

综述

食物中潜在致敏物质的评价研究进展

黄琼 徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:食物中的潜在致敏物质包括天然存在和人工修饰两种来源,转基因食品的致敏性一直是其食用安全性评价的重要部分,本文以转基因食品为例对食物中潜在致敏物质的评价策略和方法研究进展进行了综述。

关键词:食物;致敏物质;安全性评价

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0179-06

Progress on the Potential Allergenicity Assessment of Food

HUANG Qiong, XU Hai-bin

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Potential allergenic substances in food are derived from natural origin or artificial modification. The allergenicity assessment is an important part for the food safety evaluation of plant genetically modified organisms (GMOs). Take GMOs as an example, the progress on the strategy and method for the potential allergenicity assessment of food were reviewed.

Key words: Food; Potential Substances Allergenic; Assessment

食物中潜在的致敏物质不外乎天然存在和人工修饰两大类来源。天然存在食物的致敏性主要是针对那些在某地区以前未有广泛食用习惯的或新发现的食物致敏原,例如15年前在地中海地区新确认的一种来源于蔷薇科水果(桃、苹果、草莓、葡萄等)的食物致敏原——非特异性脂质转运蛋白(non-specific lipid transfer proteins, nsLTPs)^[1]。随着食品贸易的不断全球化,人们接触到更多非传统食物,因为遗传等因素的差异,这些非传统天然食物的潜在致敏性需要考虑和关注,但由于其种类繁多、敏感人群不确定等原因,临床过敏病例是确认新的天然食物致敏原的主要途径。

另一大类需要评价和鉴定其潜在致敏性的则是人工修饰食物,目前主要包括以基因工程为代表的现代生物技术改造食品,如重组DNA植物、重组DNA微生物和重组DNA动物来源食品,又称转基因食品(transgenic foods)等。转基因食品的致敏性一直是其食用安全性评价的重要部分,评价技术不断发展并趋于系统和成熟化,本文以转基因食品为

例综述目前关于食物中潜在致敏性物质评价的研究进展。

1996年国际食品生物技术委员会(IFBC)和国际生命科学学会过敏和免疫研究所(ILSI/AII)联合发布了判定树方法(decision tree approach),第一次系统地提出了评价转基因食品潜在致敏性的方法和原则^[2]。2001年国际粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)联合专家委员会对该判定树进行了发展,并推荐了一些新的评价方法^[3]。2003年国际食品法典委员会(CAC)在第26届会议上通过了生物技术食品安全评估的原则和准则,主要对重组DNA植物和微生物食品安全评估的准则进行了规定和统一,其中强调了转基因食品的潜在致敏性评价不能采用单一因素判定,推荐采用基于多学科和实验的“证据权重(weight of evidence)”方法综合评价^[4]。欧洲食品安全局(EFSA)也在2004年提出了基因改造和来源植物的风险分析指南,规定了新表达蛋白和全转基因植物的潜在致敏性评价程序和方法^[5]。基于这些不同推荐方法的相似或差异性带来的评价数据分歧等原因,美国环保局(US EPA)下属的研究和发展办公室(ORD)发起了旨在解决这些分歧和改进不同方法或评价终点的研究项目,最近又通过与美国国家过敏与感染性疾病研究所(NIAID)的合作进一步推动转基因食物的致敏性评价工作^[6]。

收稿日期:2009-08-28

基金项目:国家科技部973计划(2007CB109207);国家质检公益性行业科研专项项目(2007GYJ046)

作者简介:黄琼,女,博士生,工作单位为广东省疾病预防控制中心,研究方向为食品毒理, E-mail: huangqiong18@yahoo.com.cn

1 转基因食品潜在致敏性评价策略和程序的发展

转基因食品的潜在致敏性评价包括上市前鉴定和上市后监测,对上市后的转基因食品进行致敏性评价和监测有利于保证食品的安全性。其主要手段是建立不良反应报告系统,报告的主要内容包括:1)与致敏性相关的临床结果;2)报告的不良反应与特定转基因食品成分的因果关系。理论上该报告系统非常理想,但众多因素限制了转基因食品上市后监测系统的可行性:1)转基因食品或成分的标示;2)缺乏相关食物过敏的发生率和流行情况的背景资料;3)存在许多混杂因素;4)人们的膳食随时间而改变;5)缺乏训练有素的专家和基础设施,这在发展中国家尤为突出^[3]。所以,基于上述限制因素和对人群健康的危害以及社会、经济影响等考虑,应该重视上市前的鉴定和评估工作。

传统的毒理学试验和风险评估程序并不适用于全成分转基因食品的危害鉴定,主要原因与动物试验中营养价值和膳食平衡被破坏有关,发现任何潜在的不良反应并将此绝对与食品的某单一特性相联系是非常困难的。重组 DNA 植物的安全性评价需要多学科联手解决,人们需要转换思维来认识转基因食物的安全性评价策略。实质等同 (substantial equivalence) 的概念是 2000 年 FAO/WHO 在瑞士日内瓦召开的生物技术食品联合专家磋商会议上确定下来的,也是迄今为止被认为评估转基因食物最适当的战略措施。用实质等同方法进行的安全评估并不意味着新产品是绝对安全的,它注重的是新产品相对其传统对比物 (traditional counterpart) 的安全性,它本身不是安全性评估,却代表了一个起点,通过有效验证的试验方法和适宜的统计分析手段,用来确定新食品和其传统对比物之间的预期或非预期的相似和差异,最终得出实质等同、部分实质等同或实质不等同 3 种评估结果^[7]。

目前还没有唯一的权威方法可以预测人类对新表达蛋白的过敏反应,因此全面 (integrated)、逐步 (step wise) 和个案 (case by case) 分析是目前转基因食品新表达蛋白潜在致敏性的评估原则。全面是指要综合多学科、多种数据信息进行综合评价;逐步是指将转入基因的来源按有无致敏性分类后,依据判定树的方法逐步评定其可能致敏性;而个案是指具体情况具体分析,尊重和重视临床不良反应报道和针对性的科学研究结果。

判定树分析法 (decision tree approach) 是转基因食品潜在致敏性评价的具体程序和方法,1996 年 IFBC/ILSI 制定的判定树分析法包括结构分析和氨基酸序列比较、理化特性研究如消化稳定性和热稳

定性、蛋白质在食物中的含量及消费模式等^[2]。2001 年,FAO/WHO 在 IFBC/ILSI 判定树的基础上进行了修改和补充,使其更加完善^[3],两个判定树的主要比较之处见图 1^[8]。另外,食物中新蛋白的表达水平以及非预期效应也是需要重点考虑的两个因素。强致敏原的表达水平一般比较高,但毫克水平的致敏原就能使敏感个体致敏。敏感个体低水平暴露时就能表现出食物过敏的客观症状,虽然有研究表明暴露水平低于 500 μg 引起过敏反应的可能性不大,但目前普遍认为尚不能确定一种蛋白质不诱发致敏性的安全表达水平,这也是在 2001 年 FAO/WHO 转基因食品致敏性评价推荐指南中不再强调蛋白质表达水平的原因;就转基因食品的潜在致敏性而言,还要特别注意两类非预期效应:1) 转入基因激活或抑制宿主基因,使其特定蛋白质过度表达或低表达。如果宿主植物中含有已知致敏蛋白,则存在致敏原水平表达升高的可能性;2) 转基因食品与传统食品比较后,如果有证据表明转入基因产生了新蛋白质,则要对这些蛋白质的致敏性进行评价^[3]。

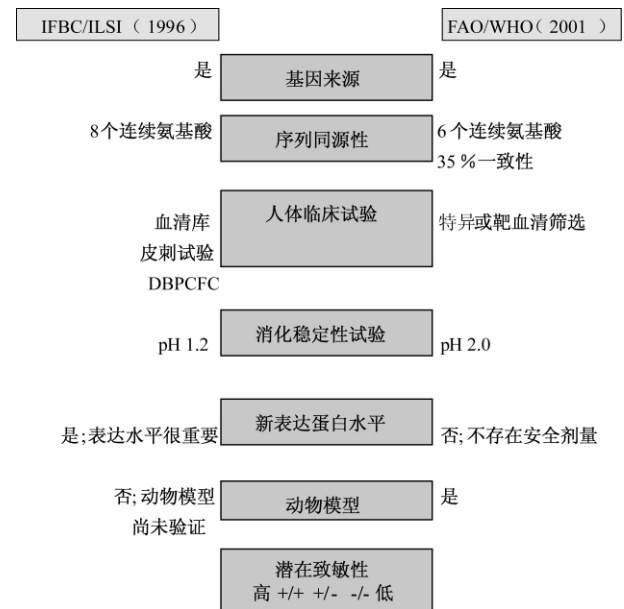


图 1 1996 年 IFBC/ILSI 和 2001 年 FAO/WHO 判定树的比较

目前各国及各国际组织对转基因食品中新表达蛋白的潜在致敏性评价普遍采用实质等同原则,遵循全面、逐步和个案分析的原则,评价方法虽然各有千秋但基本涵盖生物信息学、消化和/或加工稳定性、血清学筛选、动物模型几大部分,以下是近年来的研究进展综述。

2 转基因食品潜在致敏性评价方法研究进展

2.1 生物信息学方法

针对致敏原特性分析的生物信息学近年来发展很迅速,除原有的氨基酸序列同源性(amino acid sequence homology)的比较外,关于结构相似性(structural similarity)和序列基元(sequence motif)的研究正在兴起和发展。比较新表达蛋白与已知致敏原的氨基酸序列同源性是评价转基因食品潜在致敏性的第一步,主要涉及三方面的内容:致敏原数据库、比较和计算方法以及结果评价标准。

目前较多使用的蛋白致敏原数据库资源包括PIR(<http://www.nbrf.georgetown.edu/pirwww>)、SwissProt和TrEMBL(<http://expasy.ch/tools>)等,可以根据研究需要选择各种规模和种类的数据库,如ALLERGEN3(含635种序列)和FARRP5(含1191种序列)等。而用于比较的搜索或计算工具目前仍主要采用1988年美国弗吉尼亚大学Pearson教授创建的FASTA方法,当然随着计算机技术的日新月异,现在使用的FASTA已是高度智能和软件化的工具,利用FASTA得出的主要指标是E值(E-value)和一致性(percent identity)两项,其中E值反映的是待评估蛋白与已知致敏原相似或匹配的程度,与相似性呈反比,该值大小同时受数据库大小、计分矩阵、序列全长以及重叠部分的判定标准等因素影响,低E值如 $10e-30$ 代表的是两种蛋白序列间的高度相似性,E值等于或大于1则通常代表在进化上几乎不相关。因为E值受影响因素较多,所以不能用其作为致敏性的绝对或唯一评判标准,更多的时候需要参考一致性的结果。氨基酸序列一致性是指待评估蛋白与已知致敏原氨基酸序列相同的比例。1996年Pearson提出两种蛋白在200个或以上氨基酸序列间至少需要25%一致性才有同源的可能,这比2000年Aalberse提出的少于50%一致性的蛋白氨基酸序列不太可能引起交叉过敏的标准要高。基于这些研究观点,2003年CAC推荐转基因食品潜在致敏性评价中氨基酸序列同源性比较采用FASTA或BLAST计算方法,任一80个氨基酸长度的序列一致性超过35%即需要考虑新蛋白引起交叉致敏的可能性,同时又补充了若两种蛋白存在8个或以上连续氨基酸匹配一致也需要考虑其潜在的交叉致敏性^[9]。2001年FAO/WHO推荐的评价指南一致性标准是 $\leq 35\%$ 80个氨基酸, < 6 个匹配氨基酸,这一标准引起了转基因食品生产企业(如Monsanto, Dupont)的质疑。质疑的依据来自6个氨基酸匹配窗口的假阳性率(60%~80%)和80个氨基酸 $\leq 35\%$ 一致性的假阳性率(2.5倍于全长序列

比较结果)^[10,11],虽然这些质疑是建立在科学和系统的研究基础上,但从风险评估的放大安全性原则考虑,在不确定性尚不十分明了前,将标准适当提高也是允许和可以理解的。但是氨基酸序列的同源性并不能作为蛋白潜在致敏性的唯一标准^[12],阳性结果只能说明需要进行下一阶段的试验,这也是判定树全面、逐步原则的体现。

一旦氨基酸序列一致性被肯定,结构相似性的评价就显得重要了。一些蛋白家族如非特异性脂质转运蛋白(non-specific lipid transfer proteins),2S种子清蛋白(napins)以及小白蛋白(parvalbumins)等通常含有一种或几种致敏原,如果新表达蛋白属于这些家族中成员,则需高度怀疑其可能的致敏性。相比之下,功能相似性对交叉致敏作用的贡献不如结构相似性大^[3]。

近年来,致敏原结构数据库的研究和构建日趋成熟。美国得克萨斯州公立大学医学院的Ivanciu教授^[13]最近发表了利用他们构建的致敏蛋白结构数据库(structural database of allergenic proteins, SDAP, <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>)研究致敏原线性和结构表位的成果,并通过比较已知的IgE结合表位和致敏蛋白的理化特性,采用特性距离(property distance, PD)来定量预测蛋白的IgE交叉反应性,为序列结构基元作为致敏性评价的指纹提供依据。序列结构基元作为新近发展起来的一种生物信息学新方法,有研究证实其预测致敏原致敏性的准确度(95.5%)远高于现有的氨基酸序列同源性的比较方法(36.6%),且灵敏度也更高^[14]。专家预测结合氨基酸序列和结构信息预测蛋白质的潜在致敏性是未来生物信息学在这一领域的发展趋势和方向。

2.2 消化稳定性

消化稳定性(digestion stability)是指蛋白质在人体或模拟人体的胃肠消化体系中的降解程度。常用试验方法为在体外利用与人体胃肠消化液主要成分及消化环境类似的模拟胃液(SGF)和/或模拟肠液(SIF),也有极少试验采用志愿者或动物模型在体给予蛋白质后,抽取生理状态下的胃肠液,通过对不同消化时间的样品进行蛋白电泳、免疫印迹或其他分析方法评价蛋白质的消化稳定性。

1996年,Astwood等^[15]首次将体外胃蛋白酶消化方法系统地应用于食物致敏原的消化稳定性评价,系统比较了植物致敏原花生、大豆粗提物和多种纯致敏原在模拟胃液中的消化稳定性,结果发现一些重要的食物致敏原在模拟胃液中均较稳定,而非致敏原食物蛋白却易被消化降解。目前已有多种转

基因食品、目标或标记基因表达蛋白,如 Cry34Ab1/Cry35Ab1 蛋白^[16]、Cre 重组酶^[17]、磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)^[18]、转大豆球蛋白大米^[19]、转 11S 球蛋白玉米^[20]等都进行了体外模拟胃肠液消化稳定性试验,以作为评估其潜在致敏性的依据之一。至今已评价的绝大部分转外源基因表达蛋白在胃肠液中均是易消化而不稳定的。2001 年 Taylor^[21]报道的星链(starlink)玉米由于转入的外源基因表达产物 Cry9C 蛋白发现可抵抗胃蛋白酶的消化是少见的一个例外。

然而,在 1996 年 Astwood 的研究之后,多项研究质疑了蛋白质消化稳定性与食物致敏性之间的必然联系。2002 年 Fu^[22]的研究报道,选用 4 种类型的蛋白质,进行体外模拟胃液和肠液的消化稳定性试验,结果发现一些食物致敏原(如乳清蛋白)并不比其他未证实有致敏性的蛋白质(如细胞色素 C)更具消化稳定性。而最近 Herman 等^[23]通过动态定量的消化稳定性试验也再次表明模拟胃液中的消化稳定性与致敏性之间并无显著相关。但在当前没有更明确的理论和更有效的方法出台前,体外消化稳定性试验在评价蛋白致敏性研究中仍然是一项重要而必不可少的内容。

目前几乎所有的消化稳定性试验均在体外模拟胃肠液中进行,除了要求各实验室间方法条件(如 pH 值、温度、酶比例等)和分析条件(胶浓度、电泳时间和染色程序)尽量统一和标准化以外,受诸多因素影响,该体外试验方法本身的有效性还颇受争议,如体外消化稳定性试验中使用的蛋白酶与人体肠道实际的蛋白酶含量和催化活性相差甚远;要求高纯度目标蛋白,从而忽视了食物的复杂基质影响;脱离人体肠道中复杂的生理内环境因素等。基于以上原因,在大动物(如猪)体内安置胃肠瘘管,通过食道或胃插管给予受试蛋白的体内消化稳定性试验逐步发展起来。大动物与人类消化、免疫等多系统更具相似性和同源性的特点,发展和建立大动物在体消化稳定性模型是未来转基因食品评价方法的发展趋势之一。

2.3 血清学筛选

临床上 IgE 介导速发型(I 型)超敏反应是食物过敏的主要类型,对某一种或几种食物过敏的病人其血清中往往含有针对这些食物抗原的高浓度特异性 IgE 抗体,血清筛选试验原理就是利用过敏病人的血清来检测待评价蛋白是否具有结合食物致敏原特异性 IgE 的能力,从而达到比较待测蛋白与已知食物致敏原同源性或抗原交叉性的目的。根据血清的来源,筛选试验分为特异性血清筛选和靶血清

筛选两种方法。如果蛋白的来源为已知致敏原,或者与某已知致敏原序列同源,则需进行特异性血清筛选试验。该试验的可信度取决于过敏患者的血清数量,对于主要致敏原要获得 95% 的可信度至少需要 6 份血清阴性,99% 可信度至少需要 8 份血清阴性,99.9% 可信度至少需要 14 份血清阴性;对次要致敏原,要确定其致敏性,17 份血清中至少有 20% 有反应(95% 的可信度)或 24 份血清中至少有 20% 有反应(99% 的可信度)。如果待评蛋白与致敏原不存在序列同源性,并不能否定其有致敏性,则需要对其进行靶血清筛选试验,血清主要从对 6 种类型食物(单子叶植物、双子叶植物、霉菌、无脊椎动物、脊椎动物、细菌等)过敏患者中选择^[3]。靶血清筛选试验是在 2001 年 FAO/WHO 推荐评价指南中首次提出的方法,但在 2003 年 CAC 推荐的指南中并未作为常规推荐方法,有专家提出其有效性尚需要进一步验证。一项关于 Nangai 坚果的潜在致敏性评价案例质疑了靶血清筛选的有效性,用花粉类植物过敏患者的血清进行靶血清筛选显示该蛋白呈阳性反应,但双盲安慰剂控制食物激发(double blind placebo-controlled food challenge, DBPCFC)试验并未显示 Nangai 坚果是一种致敏原^[24]。这种试验方法的有效性在一定程度上受病例诊断和入选标准影响,DBPCFC 是诊断食物过敏的金标准,其他方法如皮刺试验和 IgE 放射性致敏原吸附试验(IgE radioallergosorbent tests, RASTs)是辅助诊断标准。2006 年 4 月 ILSI 组织了一次关于建立用于评价蛋白潜在致敏性的国际血清库的研讨会,其中入选血清库的病例诊断标准是讨论的关键,会议认为建立一个全球不同地区过敏患者血清网络的意义在于可以推动新蛋白潜在致敏性评价方法的规范和有效发展。

选择患者血清进行筛选试验时,糖基化和多糖表位也是需要考虑的因素。植物宿主中蛋白的表达可能经过转录后的修饰,这种修饰可能影响其潜在致敏性。而蛋白糖基化对致敏性的改变尤其突出,原因可能与其影响蛋白对加工和蛋白水解酶的敏感程度、改变抗原表位结构有关,几乎所有的抗原多糖表位都可引起交叉过敏反应。所以在进行血清 IgE 结合能力筛选可能致敏蛋白时,最好排除那些可能与多糖能结合的 IgE 血清,从而鉴别新抗原蛋白部分与 IgE 结合的能力^[3]。

2.4 动物模型

2001 年,FAO/WHO 食品法典委员会公布的新的转基因食品致敏性评价策略正式纳入动物致敏模型试验,认为食物致敏动物模型是评价其潜在致敏性最直接的方法^[3]。近年来食物致敏动物模型的

研究进展迅速。目前食物致敏模型动物种属涵盖啮齿类动物和非啮齿类动物,前者主要是小鼠、大鼠和豚鼠,后者包括狗、猪等。目前国际上尚未建立食物致敏原评估的标准动物模型,实际上任何单一模型都不可能适用于所有目的,至今未发现一种动物模型可同时模拟2~3种以上常见食物致敏原在人体引起的过敏反应,关键是要根据研究目的和各种模型的特点有针对性地选择。如啮齿类动物模型多适用于分子和细胞水平的致敏性机制研究,并具有费用少、易获得和易操作的优势。而在进行过敏性疾病的研究时,如更多关注皮肤、呼吸道和胃肠道等临床症状的改变,则可考虑使用大动物如猪和狗等作为模型。

啮齿类动物是发展最早且应用最为广泛的食物致敏模型,这与其致敏效应研究方法多而广、不同品系遗传背景清楚、易大量繁殖和饲养密不可分。已用于食物致敏模型研究的小鼠包括BALB/c、C3H/HeJ、C57/BL6、DBA/2、BDF-1、A/J等多个品系,其中BALB/c和C3H/HeJ是最受关注和公认的食物致敏良好模型小鼠品系^[25]。多种品系的大鼠均显示对食物蛋白的高IgE抗体应答能力,而BN大鼠是目前较为公认的理想大鼠食物致敏模型^[26]。豚鼠应用于致敏性研究历史已久,但更多应用于皮肤接触致敏性评价,同时由于其免疫球蛋白抗体反应和免疫系统与人类差异较大,作为食物致敏性的研究模型并不理想。

近年来,一些非啮齿类大动物如猪和狗,由于具有与人类更好的同源性等优势逐渐被食物致敏研究者关注和利用,缺点是种属与品系有限,基因敲除品系尚不可得,免疫方法研究试剂的缺乏,大体积而小样本以及较为昂贵的费用等方面。过去20多年来,多项研究显示狗作为食物致敏模型研究的可行性和极大优势,尤其显示了其与人类过敏反应的临床症状如呕吐和腹泻的典型相似性。具有遗传过敏性的贝吉生猎犬(spaniel/basenji)是一种高IgE应答特征稳定遗传的近交品种,已成为明确食物致敏发展机制的有效研究工具^[27]。与其他动物模型比较,猪在研究致敏原发病机制和免疫应答方面有许多更重要的优点,除了与人类在胃肠道生理学和黏膜免疫发育上的极相似性以外,由于具有先天免疫反应活性使得利用猪进行免疫反应评价更为有效和可能。

一般来说,理想的动物模型应该满足以下几个方面:1)给予途径最好为口服。理由是许多天然屏障如胃肠道粘膜或表皮层的酸变性及酶降解能阻止、减少或以其他方式影响所摄入蛋白质的致敏性;

2)最好不用佐剂。佐剂可能在过敏反应中起重要作用,为了评价蛋白质内在致敏性,最好不加佐剂;3)受试动物能产生明显数量的IgE或其他Th2特异抗体;4)受试动物应该能耐受大部分的食物蛋白质;5)给予致敏原后其临床表现应该与人类相似;6)引起抗体反应的蛋白质应与患者血清中的类似;7)模型应操作简单、可重复^[28]。目前有多项关于动物模型有效性和稳定性的验证研究正在开展,人们正在采用多种不同强度(强致敏性、弱致敏性和非致敏性)的致敏原建立新的动物模型或验证已有动物模型。相信在不久的将来,更多敏感性好、稳定可重复且经过有效验证的食物过敏动物模型被开发并应用于蛋白质潜在致敏性的评价和鉴定中。

2.5 皮肤刺激试验和DBPCFC试验

虽然皮肤刺激试验和DBPCFC试验是临床上诊断食物过敏常用的方法和标准,也是潜在致敏性评价程序中不多的在体试验方法,但出于伦理学的考虑,在2001年FAO/WHO和2003年CAC推荐的指南中均不再出现,增加了靶血清筛选和动物模型试验等内容^[3,4]。

3 结语

自1996年Metcalf发表基因工程改造植物来源食品的潜在致敏性评价判定树至今,各种评估和研究方法得到了系统发展,但仍存在不少问题,如人体临床数据的有效利用、食物致敏动物模型的验证、暴露和效应生物标志物的选择、敏感人群的确定、剂量的问题、血清库和致敏原库的构建以及方法的标准化和有效性验证等仍需要研究者不断探索和解决^[29,30],坚持全面、逐步和个案分析的方法仍然是今后评价转基因食品潜在致敏性的根本原则。

参考文献

- [1] SCHEURER S, LAUER I, FOETISCH K, et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114:900-907.
- [2] Metcalfe D D, Astwood J D, Townsend R, et al. Assessment of the allergenic potential of foods from genetically engineered crop plants [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1996, 36(S):165-186.
- [3] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology [R]. 2001.
- [4] Codex Alimentarius Commission. Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June-5 July, 2003. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants, and Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity

- [R]. 2003.
- [5] EFSA. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed [J]. *EFSA J*, 2006 (99): 1-100.
- [6] LADICS G S, SELGRADE M K. Identifying food proteins with allergenic potential: Evolution of approaches to safety assessment and research to provide additional tools [J]. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008, doi:10.1016/j.yrtph.2008.10.010.
- [7] FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin [R]. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. 29 May-2 June, 2000. Geneva, 2000.
- [8] KIMBER I, BETTS C J, DEARMAN R J. Assessment of the allergenic potential of proteins [J]. *Toxicol Lett*, 2003 (140-141): 297-302.
- [9] PEARSON W R, LIPMAN D J. Improved tools for biological sequence comparison [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988 (85): 2440-2448.
- [10] SILVANOVIČH A, NEMETH M A, SONG P, et al. The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity [J]. *Toxicol Sci* 2006 90: 252-258.
- [11] LADICS G S, BANNON G A, SILVANOVIČH A, et al. Comparison of conventional FASTA identity searches with the 80 amino acid sliding window FASTA search for the elucidation of potential identities to known allergens [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, (51): 985-998.
- [12] HILEMANA R E, SILVANOVIČHA A, GOODMANA R E, et al. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002 (128): 280-291.
- [13] IVANCIUC O, SCHEIN C H, GARCIA T, et al. Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens [J]. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009, doi:10.1016/j.yrtph.2008.11.007.
- [14] STADLER M B, STADLER B M. Allergenicity prediction by protein sequence [J]. *FASEB J* 2003, 17: 1141-1143.
- [15] ASTWOOD J D, LEACH J N, FUCHS R L. Stability of food allergens to digestion in vitro [J]. *Nat Biotech*, 1996 (14): 1269-1273.
- [16] HERMAN R A, SCHAFER B W, KORJAGIN V A, et al. Rapid Digestion of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 in Simulated Gastric Fluid [J]. *J Agric Food Chem* 2003 (51): 6823-6827.
- [17] HILEMAN R E, BONNER H K S, KAEMPFE T A, et al. Safety assessment of cre recombinase [J]. *J Agric Food Chem*, 2006 (54): 8640-8647.
- [18] PRIVALLE L S. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system, potential allergenicity assessment [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2002 (964): 129-138.
- [19] MOMMA K, HASHIMOTO W, OZAWA S, et al. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999 (63): 314-318.
- [20] SINAGAWA-GARCÍA S R, RASCÓN-CRUZ Q, VALDEZ-ORTIZ A, et al. Safety assessment by in vitro digestibility and allergenicity of genetically modified maize with an amaranth 11S globulin [J]. *J Agric Food Chem* 2004 (52): 2709-2714.
- [21] TAYLOR S L, HEFLE S L. Will genetically modified foods be allergenic? [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2001 (107): 765-771.
- [22] FU T J, ABBOTT U R, HATZOS C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids—a comparative study [J]. *J Agric Food Chem* 2002 (50): 7154-7160.
- [23] HERMAN R A, WOOLHISER M M, LADICS G S, et al. Stability of a set of allergens and non-allergens in simulated gastric fluid [J]. *International J Food Sci Nutr* 2007 (58): 125-141.
- [24] THOMAS K, BANNON G, HEROUET-GUICHENEY C, et al. The utility of an international sera bank for use in evaluating the potential human allergenicity of novel proteins [J]. *Toxicol Sci*, 2007 (97): 27-31.
- [25] DEARMAN R J, KIMBER I. Determination of protein allergenicity: studies in mice [J]. *Toxicol Lett* 2001 (120): 181-186.
- [26] PENNINKS A H, KNIPPEL L M J. Determination of protein allergenicity: studies in rats [J]. *Toxicol Lett* 2001 (120): 171-180.
- [27] BUCHANAN B B, FRICK O L. The dog as a model for food allergy [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2002 (964): 173-183.
- [28] TAYLOR S L, LEHER S B. Principles and characteristics of food allergens [J]. *Crit Rev Fd Nutr*, 1996 (36): 91-118.
- [29] SELGRADE M K, KIMBER I, GOLDMAN L, et al. Assessment of allergenic potential of genetically modified foods: an agenda for future research [J]. *Environ Health Perspect* 2003 (111): 1140-1141.
- [30] GERMOLÉC D R, KIMBER I, GOLDMAN L, et al. Key issues for the assessment of the allergenic potential of genetically modified foods: breakout group reports [J]. *Environ Health Perspect* 2003 (111): 1131-1139.