敏原检测的标准共计41项，主要为出入境检验检疫系列行业标准，检测目标为过敏原蛋白和过敏原物质。所涉及的方法主要包括酶联免疫吸附法、实时荧光PCR法、芯片法和环介导等温扩增（LAMP，Loop-mediated isothermal amplification method，技术）方法。其中4项标准与水生动物过敏原检测相关：

（1）实时荧光PCR方法：该方法涉及两项出入境检验检疫行业系列标准，分别为SN/T 1961.14-2013《出口食品过敏原成分检测第14部分：实时荧光PCR方法检测鱼成分》和SN/T 1961.10-2013 《出口食品过敏原成分检测第10部分：实时荧光PCR方法检测虾蟹成分》。该标准采用分子生物学方法，以DNA为模板，采用特异性检测引物和探针进行扩增后，判断样品中是否存在相关过敏原物质。

（2）可视芯片法：该方法涉及一项出入境检验检疫行业标准SN/T 4417-2016《常见食品过敏原可视芯片检测方法》。该方法基于标记探针的芯片，以生物素标记的DNA为模板，采用特异性检测引物和探针进行扩增后，判断样品中是否存在相关过敏原物质，可以测定8种常见食品过敏原成分，但是该方法只能用于定性检测食品过敏原。

（3）环介导等温扩增法：该方法涉及一项出入境检验检疫行业标准SN/T 4419.22-2016《出口食品常见过敏原LAMP系统检测方法第22部分：虾》，该方法以多种特异引物为模板，利用一种链置换DNA 聚合酶在等温条件(63 ℃左右) 保温30－60分钟，即可完成核酸扩增反应，从而样品中是否存在相关过敏原物质。

本标准中所采用的方法与上述标准不同。本标准采用毛细管电泳方法，将从样品提取的过敏原蛋白进行检测，实现过敏原蛋白的精确定量。该方法直接对过敏原蛋白进行处理和检测。本标准适用于水生动物源中致敏蛋白的毛细管电泳测定和确证，其他食品可参照使用。

# 八、标准属性建议

本标准为推荐性国家标准。

# 九、贯彻国家标准的要求和措施建议

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

# 十、其他应予说明的事项

无其他事项说明。