

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學研究所

碩士論文



Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

利用二甲基標記結合質譜技術建立奇異果過敏原之絕對定量分析平台

Establishment of an analytical platform for the absolute quantification of
kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens using dimethyl labeling
coupled with mass spectrometry

施奕辰

Yi-Chen Shih

指導教授：許輔 博士

Advisor: Fuu Sheu, Ph.D.

中華民國 107 年 8 月

August, 2018

致謝

三年前若有人問我為什麼要讀研究所，答案會是為了學習研究以及取得學歷。而現在看來不只如此，更有其他使這段不長不短的時光更有價值的事情。為此本篇致謝如化石標本，僅能做為一個曾經如此的證物而不足夠代表感謝的全貌。

人說歸屬感是探索世界的原點，是在這社會的錨。三年來所完成的大小事無不有第一研究室大家的支持，令人印象深刻的並不是那許多吃飯的場合，而是進度報告完你一言我一句，積極想幫忙解決實驗困境的那個場景，是與老師討論實驗規劃的小圓桌，是深夜一起邊聊天邊準備離開的默契。第一研究室像一個家，能得到關心與感到安全，而其中的大家皆是家人，很幸運能夠身為一員，也期待這份歸屬感永不消失。

研究能力不只能於學術上有所應用，更像是一個能夠應用於生活的技能，其中包含了邏輯思考、明辨是非的能力。學習是單純而快樂的過程，不管是與他人討論研究的意義，找出自己在科學上最獨一無二的價值；全盤審視自身能力與資源，摸索找尋適合的研究方向；從無數的文獻中找出關鍵的幾篇，並藉由理解他人的實驗從中反思得到靈感。於學術上承上接後，從零到有步步建造一個屬於自己的研究，皆是人生中獨一無二極具成就感的感受。

如同實驗上有起有伏，這段時間的情感亦有升有落。從初次見面到不捨分離，從無法同理到互相幫忙，從形同陌路到能夠互相依靠，敬佩、欣賞、感激、尊重、驕傲、快樂、不捨、祝福、尊敬、珍惜、期許，情感好或壞都已化為這段期間人格的成長，為此感到珍惜也為自己的逐漸成熟感到自豪。

感謝參與這人生階段的每一個人，或多或少都造就了現在的我，感謝口試委員 周志輝 博士、繆希椿 博士、蘇南維 博士以及陳家揚 博士提供各領域深入的見解，拓展了研究視野上的深度與廣度，感謝讓我再次意識到虛心求教的重要性。特別感謝恩師 許輔 教授在學術、待人處事、人生方面給予諸多指導與建議，為成熟有智慧的榜樣，我亦以此為目標，期望有天能成為像老師一樣甚至更好的人。

羅馬不是一天造成的，更亦不是單憑一人的力量。這本論文的完成是研

究所生涯的一個里程碑，能夠抵達必須感謝所有的一切。不管是科學界前人的努力，使我能站在巨人的肩膀上努力；國家、社會、學校提供的豐厚資源，讓我有足夠的材料與能力去完成研究；家人、師長、同學、朋友、夥伴的支持，使我有足夠的動力去突破困境；對於一切都感到無法回報的感恩，能做的是有一天成為有成就的人來回報大家。

施奕辰 謹誌於

國立臺灣大學園藝學景觀所

2018年7月26日



摘要

食品過敏為重要之食品安全議題，而過敏原之定量法為其管理上所必需的。市面上最普及的 ELISA 法，方法立基於抗體，亦受抗體特性所限制，具有許多難以改善之缺點。近年來以質譜為基礎之過敏原定量法逐漸受到重視，因其不僅能解決 ELISA 法之缺點，同時具有高通量、能提供分子指紋證據等優點。在食品過敏原中以水果過敏原之定量，因為蛋白質含量低、干擾物質多故較為困難。奇異果 (*Actinidia deliciosa*) 為國人大量食用之水果，亦為致敏性食物，於歐洲食物過敏原排名前六，於台灣排名前十，為我國建議標示之食品過敏原。本研究選擇奇異果作為代表物進行質譜過敏原定量法之開發。

結果分為三部分：第一部分、以奇異果為例之水果過敏原質譜前處理法開發與優化。開發出兩種適合水果之苯酚蛋白質萃取法，分別為最佳化苯酚蛋白質萃取法 (optimized phenol extraction method, OPE) 及微量苯酚萃取法 (micro phenol extraction method, MPE)，兩者皆具有高萃取率。其中 OPE 單次萃取蛋白質總重量較 MPE 多；而 MPE 之成本低、操作簡便快速 (1 天)、具良好之消化步驟相容性。同時優化胰蛋白酶水解法與確認二甲基穩定同位素標記法之標記效率與同位素效應，並將 MPE、胰蛋白酶水解法、二甲基標記法與樣品除鹽法，整合為一套可連續且低轉換損耗之質譜樣品前處理法。第二部分、建立及確效奇異果過敏原之質譜絕對定量分析法。利用 quadrupole time of flight mass spectrometer (Q-ToF MS) 結果來進行奇異果目標過敏原之選擇。以 Act d 1、Act d 5、Act d 11 作為目標物，AD1、AD5、AD11 胜肽分別作為其代表胜肽。再以 triple quadrupole mass spectrometer (QqQ MS) 選擇代表胜肽之定量離子與定性離子及進行 LC 與 MS 之參數調整。對本法進行確效試驗，AD1H、AD5H 胜肽之定量範圍分別為 1250-125000 ng/mL、2500-250000 ng/mL；準確度(回收率)分別為 82.76%、83.46%；重複性(變異係數)分別為 6.61%、8.69%；儀器定量極限分別為 0.008 ng/mL、8 ng/mL；儀器偵測極限分別為 0.008 ng/mL、4 ng/mL；兩者皆具良好專一性及線性，成功建立於多重反應監測模式下之奇異果過敏原質譜分析法。第三部分、將此法應用於奇異果加工製品中。本研究比較了鮮果、果醬、熱風乾燥果乾、冷凍

乾燥果乾、熱殺菌果泥、高靜水壓果泥、熱殺菌果汁與高靜水壓果汁，八種常見之奇異果產品於加工後過敏原之消長。此方法成功定量出八個處理組之 Act d 1、Act d 5 含量，證明了本法適用於上述加工奇異果加工製品中。於長時間加熱之加工製品中（果醬與熱風乾燥果乾）過敏原含量較低，而熱殺菌、高靜水壓或冷凍乾燥製程對於過敏原含量較無影響。

本研究成功開發出 OPE 與 MPE 兩種水果蛋白質萃取法，並將 MPE、蛋白水解法、標記法與樣品除鹽法整合優化為一套質譜樣品前處理法，及成功建立奇異果過敏原質譜絕對定量分析法，並成功將此方法應用於八種奇異果食品中。本研究可作為未來食品過敏原方法開發之範本，並於未來能應用於各國，協助食品安全之提升。

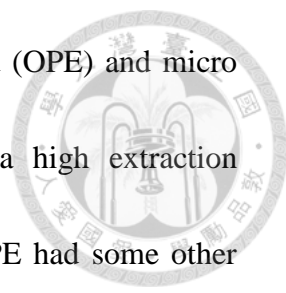
關鍵字：二甲基標記、三重四極柱質譜儀、過敏原、絕對定量、美味獼猴桃

Abstract



Food allergy management is one of the main issues in food safety. For efficient management of allergy, an effective analytical method is required. In the past, antibody-based Immuno-assay ELISA was the most popular analytical method for allergen determination, however it has some disadvantages in the use of antibody. Recently, mass spectrometry-based methods gains popularity because it can overcome the disadvantages of antibody-based methods, also possesses advantages such as high throughput, and ability to provide molecular evident etc. Quantification of plant allergens, especially fruit allergens, which have low protein contents, is difficult to achieve, compared to other food allergens. Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) is one of the popular fruits in Taiwan. It ranks the second highest among the imported fresh fruits. Kiwi fruit is also an allergenic fruit, of which allergic popularity is rated sixth among food allergens in Europe and tenth in Taiwan. Many governments suggest allergenic labeling on food label. In our study, we choose kiwi fruit as an example to develop a MS-based quantification method for fruit allergen.

Our results consisted of three major parts. In the first part, we have developed and optimized sample preparation methods for mass spectrometry analysis of fruit allergen using kiwifruit as a model sample. We have developed two fruit optimized phenol



extraction methods, including optimized phenol extraction method (OPE) and micro phenol extraction method (MPE). Both methods had yielded a high extraction efficiency. OPE had a higher protein extraction weight, while MPE had some other advantages such as low cost, fast, simple and was well compatible with further mass spectrometry sample preparation steps. Meanwhile we have optimized trypsin in-solution digestion method and confirmed efficiency as well as isotopic effect of stable isotope dimethyl labeling method. We have also combined different methods of sample preparation steps into one continuous, low intra-method conversion loss process. In the second part, we have established the method of mass spectrometry for allergen quantification of kiwifruits. First, we used the results in the test of Q-ToF to decide the target allergens (Act d 1, Act d 5, and Act d 11) and representative peptides (AD1, AD5, and AD11). Then, we decided the quantitative and qualitative daughter ions of representative peptides on QqQ MS while establishing and optimizing parameters of LC and MS. After validation of our methods, AD1H and AD5H we found to have satisfied validation characteristics, including range, accuracy, repeatability, instrumental quantification limit, instrumental detection limit, specificity, and linearity. We have successfully developed and validated mass spectrometry-based allergen quantification method for kiwifruits under the MRM mode. In the third part, we have compared eight common kiwi fruit products to study the influence of different process

methods on kiwi allergens. We have determined the allergen contents of Act d 1 and Act d 5 in all samples, which indicated that our method was robust and could be applied to some other common fruit products. We found that allergen contents were significantly reduced under long time heat processing.

In conclusion, we have developed two fruit optimized phenol extraction methods, while MPE was combined with rest of the sample preparation methods into one continuous MS sample preparation process. In addition, we have developed a MS-based allergen quantification method for kiwifruits and its derivative products. Our study not only could be an example of analytical method development of food allergen, but also could be applied to improve food safety.

Keywords: dimethylation, QqQ MS, allergen, absolute quantification, *Actinidia*

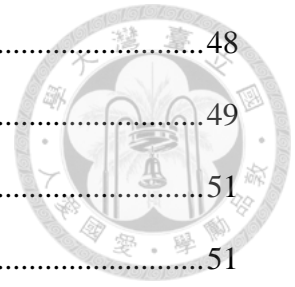
deliciosa

大綱



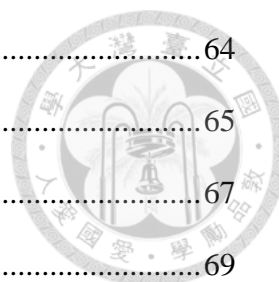
致謝	I
摘要	III
Abstract	V
大綱	VIII
表目錄	XII
圖目錄	XIII
縮寫表	XIV
壹、 前言.....	1
一、 食品過敏.....	1
1. 食品過敏的成因與發生情形.....	1
2. 過敏原種類.....	4
3. 常見的食品過敏原.....	10
4. 食品過敏與食品安全.....	11
5. 食品過敏原閾值.....	12
二、 食品過敏原分析方法.....	13
1. 以免疫為基礎之食品過敏原分析法.....	13
2. 以核酸為基礎之食品過敏原分析方法.....	15
3. 以質譜為基礎之食品過敏原分析方法.....	16
三、 奇異果.....	17
1. 歷史與品種.....	17
2. 臺灣奇異果現況.....	18
3. 營養價值.....	18
4. 產業應用.....	19

5.	奇異果過敏.....	19
6.	奇異果過敏原種類.....	20
四、	質譜技術.....	23
1.	用於定量分析之質譜技術.....	23
2.	SRM/ MRM 技術之優勢	24
3.	胜肽標記方法.....	26
4.	二甲基穩定同位素標記法.....	29
5.	利用二甲基同位素標記法搭配 MRM 進行過敏原之絕對定量.....	32
五、	質譜分析過敏原之萃取法.....	33
1.	三氯乙酸-丙酮法 (trichloroacetic acid – acetone, TCA-A)	34
2.	苯酚蛋白質萃取法 (phenol protein extraction).....	34
3.	分子量止透 (cutoff) 過濾法	35
4.	其他.....	36
六、	食品化學檢驗方法之確效.....	36
1.	分析方法之確效種類.....	36
2.	分析方法之確效方法.....	37
七、	研究動機與目的.....	41
八、	研究架構.....	42
貳、	材料與方法.....	44
一、	藥品.....	44
二、	器材.....	44
三、	實驗方法.....	45
1.	奇異果產品製作法.....	45
2.	奇異果蛋白質萃取法.....	45
3.	蛋白質定量法.....	48



4.	蛋白質定性法.....	48
5.	蛋白質消化法.....	49
6.	胜肽標記與除鹽法.....	51
7.	蛋白質質譜定性.....	51
8.	目標胜肽選擇與合成.....	52
9.	超效液相層析三重四極柱質譜儀.....	53
10.	方法確效.....	54
參、	結果.....	55
一、	樣品前處理法.....	55
1.	苯酚蛋白質萃取法選擇.....	55
2.	苯酚蛋白質萃取法優化.....	55
3.	溶液內胰蛋白酶消化法之優化.....	57
4.	穩定同位素二甲基標記法效率確認.....	57
二、	分析方法建立.....	58
1.	目標過敏原之選擇- Q-ToF 複雜蛋白質定序結果.....	58
2.	代表胜肽選擇.....	58
3.	MS 參數設定.....	59
4.	LC 梯度設定.....	60
5.	校正曲線.....	60
6.	方法確效試驗.....	61
三、	不同加工處理對奇異果過敏原之影響.....	62
1.	不同加工處理對奇異果過敏原之影響.....	62
肆、	討論.....	64
一、	樣品前處理法.....	64
1.	各萃取法 SDS-PAGE 條帶差異之探討 (圖一).....	64

2.	苯酚法重複萃取效率探討.....	64
3.	苯酚蛋白質萃取法優化.....	65
4.	溶液內胰蛋白酶消化法之優化.....	67
5.	穩定同位素二甲基標記法效率確認.....	69
二、	分析方法建立.....	70
1.	Q-ToF 複雜蛋白質定序結果.....	70
2.	代表胜肽選擇.....	71
3.	MS 參數設定.....	72
4.	標準曲線.....	73
三、	不同加工處理對奇異果過敏原之影響.....	74
1.	不同加工處理對奇異果過敏原之影響.....	74
四、	結論與未來展望.....	75
伍、	參考文獻.....	76



表目錄



表 一 多次苯酚蛋白質萃取法之萃取效率.....	96
表 二 微量苯酚法優化之結果.....	97
表 三 最佳化苯酚蛋白質萃取法 (OPE) 及微量苯酚蛋白質萃取法 (MPE) 方法性質	98
表 四 胰蛋白酶溶液內消化方法之優化.....	99
表 五 複雜蛋白質定序辨認到之奇異果蛋白質.....	100
表 六 代表胜肽之篩選條件.....	104
表 七 目標過敏原之複雜蛋白質定序辨認到之胜肽結果.....	105
表 八 候選胜肽之 BLAST 結果.....	106
表 九 目標過敏原與代表胜肽之性質.....	107
表 十 代表胜肽及其二甲基標記 (氫和氘) 胜肽之性質.....	108
表 十一 代表胜肽之定量子離子性質.....	109
表 十二 代表胜肽之定性子離子性質.....	110
表 十三 AD1H 之確效結果.....	111
表 十四 AD5H 之確效結果.....	112
表 十五 AD11H 之確效結果.....	113
表 十六 代表胜肽測定方法之確效性質.....	114

圖目錄



圖 一 不同蛋白質準備法之 SDS-PAGE.....	115
圖 二 文獻之苯酚蛋白質萃取法、最佳化苯酚蛋白質萃取法 (OPE) 及 微量苯酚蛋白質萃取法 (MPE) 萃取效率比較.....	116
圖 三 二甲基同位素標記法氫與氘標記之反應式及其產物.....	117
圖 四 代表胜肽之同位素效應.....	118
圖 五 AD1H 與 AD1D 之質譜圖	119
圖 六 AD5H 與 AD5D 之質譜圖	120
圖 七 AD11H 與 AD11D 質譜圖	121
圖 八 蛋白質複雜定序時使用之液相層析梯度圖.....	122
圖 九 目標過敏原之複雜蛋白質定序覆蓋率.....	123
圖 十 代表胜肽定量子離子之二次質譜圖.....	124
圖 十一 代表胜肽定性子離子之二次質譜圖.....	125
圖 十二 液相層析梯度圖之殘留量確認.....	126
圖 十三 液相層析梯度圖與標記胜肽之滯留時間.....	127
圖 十四 AD1H 胜肽之校正曲線與殘差圖	128
圖 十五 AD5H 胜肽之校正曲線與殘差圖	129
圖 十六 AD11H 胜肽之校正曲線與殘差圖	130
圖 十七 AD1H 於適用範圍之線性.....	131
圖 十八 AD5H 於適用範圍之線性.....	132
圖 十九 AD11H 於適用範圍之線性.....	133
圖 二十 每克經過不同加工處理後之奇異果中 Act d 1 之含量.....	134
圖 二十一 每克經過不同加工處理後之奇異果中 Act d 5 之含量.....	135

縮寫表



縮寫	全名
AD1	Signature peptide of Act d 1
AD1H(D)	Dimethyl hydrogen (deuterium) labeled signature peptide of Act d 1
AD5	Signature peptide of Act d 5
AD5H(D)	Dimethyl hydrogen (deuterium) labeled signature peptide of Act d 5
AD11	Signature peptide of Act d 11
AD11H(D)	Dimethyl hydrogen (deuterium) labeled signature peptide of Act d 11
AQUA	Absolute Quantification
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization
ICAT	Isotope-coded Affinity Tag
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
iTRQ	isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
IUIS	International Union of Immunological Societies
MPE	Micro Phenol Extraction
MRM	Multiple Reaction Monitor
OPE	Optimized Phenol Extraction
QToF	Quadruple-Time of Flight mass spectrometry
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
TEAB	Triethylammonium bicarbonate
QqQ MS	Triple Quadruple Mass Spectrometry

壹、前言



一、食品過敏

1. 食品過敏的成因與發生情形

食品過敏是指人體對某些特定食品中的蛋白質成份，所產生的非預期免疫反應 (adverse immune response)，而且定義上與食品的不耐受性、藥物反應及毒物反應都不相同[1-3]。

(1) 食物過敏的發生機轉


食品過敏的發生，通常因為人體的免疫系統錯將食品中某些蛋白質，誤認為是對人體有害的外來成份，特別是當某些可耐消化的食品蛋白質片段，受到 IgE 抗體所辨識之時，就可能引發後續的免疫反應，特別是區域性的發炎反應，因而引起食品過敏。食品過敏可就 IgE 的參與與否分為二類，有時此兩類反應可能同時發生[2, 4, 5]。

a IgE 參與之食品過敏 (IgE-mediated food allergy)

這是傳統認為的食品過敏反應，通常在攝食過敏原後兩小時內發生。當人體首次接觸外來過敏原時，B 淋巴球受過敏原活化而分化後，製造結構相對應此外來抗原的 IgE 抗體；當人體再次接觸過敏原時，可辨識此過敏原之特異性 IgE 會與過敏原結合，並進一步與顆粒性球細胞 (肥大細胞、嗜酸性與嗜鹼性白血球) 結合，導致顆粒性球反應並釋放大量例如組織胺之免疫趨化物質，引起食道、胃、腸道甚至是其他組織例如皮膚與呼吸道的發炎反應[6]。

b 非 IgE 參與之食品過敏 (non-IgE-mediated food allergy)

非 IgE 參與之食品過敏又稱為細胞參與之食品過敏 (cell-mediated food allergy)，此類食品過敏反應的發生機轉尚不完全清楚，目前已知可能有 T 細胞或是嗜酸性球的參與[7]，也可能與新生嬰兒腸道淋巴組織發育時，飲食所引起的免疫反應與耐受反應 (tolerance)，兩者間的平衡有關。非 IgE 參與之食品過敏，



因為涉及 T 細胞及其他細胞的活化，通常發生較慢，於飲食後 4-48 小時後才發生，例如嬰兒餵食數小時後的出血性腹瀉、腹脹、血便；或是例如成人攝食海鮮後造成暈眩、噁心、抽續、嘔吐反應。另一方面，食品不耐受性(food intolerance) 症狀與非 IgE 參與之食品過敏類似，但是食品不耐受性，例如乳糖不耐受性及藥物反應，因未涉及免疫反應，因此並不屬於食品過敏之範疇[8]。

由於腸道同時肩負接觸外物、吸收養分、抵禦病原的複雜功能，人體為了避免對所有攝取的外來食品蛋白質產生過敏反應，腸道免疫系統應對外來無害之食品成份具口服耐受性 (oral tolerance)，可能與後天調節性 T 細胞 (adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells, iTreg) 相關，抑制腸道免疫細胞對食品的免疫反應而產生耐受性[4]，以避免發生食物過敏。然而，食品過敏患者不具有或失去口服耐受性的原因，至今仍未完全清楚。

(2) 食品過敏的臨床症狀與流行病學研究

一般 IgE 參與之食品過敏反應，通常在兩小時內發生，可能引起消化道、皮膚或呼吸道發炎，並可能發生造成生命危險的全身性過敏性休克 (anaphylaxis)，常見症狀包括花粉食物症候群、食物蛋白誘導大小腸結腸炎、食物誘導直腸結腸炎、嗜酸性球腸胃病鼻結膜炎、過敏性氣喘、口腔過敏症候群或異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 等[8, 9]。非 IgE 參與之食品過敏的發生較為緩慢，引起小腸或結腸炎，患者常出現嘔吐、腹部絞痛、腹瀉等症狀；亦有過敏原會同時引發兩種反應[8]。食品過敏除了本身症狀造成的自身困擾之外，亦會影響病患及其家庭之整體活力及社交活動[10, 11]。

在流行病學上，約 33% 的過敏反應主要是由食物誘發，且與遺傳、地域、食物種類、飲食習慣等多種因素有關[12]。大約有 25% 的美國民眾自認對某些食物過敏，但是經由病史及實驗上可以確認過敏原的比例，在嬰幼兒大約是 2-8%，

在成人大約是 2%[6]。世界過敏組織指出，三歲以下之嬰幼兒約有 8% 對食品過敏，若是對患有濕疹的兒童而言，可能 30% 同時對食品過敏；大約 2.5% 的新生兒對牛奶過敏，在一歲內對牛奶過敏的幼兒，可能 80% 直到五歲都對牛奶過敏，25% 直到二十歲仍對牛奶過敏，而且其中 60% 屬於 IgE 參與之食品過敏反應[13]。另一方面，食品過敏好發於嬰幼兒或是其他過敏疾病之患者，例如嬰幼兒至少有 35% 發生過 IgE 參與之食品過敏反應，6% 的幼童發生過由食物引起的哮喘或是過敏性濕疹，而人類總人口數的 2.5% 對食品過敏[14]。

(3) 交叉反應與食品過敏

免疫系統的特性，在於能夠辨識自身的物質 (self) 與自身以外的異物 (non-self)，在生物體內擔任監視與防衛的角色。免疫反應可分為「先天性免疫反應」和「後天性免疫反應」兩大類，前者不具有抗原特異性，只要有異物存在就能引發；後者則具有抗原特異性，針對不同的異物產生不同的反應，需要淋巴球的參與，例如不同的 B 淋巴球株，可分別受特定結構的抗原活化，分化為抗原特異性的記憶性 B 淋巴球與漿細胞 (plasma cells)，其中漿細胞職司產生抗體，以中和 (neutralize) 或吸附 (opsonize) 異物。

當免疫系統無法鑑別兩種抗原，同時對兩種結構類似的不同抗原均發生反應，稱為交叉反應 (cross reaction)[15]。交叉反應在免疫與醫學上非常重要，例如金納醫師 (Edward Jenner, 1749~1823) 即是利用免疫系統的交叉反應，以牛的天花作為抗原免疫個體，讓個體對人的天花產生免疫反應。然而，交叉反應也可能引起非預期的不良反應，食品過敏就是典型的例子，倘若是致敏 (sensitization) 的抗原與食品中的蛋白結構相似時，就可能引起食品過敏反應。

臨床上食品過敏的首例於 1942 年被提出，當時發現受花粉過敏原致敏的個體，有可能對部份的新鮮水果產生過敏症狀[16]。後續的研究發現，此一過敏的

機制與 IgE 抗體有關，個體第一次接觸花粉過敏原時，可能活化 B 淋巴球產生可辨識花粉過敏原的特異性 IgE；當人體第二次接觸結構近似的過敏原例如蘋果 **Mal d 1** 蛋白時，因為花粉過敏原與蘋果 **Mal d 1** 蛋白的結構類似，因此個體內特異性的 IgE 便會與蘋果 **Mal d 1** 蛋白結合，並進一步與顆粒性球細胞（肥大細胞、嗜酸性與嗜鹼性白血球）結合，導致顆粒性球反應並釋放大量例如組織胺之免疫趨化物質，於是蘋果便可能因為交叉反應，造成個體過敏引起發炎反應。

2. 過敏原種類

現在 Pfam (蛋白質家族, protein family) 資料庫共記載了 16,295 個蛋白質家族 [17]。蛋白質家族又再分群組成蛋白質超家族 (superfamily)，而某些蛋白質家族又再細分成蛋白質次家族 (subfamily)。SDAP (<https://fermi.utmb.edu>) 過敏原蛋白質結構資料庫將現今已知之過敏原分類於 Pfam 資料庫 16,295 家族中的 130 個家族中。世界上最重要的過敏原蛋白可被粗略分類於 30 – 40 個蛋白質家族中。以下介紹較重要的幾種家族及其之下之次家族與過敏原。[18]

表 a. 常見過敏原來源及其所屬之蛋白質家族

超家族 (superfamily)	家族 (family)	過敏原來源
醇溶蛋白 (prolamin)	穀醇溶蛋白 (cereal prolamins)	穀類穀粒
	雙功能抑制劑 (bifunctional inhibitors)	穀類穀粒
	2S 白蛋白 (2S albumins)	堅果、花生、豆類、種子
	非特異性脂質傳送蛋白 (non-specific lipid transfer proteins)	水果、堅果、花生、蔬菜、花粉、膠乳
EF-hand	polcalcins	樹、草、野草花粉
	parvalbumins	魚
類肌動蛋白結合蛋白	肌動蛋白結合蛋白 (profilin)	樹、草、野草花粉、蔬菜、水

(profilin-like)		果、膠乳
類原肌凝蛋白原肌凝蛋白 (tropomyosin)		甲殼類、軟體類及魚類寄生蟲
(tropomyosin-like)		海獸胃線蟲 (<i>Anisakis simplex</i>)、蟎類、蟑螂
cupin	蠶豆球蛋白 (vicilins)	堅果、花生、豆類、種子
	豆球蛋白	堅果、花生、豆類、種子
Bet v 1-like	Bet v 1	殼斗目花粉、水果、蔬菜、豆類、堅果
calycin	脂質運載蛋白 (lipocalins)	哺乳類、蟎類、蟑螂
double-psi	DPBB_1	草類花粉
beta-barrel	pollen_allerg_1	草類花粉

(1) 醇溶蛋白家族 (prolamin superfamily)

醇溶蛋白超家族之名字來自於穀類穀粒中醇溶的儲藏性蛋白。此超家族特色為具有 α -螺旋球狀結構域 (domain)，此結構域含有保守的半胱胺酸殘基模式，通常形成三至五個分子內雙硫鍵。除了保守的半胱胺酸模式之外不同家族間僅存在少量的序列相似性。此超家族包含穀類醇溶的儲藏性蛋白，如麥膠蛋白 (gliadins) 與麥蛋白 (glutenins) 及其他雙硫鍵豐富的蛋白質家族，如雙功能抑製劑 (bifunctional inhibitors)、2S 儲藏性白蛋白與非特異性脂質傳送蛋白 (nonspecific lipid transfer proteins)。

(2) 穀醇溶蛋白 (cereal prolamins) 家族

穀醇溶蛋白為在穀類穀粒中大量存在之種子儲藏性蛋白，與其他低分子量的超家族成員相比，其 α -螺旋結構域中插入了一段重複性序列 [19]。麥膠蛋白 (gliadins) 與麥蛋白 (glutenins) 為穀醇溶蛋白家族代表性之成員。麥膠蛋白可溶於醇類並被分類為 α/β -、 γ -、 ω -麥膠蛋白。麥蛋白為多聚體蛋白彼此間由雙硫鍵結



合。其分為高分子量與低分子量兩群[20]。

- 小麥(*Triticum aestivum*)含有一些過敏性穀醇溶蛋白。**Tri a 19** 為 ω -5 麥膠蛋白、**Tri a 21** 為 α/β -麥膠蛋白、**Tri a 26** 為高分子量之麥蛋白。

(3) 雙功能抑製劑 (bifunctional inhibitors)

與麥醇溶蛋白一樣雙功能抑製劑僅存在於穀類穀粒。這些過敏原藉由呼吸系統吸入麵粉或藉由消化系統食入含有小麥、大麥或米造成過敏。其為 12 到 16 kDa 之蛋白質，由 4 到 6 個雙硫鍵組合而成[21]。單體、異雙聚體和異四聚體形態之過敏原藉由其次單元的聚合度來分辨。雙功能抑製劑為造成烘焙師哮喘之主因，並同時是植物食品之過敏原[22]。

- **Hor v 15** 為大麥之單體 α -澱粉酶抑制劑，**Tri a 28** 及 **Tri a 29** 分別為小麥之二聚體及四聚體 α -澱粉酶抑制劑。

(4) 2S 白蛋白

2S 白蛋白為植物主要一群種子儲藏性蛋白質，許多重要之種子或堅果過敏原為 2S 白蛋白。多數 2S 白蛋白先合成成單鍊的蛋白再被切成一個小的及一個大的次單元。兩個次單元藉由 4-5 個雙硫鍵組合成緊密的 α -螺旋分子[23]。

- 過敏性 2S 白蛋白包含花生之 **Ara h 2** 及 **Ara h 6**、巴西果之 **Ber e 1**、榛果之 **Cor a 14**、英國胡桃之 **Jug r 1**、芝麻子之 **Ses i 1** 以及黃芥末之 **Sin a 1**。

(5) 非特異性脂質傳送蛋白 (nonspecific lipid transfer proteins, nsLTP)

nsLTP 之功能為調節囊泡與細胞膜間磷脂質之傳送，許多 nsLTP 也擔任抵抗防禦真菌及細菌之角色。過敏性 nsLTP 為一大群耐熱及消化之蛋白質[24]。nsLTP 高濃度存在於水果之表皮組織。另外過敏性 nsLTP 存在於堅果、種子、蔬菜及橡膠樹 (*Hevea brasiliensis*) 之乳汁。

- 薔薇科水果之 nsLTP 包含蘋果之 **Mal d 3** 及桃子之 **Pru p 3**，堅果中具代表性之過敏性 nsLTP 為榛果之 **Cor a 8** 與胡桃之 **Jug r 3**。花粉類 nsLTP 包含法國梧桐之 **Pla a 3** 與北艾之 **Art v 3**。玉米中之 nsLTP 為 **Zea m 14**。



(6) EF-hand 家族

許多鈣結合蛋白皆具有一個保守性結構域，此域為 12 個胺基酸組成之鈣結合環，此環包圍於由 12 個胺基酸組成之 α -螺旋之兩側[25]。這些蛋白質之功能包括訊號傳遞及鈣離子的緩衝或傳送。

(7) Polcalcins 家族

Polcalcins 為 9-kDa 之鈣結合花粉蛋白，其生理功能尚不清楚。通常 polcalcins 含有兩個 EF-hand 結構域，一些 polcalcins 相關之過敏原含有三或四個 EF-hand 結構域[26]。Polcalcins 為少數但高交叉反應性的花粉過敏原來自多個植物的科。

- 過敏性 polcalcins 包含來自樺樹之單體的 **Bet v 4**，來自貓尾草的二聚體 **Phl p 7** 及來自藜 (*Chenopodium album*) 之四聚體 **Che a 3**。

(8) Parvalbumins 家族

Parvalbumins 為 12 kDa 並含有兩個 EF-hand 結構域的蛋白。他們存在於脊椎動物快速抽動的肌肉纖維中，在肌肉放鬆時與鈣離子結合。來自魚與兩生類之 parvalbumins 為誘發多數魚類過敏患者的主要過敏原[27]。

- 過敏性 parvalbumins 包含大西洋鱈魚的 **Gad m 1** 與大西洋鮭魚的 **Sal s 1** 與螃蟹中的 **Cyp c 1**。

(9) 類肌動蛋白結合蛋白家族 (profilin-like superfamily)

Profilin 為可以在所有的真核細胞中發現的小胞漿蛋白。Profilin 會與單體的肌動蛋白和其他肌肉蛋白結合，並在細胞移動、胞質分裂及訊號傳遞時調節肌動蛋白聚合作用之動力。來自高等植物的 profilin 組成了一個蛋白質家族，其蛋白質間序列非常保守，在親緣關係非常遙遠的成員間序列相似性都至少有 75%[28]。Profilin 專一之 IgE 反應通常與所有植物來源的同源物產生交叉反應，這些過敏原被認為是花粉-食物過敏的一個風險因子[29]。

- 過敏性 profilin 包含北艾花粉之 **Art v 4**、樺樹花粉之 **Bet v 2**、橄欖花粉之 **Ole e 2**、柳橙之 **Cit s 2**、厚皮甜瓜之 **Cuc m 2** 及香蕉之 **Mus a 1**。



(10) 類原肌凝蛋白家族 (tropomyosin-like superfamily)

Tropomyosin 存在於肌肉及非肌肉細胞。於橫紋肌中其調解肌鈣蛋白複體與肌動蛋白之互動以調節肌肉收縮。Tropomyosin 被認定是動物性食物像是甲殼類、軟體類及魚類寄生蟲海獸胃線蟲 (*Anisakis simplex*)之過敏原[30]。Tropomyosin 同時也是節肢動物 (塵蟎、蟑螂)中之吸入性過敏原。Tropomyosin 之序列具很高的保守性，說明了其在含有 tropomyosin 來源間的經常交叉反應[31]。

- 印度明對蝦中之 **Pen I 1**、德國蟑螂中之 **Bla g 1** 及家塵蟎中之 **Der p 10** 為有名之過敏性 tropomyosin。

(11) Cupin 家族 (cupin superfamily)

Cupin 超家族為一巨大且蛋白質生理功能差異非常大之超家族，其具有共同起源並可被追溯從細菌至真核生物包含動物與高等植物。Cupin 超家族下具 57 個蛋白質家族。最大的兩個家族為 7/8S 與 11S 種子儲藏性球蛋白，其為植物種子中主要的成分為人類飲食中重要的蛋白質來源且同時為過敏原[32, 33]。

(12) 蠶豆球蛋白家族 (Vicilins family)

這些同三聚體蛋白分子量約 150 – 190 kDa。其次單元之組成差距非常大歸因於其單體在蛋白質分解及醣基化過程之差異。

- 過敏性蠶豆球蛋白包含花生 **Ara h 1**、黃豆 **Gly m 5**、胡桃 **Jug r 2** 及芝麻 **Ses i 3**。

(13) 豆球蛋白家族 (Legumins family)

成熟之豆球蛋白由兩個三聚體形成一個六聚體。

- 過敏性豆球蛋白包含花生 **Ara h 3**、黃豆 **Gly m 6**、巴西堅果 **Ber e 2** 及蕎麥 **Fag e 1**。

(14) 類 Bet v 1 家族 (Bet v 1-like superfamily)

類 **Bet v 1** 超家族含有來自 1,452 個物種之 14,065 種蛋白質，其序列全部與樺樹 (*Betula verrucosa*)花粉之主要過敏原 **Bet v 1** 相關。這些蛋白分散於 14 個蛋

白質家族。這些來自 14 個家族 (其中一個為 **Bet v 1** 家族)的蛋白都具有相同的結構，此結構由 7 個反平行的 β -摺板及 3 個 α -螺旋組成[34]。至今過敏原被發現存在於 **Bet v 1** 家族下 11 個次家族中的其中 3 個次家族。

(15) 十號致病性相關蛋白質次家族 (Pathogenesis-related protein subfamily 10, PR-10)

PR-10 蛋白質為 **Bet v 1** 家族下 11 個次家族中的其中一個。這些蛋白之表現由病原體攻擊或非生物體逆境或由生長調節所引發。PR-10 蛋白於生殖組織中高濃度表現，像是於花粉、種子及果實。許多樺樹花粉過敏患者對許多水果與蔬菜產生過敏反應，是因為 **Bet v 1** 與植物食物中同源過敏原產生 IgE 交叉反應所造成。多數 **Bet v 1** 相關之食物過敏原存在於特定植物科別：薔薇科 (蘋果、梨子、核果)、繖形花科 (西洋芹、胡蘿蔔)、豆科 (黃豆、花生)。

(16) 成熟相關蛋白/主要乳汁蛋白家族 (ripening-related proteins/major latex proteins family, RRR/MLP family)

RRR/MLP 蛋白家族為另一個 **Bet v 1** 家族之次家族。奇異果之 Act d 11 為第一個來自 RRR/MLP 次家族之 **Bet v 1** 相關過敏原。

(17) 細胞分裂素專一結合蛋白家族(cytokinin-specific binding proteins subfamily, CSBP subfamily)

來自綠豆之 Vig r 6 為第一個來自 CSBP 次家族的 **Bet v 1** 相關過敏原。

(18) Calycin 家族 (Calycin superfamily)

Calycin 超家族由 16 個家族組成，儘管結構相似此超家族成員間之序列相似性低。Calycin 結構基於八股 β -桶狀結構並可能與不同配體結合[35]。

(19) 脂質運載蛋白 (Lipocalins)

Lipocalins 為輸水性小分子之運載者，像是脂質、固醇類激素、後膽色素類 (bilins)及類視色素。Lipocalins 摺疊成一八股反平行 β -桶狀結構。此家族之過敏原包含 β -乳球蛋白、哺乳動物皮屑過敏原及細胞質脂肪酸結合蛋白[36, 37]。 β -乳

球蛋白為反芻物種之主要乳清蛋白。**Bos d 5** 為牛乳中主要之過敏原。其他物種與牛乳蛋白也存在交叉反應。Lipocalins 組成動物皮屑過敏原的一大部分。細胞質脂肪酸結合蛋白與細胞質外 lipocalins 及 β -乳球蛋白間具遙遠的親緣關係。其為塵蟎與蟑螂中之小部分過敏原。

- 哺乳動物來源之過敏性 lipocalins 為來自馬之 **Equ c 1**、牛之 **Bos d 2**、狗之 **Can f 1** 與 **Can f 2** 及貓之 **Fel d 4**。

(20) Double-psi beta-barrel superfamily, DPBB superfamily

β -桶狀結構為蛋白質結構中常見之元素。不同股數之桶狀結構能夠有不同的股間連結或拓撲 (topology)。其中由六個 β 股特殊排列而成之拓撲稱為 double-psi beta-barrel (DPBB)[38]。第一組之草類花粉過敏原存在於 DPBB 超家族下的 DPBB_1 家族中。其與 β -胞壁擴張蛋白具很近的親緣關係，兩者皆含有兩個結構域。第一個結構域為六股的 DPBB 拓撲，與醣苷水解酶家族的 45 個蛋白有遙遠的親緣關係。第二個結構域由類似免疫球蛋白摺法的兩個堆疊 β -摺板組成，此域同時也稱為第二組草類花粉過敏原結構域[39]。胞壁擴張蛋白之活性通常與生長細胞之細胞壁鬆動活性相關，包含花粉管穿過柱頭及花柱[40]。第二與第三組草類花粉過敏原同屬於花粉過敏 1 家族 (Pollen_allerg_1)，並與 β -胞壁擴張蛋白之第二結構域相關。

- 第一組的草類花粉過敏原為黑麥草之 **Lol p 1**、貓尾草之 **Phl p 1** 與草地早熟禾之 **Poa p 1**。第二/三類草類花粉過敏原為鴨茅之 **Dac g 2** 與 **Dac g 3**、黑麥草之 **Lol p 2** 與 **Lol p 3** 及貓尾草之 **Phl p 2** 與 **Phl p 3**。

3. 常見的食品過敏原

食物過敏主要由食物內生性的蛋白過敏原所引起，無論動物性或植物性食物都可能含有過敏原。因為食品過敏的種類及發生機制不同，因此造成兒童過敏及成人過敏的食品，也不盡相同。90% 之食品過敏由八種食物群所造成，包含蛋類、魚類、奶類、花生、貝類、黃豆、堅果類及小麥，為「八大過敏原」[41]。

文獻上，常引發兒童過敏之食物主要有牛奶、蛋、花生、大豆、小麥；而引起成年人花粉相關食物過敏之食物則有水果、蔬菜、堅果、種子及魚貝類等[42-45]。榮民總醫院吳子聰教授曾針對台灣常見的食物過敏進行研究，結果顯示蝦、蟹、牛奶、蛋、花生是台灣地區最易引起過敏反應的第一級食物，第二級致敏食物為芒果、其他海鮮，第三級致敏食物則是花枝、蛤蠣、魷魚、墨魚、螺、鱈魚、大豆、小麥、奇異果等[46]。

4. 食品過敏與食品安全

食品過敏 (food allergy) 是重要的食因性疾病 (foodborne illness) 之一，也是現代非常重要的食品安全議題之一。美國國會在 2004 年通過「食物過敏原與消費者保護法案」(Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004, FALCPA 2004)，後續 FDA 規定自 2006 年開始，所有包裝食品中，若含有主要過敏原 (major food allergen) 之原料，及部份可能引起過敏的食品添加物，均應予以標示[1]。除美國之外，在聯合國食品法典委員會 (CAC Food Standards 4.2.1.4)、歐盟(2000/13/EC, 2003/89/EC)、英國(Directive 2006/142/EC)、日本 (食品安全法, 食品衛生執行條例)、澳洲、紐西蘭、中國 (預包裝食品標籤通則) 等國，均對食品過敏成份的標示，有不等的法令規範[1, 2]，我國亦於 2014 年發布「食品過敏原標示規定」，規定於 2015 年 7 月 1 日起市售有容器或包裝之食品含有下列對特殊過敏體質者致生過敏之內容物，應於容器或外包裝上，顯著標示含有致過敏性內容物名稱之醒語資訊，須標示之內容物包含蝦、蟹、芒果、花生、牛奶、蛋及其製品，另公布「食品過敏原標示之建議事項」，建議得自願性標示相關醒語，包含羊奶、魚類、頭足類、螺貝類、堅果種子類、含有麩質之穀類、大豆、奇異果及其製品，與產品中亞硫酸鹽類或二氧化硫殘留量總計達 10 毫克/公斤以上時。鑑於食品過敏對食品安全以及人體健康非常重要，及各國過敏原強制標示之規定，有必要建立食品過敏原之分析平台。

5. 食品過敏原閾值

現今食品過敏原標示僅以醒語標示過敏原之存在，而無法明確表達其代表之風險，建立食品過敏原閾值能幫助解決當前法規對於食品過敏原標示之不確定性。食品過敏原閾值之定義為誘發劑量或能夠引起過敏反應之最低攝食過敏原量[47]。定義此閾值能為各個不同團體帶來效益：食物過敏患者及其照顧者、食品產業、政策決定者及政府部門[47-49]。考慮到現行標示法規的不足，定義食品過敏原閾值為重要之策略。現行法規，以美國「食物過敏原與消費者保護法案」FALCPA 為例，其「可能含有」、「於同一設備製作」、「於同一工廠製作」之防範性醒語標示造成了不確定性，因為這些標示無法明確闡明其含有主要過敏原之風險 [50-53]。數據顯示許多過敏患者因各種原因忽略防範性醒語標示，原因包括：先前曾安全的食用過此產品因此產生了此產品是安全的這種錯誤的假設；文字之誤解（將「可能含有」誤解與「於同一工廠製作」相同）；或直接忽略其潛在風險 [51, 54]。這是個潛在的危險情形，考慮到這些產品通常含有百萬分之一水平的過敏原[51-53, 55]。

然而食品過敏原閾值之建立具有潛在問題，包含食品過敏原閾值的代表性不足、消費者對於此閾值之接受度不足、社會對於此閾值之信任度不足以及建立過程之花費過大，其中花費包含評估、偵測及標示花費高於其帶來之利益。目前食品產業主要依靠酵素免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 為基礎的過敏原檢驗方法來確效其過敏原控制計畫[51, 52, 55]。儘管於發展及使用這些過敏原測試方法有大量的進展，仍需投入更多的努力於發展、提升及標準化過敏原食品之檢驗方法，及降低方法之價格來擴大小型製造商對方法之使用及接受度[53]。建立食品過敏原閾值能幫助解決當前法規對於食品過敏原標示之不確定性，然而在建立此閾值系統中仍缺乏價格划算、可信、高通量之標準化的過敏原分析方法。

二、 食品過敏原分析方法

現今用於偵測食物中潛在過敏原的方法以過敏原本身或者是能夠代表過敏原存在的標記為目標。這些食品標記通常於過敏食品中具有蛋白質專一性或是為有特徵之 DNA 片段[56]。以蛋白質為目標之方法通常涉及免疫學步驟，像是放射性過敏原吸附試驗 (radio-allergosorbent test; RAST)、酵素過敏原吸附試驗 (enzyme allergosorbent test; EAST)、火箭免疫電泳法 (rocket immunoelectrophoresis; RIE)、免疫墨點法 (immunoblotting) 及酵素鏈結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，現今 ELISA 法被用於例行的食品分析，因其具高準確性、簡單處理及於步驟標準化有很高的潛力。而以 DNA 為主之方法則利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 來放大特定之 DNA 片段，藉由即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction; qPCR/qrt-PCR) 可以得到高精確度之結果[56]。而於過去幾年間，於開發食品過敏原分析方法時，開發者使用質譜儀系統以解決現今常用方法之主要缺點 [57]。

1. 以免疫為基礎之食品過敏原分析法

酵素鏈結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 為現今最廣泛使用於例行測定及篩選食品過敏原的分析技術。大體上 ELISA 可依偵測原理為三明治或競爭法分為兩種形式。三明治式 ELISA (sandwich ELISA; s-ELISA) 利用對目標蛋白(過敏原或食品標記)專一的固定式抗體來捕捉目標分析物，目標分析物則再被另一抗原專一並帶有酵素標記的抗體辨認，形成「三明治」。於偵測步驟時此標記於抗體之酵素與特定基質反應產生有顏色之產物，有顏色之產物之吸光值與分析物之濃度成直接的比例關係。而在三明治法因抗原必須要有一個以上之抗原決定位，此方法只能應用於大分子像是蛋白質。因此 s-ELISA 為最常見的食品過敏原免疫偵測法[58]。



儘管 ELISA 具高靈敏性且專一性並能夠產出定量結果[56]，但是 ELISA 法具下述缺點。

(1) 可偵測之過敏原目標受限制

雖然八大過敏原中大多數皆有可利用的 ELISA 套組，但多數的套組只針對來自單一食品中的單一過敏原，舉例來說，牛奶過敏原之商業 ELISA 套組之偵測目標僅包含酪蛋白 (casein)、 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin)及總過敏原含量 (酪蛋白及 β -乳球蛋白)，而其他牛奶中已知的過敏原像是同為主要過敏原的 α -乳球蛋白 (α -lactoglobulin) 則無被列為目標。

(2) 對抗體瞭解程度不足

抗體為主之方法需有單株亦或多株抗體，多數抗體為商業可及，但多數抗體之特性尚未被清楚了解。使用抗體為主之方法時可能會產生交叉反應，造成潛在偽陽性結果。複雜之基質可能會包含影響物質像是多酚類或單寧，可能會與蛋白質或抗體反應或結合。此外食品加工或樣品準備過程可能會修飾過敏原，造成無法被目標抗體辨認產生潛在偽陰性結果。食品之熱加工過程可能會破壞或創造結構性抗原決定位，造成抗體辨認上之錯誤[59]。

(3) 不同套組結果差異大

文獻[60-62]比較不同 ELISA 套組間之分析結果，其準確度、精密度甚至適用範圍皆有明顯缺陷。因缺乏通用之標準品或參考物質，故不同 ELISA 套組間相比較非常困難。

(4) 不具指紋不能夠鑑定

ELISA 套組針對特定過敏原目標進行偵測或定量，然而受限於其抗體與過敏原抗原決定位的專一性，其對非目標之蛋白不具分辨性，故 ELISA 法不能用做鑑定過敏原之方法。

這些不足之處明顯表明了於食品過敏原分析定量方法上需要其他方法之迫切需求[57]。



2. 以核酸為基礎之食品過敏原分析方法

聚合酶連鎖反應 (PCR) 用於擴增一小段已知的 DNA 片段，可能是單個基因，或僅是某個基因的一部分。一般的聚合酶連鎖反應由 20 到 35 個循環組成，每個循環包括以下 3 個步驟：

(1) 變性

利用高溫 (93-98°C) 使雙鏈 DNA 分離。高溫將連接兩條 DNA 鏈的氫鍵打斷。在第一個循環之前，通常加熱長一些時間以確保模板和引物完全分離，僅以單鏈形式存在。該步驟時間 1-2 分鐘，接下來機器就控制溫度進入循環階段。

(2) 接合

在 DNA 雙鏈分離後，降低溫度使得引物可以結合於單鏈 DNA 上。此階段的溫度通常低於引子熔點 5°C。

(3) 延伸

DNA 聚合酶由降溫時結合上的引子開始沿著 DNA 鏈合成互補鏈。此階段的溫度依賴於 DNA 聚合酶。該步驟時間依賴於聚合酶以及需要合成的 DNA 片斷長度。

即時聚合酶連鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction; qPCR/qrt-PCR) 是一種在 DNA 擴增反應中，以螢光染劑偵測每次聚合酶連鎖反應 (PCR) 循環後產物總量的方法，其偵測範圍廣、靈敏度高、準確、專一及快速。

qPCR 與 ELISA 法相比因多數情況下 DNA 比起蛋白質較不易受到熱變性影響，因此偽陰性結果可被避免。然而與蛋白質相同，食品原料可能會與 DNA 反應並影響 PCR 反應的進行。然而此方法並無法提供蛋白質含量的直接資訊，因其仍缺乏校正參數來將 DNA 的重量、濃度或套數 (copy number) 轉換為蛋白質

[59]。

3. 以質譜為基礎之食品過敏原分析方法

以質譜系統為基礎之食品過敏原分析方法於近年快速且蓬勃發展。質譜儀 (mass spectrometry, MS) 主要由三個部分組成：離子源、質量分析器以及偵測器。最為常見之兩種離子源為基質輔助雷射脫附電離 (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 及電灑游離 (electrospray ionization, ESI)。質量分析器於蛋白質體學最常見的為飛行時間 (time of flight, TOF) 及離子阱 (ion trap, IT)，於定量上則以三重四極柱 (triple quadrupoles, TQ/QQQ) 最為廣泛利用。通常會再搭配樣品分離方法像是高/極效液相層析 (High/Ultra performance liquid chromatography, HPLC/UPLC) 或是氣相層析 (gas chromatography, GC)，於分析食品過敏原通常使用極效液相層析。組合不同之層析法、離子源與質量分析器可得混和式的質譜儀系統，像是 UPLC-ESI-qTOF、MALDI-TOF、UPLC-ESI-IT、UPLC-ESI-TQ 等系統[59]。

蛋白質體學於質譜儀分析蛋白質時，需一系列的方法步驟包含以蛋白酶消化蛋白質來產生胜肽並將其引導至質譜儀中進行分析。接著利用生物資訊工具及蛋白質資料庫來分析質譜圖。藉由荷質比確認胜肽序列，而過敏原蛋白可利用其衍生之胜肽序列與已知的蛋白相比對而確認。蛋白質定量分析時之步驟將於後面章節詳細說明。

質譜儀系統具有許多優點，像是簡單的樣品準備方法、快速的分析時間及能夠同時分析多個過敏原。質譜儀與其他同樣擁有低偵測極限 (limit of detection, LOD) 與定量極限 (limit of quantification, LOQ) 的方法相比較為強大且穩定，並能夠簡單的自動化及標準化。另一優點是擁有更明確的標準，使得比較方法間與實驗室間的結果更為容易。食品熱加工所產生之後轉譯修飾、蛋白質立體結構破壞

可能會影響 ELISA 法的靈敏性與專一性，而質譜法則受影響程度較小，因其偵測較穩定之蛋白質一級結構。質譜法更能夠提供過敏原的胺基酸序列，並辨認後轉譯修飾以及蛋白質亞型 (protein isoform)。總結來說，質譜儀系統於近幾年被應用於開發食品過敏原之分析方法，其能夠解決現在已開發之方法的主要缺點，如非特異性抗體-抗原反應與未知修飾的問題[59]。

三、 奇異果

1. 歷史與品種

奇異果為獼猴桃屬 (*Actinidia*) 木質藤蔓植物的可食性果實。獼猴桃屬下有許多物種與許多品種，各有不同的特性。奇異果又稱獼猴桃，原生於中國南方，1904 年時奇異果種子被傳教士引進紐西蘭，被當地人稱為中國醋栗 (chinese gooseberry)，因其嘗起來像醋栗且來自中國[63, 64]。而現今奇異果中最重要之綠肉奇異果栽培種 'Hayward' 即是那批種子的直系後代，其於 1920 年代由 Hayward Wright 在艾文代爾 (Avondale) 地區發展出來。於 1950 年代紐西蘭開始將奇異果出口至美國，但因美國正值冷戰時期，基於政治考量名稱奇異果 (kiwifruit) 被提出並接受[63]。於 2000 年時黃肉奇異果栽培種 'Hort 16A' (ZESPRI®) 被引入市場，打破了奇異果只有綠肉的概念。至今許多國家都有栽種奇異果，像是義大利、中國、智利、法國、希臘、日本與美國[64]。現今市面上最常見的兩個栽培種為綠肉的美味獼猴桃 *Actinidia deliciosa* 'Hayward' 與黃肉之中華獼猴桃 *Actinidia chinensis* 'Hort 16A', (ZESPRI®)。市面上之其他栽培種還有 *A. deliciosa* 'Summer 3373'、*A. chinensis* 'Jintao' 或是俗稱奇異果莓的 *A. arguta*，或極可能於未來上市的 *A. eriantha* 'Eriantha 96' 和 'Eriantha 114'[65]。

(1) 美味獼猴桃 *Actinidia deliciosa* 'Hayward'

栽培種 'Hayward' 之果實小呈蛋形，大小近大顆的雞蛋，果皮上有毛並呈現褐色包覆著果肉，果肉為半透明且鮮綠色，於果肉中包覆著排狀排列的可食黑色小種子，果肉具有撲鼻酸甜動人的香味[66, 67]。

(2) 中華獼猴桃 *Actinidia chinensis* ‘Hort 16A’

黃金奇異果栽培種 ‘Hort 16A’ 之形狀特殊，其具有突出的花柱頂，稱為「喙 (beak)」。果實具有明亮的黃色果肉，包覆於光滑、無毛、青銅色果皮中，果肉具有香甜和熱帶的味道[66, 67]。



2. 臺灣奇異果現況

於 1980 年代起台灣開始進口奇異果，於市面上首次能購買到此特殊之水果，於短短 40 年進口量每年持續成長，於 2017 年奇異果年進口重量已到 42,019 公噸，年進口價值為 124,701 千美元，佔總生鮮冷藏水果進口價值之 16.9%，為總生鮮冷藏水果第二名，僅次於蘋果，為農產品進口值之第 24 名。隨新食物之引入同時亦可能引入新的風險，其中對新食物之過敏症即是其中一個不可忽視之風險，而在隨著進口量逐年增加，本國國民更亦暴露於奇異果過敏之風險下。

3. 營養價值

與其他常見的水果相比不論是綠肉或黃肉的奇異果皆是營養密度高的水果，其尤其富含維生素 C、E、K、葉酸、類胡蘿蔔素、鉀、纖維及數種植化素 (phytochemical)[67]。黃金奇異果搭配富含鐵的飲食是幫助輕微鐵元素缺乏的女性增加的鐵含量的有效策略[68]。規律食用綠色或黃金奇異果可能對血脂組成有良好的影響，例如增加高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 含量、減少總膽固醇和高密度脂蛋白膽固醇比值 (TC/HDL-C) 及三酸甘油脂 (TG) 含量[69-72]，同時具有抗血栓的效果，如減少血小板聚集[69, 72, 73]。規律食用奇異果亦有抗高血壓的效果，此效果來自於血管緊縮素轉化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 活性的抑制調控[69, 72, 73]。綠色奇異果亦能幫助消化，其能幫助有效率的消化蛋白質、增加糞便體積與柔軟度及提供潤滑幫助排便[67]。規律食用綠色與黃色奇異果能增加體內的抗氧化能力，保護身體受到內生性氧化的傷害[72, 74]。連續四週每日食用黃金奇異果可減少幼童發生感冒或流感類的發生率，且於易發感冒與流感類症狀的兩個族群(幼童與年長者)中減少感冒或流感類症狀的嚴重性[75,

76]。

4. 產業應用

奇異果被大量應用於食品產業，做為果醬、果凍、糖漿、糕點之原料[77]，而又因其含有奇異果酵素 Actinidin，為一種半胱胺酸蛋白酶，故被利用為食品加工助劑，例如肉質軟化劑[78, 79]、起司產業之乳凝結劑[80]。做為肉質軟化劑，actinidin 水解效果雖不如番木瓜酵素 papain，但番木瓜酵素因活性太強常會造成肉表面之過度軟化問題，此問題亦在鳳梨酵素 bromelain、無花果酵素 ficin 中發生，故水解效果溫和之 actinidin 具有其優勢，包含無不良風味及不會產生肉面黏糊現象，然而常需提高活性來達到同等柔軟度[81]。亦有研究成功將奇異果酵素做為舌面生物膜移除劑[82]，

5. 奇異果過敏

將新的物質引入人類飲食中存在著風險，而奇異果就能做為此現象之範例。自引入人類飲食後，第一起記載之奇異果過敏反應發生於 1981 年[83]，至今已成為十大食品過敏原之一。奇異果過敏之發生頻率於西方人口更高[84]。奇異果過敏之症狀從輕微之口腔黏膜局部性反應至嚴重之系統性反應，系統性反應特別好發於幼童[84]。其症狀嚴重性與致敏模式依地域而異，於全歐洲可觀察到許多不同之致敏模式。奇異果過敏症並非同質單一之病症，於臨床可建立數個不同的子族群[85]。奇異果過敏可歸因於單一致敏反應 (monosensitization) 或與其他過敏原產生交叉反應 (cross reaction)，主要產生交叉反應之過敏原為樺樹與草類花粉 [86]。

西方之奇異果過敏人口比例較高，於芬蘭研究調查食物過敏的盛行率，報告中奇異果最常造成不良反應 (38.4%)[87]。而在法國學童中奇異果過敏人數僅次於對常見之蛋與奶過敏人數[43]。在一個大型的歐洲人口研究調查報告中，奇異果過敏為於歐洲前六常見之食物過敏[88]。於台灣食品過敏症盛行率之調查研究結果，在 2086 位食品過敏人口中奇異果過敏之人數為 57 人 (2.7%)，名列台灣

前十大食品過敏原之一[46]。而奇異果過敏又會因地區而有所不同，於聯合國 EUROPREVALL 報告中，來自冰島之病患相較於其他地區之病患更易產生嚴重之奇異果過敏反應，並更常辨認到 Act d 1。在西、中、東歐地區奇異果過敏最常伴隨樺樹花粉過敏，而相對應地區之患者主要之奇異果過敏原亦為與樺樹花粉相關的 Act d 8；在南歐則最常伴隨草類花粉，主要過敏原則為 Act d 9，而 Act d 10 亦為此族群中比例較高之過敏原[65, 89]。

而不同之奇異果栽培種亦展現了不同之致敏性，一項於荷蘭與瑞典過敏患者上進行的研究，其利用了三個不同種六個不同栽培種的奇異果進行針刺試驗 (prick-to-prick test)，結果可將奇異果劃分為低致敏性 (Hort16A)、中致敏性 (Summer 3373、Jintao) 與高致敏性 (Eriantha 96、Eriantha 114 及 Hayward) 三類。而常見之黃金奇異果 Hort16A 及較新之綠奇異果 Summer 3373 與綠奇異果 Hayward 相比較低之致敏性也由食物過敏原激發測試 (food challenge) 確認[90]。

6. 奇異果過敏原種類

奇異果過敏原根據世界衛生組織過敏原命名小組委員會 (WHO/IUIS allergen nomenclature sub-committee) 有 13 種，分別為半胱胺酸蛋白酶 (cysteine protease) Act d 1、索馬甜蛋白 (thaumatin-like protein) Act d 2、Act d 3、植物半胱胺酸蛋白酶抑制劑 (phytolectin) Act d 4、奇異果素 (kiwellin) Act d 5、果膠甲酯酶抑制劑 (pectin methylesterase inhibitor) Act d 6、果膠甲酯酶 (pectin methylesterase) Act d 7、十號致病相關蛋白質 (pathogenesis-related protein, PR-10) Act d 8、肌動蛋白結合蛋白 (profilin) Act d 9、非特異性脂質傳送蛋白 (nsLTP) Act d 10、主要乳汁蛋白/成熟相關蛋白 (major latex protein/ripening-related protein, MLP/RRP) Act d 11、11S 球蛋白 (cupin, 11S globulin) Act d 12 及 2S 白蛋白 (2S albumin) Act d 13。

(1) Act d 1

Act d 1 為半胱胺酸蛋白酶，其 EC 編號為 EC 3.4.22.14，俗稱為奇異果酵素

或 actinidin，來自於番木瓜蛋白酶家族 (papain superfamily)。Actinidin 之成熟形態包含單一多肽鏈組成之含有三個雙硫鍵的兩個結構域 (domain)，其分子量為 23.8 kDa 而等電點為 3.5 [91-93]。Actinidin 有數個亞型蛋白，編碼於十個以上不同之 mRNA 中，亞型蛋白之預測等電點範圍從酸性 (3.9) 至鹼性 (9.3) 都有[94]。Actinidin 之活性 pH 範圍 (pH 4 - pH 10) 與基質專一性相當廣，其偏好水解離胺酸 (Lys) 羧基端之醯胺鍵與酯鍵[77, 95, 96]。Actinidin 不會與樺樹花粉或草類花粉產生交叉過敏反應，故被認為是造成奇異果單一致敏反應 (monosensitization) 的其中一個過敏原[77, 85, 92, 97, 98]。在多數的研究中 actinidin 被辨識為是奇異果過敏患者的主要過敏原[97-101]。

Actinidin 佔綠奇異果 (*Actinidia deliciosa* 'Hayward') 總可溶性蛋白含量之 50%，而在黃金奇異果中 (*Actinidia chinensis* 'Hort 16A') 則相當低[94, 102]。免疫組織定位研究發現 actinidin 分佈於綠奇異果外果皮小細胞之液胞中[94]。其他來自番木瓜、鳳梨、無花果等，同為 papain 家族的同源性半胱胺酸蛋白酶，亦會在特定組織或細胞中高含量的累積[77]。這些酵素的生理角色尚未知，但有人提出其功能為儲藏性蛋白質或參與昆蟲、植物疾病或逆境的防禦機制[101, 103]。

Actinidin 在熱處理後仍保持其致敏性，此性質為造成攝食含有奇異果之食品後產生過敏反應之重要特性[77]。儘管某些研究指出 actinidin 在經過腸胃道時容易被分解[104]，但其他研究顯示 actinidin 在經過腸與胃的消化環境後，仍保持其酵素活性並能幫助消化食物中之蛋白質[105, 106]。

(2) Act d 5

Act d 5 又稱為 kiwellin 最先於綠奇異果中發現，為一種過敏原同時亦是奇異果蛋白質成分之主要組成之一[107]，於黃金奇異果中亦存在，且 kiwellin 是黃金奇異果中最大量的蛋白質成分。Kiwellin 含有 189 個胺基酸，而於序列之 61 號位置存在著序列異質性 (sequence heterogeneity)，40%之蛋白質分子的 61 號位置上之酪胺酸 (Tyr) 被組胺酸 (His) 所取代[77]。

Kiwellin 被分割成四個以下的胜肽：kissper、KiTH1、KiTH2、KiTH3[108]。Kissper 為一段 39 個胺基酸之胜肽，可於奇異果可食部位中大量純化出來，其序列與 kiwellin N 端前 39 個胺基酸序列完全相同。Kiwellin 為 kissper 之前驅物，kiwellin 經過 Thr 39 與 Thr 40 間肽鍵斷開而產生 kissper。Kissper 因大量存在於成熟的奇異果果實中，且同時具有高抗蛋白質水解性，導致其非常有可能影響腸胃的生理[109]。KiTH 之一級結構與 kiwellin 序列 40 - 189 相同，從綠奇異果中純化出之 KiTH 與 kissper 化學計量大約相同，故兩者產生之方式可能皆是從 kiwellin 之水解而來[108]。而 KiTH 與 kissper 於黃金奇異果中皆無法被偵測到。研究觀察到兩者的存在與高含量之 actinidin 存在著關聯性，而後續研究更進一步證明了 actinidin 造成 kiwellin 之水解而產生 KiTH 和 kissper[77, 108]。

Kiwellin 會被奇異果過敏患者之 IgE 所辨認，而與綠奇異果相似，黃金奇異果之同源性蛋白質亦展現 IgE 結合能力。利用同一血清測試來自綠奇異果與黃金奇異果之 kiwellin 蛋白，兩者皆能被血清所辨識，甚至西方墨點法之訊號亦能相比較，可能意味著 IgE 結合抗原決定位的保守性。KiTH 亦被偵測為 IgE 結合分子，結果表示 kiwellin 可能含有隱藏性 IgE 結合抗原決定位，在 kissper 被水解後於 KiTH 上產生；kissper 本身可能即是一個 IgE 結合抗原決定位[77, 108]。而另有研究發現，此過敏原在不同環境下 (pH、極性) 可能產生體內的結構變化而暴露出不同的抗原決定位，包含特異性 IgE 的合成/相互作用。使用標準的皮下測試 (skin prick test, SPT) 發現於 29 個奇異果過敏人口中，有 8 個 (28%) 會對 Kiwellin 產生陽性反應[110]。

(3) Act d 11

Act d 11 為一個 17 kDa 與成熟相關之蛋白質，其於綠奇異果萃取物中之含量與正常成熟過程與採收後處理 (如乙烯處理) 相關[111]。與 Act d 11 序列與屬於 Bet v 1 家族 (superfamily) 的主要乳汁蛋白/成熟相關蛋白 (major latex protein/ripening-related protein, MLP/RRP) 家族有最高程度的相似性[112]，而與

十號致病相關蛋白質 (pathogenesis-related protein, PR-10) 家族 (Bet v 1 為其中一員) 有較低程度的序列相似性[111]。多數 Bet v 1 或其相關過敏原中屬於 B 細胞或 T 細胞抗原決定位的胺基酸序列皆在 Act d 11 中出現，而主要聚集於 p-loop 模體 (motif) 或 C 端結構域 (domain) 上[111]。

在 Bet v 1 被 IgG、IgE 結合的過程中，Glu⁴⁵ 扮演了非常重要的角色，而與其他 MLP/PRPs 相似，Act d 11 與其他 Bet v 1 同源過敏原皆共有此特徵。由 Act d 11 抑制 IgE 結合 Bet v 1 或其同源物之能力，可推測其與 Bet v 1 類似物共抗原決定位之區域比從序列相似度推測的還要大。Act d 11 在皮下測試 (SPT)、雙盲合併安慰劑對照組的激發測試 (double blind placebo-controlled food challenge, DBPCFC)、免疫墨點法 (immunoblot) 中皆產生 IgE 反應性。Act d 11 能部分抑制 Bet v 1 及其同源物 (Mal d 1、Cor a 1) 與 IgE 之結合。而 Bet v 1 可達到 100% 之對 Act d 11 正反應血清之 IgE 抑制[111]。

四、 質譜技術

1. 用於定量分析之質譜技術

(1) 提取離子色譜圖 (eXtracted Ion Chromatograms, XIC)

最簡單用於 LC-MS 是之定量方法為提取離子色譜圖 (eXtracted Ion Chromatograms, XIC)，藉由全域的 MS 掃描模式獲得數據，並於資料獲取後進行數據處理建立目標離子的洗脫曲線。XIC 之波峰高度或面積能夠用於計算分析物之含量。

(2) 選定離子監測 (selected ion monitoring, SIM)

SIM 為藉由掃描式質譜儀將資料獲取範圍限定於目標離子荷質比之周圍。範圍越窄 SIM 方法越專一。SIM 比起全域掃描的 XIC 更加靈敏，因為 MS 能夠於目標範圍內停留更長的時間。數個給定荷質比範圍的離子可以被觀察並累積量化，定量方式仍然是透過離子之層析圖。

(3) 選擇反應監測 (selected reaction monitoring, SRM)

SRM 為非掃描式的技術，主要應用於三重四極柱(triple-quadrupole, QQQ/TQ)設備上，藉由碎片化來提高選擇性。於 SRM 實驗中兩個質量分析器被用做靜態的質量篩選器，用以監測特定前驅物離子之特定碎片離子。結合兩個質量篩選過程之選擇性與高佔空比 (duty cycle)可得到無可媲美的高靈敏性定量分析方法。所選擇之前驅離子與碎片離子荷質比所組成的特定一對數值被稱為「躍遷」(transition)。舉例來說像是 673.5/534.3。

(4) 偽選擇反應監測 (pseudo SRM)

Pseudo SRM 被用來描述以線性離子阱(linear ion trap, LIT)或 QqTOF 來對特定前驅離子的碎片離子進行一個小範圍的掃描。雖然此掃描模式與 SRM 相似，但其目標碎片離子之訊號為藉由電子式的提取，故也可被視為碎片離子之 SIM。

(5) 多重反應監測(multiple reaction monitoring, MRM)

藉由於同一個實驗的層析時間間快速的循環於多個躍遷，並記錄各躍遷的訊號來做為洗脫時間的函數，即能偵測複數的 SRM 躍遷。此方法於偵測層析時之共洗脫物的多個躍遷具有更高的選擇性。這樣的並行式 SRM 被廣泛稱為多重反應監測 MRM，然而此名稱遭到國際純化學暨應用化學聯合會命名法 (IUPAC nomenclature)所棄用(Provisional Recommendations, August 2006)[113]。

2. SRM/ MRM 技術之優勢

選擇反應監測 (selected reaction monitoring, SRM)利用三重四極柱(triple-quadrupole, QQQ/TQ) 之獨特性質來進行定量分析。於 SRM 中第一個與第三個四極柱被用作為篩選器來侷限僅特定目標胜肽離子或胜肽碎片離子之荷質比能通過，第二個四極柱則被用作碰撞室使用，如圖 a。多個躍遷能夠於分析時被偵測，並產生出多張以層析時間與訊號強度為座標軸之特定躍遷的層析圖譜。此兩階段的小窗口質量篩選使得方法具高選擇性能夠將共洗脫的背景有效率的篩選掉。與其他質譜為基礎的方法不同，QQQ 為主之 SRM 分析並不會記錄全域的質

量質譜圖。SRM 這非掃描式的特性使其靈敏性高於傳統式全域掃描方法的一至二倍。此外也同時使得其線性反應的動態範圍 (dynamic range)擴大至五倍。使得 SRM 技術能夠偵測於複雜樣品中的低含量蛋白質，此特性於系統性定量研究上十分重要[113]。

文獻[114]比較同一 LC 系統之 UV 偵測器及質譜儀，在偵測牛乳過敏原上後之靈敏度為前者之 10 倍以上。且 MRM 可偵測到含量為 femtomole 至 attomole 範圍含量之胜肽，等同於由 ELISA 計算之 ppm 到 ppb 範圍[57]。另一文獻[115]比較 LC/qTOF 與 LC/MRM，後者之靈敏度高於前者 10 倍。文獻[114]分析牛乳過敏原添加樣品得到之偵測極限及定量極限分別為 1 與 4 ppm。文獻[116]分析花生過敏原 Ara h 2 之偵測極限及定量極限分別為 5 及 13 ppm，Ara h 3/4 之偵測極限及定量極限分別為 1 及 3.7 ppm。文獻[117, 118]分析甲殼類原肌凝蛋白及精胺酸激酶得到之偵測極限及定量極限分別為 3 及 0.25 nM。文獻[119]利用 LC/MRM 系統偵測到微量之穀物過敏原，偵測極限及定量極限分別介於 0.01 到 0.03 ppm 及 0.01 到 0.1ppm 之間。以上研究證明 MRM 之靈敏度與 ELISA 法相當甚至更高[57]。具高選擇性、靈敏性、廣的動態範圍及能夠同時分析多樣品使得 QQQ MS 系統搭配 SRM/MRM 技術為解決食品過敏原定量分析之樣品基質複雜、過敏原含量變化大、過敏原目標多等問題之方法。

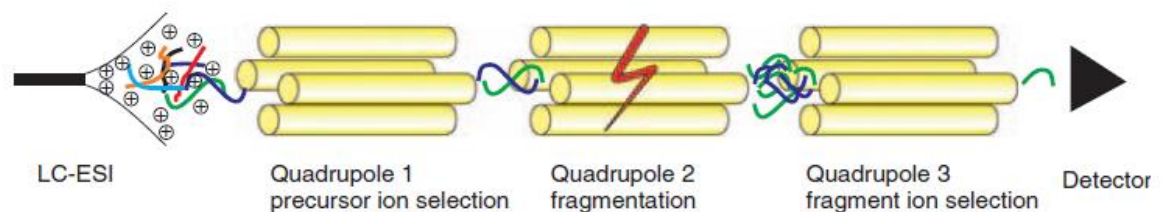


圖 a、SRM/MRM 於 QQQ MS 之分析。數個分析物於層析系統中共洗脫出。第一個四極柱以特定之荷質比篩選掉多數的共洗脫離子，然而因為與目標物有相同的質量藍色的干擾物仍存在。於第二個四極柱分析物被碰撞為碎片。於第三個四極柱又再過濾掉多數的碎片離子，包含全部的藍色碎片離子，僅留下特定目標

離子之碎片離子[113]。

3. 胜肽標記方法

質譜儀本質上並不可定量，因為蛋白質消化而來的胜肽的物化性質非常廣，像是大小、帶電荷數、親疏水性等，造成質譜儀訊號上巨大的差異。為了能夠準確定量通常需要能夠比較實驗間各個胜肽。其中一個方法立基於同位素稀釋法理論，穩定同位素標記的胜肽與原胜肽於化學特性上是相同的，因此兩胜肽於層析或質譜儀分析上也是相同的。故達到絕對定量的最簡單的方法為在蛋白質消化樣品中加入已知量的穩定同位素標記標準胜肽，作為內標準品，再比較其與原本樣品中胜肽的質譜訊號[120]。作為內標準品的同位素標記胜肽能夠以四種方法產生：代謝標定、酵素標定、化學標定及合成胜肽[121]。

(1) 代謝標記 (metabolic labeling)

能於蛋白質中引入穩定同位素之最早時間點為藉由代謝標定於細胞生長與分裂時。較常見之代謝標定為氮-15 添加細胞培養基質 (^{15}N -enriched cell culture medium)[122]與細胞培養之胺基酸穩定同位素標定 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)[123]。代謝標定最重要之優勢在於能夠在細胞階段就將不同處理的樣品混合，藉此能夠排除生化或質譜儀步驟上造成的所有定量失誤，因為這些步驟會以同樣的方式影響所有的蛋白質。考慮到其與樣品早期便結合，代謝標定，尤其是 SILAC 法可能是定量質譜法中最準確的方法。然而其缺點為下列幾項[120]。

- i. 其適用範圍受限，於真核生物儘管一些實驗證明代謝標定使用於高等生物的可行性，但因創造與維持這些系統的費用與時間與其提供的資訊價值相比並不划算，因此代謝標定之主要應用為於高等真核生物之不死細胞株。
- ii. 標記數量的限制，以 SILAC 為例，於同一實驗最高僅能比較三種標記（未標記、 $^{13}\text{C}_6$ 及 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ 標記之胜肽）。
- iii. 易受到培養基質組成變化或難以培養或持續培養的細胞株可能不適合代謝

標定。

(2) 酵素衍生標記 (enzymatic derivation labeling)

於生物合成後標記蛋白質或胜肽的方法有兩種，酵素法或化學法。其中於蛋白質消化時胰蛋白酶或 Glu-C 酵素催化合併的 ^{18}O 法為專一且精美的胜肽標記方式[124, 125]。酵素標記可在蛋白質消化過程中或更常見的在消化後與蛋白酶於第二個培養過程中進行。因為胜肽為酵素標記，因此可避免使用化學標記常見的副反應。然而其缺點是受限於酵素反應效率，很少能夠將胜肽完全標記，而不同胜肽之標記速率也不盡相同，這會造成數據分析的複雜化[120, 126, 127]。

(3) 化學標記 (chemical derivation labeling)

原則上所有具反應性的胺基酸側鏈都能夠以化學法參與同位素質量標記[121]。然而於實際上應用以離胺酸 (lysine) 與半胱胺酸 (cysteine) 之側鏈為主。化學法共通之缺點為其通常容易產生側反應產生非預期之產物，可能會對定量結果產生不良影響[120]。

a 以半胱胺酸側鏈反應之標記法

以半胱胺酸側鏈反應之標記法以同位素編碼親和性標記技術 (isotope-coded affinity tag, ICAT)[128]為主，其後衍生出些許改進方法，如標記胜肽之回收率或層析性質[122, 129-131]。其他硫氫基特異之試劑通常含有鹵素取代的羧酸或醯胺[132-135]或對羰基進行麥可加成 (Michael-type addition)反應[136, 137]。因為半胱胺酸為較稀有的胺基酸，ICAT與相關之方法可顯著減少胜肽混和物的複雜性，這在複雜度高的樣品中為很有優勢的特性。但 ICAT 明顯不適合用以定量不含有或低含量半胱胺酸蛋白質，且無法分析後轉譯修飾及剪接蛋白質亞型 (splice isoforms) [120]。

b 以離胺酸側鏈反應之標記法

以胜肽 N 端及離胺酸之 ϵ -胺基為目標之標記法，包含同位素編碼蛋白質標記 (the isotope coded protein label, ICPL)[138]、相對與絕對定量同位素標記

(isotope tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)[139]、串聯質量標記 (tandem mass tags, TMT)[140]及乙酸/琥珀酸酐 (acetic/succinic anhydride)[141-144]。而異氰酸酯 (isocyanates)或異硫氰酸酯 (isothiocyanates)也有被少量應用 [145, 146]。近年研究利用甲醛透過產生希夫鹼 (Schiff base)再藉由氰硼氫化物的還原反應將離胺酸之 ϵ -胺基甲基化[147-149]。等壓質量標記技術 (isobaric mass tagging)於胜肽上進行等重的標記，並使其層析分離時間一致，僅在胜肽碎片化後不同之等壓標記才能被質譜儀辨識使其能同時辨認胜肽之身分及胜肽組間相對含量，商業用 iTRAQ 試劑更進一步提升此方法使其能同時定量高達八種樣品。以離胺酸側鏈反應之標記法缺點為在標記蛋白質上，因胰蛋白酶無法消化標記過之離胺酸故會產生不易被質譜儀偵測之更長的胜肽[120]。

c 其他化學標記法

其他化學標記法包含利用含氫之醇類對胜肽 C 端或麩胺酸與天門冬胺酸之側鏈羧酸進行酯化反應[150, 151]；又或於磷酸化胜肽以磷酸之 β -氫消除反應 (β -elimination)再以麥可加成反應 (Michael addition)標記，最常使用乙二硫醇衍生物 (ethanedithiol derivative)[152-155]；或於醣基化胜肽以醣肼化學將碳水化合物之部分取代為化學標記[120, 156]。

(4) 合成胜肽 (synthetic peptide)

同位素標記之合成胜肽標準品於質譜儀之應用已相當長一段時間，現在為一種被廣泛應用之方法，稱為 AQUA (absolute quantification of proteins) [157]。方法又更進一步衍生，利用合成重組蛋白在經胰蛋白酶消化後產生目標蛋白質之多個胜肽以進行定量。此方法不僅提供多個胜肽來提升定量的信心，重組蛋白質更能夠在早於單個合成胜肽添加的時間點添加於樣品中，故能夠控制實驗中可能的偏差，像是蛋白質消化之效率。與代謝標定提供之大量的蛋白質相對定量資訊不同，合成胜肽法專注於單一或少量之特定蛋白之定量[120]。

(5) 無標記定量 (label-free quantification)

近年嘗試使用另一種方法-無標記定量法 (label-free quantification)，無標記定量法藉由比較 i. 胜肽直接的質譜儀訊號強度或 ii. 直接計算有目標胜肽之質譜圖數量以比較兩個或多個實驗，藉此來當作其在樣品中的相對含量。於方法 i. 中藉由各胜肽的離子層析圖以積分其質譜波峰面積，於低解析度質譜圖中通常為產生各胜肽之 XICs (extracted ion chromatograms)，近年此概念於高解析度的數據中考量 ^{13}C 同位素進而對整體訊號強度做調整[158]。方法 ii. 之產生是基於經驗上觀察到當特定蛋白質在樣品中越多時相對應數據收集到對該特定蛋白質之胜肽串聯質譜圖就會越多，方法有胜肽計數或光譜計數[159-161]。此計數方法仍具許多爭議，因為其並不直接測量胜肽之物理性質。其假設每個蛋白質的線性反應量皆相同，實際上每個胜肽之光譜計數反應量皆不同，舉例來說：於層析性質上(層析時間、波峰寬度等)每個胜肽皆不同[120]。

無標記定量方法無疑的是所有質譜定量技術中最不準確的方法，因為實驗過程中所有的系統性或非系統性偏差皆會反應到數據中。然而無標記定量仍然因下列因素可被考慮使用，其可省略標記步驟花費的大量時間與金錢；其可比較的實驗不受標記法上限所限制；因為其無標記因此與標記法相比質譜圖的複雜度較低，可能可以提供更多的分析深度；證據顯示無標記方法提供比穩定同位素標記法更高的動態範圍 (dynamic range)。然而必須要考慮其帶來之缺點包含不清楚之線性與相對差之準確性，尤其是光譜計數[162]。

4. 二甲基穩定同位素標記法

二甲基穩定同位素標記法 (stable isotope dimethyl labeling)，又稱二甲基標記 (dimethyl labeling)、二甲基化 (dimethylation)、還原性二甲基化 (reductive dimethylation)，最早於 2003 年由 Hsu 等人提出，藉由還原胺反應利用甲醛或其氘同位素甲醛 ($\text{CH}_2\text{O}/\text{CD}_2\text{O}$)與胜肽 N 端或離胺酸側鏈 ϵ -胺基之一級胺反應形成

希夫鹼(Schiff base)再以氰硼氫化鈉 (NaBH₃CN)還原形成二級胺，二級胺再與甲醛反應並被還原形成二甲基胺基團 (dimethylamine group)如圖 b，當胜肽 N 端為脯胺酸時此反應僅會標記單甲胺 (monomethylamine)[147]。

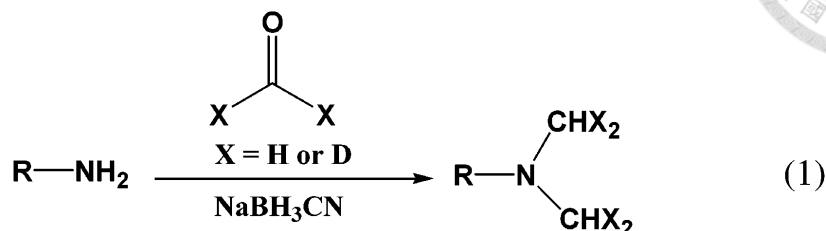


圖 b、二甲基穩定同位素標記法之反應式[147]。

(1) 二甲基穩定同位素標記法之多質量標記

近年此技術越發成熟，2014 年 Wu 等人提出 5 種不同質量標記之二甲基標記，利用三種不同質量之甲醛 (CH₂O, CD₂O, ¹³CD₂O)以及兩種不同質量之氰硼氫化鈉 (NaBH₃CN, NaBD₃CN)組合形成五種二甲基標記(2CH₃, 2CDH₂, 2CD₂H, 2CD₃, 2¹³CD₃)，標記分子量分別為 28, 30, 32, 34, 36 Da，此方法能於同一次實驗中同時偵測五種不同之蛋白質樣品[163]。而於 2013 年 Zhou 等人提出假同壓二甲基標定法 (pseudo-isobaric dimethyl labeling, pIDL)，其利用 ¹³CD₂O/NaCNBH₃ 與 CD₂O/NaCNBD₃ 之組合來分別產生 2¹³CHD₂ 與 2CD₃ 標記，於 MS/MS 時被同時選擇並進行碎片化產生質譜圖，藉由超高解析度之質譜儀來分辨其碎片離子之間之質量缺陷 (mass defect)，藉此達到假同壓之二甲基標定[164]。目前共有四種甲醛試劑(CH₂O, CD₂O, ¹³CH₂O, ¹³CD₂O)以及兩種氰硼氫化鈉試劑(NaBH₃CN, NaBD₃CN)，共有八種組合，理論上來說解析度夠高之質譜儀即可進行分離，達到同時分析八種不同處理之樣品。

(2) 二甲基穩定同位素標記法之不同標記流程

此外三種不同之標記流程也被提出，溶液內 (in-solution)、線上 (online)、管柱上 (on-column)[165]。

- i. 溶液內 (in-solution)標記法其標記反應於微量離心管中進行，優點為可輕易進行大量胜肽的標記；可同時間標記多個樣品；無設備 (SPE 管柱)需求；能

在混和不同標記樣品之前先確認標記效率；不必更動 LC-MS 之方法；可進行 2D-LC-MS。缺點為與樣品步驟多並必要時需要進行淨化可能會造成損失；可能會有含一級胺之干擾物質存在於基質中；終止步驟為放熱反應可能會對樣品造成加熱及發泡；可能會遭到汙染。

- ii. 線上 (online)標記法其標記反應於 C18 捕捉管柱中串於 LC-MS 系統上，優點為可自動化標記；於標記完後直接進行分析減少樣品損失；不必進行終止步驟。缺點為需要對 LC-MS 方法進行調整；增加 LC-MS 運作時間。[166]
- iii. 管柱上 (on-column)標記法結合固相萃取(solid phase extraction, SPE)反應於 SPE C18 管柱上進行，優點包含結合脫鹽與標記以減少損失；不必進行終止步驟；不必調整 LC-MS 方法；能在混和不同標記樣品之前先確認標記效率；可進行 2D-LC-MS。缺點為需要 SPE 系統；於需標記許多樣品時會花費大量時間。

(3) 二甲基穩定同位素標記法之優缺點

二甲基穩定同位素標記法具許多優點包含標記試劑價格便宜、穩定且商業可及、標記反應快速、簡單、高效率及穩健、適用範圍廣。標記試劑便宜，Boersema 等人計算於三種質量之二甲基標記實驗進行三重標記 25 μg 試劑所需之花費低於 0.1 歐元，與常見標記反應試劑如 iTRAQ 相比便宜許多。標記反應穩健，可在 8 M 尿素中或於膠內消化反應 (in-gel digestion)後進行，並在加入過量的標記試劑一小時後無觀察到明顯之副反應[165]。標記反應迅速及高效率，反應時間少於 5 分鐘且反應效率接近 100%[147, 149]。適用範圍廣，因二甲基穩定同位素標記之基團為胺基 N 端與離胺酸側鏈，固可標記所有來源之胺基，適用範圍與僅能標記半胱胺酸之 ICAT 相比廣許多。

二甲基穩定同位素標記法之缺點包括其層析時間於不同標記間有微量的差異，但此現象造成之定量不準確性於 Hsu 等人 2003 年之研究中不高可忽略[147]。

其會標記所有之胜肽，會造成 MS 圖譜之複雜化。與 SILAC 相比僅能在實驗後端進行標記。於蛋白質標記時會限制後續消化可用之蛋白酶，因胰蛋白酶或 Lys-C 無法切除修飾後之離胺酸。雖然二甲基標記法可藉由組合不同同位素來達到多質量標記，但標記胜肽間之質量差異小，當質譜儀解析度不足時可用之質量標記數量受限制[147, 165]。

(4) 二甲基穩定同位素標記法之應用

二甲基穩定同位素標記法因其許多優點被廣泛應用於各個領域之蛋白質分析，包括癌症研究[167-177]、幹細胞研究[170, 178-183]、磷酸化蛋白質體學[178, 181, 182, 184-198]、糖基化蛋白質體學[168, 199-203]、阿茲海默症研究[195, 204, 205]，使用之生物體最多數為細胞，少數用於酵母[191, 206]、細菌[207-210]、實驗鼠[173, 195-198, 211-215]、人體[204, 205, 216-218]、黃豆[219]、草莓[220]、蛇毒[221]、金頭鯛魚[222]。

5. 利用二甲基同位素標記法搭配 MRM 進行過敏原之絕對定量

食品過敏原絕對定量之重要性在多篇文獻皆一再強調。對於食物過敏原最大的興趣在於食品基質中過敏原蛋白質絕對含量的測量[223]。食品安全之迫切議題為過敏原之絕對定量[224]。Koeberl 等人於 2014 年回顧中建議在建立、評估及確效一套新的 SRM/MRM 絕對定量方法時需考慮下列幾個關鍵項目[57, 118, 119, 225]。

- i. 目標胜肽或特徵胜肽 (signature peptides) 需盡可能符合胜肽選擇條件並經過 LC/SRM 條件優化過。特徵胜肽選擇條件包括獨特、可再現性(尤其於消化步驟)、可輕易被質譜偵測、大量存在於食品基質中、穩定、無修飾、可簡單萃取、胜肽長度介於 8-19 個 a.a. 之間。LC/SRM 條件優化之躍遷選擇條件包括能夠被質譜輕易偵測、大量存在於食品基質中、無修飾、層析時間可再現性，碎片離子專一於目標胜肽，且是可再現的。可再現性包含應避免易遺漏切點之序列，像是於胰蛋白酶為 KRXX 或是 XXRK 等連續切點序列。其中

無修飾包含易產生後修飾之胺基酸，例如半胱胺酸（反應性巰基）、甲硫胺酸（可氧化）、天門冬醯胺及穀氨醯胺（去胺反應）、N 端天門冬醯胺 (pyroglutamate)[224]。

- ii. 樣品中應添加合成胜肽或同位素標記的胜肽，以論證實驗室內與實驗室間的再現性與精密度。所有的樣品準備步驟與前驅/碎片離子之產生過程必須要被證明為穩定且可再現的。合成胜肽或同位素標記之胜肽應在樣品準備前與後添加於基質中，以辨認萃取步驟之損失並獲得回收率的資訊，空白樣品中也應被論證。
- iii. 利用重組蛋白反覆進行消化實驗來論證特徵胜肽是可被一直辨認到的，並評估樣品準備過程的損失。
- iv. 最後，應計算方法之重複性、精密度、線性、準確度、回收率。

本研究欲利用二甲基同位素標記法搭配 QQQ-MS 之 MRM 模式建立食品中過敏原之絕對定量平台。利用二甲基同位素標記法對合成胜肽進行標記形成外標準品以及內標準品，在藉由外標準品/內標準品及目標胜肽/內標準品之比例來對目標過敏原進行絕對定量。

五、 質譜分析過敏原之萃取法

食品中過敏原可能來自主原料亦可能來自含量較少之配料，因此過敏原含量之差異非常大，又因食品原料基質多樣性高，往往含有許多干擾物質，因此在分析過敏原含量低之食品時常依賴前處理步驟來提高偵測之靈敏性。在使用質譜儀對過敏原絕對定量上，萃取步驟為其中一個非常重要的環節，應小心評估以得準確的定量結果[224]。所有以食品中過敏原為目標之分析方法皆需要一個有效率的萃取方法[226]。若過敏原之回收率不完全即會造成定量結果之低估。植物組織來源之蛋白質萃取尤其困難，因為其含干擾物質[227-229]。因此萃取方法需要依起始食品基質特性適時適應，應避免非蛋白質化合物之干擾，像是單寧。在萃取緩衝液的選擇上必須要考慮食品加工的影響。熱處理像是烤、煮、滾及消毒殺菌

步驟都對於蛋白質之穩定性、結構甚至對於萃取效率有巨大的影響[230]。於食品加工中焙烤溫度之提升會大幅減少油及乾烤花生之蛋白質萃取效率，與原始材料相比減少幅度分別為 50-75% 及 75-80% [231]。Picariello 等人建議要達到準確定量應使用變性劑 (detergents) 及離散劑 (chaotropes) 以達到變性萃取環境[224]。僅以簡單鹽類緩衝液萃取加工過的蛋白質是免疫法定量的可靠性低落的部分原因[226]。以下整理不同種類基質之蛋白樣品之前處理步驟。

1. 三氯乙酸-丙酮法 (trichloroacetic acid – acetone, TCA-A)

三氯乙酸-丙酮法(trichloroacetic acid – acetone, TCA-A)主要利用三氯乙酸沉澱蛋白質再搭配丙酮進行清洗的動作。其適合運用於低蛋白質含量且高汙染物(蛋白酶、次級代謝物)之基質，尤其適用於植物組織。Ippoushi 等人對甜櫻桃 (*Prunus avium* L.) 及其產品中過敏原 Pru av 2 之含量進行絕對定量分析，樣品包含新鮮、冷凍、乾燥甜櫻桃、甜櫻桃果凍及果醬[232]，另一篇以新鮮番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 中潛在過敏原 NP24 蛋白質為目標[233]，及另一篇則以辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 及茄子 (*Solanum melongena* L.) 中 PR5 蛋白質為目標[234]，三篇皆利用 Isaacson 等人於 2006 年提出之三氯乙酸-丙酮法 (trichloroacetic acid – acetone, TCA-A) 進行蛋白質之萃取[235]。Korte 等人使用 44 個指標胜肽來同時偵測多種食物中杏仁、腰果、榛果、花生、開心果及核桃之存在，同樣使用 TCA-A 沉澱法來進行堅果類、麵包類、穀類、巧克力等多種產品之樣品前處理[236]。

2. 苯酚蛋白質萃取法 (phenol protein extraction)

苯酚蛋白質萃取法 (phenol protein extraction) 利用苯酚對蛋白質進行萃取，再以含醋酸銨之甲醇沉澱蛋白質。適用樣品基質與 TCA-A 法相似，雖然步驟較多且耗時，但在萃取效率上較 TCA-A 法佳[237, 238]。Pavokovic 等人於 2012 年之研究比較苯酚萃取法與 TCA-A 法於 *B. vulgaris* 細胞株、*M. gracilis* 及 *S. tectorum* 葉片之蛋白質萃取量，苯酚法之萃取量分別為 1.081、1.019、0.966 mg/cm³

高於 TCA-A 法之萃取量 0.444、0.229、0.137 mg/cm³[237]。Houston 等人以相對與絕對定量之方法對黃豆中 10 種過敏原進行分析，以 Lee 等人於 2010 年提出之苯酚 (phenol) 萃取法進行黃豆全蛋白之萃取[238, 239]。相似的 Martinez-Marquez 等人利用苯酚/SDS 法進行枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 中蛋白質萃取，成功定量枇杷中一種多酚氧化酶亞型的含量[240]。Song 等人同樣利用苯酚法進行草莓 (*Fragaria × ananassa*) 之蛋白質萃取，其以 MRM 模式定量草莓中類黃酮及花青素生成相關 21 種蛋白及其亞型[241]。Sayers 等人以八條花生過敏原胜肽及五種花生過敏原為目標進行絕對定量，並比較五種萃取液對不同加工過程 (滾煮時間、焙烤溫度、油炸等) 之樣品萃取率之影響，以含有離散劑及兩性離子之緩衝液 (7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT) 有最佳之萃取效率 [226]。

3. 分子量止透 (cutoff) 過濾法

分子量止透過濾法 (molecular weight cutoff filtration) 為利用特定孔徑大小之過濾膜來將大分子物質(蛋白質)與小分子(鹽類)物質分離並加以濃縮。Faeste 等人建立了兩種海獸胃線蟲蛋白 (*Anisakis simplex*) 於魚類食品中之絕對定量法，其以 PBS 萃取魚肉中蛋白，再以 10 kDa 之止透 (cutoff) 過濾器進行純化，並成功於鮭魚及鱈魚 (自然含有或添加海獸胃線蟲) 中成功定量出兩種海獸胃線蟲蛋白[242]。另外同樣使用止透過濾器之文獻，其建立食品中牛乳過敏原 α -乳白蛋白 (α -lactalbumin)、 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin)、 α _{S1}-酪蛋白 (α _{S1}-casein) 之定量方法，其利用 Tris 緩衝液萃取並搭配 3 kDa 之止透過濾器進行樣品純化，使用之樣品包含奶粉、巧克力餅乾、蘇打餅、蛋黃派 (內餡及外皮)、糕點、鬆餅、花生醬、麵粉，定量結果皆與產品相吻合[243]。Heick 等人比較商用 ELISA 套組與 MRM 方法於七種過敏原 (奶、蛋、黃豆、花生、榛果、核桃及杏仁) 偵測之能力，同樣使用止透過濾器在 Tris 緩衝液萃取後進行蛋白質純化[61]。Parker 等人比較熱加工對烘焙產品中蛋、奶、花生過敏原之含量之影響，使用尿素萃取溶液及 10

kDa 之止透過濾器進行前處理[244]。Locati 等人對食品中之羽扇豆 (*Lupinus albus*) 主要儲存蛋白進行偵測，其先利用 Tris 緩衝液進行萃取再以硫酸銨沉澱蛋白，接著使用 1 kDa 之止透過濾膜進行純化[245]。



4. 其他

其他方法包含透析、管柱來進行純化，也有不進行純化之前處理方法。文獻[246]對玉米葉中三種蛋白進行定量分析，以 PBST buffer 進行蛋白質萃取。Resta 等人開發了以羽扇豆 (*Lupinus albus*) 之 γ -羽扇豆球蛋白 (γ -conglutin) 為目標之無標記絕對定量方法，以 Tris Buffer 進行蛋白質萃取再以透析之方式進行樣品前處理[247]。Posada-Ayala 等人對醬料與餅乾中芥末過敏原 Sin a 1 進行定量，其以碳酸氫銨緩衝液進行萃取，再以粒徑篩管柱進行蛋白質純化[248]。

六、 食品化學檢驗方法之確效

1. 分析方法之確效種類

國際醫藥法規協和會 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 在 Q2(R1) 文件討論四種最常見的分析方法之確效，分別為鑑別試驗 (identification tests)、不純物定量試驗 (quantitative tests for impurities' content)、不純物限量試驗 (limit tests for the control of impurities)、藥品中主成分之定量試驗 (quantitative tests of the active moiety in samples of drug substance or drug product or other selected component(s) in the drug product)。

(1) 鑑別試驗 (identification tests)：

鑑別試驗目的為確認樣品中分析物之身份。通常藉由比較樣品與標準品之性質 (質譜圖、層析特性、化學反應等) 來達成。

(2) 不純物定量與限量試驗 (quantitative tests and limit tests for impurities



content) :

對樣品中不純物之測試可能為定量試驗或限量試驗。任一種試驗皆欲精準表現樣品純度性質。兩種試驗間所需之確效特性相異。

(3) 藥品中主成分之定量試驗：

方法步驟之目的為量測樣品中分析物的存在，於此文件，方法代表藥物基質中之主成分的定量量測。在藥物產品中，相似的確效特性同時也適用於其活性成分或其他選擇之成分。相同的確效特性也適用於相關分析步驟之方法，如溶解步驟。

2. 分析方法之確效方法

根據我國衛生福利部食品藥物管理屬之規定，實驗室使用修飾之衛生福利部公告方法、衛生福利部公布之建議方法或其他國際認可方法，以執行食品衛生相關檢驗，為證實檢驗方法之適用性及分析結果之正確性，該檢驗方法需經確效(validation)後使用。執行方法如下

(1) 適用範圍

檢驗方法適用不同類別檢體，應就各類檢體選出至少一種代表性基質進行檢驗方法確效。ICH Q2(R1)文件建議方法範圍應考量目標物之性質，如若為藥物或最終產品之方法，方法範圍應涵蓋最終偵測濃度之 80% ~ 120%。

(2) 專一性 (specificity)

專一性為能夠在預期出現物的存在下明確評估分析物之能力，這些預期出現物可能包括不純物、分解物、基質等。以含類似樣品基質之空白樣品進行試驗，若無空白樣品，則執行試劑空白試驗。依檢驗方法步驟進行空白樣品或試劑空白試驗，需無干擾待測現象，必要時添加可能之干擾物質以測試方法之專一性。

(3) 檢量線 (calibration curve)

應描述檢量線之數學方程式及線性範圍，一般至少包括 5 種不同濃度(不包括空白)，線性回歸方程式之相關係數不應低於 0.99。檢液中待測物濃度應在檢

量線之線性範圍內。



(4) 準確度 (accuracy)

分析步驟之精準度代表得到之值與傳統認可的真值 (true value)或被接受的參考值之間的相近程度。準確度有時也被稱作真實性 (trueness)。

- i. 將適量之待測物標準品添加於類似樣品基質之空白樣品中，計算其回收率 (%)。添加量包括定量極限及定量極限 2~10 倍(或待測物之管制值)至少 2 種濃度，依檢驗方法分析步驟，各進行 5 重複之檢測。而 ICH Q2(R1)文件建議準確度之評估，應涵蓋方法範圍最少 3 個不同濃度及最少 9 個偵測值 (例如：3 個濃度各 3 重複)。
- ii. 依樣品所含待測物之濃度，其回收率(%)規範如下表：

濃度範圍(ppm)	回收率(%)
≥100	85 ~ 110
>10~100	80 ~ 115
>1~10	75 ~ 120
>0.1~1	70 ~ 120
>0.01~0.1	70 ~ 120
>0.001~0.01	60 ~ 125
≤0.001	50 ~ 125

(5) 精密度 (precision)

精密度代表在規定的條件下對同質樣品的多次採樣所取得之一連串測量值之間的相近程度。精密度應使用同質且真實之樣品，若無法取得同質樣品可以使用人工準備之樣品或樣品溶液。精密度通常以一系列測量之變異數 (variance)、標準差 (standard deviation)或變異係數 (coefficient of variation)來表示。

精密度之評估包括重複性(repeatability)、中間精密度(intermediate precision)及再現性(reproducibility)，依必要性選擇執行。

a 重複性 (repeatability)

重複性代表在短時間內於相同的操作條件下之精密度。重複性也被稱為測定內精

密度 (intra-assay precision)。重複性係以同一實驗室於同一批次執行該檢驗方法，所得之結果予以評估。



b 中間精密度 (intermediate precision)

中間精密度代表實驗室內精密度，係以同一實驗室執行該檢驗方法，於不同分析日期、分析人員、分析設備等，所得之結果予以評估。

c 再現性 (reproducibility)

再現性代表實驗室間精密度，係以不同實驗室執行該檢驗方法，所得之結果予以評估。

將適量之待測物標準品添加於類似樣品基質之空白樣品中，或選取合適濃度之驗證參考物質(certified reference material, CRM)進行 5 重複之檢測。添加量包括定量極限及定量極限 2~10 倍(或待測物之管制值)至少 2 種濃度，依檢驗方法分析步驟，各進行 5 重複之檢測。而 ICH Q2(R1)文件建議重複性之評估，應涵蓋方法範圍最少 3 個不同濃度及最少 9 個偵測值(例如：3 個濃度各 3 重複)或於試驗濃度之 100% 進行 6 重複測定。依樣品所含待測物之濃度，其變異係數 (CV, %) 規範如下表：

濃度範圍(ppm)	變異係數(CV, %)		
	重複性	中間精密度	再現性
≥1	10	14	16
>0.1~1	15	18	23
>0.01~0.1	20	22	32
>0.001~0.01	30	32	45
≤0.001	35	36	53

(6) 定量極限 (Limit of Quantification, LOQ)

定量極限為分析物在方法中可被定量且具適當的準確度與精密度之最低量。定量極限為低含量物質定量方法的參數，特別像是於不純物或降解產物中。可採以下方法：

- i. 量測適當數目($n \geq 7$)的空白樣品或低濃度樣品(約偵測極限之 1-5 倍)之感應

值，再計算其感應值之標準差(s)。

$LOQ = 10 s/m$ ； m：檢量線之斜率

ii. 訊號/雜訊比(signal/noise ratio, S/N ratio)

含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析圖中待測物波峰之訊號/雜訊比 ≥ 10 。

iii. 評估含有已知量待測物之低濃度樣品，其回收率及重複性符合要求。



七、 研究動機與目的

食品過敏症為食品安全上重要的議題，輕微之症狀包含皮膚起疹紅腫、消化道發炎、呼吸道發炎、呼吸不適等，在某些特定族群(尤其是幼童)中，嚴重者可能產生全身過敏性休克反應造成生命危險。目前我國及世界各國法律要求食品製造者標示食品中可能含有之過敏原，然而若缺乏精確且強大的分析方法支持，法律將無法有效地運作與被執行，於未來亦無法建立食品過敏原的閾值以強化食品安全的管理，因此食品過敏原分析方法的研究具其迫切性與重要性。

目前食品過敏原的分析以免疫化學法之 ELISA 法最為普遍，雖然其商用套組已相當普及與廣泛，但因 ELISA 法立基於抗體與抗原決定位之結合反應，但在使用上發現以下缺點：一、容易產生不準確之結果，受限於抗體特異性，可能於不同過敏原間產生交叉反應，造成偽陽性結果或因加工過程造成過敏原結構改變抗原決定位消失，產生偽陰性結果，使得法律裁定上出現模糊地帶。二、可定量之過敏原種類受限於套組內提供之抗體種類，多偵測一種過敏原便需多一個抗體。三、因對於抗體之熟悉度不足，使得各套組中抗體歧異度大，造成其產生之結果差異大。

近年以質譜為主之過敏原分析法日漸成熟，其於專一性、靈敏性皆已與 ELISA 法相當甚至更高，質譜法具有同時分析多個過敏原之能力，並擁有較低廉之開發費用，同時其分析時間也較快速，且能自動化與標準化，亦能提供強而有力的目標物質譜指紋證據，減少法律執行上的不確定性。質譜法不僅能夠解決免疫法之缺點，並擁有許多其他優勢，因此質譜方法之發展受各界重視。

相較於小分子化合物的分析，將質譜定量技術應用於食品過敏原這類的蛋白高分子上，仍具有許多障礙像是：一、前處理方法複雜，蛋白質質譜分析前需以消化步驟，先將高分子酵素水解成肽進行分析。二、基於同位素稀釋法之定量，需在蛋白分子上進行同位素標記，而蛋白質依物種、存在部位、蛋白質種類、結構，在萃取、純化、消化、標記等步驟上會產生許多不同之差異。三、蛋白質之

標準品難以取得，因蛋白質之序列複雜、變異性大、純化不易，皆會造成其標準品取得困難。四、於質譜圖上較複雜，胜肽分子帶電荷數多、後修飾種類多、分子大小差異大，且因分子量大，子離子之組成也較複雜，使蛋白質一次、二次質譜圖較為複雜，以上四點使蛋白高分子之質譜分析較小分子質譜分析具挑戰。

過敏原之來源相當多元，其中以植物性過敏原的分析較為複雜，因植物組織蛋白質含量較低，需仰賴前處理步驟來提高分析的靈敏性；含有大量干擾物質(次級代謝物、植物性酵素、碳水化合物)；具細胞壁，細胞較難破碎，因此於分析時常需搭配基質特異的前處理步驟。而目前植物性過敏原之研究以花生、黃豆等常見致敏性作物為主，於水果過敏原之研究較少。水果具有與被廣泛研究之作物不同的特性，造成過敏原分析上之挑戰：一、水分多蛋白含量低，使其在前處理步驟上更需注重萃取純化步驟，以確保低含量之過敏原亦能於後續質譜分析時具一定靈敏性。二、於後熟水果中果實性質、組成、酵素活性會隨成熟度而產生巨幅度變化。

本研究目標利用穩定同位素二甲基標記結合質譜技術建立奇異果過敏原之分析法。奇異果為我國重要進口水果之一，亦為國民前十大食品過敏原。其為後熟性水果，並含有大量高活性之可能干擾前處理步驟之奇異果蛋白酶 Actinidin，使其適合做為水果過敏原前處理法開發之代表物。同時利用穩定同位素二甲基標記法搭配合成胜肽，來產生具同位素標記之合成胜肽，此法能解決其他標記法昂貴、費時等缺點，並能對目標過敏原進行絕對定量。期望此研究能成為未來質譜水果過敏原分析法之範本，協助提升我國之食品安全管理。

八、 研究架構

研究分為三部分，第一部分：進行樣品前處理方法之開發與優化；第二部分：質譜分析方法之建立與確效；第三部分：不同加工處理對奇異果過敏原之影響。

第一部分：進行樣品前處理方法之開發與優化

1. 從四種常用的蛋白質製備法中選擇出苯酚法作為奇異果過敏原分析前處理

方法之蛋白質萃取法，並對苯酚法進行適合奇異果蛋白質萃取之方法優化，同時開發方便操作並可與後續質譜相容之微量苯酚萃取法。優化參數包含萃取溫度、萃取果泥量、萃取方法、沉澱時間，選擇高萃取效率、高精密度與高操作簡易性之參數。

2. 對其餘前處理步驟，胰蛋白酶蛋白質消化、二甲基標記、樣品除鹽，進行步驟整合與優化。溶液內胰蛋白酶消化法之優化，包含消化輔助基質之選擇 (SDC 與 urea) 與消化時間優化。穩定同位素二甲基標記法之部分包含標記效率確認與同位素效應之探討。

第二部分：分析方法建立與確效

1. 分析方法之建立包含利用 Q-ToF 複雜蛋白質定序結果進行目標過敏原 (Act d 1、Act d 5、Act d 11)、代表胜肽 (AD1、AD5、AD11) 之選擇。再委外合成代表胜肽，標記後對 QqQ MS 進行子離子選擇與參數設定。利用標記合成胜肽進行定量與定性子離子之選擇；而設定之參數包含進樣錐電壓 (con voltage, CV)、碰撞室電壓 (collision energy, CE)、定量與定性子離子之躍遷 (transition) 設定。最後再建立 LC 方法梯度圖，以獲得快速、高分離效率、低殘留之 LC 方法。再利用氫標記合成胜肽作為外標準品，利用氘標記合成胜肽作為內標準品，進行標準曲線之繪製，定義出方法之線性範圍。

2. 方法確效依 ICH 之文件執行，以三個目標物各五個不同濃度三重複對重複性、準確性與定量範圍進行方法確效。

第三部分：不同加工處理對奇異果過敏原之影響

1. 以常見之七種加工法 (果醬、熱風乾燥果乾、冷凍乾燥果乾、熱殺菌果泥、高靜水壓處理果泥、熱殺菌果汁、高靜水壓處理果汁) 自行製備奇異果產品，並以本研究開發之分析法對其過敏原進行含量消長之研究，探討不同加工處理對於過敏原含量之影響。

貳、材料與方法



一、藥品

液相層析使用之移動相皆為 LC-MS 級

1. 硫酸銨 (ammonium sulfate) 購自台灣肥料股份有限公司，新竹市，台灣
2. APS、Dye reagent、TEMED、Polyacrylamide 購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
3. Acetonitrile、Coomassie Brilliant Blue、Methanol、Tris-base 購自 Mallinckredt Baker, Kentucky, USA
4. Pierce Trypsin Protease, MS grade 購自 Thermo Fisher Scientific Inc., USA
5. Sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN), 95% purity 購自 Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA
6. Urea 購自 VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
7. 其他藥品購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

二、器材

1. 低溫離心機 Allegra™ XR Centrifuge 購自 Beckman Coulter, Inc., CA, USA
2. Vortex-Genie 2 購自 Scientific Industries, Inc., USA
3. PB-10 pH meter 購自 Satorious, Goettingen, Germany
4. 恆溫水浴機 Water baths 購自 TKS, Genmedika Biotechnology Corp., Taiwan
5. Mini-protein 蛋白電泳系統購自 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
6. 果汁機 Water blender 購自 Royal Dutch Philips Electronics Ltd., Amsterdam, Holland
7. Waters Synapt G2 HDMS (Waters Q-ToF system, hybrid quadrupole- time of flight mass spectrometry)，由臺灣大學化學系蛋白質體質譜核心實驗室提供
8. ELISA reader EnSpire 2300 Multilabel Reader 購自 Perkin Elmer Inc., USA

9. Waters ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE MS (MLtraperformance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometer), 由臺灣大學公衛學院環境暨職業衛生研究中心提供



三、 實驗方法

1. 奇異果產品製作法

(1) 果醬

挑選 4 顆成熟奇異果，將其洗淨、去皮、切丁後以果汁機破碎成果泥。加入等重之水，加熱至重量減少三分之一。以檸檬酸 (citric acid) 調整酸度至 pH 落於 2~3 間，加入蔗糖使最終總固形物含量為 65°Brix，加入 1.5% 之高甲氧基果膠，煮至沸騰後即關火裝罐。

(2) 果乾

挑選 5 顆成熟奇異果，將其洗淨、去皮後，切成 1 cm³ 之方塊。將奇異果方塊分成 200 g 兩組，分別以熱風乾燥 (60°C, 850 mins) 處理與冷凍乾燥處理，乾燥後置於乾燥處保存。

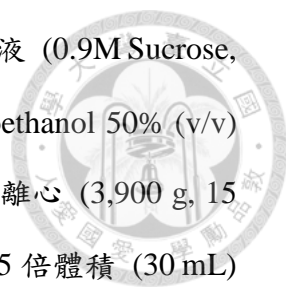
(3) 果泥、果汁、鮮果

挑選 8 顆成熟奇異果，將奇異果洗淨、去皮、切丁後以果汁機破碎成果泥，取出適量果泥作為鮮果組接續進行後續蛋白質萃取。高靜水壓處理 (HPP) 果泥：取 150 g 果泥裝入真空袋中真空密封，進行高靜水壓處理 (500 MPa, 持壓 3 分鐘)，將完成 HPP 處理之果泥袋放入 -20°C 冰箱保存至進行後續蛋白質萃取；熱殺菌處理果泥：取 150 g 果泥裝入血清瓶中以水浴機進行熱殺菌處理 (65°C, 30 分鐘)，將完成熱殺菌處理之果泥放入 -20°C 冰箱保存至進行後續蛋白質萃取；果汁：將果泥以絹網過濾出果汁，其 HPP 處理與熱殺菌處理步驟與果泥之方法條件相同。

2. 奇異果蛋白質萃取法

(1) 苯酚蛋白質萃取法 (phenol protein extraction)

苯酚蛋白質萃取法參考文獻[238]並稍作調整。奇異果果肉切丁以果汁機打成果



泥後，取 1.5 g 果泥至 15 mL 離心管。於離心管加入 10 mL 萃取液 (0.9M Sucrose, 100 mM Tris-base, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.4% (v/v) β -mercaptoethanol 50% (v/v) phenol)，於均質震盪 20s 後，於 4°C 下以混合機混和 30 mins。離心 (3,900 g, 15 mins, 4°C) 後取苯酚層至新的 50 mL 離心管。於離心管中加入 5 倍體積 (30 mL) 0.1 M ammonium acetate/100% methanol，震盪後在 -20°C 下過夜 (至少 16 hrs)。離心 (3,900 g, 10 mins, 4°C) 後去除上清。分別加入 20 mL 之 -20°C, 0.1 M ammonium acetate/ 100% methanol、80% acetone 及 70% ethanol 各洗一次。以 70% ethanol 轉移沉澱物至 1.5 mL 微量離心管中，將微量離心管冷卻至 -20°C 後離心 (21,100 g, 15 mins, -9°C)，去除上清。重複至沉澱全部轉移。以真空乾燥機將沉澱表面抽乾。加入 1 mL 回溶溶液 (9M Urea pH8.0)。

(2) 優化之苯酚蛋白質萃取法 (optimized phenol protein extraction, OPE)

奇異果果肉切丁以果汁機打成果泥後，加入液態氮研磨三次，取 1.5 g 研磨後之果泥至 15 mL 離心管，於離心管加入 10 mL 萃取液 (0.9M Sucrose, 120 mM Tris-base, pH 8.0, 12 mM EDTA, 0.48% (v/v) β -mercaptoethanol, 50% (v/v) phenol)，於室溫下震盪 20 mins。離心 (3,900 g, 15 mins, 25°C) 後取 phenol 層至新的 50 mL 離心管。重複萃取步驟兩次，於步驟間加入 0.2 g Sucrose 以穩定分層，共得到每樣品共三管萃取物。於離心管中加入 5 倍體積 (30 mL) 0.1 M ammonium acetate/100% methanol，震盪後在 -20°C 下過夜 (至少 16 hrs)。取第一次萃取物離心 (3,900 g, 10 mins, 4°C) 後去除上清，於同管加入第二次萃取物離心後去除上清，於同管加入第三次萃取物後離心去除上清，將三次萃取物合併為同一管。分別加入 20 mL 之 -20°C, 0.1 M ammonium acetate/ 100% methanol、80% acetone 及 70% ethanol 各洗一次。加入 0.1 M ammonium acetate/ 100% methanol 時可先潤洗第二、三次萃取物之離心管後倒入第一管中以減少損耗。以 70% ethanol 轉移沉澱物至 1.5 mL 微量離心管中，將微量離心管冷卻至 -20°C 後離心 (21,100 g, 15 mins, -9°C)，去除上清。重複至沉澱全部轉移。以真空乾燥機將沉澱表面抽乾，

加入 0.5 mL 回溶溶液 (9M Urea pH8.0)，待其回溶後以 1 mL 定量瓶加入回溶溶液定量至 1 mL 後取回原微量離心管。

(3) 微量苯酚蛋白質萃取法 (micro phenol protein extraction, MPE)

若樣品為鮮果：取兩顆奇異果去皮、果肉切丁以果汁機打成果泥；果醬：取 100 g 之果醬以果汁機均質化；果乾：取 25g 果乾加入 75 g Milli-Q water 以果汁機均質化；果泥：取 100 g 之果泥以果汁機均質化；果汁：取 100 g 之果汁。將前步驟之樣品 (除了果汁之外) 加入液態氮研磨三次，取約 0.07 g 樣品至 1.5 mL 微量離心管。於離心管加入 70 μ L 緩衝液 (1.8M Sucrose, 240mM Tris-base, pH 8.0, 24mM EDTA, 0.96% (v/v) β -mercaptoethanol) 及加入 100 μ L 飽和蔗糖苯酚溶液，vortex 使其混和均勻。並於 40°C 下超音波震盪 20 mins，結束後 vortex 使其混和均勻。離心 (3,900 g, 15 mins, 25°C) 後取 phenol 層至新的 1.5 mL 離心管。重複萃取步驟兩次，唯於加入飽和蔗糖苯酚溶液體積為 70 μ L，將三次萃取物合併於同一管。於離心管中加入約 5 倍體積 (1100 μ L) 0.1 M ammonium acetate/100% methanol，震盪後在 -20°C 下靜置 4 小時。將萃取物離心 (21,100g, 10 mins, -9°C) 後去除上清。分別加入 800 μ L 之 -20°C, 0.1 M ammonium acetate/ 100% methanol、80% acetone 及 70% ethanol 各洗沉澱表面一次，加入時手持輕微搖晃，離心 (21,100g, 15 mins, 4°C) 後去除上清後換下一溶劑。以真空乾燥機真空乾燥 30 分鐘將沉澱表面殘留溶劑抽乾。

(4) 三氯乙酸蛋白質沉澱法 (trichloroacetic acid protein precipitation, TCA)

以果汁機將切丁之奇異果可食部位均質化，全程需保持在低溫 (4°C) 下。取足夠量之果泥至研砵中加入液態氮研磨。取 4 g 之果泥置於 50 mL 離心管中並加入 25 mL TCA 萃取緩衝液。於 -20°C 冰箱靜置 1 小時以上。蛋白應呈現白色雪花狀沈澱。以 5,000g 4°C 之條件離心 30 分鐘，去除上清液。加入 10 ml 冰丙酮以清洗蛋白沈澱團塊，5,000g 4°C 10 分鐘離心去除上清，重複此步驟兩次。以真空乾燥法去除殘留丙酮。將蛋白回溶於 15 mL 之 tank buffer 中，5,000g 4°C 10 分鐘離

心後將上清轉移至新的離心管中保存。

(5) 硫酸銨蛋白質沉澱法 (ammonium sulfate protein precipitation, AmSulf)

將 250 g 奇異果可食部位與 250 mL 萃取緩衝液 (100mM Tris-HCl, 2 mM NaCl and 10 mM EDTA) 以果汁機均質化。以絹網過濾之濾液離心後 (4,500 rpm, 15 mins, 25°C) 取上清。加入硫酸銨 (ammonium sulfate) 至飽和。硫酸銨加入量以網路上之軟體 ammonium sulfate calculator (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) 計算，於 4°C 靜置過夜。離心 (9299 g, 15 mins, 4°C) 收集沈澱物於 50 mL 離心管中。將沈澱之蛋白團塊與適量透析液 (200mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 2 mM NaCl, 0.8% (v/v) β -mercaptoethanol) 均質後加入透析袋 (3 kDa) 中透析，透析液更換約 5-6 次每次間隔至少 4 小時以上。將蛋白液分裝為 1 mL 量儲存於 -80°C 保存。

(6) 蛋白質鹽萃取法 (salt protein extraction method)

方法參考 [249] 將 0.7g 冷凍之奇異果可食部位果肉與 0.07 mg polyvinylpolypyrrolidone 一同以液態氮於研钵中研磨。加入 1 mL 之萃取液 (0.5M NaCl, 10 mM DTT, 以 NaOH 調整至 pH 8.3) 置冰靜置 1 小時並離心 (16 000g, 4 °C, 10 min) 取上清，於 -20°C 保存。

3. 蛋白質定量法

(1) Bradford 蛋白質定量法

將 Bio-Rad Protein assay dye concentrate 以水稀釋 5 倍。配製標準品使濃度落於 0.05 - 0.5 mg/mL 範圍。將樣品稀釋至 0.05 - 0.5 mg/mL 範圍。將 10 μ L 樣品及標準品載入 96 孔盤中，加入 200 μ L 稀釋過之 Bio-Rad Protein assay dye concentrate，靜置 5 分鐘，測定波長 595 nm 吸光值。

4. 蛋白質定性法

(1) SDS-PAGE

變性膠體製備：鑄膠玻片以 75% 酒精清潔並擦拭乾淨，置於固定架上夾緊，確

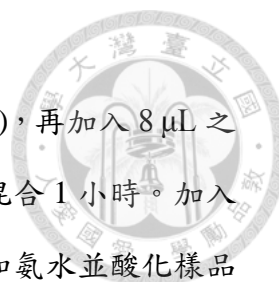
保不會漏液。配製 12% running gel 後注入玻片間，輕敲去除氣泡，於上方加入 methanol 將溶液壓平。待凝膠完成，倒除 methanol，將 4% stacking gel 注入玻片間，插入齒梳，靜置等待凝膠。凝膠完成，將齒梳拔除，即可進行膠體電泳分析。膠體電泳、染色與退染：將鑄好之膠片置於電泳槽中，倒入 tank buffer，注入樣品，蓋上電泳槽上蓋，連接電源供應器，以固定電壓 60 V 進行電泳。待樣品之 sample dye 通過 stacking gel 跑至 running gel 上緣，則可更改電壓為 130 V 繼續進行電泳。電泳完成後，將膠體自玻片取下，於染色盒中以 CBR stain solution 進行染色。當染色完成後倒除染劑，再以 Milli-Q water 或 destain solution 退染直至背景呈透明，即可用照膠系統保存影像。

5. 蛋白質消化法

(1) 尿素基質前處理方法

a 優化尿素基質溶液內胰蛋白酶蛋白質消化法 (optimized urea based in-solution trypsin digestion method, Urea digestion)

於苯酚法萃取之蛋白樣品中加入 0.5 mL 回溶溶液 (9M Urea 1M TEAB pH8.0)，待其回溶後以 1 mL 定量瓶加入回溶溶液定量至 1 mL 後取回原微量離心管。將蛋白質溶液以 9M Urea 1M TEAB 緩衝液稀釋使蛋白質濃度落於 1.5 - 2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之間。取 10 μL 之蛋白質溶液於微量離心管中。於管中加入 0.6 μL 之 100 mM DTT 至管中濃度達約 5 mM，置於室溫下 30 分鐘以還原雙硫鍵。加入 0.9 μL 500 mM iodoacetamide 溶液至最終濃度達到 35 mM 混合均勻後置於室溫暗處 30 分鐘以烷基化半胱胺酸。加入 4 μL 之 100 mM DTT 至最終濃度達 25 mM 並置於室溫下 10 分鐘以終止烷基化反應。將溶液加入 182 μL Milli-Q water 將 urea 濃度稀釋至 1 M 以下來避免胰蛋白酶變性失活。加入 2.5 μL 胰蛋白酶溶液，蛋白與蛋白酶比例應落於 20~200 之間。置於 37°C 下以 300 rpm 震盪混合進行消化 16 小時。



b 尿素基質二甲基標記法

消化後接續二甲基標記步驟，加入 8 μL 之 4% (v/v) 甲醛 (CH_2O)，再加入 8 μL 之 0.6 M 氰硼氫化鈉 (NaBH_3CN)，置於 20 $^\circ\text{C}$ 下以 300 rpm 震盪混合 1 小時。加入 32 μL 之 1% (v/v) 氨水終止標記反應，加入 16 μL 之甲酸中和氨水並酸化樣品以進行後續質譜分析。取 8 μL 之樣品溶液至新的微量離心管中，加入 4 μL 之三種濃度為 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之內標準品 (AD1D、AD5D、AD11D)，最終得 20 μL 樣品體積。

c 尿素基質樣品除鹽法

分別利用 100% 乙腈與 0.1% 甲酸水溶液平衡 zip tip，吸取 10 μL 之前述溶液並排至廢液三次。以 zip tip 吸排樣品溶液 30 次以裝載樣品至管柱上。以 0.1% 甲酸水溶液洗出 zip tip 中鹽類，吸取並排至廢液六次。於預先分裝至微量離心管之 20 μL 60% 乙腈 0.1% 甲酸水溶液中吸排 20 次，以流洗出肽。加入 180 μL Milli-Q water，儲藏於 -20 $^\circ\text{C}$ 待後續分析。

(2) 脫氧膽酸鈉基質前處理方法

a 優化脫氧膽酸鈉基質溶液內胰蛋白酶蛋白質消化法 (optimized sodium deoxycholate based in-solution trypsin digestion method, SDC digestion)

於苯酚法萃取之蛋白樣品中加入 100 μL 5% 脫氧膽酸鈉 (SDC) 50 mM TEAB 緩衝液。加入 1 μL 500 mM DTT 50 mM TEAB buffer 至最終 DTT 濃度為 5 mM。吸排至蛋白塊全數溶解，置於室溫下 30 分鐘以還原雙硫鍵。加入 8 μL 500 mM iodoacetamide 50 mM TEAB buffer 至最終 IAA 濃度至 35 mM 置於室溫暗處 30 分鐘以烷基化半胱胺酸。加入 6 μL 之 500 mM DTT 至最終濃度為 25 mM，放置 10 min 以終止烷基化反應。加入 885 μL 50 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) 緩衝液。取 35 μL 樣品溶液至新微量離心管，加入 15 μL 內標準品混和液(三種內標準肽 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以等比例混和)。加入 2.5 μL 之 0.1 mg/mL 胰蛋白酶。置於 37 $^\circ\text{C}$ 下以 300 rpm 震盪混合進行消化反應 7 小時。



b 脫氧膽酸鈉基質二甲基標記法

消化後加入 1.5 μL 之 4% (v/v) 甲醛 (CH_2O)。混和後加入 1.5 μL 之 0.85 M 氰硼氫化鈉 (NaBH_3CN)，置於 20 $^\circ\text{C}$ 下以 300 rpm 震盪混合 1 小時。加入 6 μL 之 1% (v/v) 氨水終止標記反應，加入 3.5 μL 之甲酸中和氨水並酸化樣品以進行後續質譜分析。以 15700g 離心 2 分鐘以沉澱 SDC。取 52 μL 之樣品上清液至新的微量離心管中。

c 脫氧膽酸鈉基質樣品除鹽法

分別利用 100% 乙腈與 0.1% 甲酸水溶液平衡 zip tip，吸取 10 μL 之前述溶液並排至廢液三次。以 zip tip 吸排樣品溶液 30 次以裝載樣品至管柱上。以 0.1% 甲酸水溶液洗出 zip tip 中鹽類，吸取並排至廢液六次。於預先分裝至微量離心管之 20 μl 60% 乙腈 0.1% 甲酸水溶液中吸排 20 次，以流洗出胜肽。加入 180 μl Milli-Q water，儲藏於 -20 $^\circ\text{C}$ 待後續分析。

6. 胜肽標記與除鹽法

(1) 標準胜肽標記法

取 25 μL 之 1 mg/mL 合成胜肽溶液。加入 100 μL 之 100mM TEAB 緩衝液，加入 5 μL 之 4% (v/v) 甲醛 (CH_2O 或 CD_2O)。混和後加入 5 μL 之 0.6 M 氰硼氫化鈉 (NaBH_3CN)。置於 20 $^\circ\text{C}$ 下以 300 rpm 震盪混合 1 小時。加入 20 μL 之 1% (v/v) 氨水終止標記反應，加入 10 μL 之甲酸中和氨水並酸化樣品以進行後續質譜分析。加入 835 μL Milli-Q water 以取得 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準標記胜肽溶液。

7. 蛋白質質譜定性

(1) 複雜蛋白質定序

將樣品以胰蛋白酶消化後，送至臺灣大學化學系蛋白質體質譜核心實驗室以 Q-ToF (Waters Synapt G2 HDMS, Waters Q-ToF system, hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometry) 進行質譜分析；樣品以 zip tip 除鹽後以 0.1% formic acid/ Milli-Q water 回溶並進樣。Q-ToF 之機器參數如補充資料一



(2) Q-ToF 資料分析

以 Mascot Distiller 質譜數據分析平台進行結果分析。參數如下：

- Database(s) : NCBIInr
- Taxonomy : Vindiplantae (Green Plants)
- Enzyme : Trypsin
- Maximum missed cleavages : 2
- Quantitation method : None
- Fixed modifications : None
- Variable modifications : Carbamidomethyl (C)、Deamidated (NQ)、Oxidation (M)、Carbamyl (K)、Carbamyl (N-term)
- Peptide mass tolerance : 0.1 Da
- Fragment mass tolerance : 0.1 Da
- Mass values : Monoisotopic
- Instrument type : ESI-QUAD-TOF
- Isotope error mode : 0
- Decoy database also searched : 1

8. 目標胜肽選擇與合成

(1) 同源性蛋白確認

以 NCBI 之 BLAST 平台分析。

(2) 目標胜肽合成

委託國家衛生研究院感染症與疫苗研究所核心設施服務平台 (NIIDV Core Facility) 生化分析實驗室合成能夠代表目標過敏原之目標胜肽。合成胜肽之資訊如補充資料二



9. 超效液相層析三重四極柱質譜儀

(1) 多重反應監測 (MRM) 躍遷 (transition) 設定

a 利用標記後之合成胜肽對 QqQ MS 進行質譜儀之方法建立與參數優化

方法為以 Q-TOF 定性結果為參考依據，分別對 1 $\mu\text{g/mL}$ 之未標記、標記 CH_2O (CH_2) 和標記 CD_2O (CD_2) 之合成胜肽以 MS Tune 模式進行掃描；初始選擇 MS Scan 模式並設定母離子 (parent ions) 之 m/z 值，持續調整進樣錐的電壓並擷取 (acquire) 固定時間及固定質量範圍內的母離子訊號 (intensity)，而後儲存為 Centroid 資料模式；以 MassLynx 軟體分析所擷取之訊號並針對不同電壓下所得之強度進行比較，找出訊號最強時的電壓作為進樣錐的最適電壓。

b 以 QqQ MS 尋找適合之代表目標胜肽之二次質譜子離子

方法為固定進樣錐電壓 (V) 並開啟碰撞室氣體，選擇 Daughter Scan 模式進行大範圍掃描，以尋找訊號前二強之子離子 (daughter ions)，其中第一子離子用來作為定量子離子，而第二子離子則為定性子離子；將 Set 設為母離子之 m/z 、Mass 分別設成前二強子離子之 m/z ，同時監控兩個子離子並調整碰撞能量；以 MassLynx 軟體分析所擷取之訊號並針對不同電壓下所得之強度進行比較，找出訊號最強時的電壓作為最適的碰撞能量。

(2) 超效液相層析流洗梯度設定

a 利用標記之合成胜肽對 UPLC 進行層析方法建立與優化

方法為參考 Q-TOF 使用之流洗梯度，設定適當之層析條件，判斷標記合成胜肽之流洗時間，流動相 A 為 5mM 醋酸銨及 0.1% Formic acid 水溶液；流動相 B 為 0.1% Formic acid ACN 溶液；管柱為 Waters nano ACQUITY UPLC peptide BEH 130, C18, 1.7 μm resin, 75 μm (ID) x 250 mm (L)。考量各因素對層析條件進行調整，考量因素包括目標胜肽之洗脫濃度、流洗時間，並以空白樣品確認無干擾物質殘留。



(3) 其餘參數

設定如補充資料三。

(4) 數據處理

以 TargetLynx 軟體進行結果分析。

10. 方法確效

(1) QqQ MS 檢量線繪製

將標記 CH₂O 之合成胜肽(AD1H、AD5H、AD11H)作為外標準品，配置成 21 管不同濃度之溶液，濃度分別為 4000, 2000, 800, 400, 200, 80, 40, 20, 8, 4, 2, 0.8, 0.4, 0.2, 0.08, 0.04, 0.02, 0.008, 0.004, 0.002, 0.0008 ng/mL，內標準品(AD1D、AD5D、AD11D)濃度為 500 ng/mL。以 QqQ MS 進行分析，使用 TargetLynx 軟體分析數據，使用對數轉換之座標軸。

(2) 確效試驗

適用範圍、準確度、重複性依國際醫藥法規協和會 (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 的文件 validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) 來進行確效試驗設計，以待測濃度之 1000%、125%、100%、80%、10% 進行標準品添加試驗，編號分別為 A、B、C、D、E，AD1H 之添加量分別為 125000、15625、12500、10000、1250 ng/mL；AD5H 添加量分別為 250000、31250、25000、20000、2500 mg/mL；AD11H 添加量分別為 12500、1562.5、1250、1000、125 ng/mL，進行五個濃度的三重複測定。儀器定量極限、儀器偵測極限分別以訊噪比 10:1 與 3:1 判定。

參、結果



一、 樣品前處理法

1. 苯酚蛋白質萃取法選擇

選擇蛋白質萃取法時應該考慮萃取出來之蛋白質組成，以確保所有過敏原能夠無偏差的被萃取出來，本研究使用四種不同的蛋白質製備法對奇異果進行萃取製備全蛋白樣品，並以 15% 之 SDS-PAGE 進行組成分析，結果如圖一。泳道 1 為標準蛋白液；泳道 2 為苯酚萃取法；泳道 3 為硫酸銨沉澱法；泳道 4 和 5 為 TCA 法；泳道 6 和 7 為鹽萃取法，並以箭頭標示之條帶為蛋白質組成完整性之參考。可以見到硫酸銨沉澱法(泳道 3)僅出現兩個條帶；而鹽萃取法(泳道 6 和 7)僅出現有箭頭標示之條帶，其他條帶較少。苯酚萃取法(泳道 2)、TCA 法(泳道 4 和 5)條帶較豐富且完整，意味此兩種方法皆能有效率的萃取出組成完整之奇異果蛋白質。於後續萃取方法選擇上本研究選擇使用苯酚萃取法，因其一、操作上可計算性較高，於定量分析上較能準確計算。二、TCA 法雖然步驟較少，但有文獻[235]指出，在複雜基質的情況下，TCA 法可能並非最佳的方法，考量後續方法可能使用於基質差異相當大的不同產品上，故捨棄使用 TCA 法。

進行定量分析時，應將所有目標物萃取出來進行分析，避免含量低估，因此需判斷萃取法之萃取效率。而萃取法受限於萃取分配係數，常需多次萃取將目標物完整萃取出。表一為進行對同一樣品重複苯酚法萃取四次之結果，萃取至第四次已無法偵測到蛋白質，故設定對相同之果肉樣品進行三次苯酚蛋白質萃取法可將全蛋白萃出，之後方法設計進行三次萃取將所有蛋白萃出。以萃取出之蛋白總量設定為 100%，於第一、二、三次萃取時可分別萃取出奇異果中 73.72%、20.17%、6.11% 之蛋白質。

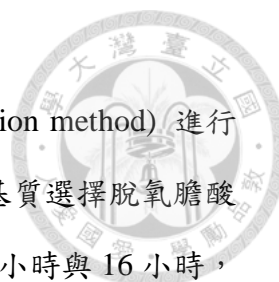
2. 苯酚蛋白質萃取法優化

苯酚法之方法來自 Lee 等人之方法[238]，經過萃取參數調整後之方法為最

佳化苯酚萃取法 (optimized phenol protein extraction, OPE)，以 OPE 為參考將方法大幅度的減少操作體積量，並考量質譜分析相容性，開發微量苯酚萃取法 (micro-phenol protein extraction, MPE)。

對微量苯酚法進行方法操作性及參數優化，參數優化結果如表二。優化之參數包含醋酸銨沉澱步驟之沉澱時間 (2 hrs、4 hrs、6 hrs、>16 hrs)、萃取輔助法 (超音波震盪法和均質震盪法)、萃取之果泥量 (0.02 g、0.04 g、0.06 g、0.08 g、0.1 g)、苯酚萃取時溫度 (15°C、40°C)。萃取溫度試驗之確認法使用本研究開發之方法分別測定三條胜肽含量作為參數調整依據 (AD1H、AD5H、AD11H)，因溫度可能會造成於蛋白總量上看不出差異的變化如後修飾等，故以此方法評估較為完整。其他試驗之結果確認使用 Bradford 蛋白質定量法。依確認方法為 Bradford 法或本研究開發之方法分別，以每克奇異果果肉含有之蛋白量或過敏原量為比較基準。參數調整目的為期望能達到最高之蛋白質萃取量，故最佳化參數以目標物 (蛋白或過敏原) 最高量、標準差小、操作方便性依序為選擇依據。表中標註底色之處理組為最終決定之參數。

待 OPE 與 MPE 優化完成後，與原文獻方法進行比較，確認優化提升之萃取量。結果如圖二，可見文獻、OPE 與 MPE 每克奇異果果肉蛋白質萃取量分別為 2.56 mg、 4.46 ± 0.091 mg、 4.47 ± 0.24 mg。OPE 與 MPE 蛋白質萃取效率明顯較文獻之方法高。表三比較 OPE 與 MPE 性質，於蛋白質萃取效率上，OPE 與 MPE 皆具結果相近之高蛋白質萃取效率；使用果泥量 OPE 較多 (1.5 g)，MPE 較少 (0.07 g)；總萃取出蛋白質重量 OPE 和 MPE 分別為 6.7133 ± 0.12 mg 和 0.4235 ± 0.044 mg，OPE 單次可萃出較大量之蛋白質；MPE 因體積大量減少，故相對應之試劑需求量亦較少，故成本較低；MPE 因方法較簡便、快速、方便操作，單次萃取僅需約 1 天，且人力勞動量較低；而 MPE 與後續胰蛋白酶消化步驟進行相容性方法調整，故自 MPE 轉換至胰蛋白酶消化步驟無須濃度調整、移液等方法轉換之中間步驟。



3. 溶液內胰蛋白酶消化法之優化

對溶液內胰蛋白酶消化法 (in-solution trypsin protein digestion method) 進行參數優化，優化參數包含消化輔助基質與消化時間。消化輔助基質選擇脫氧膽酸鈉 (sodium deoxycholate, SDC)、尿素 (urea)；消化時間選擇 7 小時與 16 小時，結果如表四。消化輔助基質 SDC 處理組與消化時間 7 小時處理組偵測到較高之過敏原含量，故選擇其作為最佳化之參數。

4. 穩定同位素二甲基標記法效率確認

對穩定同位素二甲基標記法進行同位素滯留時間差異以及標記效率之確認，本試驗使用氫與氬同位素之甲醛進行二甲基標記，其標記後質量變化如圖三，標記氫同位素於每個標記位會產生 28 Da 之質量差；標記氬同位素則產生 32 Da 質量差。

同位素滯留時間差異為同位素化合物間產生化學性質上差異，造成於層析圖上滯留時間不一致，可能造成定量不準確性。圖四探討二甲基標記後之六個胜肽 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H 和 AD11D 之同位素滯留時間之差異。AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H 和 AD11D 之滯留時間分別為 1.20、1.19、2.91、2.90、1.49 和 1.49，穩定同位素胜肽間之滯留時間差異微小可忽略，故利用穩定同位素二甲基標記法標記 AD1、AD5 和 AD11 不會產生同位素滯留時間差異。

利用質譜圖來確認二甲基穩定同位素標記法對胜肽 AD1、AD5 和 AD11 之標記效率，若於原胜肽荷值比處無訊號，則認定原胜肽已被標記完全。圖五確認 AD1 以氫與氬甲醛同位素標記之標記效率，於質譜圖上可見於 AD1 荷值比 859.48 處無明顯訊號，並分別於上圖 AD1H 與 AD1D 荷值比 915.74 與 923.75 具明顯訊號，其與 AD1 荷值比相差分別約為 56 與 64，與其帶兩個標記位所應增加之質量相符合。圖六確認 AD5 以氫與氬甲醛同位素標記之標記效率，於質譜圖上可見於 AD5 荷值比 936.97 處無明顯訊號，並分別於上圖 AD5H 與 AD5D 荷

值比 965.37 與 969.12 具明顯訊號，其與 AD5 荷值比相差分別約為 28 與 32，與其帶兩個標記位且帶二價電荷所應增加之質量相符合。圖七確認 AD11 以氫與氘、¹³C 與 ¹²C 同位素標記之標記效率，於質譜圖上可見於 AD11 荷值比 578.93 處無明顯訊號，並分別於上圖 AD11H 與 AD11D 荷值比 597.69 與 600.38 具明顯訊號，其與 AD11 荷值比相差分別約為 18.66 與 21.33，與其帶兩個標記位且帶三價電荷所應增加之質量相符合。AD1、AD5 和 AD11 於標記後皆無原胜肽殘留，且標記後正確質量之化合物皆有產生，故利用穩定同位素二甲基標記法能夠有效且完全標記 AD1、AD5 和 AD11。

二、 分析方法建立

1. 目標過敏原之選擇- Q-ToF 複雜蛋白質定序結果

分析目標物的選擇包含選擇適當過敏原及其胜肽，本研究委託國立臺灣大學化學系質譜核心實驗室使用 Q-ToF 對奇異果全蛋白進行複雜蛋白質定序，圖八為進行定序時使用之液相層析梯度圖。圖上標示之#1、#5、#11 分別為目標過敏原代表胜肽 AD1、AD5、AD11 之滯留時間。補充資料一為定序蛋白質結果，將物種為奇異果之結果整理而得表五。於定序結果中奇異果蛋白有 52 個，其中過敏原則有 8 種，分別為 Act d 1、Act d 2、Act d 4、Act d 5、Act d 6、Act d 7、Act d 10、Act d 11。從過敏原中選擇 Act d 1、Act d 5、Act d 11 作為目標過敏原。

2. 代表胜肽選擇

選擇質譜分析之代表胜肽，需注意許多條件如表六，條件依重要性高至低排序為代表胜肽長度應介於 8-19 個胺基酸間；序列不應含有半胱胺酸 (cysteine)、甲硫胺酸 (methionine)；不應含有胰蛋白酶切點；不含有相連的切點 (ragged end)；胜肽分數應越高越好；胜肽序列可概括所有之亞型蛋白。將三個目標過敏原 (Act d 1、Act d 5、Act d 11) 無後轉譯修飾之胜肽結果整理為表七，並依表六之條件審視其中之胜肽，並將不符合之條件以底線標示。條件皆符合之胜肽稱為候選胜肽，共四個以粗體標示，分別為 Act d 1 之編號 3 胜肽 (Act d 1-1)、Act d 5 之編號 1

與 2 胜肽 (Act d 5-1、Act d 5-2)、Act d 11 之編號 2 胜肽 (Act d 11-1)。

將候選胜肽以美國國家生物技術資訊中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 之 BLAST 進行胜肽序列比對，結果去除高同源性之獼猴桃屬物種，整理結果如表八。胜肽 Act d 1-1、Act d 5-1、Act d 11-1 序列僅於獼猴桃屬中同源性蛋白中出現，而 Act d 5-2 序列保守於許多非獼猴桃屬物種中皆存在，可能於後續分析複雜基質時產生偽陽性結果，故將 Act d 5-2 排除自候選胜肽中。剩下之候選胜肽則重新命名成為各目標過敏原之代表胜肽。Act d 1-1 命名為 AD1、Act d 5-1 命名為 AD5、Act d 11-1 命名為 AD11。

將目標過敏原與其代表胜肽資訊整理後，如表九。其中包含目標過敏原之蛋白質名字、過敏原名、Uniprot 編號、蛋白序列長度、蛋白質分子量、理論等電點、Q-ToF 複雜蛋白質定序結果中之覆蓋率，而圖九蛋白質完整序列中標註底線為定序成功之胜肽結果，於 Act d 5 中虛底線為 kissper 胜肽，而標粗體為代表胜肽。後續將代表胜肽委託國家衛生研究院進行胜肽序列合成。

3. MS 參數設定

取得委外合成之 AD1、AD5、AD11，對其進行二甲基穩定同位素標記，標記效率如前節 4。AD1 標記氫同位素之胜肽命名為 AD1H；AD1 標記氘同位素之胜肽命名為 AD1D。AD5、AD11 亦依此規則命名其標記後胜肽 AD5H、AD5D、AD11H、AD11D。利用標記後胜肽進行三重四極柱質譜儀之參數優化，調整之參數為進樣錐電壓 (cone voltage, CV)。將代表胜肽及其標記胜肽之性質整理為表十。表中欄位左至右依序為代號、序列及其標記、帶電荷數 (Z)、理論荷質比 (expect M/z)、實驗荷質比 (observed M/z)、理論與實驗荷質比之差異 ($\Delta M/z$)、進樣錐電壓 (CV)、與代表胜肽之荷質比差異 (M/z shift)、與代表胜肽之質量差異 (Mr shift)。

對標記胜肽進行碰撞室電壓 (collision energy) 優化、定量與定性子離子之選擇。定量子離子質譜圖如圖十，自上而下分別圈出 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、

AD11H、AD11D 之定量子離子荷質比，其躍遷 (transition) 分別為(915.47 > 288.42)、(923.54 > 292.44)、(965.38 > 460.40)、(969.10 > 921.68)、(597.69 > 302.35)、(600.47 > 527.74)。定性子離子質譜圖如圖十一，自上而下分別圈出 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H、AD11D 之定量子離子荷質比，其躍遷 (transition) 分別為(915.47 > 628.54)、(923.54 > 632.63)、(965.38 > 584.30)、(969.10 > 1564.05)、(597.69 > 466.44)、(600.47 > 855.41)。將定量子離子與定性子離子之性質分別整理成表十一與表十二。表中欄位左至右依序為代號、子離子序列及其標記、胜肽碎片離子名稱 (fragment ion, FI)、帶電荷數 (Z)、理論荷質比 (expect M/z)、實驗荷質比 (observed M/z)、理論與實驗荷質比之差異 ($\Delta M/z$)、碰撞室電壓 (CE)。

4. LC 梯度設定

使用標記胜肽進行液相層析梯度調整與優化，配置 4000 ppb 之標準品進行梯度圖之目標物分離效果及殘留量確認，結果如圖十二。最終決定使用之梯度具良好分離效果，而以空白樣品確認標記胜肽殘留量皆非常低。液相層析梯度圖與標記胜肽滯留時間如圖十三，#1 為 AD1H 與 AD1D 之滯留時間為 1.19 分鐘；#5 為 AD5H 與 AD5D 之滯留時間為 2.91 分鐘；#11 為 AD11H 與 AD11D 之滯留時間為 1.49 分鐘，此 LC 方法全長為 5 分鐘。

5. 校正曲線

以 AD1H、AD5H、AD11H 作為外標準品，以 AD1D、AD5D、AD11D 作為內標準品 (internal standard, IS)。外標準品配置濃度為 4000, 2000, 800, 400, 200, 80, 40, 20, 8, 4, 2, 0.8, 0.4, 0.2, 0.08, 0.04, 0.02, 0.008, 0.004, 0.002, 0.0008 ng/mL，內標準品濃度為 500 ng/mL。濃度計算方法為先使用外標準品面積 (area)、內標準品面積 (IS area)、內標準品濃度 (IS conc.) 算出反應量 (response)，IS conc. 為 500 ng/mL，area 和 IS area 為機器之偵測訊號積分值。計算方法為 $\text{response} = \text{area} * (\text{IS conc.} / \text{IS area})$ 。以外標準品配置濃度之對數值為 x 軸，以反應量之對數值作為 y 軸，繪製出之 AD1H 校正曲線與殘差圖如圖十四，繪製出之 AD5H 校正

曲線與殘差圖如圖十五，繪製出之 AD11H 校正曲線與殘差圖如圖十六。AD1H、AD5H、AD11H 之線性範圍分別為 0.4 - 4000 ng/mL、8 - 4000 ng/mL、20 - 4000 ng/mL，決定係數 (R^2) 分別為 0.9990、0.9936、0.9908。



6. 方法確效試驗

方法建立完成後進行確效試驗，依國際醫藥法規協和會 (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 的文件 validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) 來進行確效試驗設計，以待測濃度之 1000%、125%、100%、80%、10% 進行標準品添加試驗，編號分別為 A、B、C、D、E，AD1H 之添加量分別為 125000、15625、12500、10000、1250 ng/mL；AD5H 添加量分別為 250000、31250、25000、20000、2500 mg/mL；AD11H 添加量分別為 12500、1562.5、1250、1000、125 ng/mL，進行五個濃度的三重複測定。表十三、表十四、表十五分別為 AD1H、AD5H、AD11H 之確效結果，包含胜肽名、標準品編號、胜肽添加量、胜肽測定之平均量、變異係數 (coefficient of variation, CV%)、回收率，其中粗體之數值為超出我國「食品化學檢驗方法之確效規範」規定之數值。

AD1H 之變異係數皆落於我國規範標準內，C 與 E 之回收率分別為 78.9%、65.5%，分別落於規範 80 - 115%、75 - 120% 之外，其餘回收率則皆落於規範內；AD5H 之變異係數除了 E (17.21%) 落於規範 10% 外，回收率除了 A、D (75.77%、72.50%) 分別落於規範 85 - 110%、80 - 115% 外，其餘數值皆符合我國規範。AD11H 之變異係數與回收率皆不符合我國規範。AD1H 與 AD5H 雖皆有數值落於我國規範外，但其數值相當接近規範之限值，故仍具有良好之重複性與回收率。

將 A、B、C、D、E 之濃度對數值作為 x 軸，反應量對數值作為 y 軸，繪製檢視適用範圍內之線性，AD1H、AD5H、AD11H 之結果分別如圖十七、圖十八、圖十九。AD1H 與 AD5H 分別於添加濃度 1250 - 125000 ng/mL、2500 - 250000 ng/mL 具有良好線性，其決定係數 (R^2) 分別為 0.9981、0.9937。AD11H 於添加

濃度範圍內則無線性。表十六統整確效之結果，包含定量範圍 (range)、準確度 (accuracy)、重複性 (repeatability)、儀器定量極限 (instrumental quantification limits, IQLs)、儀器偵測極限 (instrumental detection limits, IDLs)、專一性 (specificity)、線性 (linearity)。



三、 不同加工處理對奇異果過敏原之影響

1. 不同加工處理對奇異果過敏原之影響

將本研究之方法，應用於奇異果產品，並探討不同加工處理對奇異果過敏原之影響。使用之奇異果產品為果醬、熱風乾燥果乾、冷凍乾燥果乾、熱殺菌果泥、高靜水壓處理果泥、熱殺菌果汁、高靜水壓處理果汁，以鮮果作為對照組，果實外觀與糖度重量分別如補充資料 4 與 5。過敏原含量因為各產品中奇異果所含比例不同，故換算為以每克奇異果果肉含量為基準，圖中相同字母組內無顯著差異，不同字母則代表有顯著差異 ($p < 0.05$)。

圖二十為不同加工處理之奇異果產品中 Act d 1 含量，鮮果 (fresh)、果醬 (jam)、熱風乾燥果乾 (heat dried kiwi)、冷凍乾燥果乾 (freeze dried kiwi)、熱殺菌果泥 (heated puree)、高靜水壓處理果泥 (HPP puree)、熱殺菌果汁 (heated juice)、高靜水壓處理果汁 (HPP juice) 之每克奇異果 Act d 1 過敏原含量分別為 0.0475 ± 0.00107 、 0.0169 ± 0.00208 、 0.0317 ± 0.00258 、 0.04920 ± 0.00215 、 0.0509 ± 0.00227 、 0.0488 ± 0.000405 、 0.0515 ± 0.00129 、 0.0512 ± 0.00468 mg。經過果醬與熱風乾燥果乾加工過程後，每克奇異果中 Act d 1 含量顯著較其他加工處理組別低，而果醬組又顯著較熱風乾燥組低，其他組別彼此間無顯著差異。

圖二十一為不同加工處理之奇異果產品中 Act d 5 含量結果，鮮果 (fresh)、果醬 (jam)、熱風乾燥果乾 (heat dried kiwi)、冷凍乾燥果乾 (freeze dried kiwi)、熱殺菌果泥 (heated puree)、高靜水壓處理果泥 (HPP puree)、熱殺菌果汁 (heated juice)、高靜水壓處理果汁 (HPP juice) 之每克奇異果 Act d 5 過敏原含量分別為 0.0530 ± 0.00410 、 0.0125 ± 0.00478 、 0.0300 ± 0.00548 、 0.0485 ± 0.00366 、 0.0338

± 0.00487 、 0.0521 ± 0.00190 、 0.0300 ± 0.00402 、 0.0530 ± 0.0117 mg。每克奇異果中 Act d 5 含量鮮果、冷凍乾燥、高靜水壓處理果泥、高靜水壓處理果汁組間無顯著差異；冷凍乾燥果乾、熱加工果泥組間無顯著差異；熱風乾燥、熱殺菌果泥、熱殺菌果汁組間無顯著差異；果醬 Act d 5 含量則顯著低於其他組別。比較同奇異果產品之不同加工處理，使用熱加工之果汁、果泥、果乾皆分別顯著低於非熱加工處理之果汁、果泥、果乾。

肆、討論



一、 樣品前處理法

1. 各萃取法 SDS-PAGE 條帶差異之探討 (圖一)

以硫酸銨沉澱法製備奇異果之蛋白質，以 SDS-PAGE 分析其蛋白質組成發現其條帶非常少，僅 actinidin 與其 propeptide (圖一)，推測原因為長時間透析過程中奇異果蛋白酶 actinidin 保持活性持續作用將其他奇異果蛋白水解成小分子，而被透析遺失。然而透析液中含有 0.8% 之 2-ME，其為強還原劑，故 actinidin 可能抵抗 0.8% 之 2-ME 影響，而持續保持酵素活性。而以鹽萃法(圖一泳道 6 和 7)萃取之條帶與苯酚法或 TCA 法相比皆較少，可能原因為因鹽萃法不含緩衝鹽類，故萃取系統 pH 值可能受果泥之影響變化大落於酸性，使得某些蛋白質萃取效率低落；亦可能為其萃取液強度不夠，其萃取液為水相，其蛋白質萃取分配效率不如苯酚強大，故萃取出之蛋白質較少，且可能受與萃取液之親和性影響，使得部分蛋白質萃取效率低。

以 TCA 法與苯酚法萃取之蛋白於 SDS-PAGE 上進行組成分析，其蛋白質條帶組成相近無明顯之差異。然而於文獻中[250]苯酚法相較於 TCA 法，在頑強的植物組織中有較高之萃取量，這些植物組織像是成熟的果實，含有高含量之多醣類、多酚類化合物之萃取干擾物。另外文獻[235, 251]亦表示 TCA 法易受到許多物質之干擾如多酚類、萜類、有機酸類。考量到後續欲將方法應用至奇異果之加工製品中，其中含有大量之干擾物質，故本研究選擇使用基質耐受性較高之苯酚法作為蛋白質萃取法。

2. 苯酚法重複萃取效率探討

進行苯酚法重複萃取效率探討(表一)，對同一個樣品進行重複萃取，探討萃取次數對蛋白質萃取效率之關係。第一、二、三、四次萃取分別可萃取出 73.72、20.17、6.11、0% 之蛋白質，與文獻[238]之結果 79.0、15.3、5.8% 相比，第一次萃

取之蛋白質比例較低，而第二、三次萃取之蛋白質比例上較文獻高，這可能為樣品基質組成不同（奇異果與黃豆）所產生之差異。而第四次萃取之蛋白質含量已落於 Bradford 法定量範圍外，無法定量蛋白含量，可能原因為經過萃取三次後之蛋白質含量已所剩不多，再經過萃取時之損耗，故無法測出蛋白質。故本研究最終決定對樣品萃取三次，並認定為已將其中之蛋白質完全萃取出來。

3. 苯酚蛋白質萃取法優化

(1) OPE 與 MPE 目的與優勢探討

OPE 與 MPE 步驟中溶劑清洗步驟為使用 80% 丙酮與 70% 乙醇清洗一次，而同樣使用苯酚法之文獻[235]中，使用甲醇與丙酮各清洗兩次，不僅使用溶劑不同，清洗次數亦不相同，此差異在於蛋白質後續之用途不同。文獻中以萃取之蛋白主要用於蛋白質體學研究，以低干擾物質殘留率為目的，故其去除污染物之步驟相當多，然而在去除污染物的同時許多蛋白亦會同時損耗，若使用於過敏原定量上則會造成過敏原含量的低估。

於 OPE 與 MPE 蛋白質之清洗步驟，目的為去除消化、標記步驟及質譜儀之干擾物質，並盡量將清洗強度降低以維持高回收率，雖然已進行優化過，但後續更深入之探討仍未完成，包含清洗溶劑組成、清洗溶劑之溫度、清洗時之震盪幅度以及其對消化效率、標記效率、除鹽效率之影響。於蛋白質定量上，萃取步驟的效率因為在於方法最前端，且可能會因為樣品基質或蛋白質性質不同，產生非常多的變化性，因此本研究認為於蛋白質精準定量法中，前處理步驟的開發為最具挑戰性之部分。許多苯酚法以蛋白質體學為目的，若蛋白質定量法將未優化過之蛋白質體方法直接應用於定量法中，將產生巨大之定量誤差。一套適合所有基質或能輕易依樣品基質調整，並能與質譜定量法搭配之高效率蛋白質萃取法仍待後續研究開發。

(2) 蔗糖與 PVPP 於苯酚法之作用探討

蔗糖於苯酚法中之作用為增加水相之密度，使苯酚層維持於上層，因雙相之

高密度差異達到穩定雙相之分隔線。於 OPE 與 MPE 操作中發現隨苯酚法萃取次數增加雙相之分層逐漸模糊，且水相更易被微量定量管吸走。推測為水相之醣類大量進入苯酚層，導致使水相密度下降，造成密度差減少分層不明顯。嘗試於萃取間加入蔗糖，加入蔗糖後分層變穩定，修改方法將蔗糖先行溶於苯酚中達到飽和，增加方法操作方便性。分層模糊將造成取苯酚層之操作不易，易使水相同苯酚進入苯酚蛋白沉澱步驟造成沉澱之蛋白量下降，使回收率降低。故於苯酚中加入過量蔗糖使其事先飽和，便能穩定萃取時雙相之分層，有利減少人為誤差。

另外某些文獻建議於植物組織液態氮研磨時加入 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)，此物質能幫助研磨，且能幫助吸附多酚類化合物，然而本研究於研磨上無明顯缺點，考量到 PVPP 之加入將增加方法複雜度及須重新考慮均質度及其帶來之誤差，故選擇於本方法中不添加 PVPP 與其他幫助研磨之物質。

(3) MPE 優化參數(沉澱時間、果泥量、萃取溫度)探討

對 MPE 進行參數優化探討 MPE 蛋白質沉澱步驟之沉澱時間(表二)，在優化前沉澱時間並無定時，僅需於-20°C 下靜置過夜即可，然而此步驟相當耗時，會使操作時間加長許多。使用沉澱時間 2 hrs、4 hrs、6 hrs、>16 hrs 之處理組，欲找出最高蛋白質萃取量下之最短沉澱時間。原先預期沉澱時間與萃取量之關係為隨沉澱時間提升，蛋白質萃取量亦隨之提升至某時間點達到最高量不再增加。於文獻[235]中，亦提及多數蛋白質會在 30 分鐘內沉澱。實驗結果 4 hrs 處理組具有最高之每克奇異果蛋白質萃取量，而 6 hrs 與 >16 hrs 處理組反而較 4 hrs 之萃取量低。此結果與預期不同，可能原因為蛋白質於儲藏過程中產生降解，後續實驗選擇沉澱 4 小時作為 MPE 之條件。

對 MPE 進行參數優化，其中嘗試萃取不同量之奇異果果泥，希望能找到一次萃取可以容納最多果泥量，以萃取出最大量蛋白。其中要考量到大量果泥對萃取系統帶來的影響 (pH 值變化、還原劑濃度變化、操作方便性、等)，而最後以萃取量高之果泥量作為選擇。太少量之果泥於萃取中可能因蛋白量少，故若發生

實驗誤差於比例上會較大，使每克果泥蛋白萃取量大幅度波動；太大量之果泥可能會造成微量苯酚法萃取無法將其蛋白全數萃取完畢，造成每克果泥蛋白萃取量下降，而此現象也在表二之 0.1 g 處理組之結果中看到。結果中發現 0.06 g 跟 0.08 g 處理組每克蛋白質萃取量都很高且相近，後續 MPE 考量奇異果之個體差異，選擇 0.07 g 作為果泥萃取量。

本研究之第一部分於試驗進程上與第二部分同時進行，故 MPE 之參數優化使用到了後續開發之方法。於優化萃取溫度時表二使用質譜儀對胜肽 AD1H、AD5H、AD11H 進行定量，使用質譜儀而非 Bradford 法之原因為於加熱過程中，蛋白質可能產生許多後轉譯修飾，而 Bradford 法對後轉譯修飾之靈敏性不如質譜儀靈敏，故使用質譜儀能得到更準確之結果。穩定萃取溫度有助於提升方法精密度於 15°C 處理組於萃取過程中可見其苯酚流動性較 40°C 處理組差，故低溫可能造成苯酚層黏稠性上升不利於雙相之均質混和，造成萃取效率的下降。

4. 溶液內胰蛋白酶消化法之優化

(1) SDC 法與 urea 法溶液內胰蛋白酶消化法之探討

為了使蛋白質能夠被胰蛋白酶有效率的水解，將蛋白質結構展開為必要之處理，其中包含離散劑 (chaotropic reagent) 的使用。傳統上廣泛使用 urea 作為離散劑輔助進行蛋白質水解，雖然 urea 具有便宜易取得、可廣泛應用且蛋白質回溶效果好等優點，然而其易造成蛋白質 carbamylation 轉譯後修飾，造成許多蛋白質定量上之問題[252]，例如 carbamylation 反應位置與化學同位素標記法之 N' 端標記法相同，因此造成無法進行同位素標記；於 lysine 上產生 carbamylation 後將造成蛋白質無法被胰蛋白酶水解；造成層析時間改變及質譜圖質量變化，造成分析複雜化；造成目標波峰離子化及訊號強度下降[252]。脫氧膽鹽鈉 (sodium deoxycholate, SDC) 於自然界存在於哺乳動物之膽鹽中，因為 SDC 為低價且具有質譜儀相容性之溶液內消化之離散劑。且於 1% 之濃度下能夠增強近五倍之胰蛋白酶活性，且具有酸沉澱之特性使其之移除相當簡單，故近年逐漸受蛋白質體研

究者關注[253]。

Leon 等人於 2013 年之研究[253]比較九種不同之胰蛋白酶溶液內消化法，本研究參考其方法修改並調整後整合為樣品前處理方法，嘗試使用文獻中 SDC 之相轉移法(phase transfer, PT 法)，其操作方便性不若酸沉澱法，於相轉移時操作不易（水層在下方）容易產生溶劑殘留，造成後續除鹽時親水性高之胜肽流失。蛋白質消化之效率與最佳條件與目標蛋白質性質相關，因此適用所有蛋白質之消化方法並不存在，於 MRM 模式的消化方法建立上較重要的並非全蛋白的完整消化，而是代表胜肽的消化穩定性與高消化效率，尤其消化的穩定性較重要。消化穩定代表能夠藉由計算準確的校正消化效率，而高消化效率代表目標物之訊號提高，致質譜靈敏度提高[254]。

本研究比較了 urea 法與 SDC 法各於最佳條件下之消化效率比較(表四)，結果 SDC 法因消化效率較高、具有高穩定性、方法操作性高勝過 urea 法。另外本研究亦比較了 SDC 消化 7 小時與 16 小時之過敏原含量比較，因於文獻[255]上指出減少過夜之消化時間能有有效最小化胜肽的 deamidation 後修飾。結果亦是消化 7 小時之處理組具有較高之過敏原含量。

本方法之樣品前處理法將萃取、消化、標記及除鹽整理後成為一套連續之方法，而 SDC 消化法與穩定同位素標記法於終止步驟皆須加入甲酸酸化樣品，整合後將酸化步驟一併移至標記步驟後一起進行。本樣品前處理法雖已優化整合過，但仍有些地方能再改進，像是胜肽烷基化修飾終止步驟，添加完 DTT 後 SDC 會形成膠體，因此於下步驟需吸排將膠體打散混和。SDC 於中性條件(pH 7.1)下及濃度大於 5 mM 時形成膠體[256]。欲解決本法之 SDC 問題應能從調整 TEAB 濃度此方向著手。本研究內標準品加入之時間點為進行 7 小時消化步驟之前，此時間點為能夠添加胜肽內標準品之最早之時間點，可校正從消化開始至質譜儀分析之間之誤差。此校正並不包含消化效率之校正，受限於內標準品為胜肽，本研究對消化效率無法進行深入之探討，若未來欲探討消化效率，純化或重組之蛋白質

標準品為評估消化效率之必要材料。

5. 穩定同位素二甲基標記法效率確認

(1) 二甲基標記法標記效率與應用之討論

為了進行絕對定量，取得同位素標記之內標準品為必要之條件，本研究選擇利用二甲基標記法搭配合成胜肽來製備內標品胜肽，此法為 absolute quantification peptide, AQUA 胜肽法與二甲基標記法之合併方法，AQUA 胜肽法通常直接合成帶有同位素標記之胜肽片段，而二甲基標記法則較多用於比較多種不同處理之相對定量，本研究使用二甲基標記法對無標記之合成胜肽進行穩定同位素標記，使用於絕對定量。在將二甲基標記法整合至樣品前處理法，除了濃度、體積等基本注意事項外，需避免標記反應干擾物（含一級胺的物質）存在，如常用之 Tris 緩衝系統與碳酸氫銨 (ammonium bicarbonate) 緩衝系統，故本研究於蛋白質萃取後使用不會影響二甲基標記反應之三乙基碳酸氫銨 (triethylammonium bicarbonate, TEAB) 緩衝系統。

二甲基標記法具有許多優點，然而其中一個被詬病之缺點為其同位素標記質量差距小。於本研究亦觀察到此現象，本研究之代表胜肽於圖五、圖六、圖七中氫標記胜肽與氘標記胜肽之帶電荷數分別為+1、+2、+3 質量差距分別為 8、4、2.67 Da，然而本研究選擇之代表胜肽皆帶有離胺酸 (K) 故擁有兩個標記位，造成質量差亦為一個標記位的兩倍。若是僅擁有一個標記位之胜肽，且同時帶三價電荷，其氫與氘標記胜肽之間之荷質比差距則會縮小至 1.33 Da，於低解析度之質譜儀可能會造成定量上之困難，尤其於判斷低質量變化之後轉譯修飾時，如 deamidation (+1)。故若使用低解析度之質譜儀時建議使用高質量差距之二甲基標記法組合或使用其他高分子量差異之標記法，高質量差異之二甲基標記法組合，如使用 $C^{13}D_2$ 甲醛與 $NaBD_3CN$ 組成之+36 標記與無同位素之二甲基標記即可差異+8 Da。總結而言，雖然在某些特定情況下，二甲基標記會造成訊號無法分離之情形，但於多數情況下，二甲基標記法仍是一個高效率、便宜、穩定之胜肽同



位素標記法，且非常適合用於基於高解析度 MRM 模式之定量方法中。

本研究加入內標準品之時間點為消化步驟時，代表著內標準品胜肽會再次經過標記步驟，然而因二甲基標記法之效率極高，故於內標準品胜肽上並不會留下二甲基標記法可標記位，因此可假設內標準品胜肽不會標上第二個標記，然而此過程是否會產生其他副反應則難以判定，理論上二甲基標記法無不良之副反應，但此部分仍須更深入之研究才能確認。

理論上同位素間化學性質類似，故於層析上應有相同之滯留時間。而於某些同位素化合物間可能產生滯留時間之差異，而二甲基標記之同位素滯留時間差異微小至可忽略[147]。若同位素滯留時間差異產生，便會對於質譜分析上產生許多變異，因不同時間點之基質組成不同，造成游離化效率不同，而使得結果難以相互比較。本研究使用之二甲基標記法並無同位素滯留時間差異之產生（圖四）。

本研究於圖五、圖六、圖七利用原始胜肽之訊號來判定標記效率，而得到結論判斷三個代表胜肽皆擁有相當高之標記效率，但此判斷標記效率之方法必需基於標記法無副反應的情況下才能夠使用，而 Boersema 等人之研究[165]指出二甲基標記法相當穩定無明顯之副反應，故二甲基標記法符合此標記效率判斷方法之前置條件。

二、 分析方法建立

1. Q-ToF 複雜蛋白質定序結果

(1) 過敏原選擇依據討論

本研究使用 Q-ToF 對奇異果全蛋白進行複雜蛋白質定序，並依定序結果選擇出目標過敏原（表五）。許多文獻使用 *in silico* 方法利用蛋白質資料庫以及胰蛋白酶消化模擬器來進行目標過敏原以及目標胜肽之選擇，此法雖然快速且低價，但實際操作上因蛋白質特性難以預測，產生像是蛋白質萃取效率與胰蛋白酶水解效率不準確，造成實際於質譜上無目標胜肽之訊號。亦有文獻提及在決定代表胜肽時，雖已有模擬軟體，但仍藉由全域掃描的 LC/MS 來決定[224]。本研究為了

避免此現象之發生，利用與後續方法建立後相似之萃取與消化方法進行複雜蛋白質定序之樣品準備，便能避免 *in silico* 模擬時所產生之不確定性。



2. 代表胜肽選擇

(1) 代表胜肽選擇依據討論

於表六列出了選擇代表胜肽時篩選胜肽之條件，許多條件於各文獻皆有提到，如表六編號 2、3、4，而胜肽長度各文獻皆有提到，但每篇文獻建議之長度皆不同，此篇[239]建議胜肽長度落於 8–19 之間，此篇[57]建議胜肽長度落於 6–12 之間，長度若過長則可能會超出質量分析器之篩選範圍，造成無法定量，亦可能造成游離化效率低落。而實際上於代表胜肽選擇時，能夠符合所有篩選條件之胜肽並不多，於某些過敏原中甚至找不到符合條件之代表胜肽，文獻[257] 亦指出於食物過敏原的標記 (marker) 上具有迫切之需求，因為目前僅在少數過敏原中發現可靠的代表胜肽。

本研究選擇之代表胜肽 AD1、AD5、AD11 長度分別為 9、18、14，其訊號強弱差異大，於繪製校正曲線時(圖十四、圖十五、圖十六)，同重量濃度下訊號強度由高而低依序為 AD1H、AD5H、AD11H，與胜肽長度之趨勢不相等，訊號強度反而與帶電荷數有相同之趨勢，其帶電荷數分別為+1、+2、+3。本研究推測若胜肽長度可能影響之層面有兩個，第一、越長的胜肽則需帶有更多電荷以進入質譜儀，而因為其最大帶電荷數多，胜肽將可能帶有不同電荷，造成於質譜圖上分成多個訊號出現，與帶有單個電荷訊號沒有被分散之胜肽相比，帶多個電荷之胜肽訊號較低；第二、越長的胜肽其分子量亦較大，故於同濃度下莫耳數較少，故偵測到的分子亦較少，故產生之訊號較低。故選擇胜肽時，雖然長度可能受限於質譜儀之可分析範圍，但長度與訊號值之關係可能基於胜肽帶電荷數與分子量影響。

而另外文獻提到胜肽的疏水性與其游離化效率相關，因為胜肽的疏水性在游離去溶劑化時，決定了胜肽遷移到液滴 (droplet) 表面的速率。這解釋了界面活

性劑造成質譜訊號低落的成因，界面活性劑類化合物於游離化時佔滿水滴表面將胜肽推至水滴內部，造成胜肽無法被有效游離。亦解釋了高含量蛋白產生之疏水性胜肽如何抑制其他胜肽的游離化效率，其消除或降低其他胜肽於水滴表面質子化進入氣相之機會[258]。這代表在考慮代表胜肽時，也應考量到胜肽疏水性帶來的游離化效率差異。

在選擇過敏原之代表胜肽時，另外一項需要考量的點在於代表胜肽是否應包含亞型蛋白之序列。若選擇了包含所有亞型蛋白序列之胜肽，若亞型蛋白並不具有致敏性，則可能會產生高估致敏性蛋白之情形；反之，若選擇了僅包含單一蛋白之序列，則可能會低估致敏性亞型蛋白的含量。

本研究在選擇代表胜肽時，參考文獻[239]胜肽篩選方法建立篩選條件表六選擇出了 AD1、AD5、AD11，然而 AD5 與 AD11 含有可能會產生去胺反應之天門冬醯胺，可能於後續定量產生後修飾，造成過敏原含量低估，故於前處理方法亦減少消化時間以減少去胺反應之產生。

而在選擇代表胜肽時，亦必須確認於其他物種是否存在相同之序列，表八確認了四條候選胜肽是否具有同源性序列於獼猴桃屬外之物種。獼猴桃屬親源關係近，故蛋白質序列保守，故難以選出符合所有篩選條件同時具有物種專一性之胜肽。因此於定量時，會將所有含有代表胜肽之所有同源性蛋白皆計算，所幸因親源關係近，同源性蛋白之致敏性亦相似，故產生偽陽性之機率低。然而此現象僅限於獼猴桃屬內，若選到其他屬之同源性蛋白序列，因致敏性差異大，對於定量準確性影響較大，故應避免選擇到非獼猴桃屬外之同源性序列。

3. MS 參數設定

(1) MS 參數設定之試驗觀察現象探討

於表十中 AD5H 之理論荷質比與實際荷質比差距 0.41 Da，而於圖六上可看到除了此訊號外並無其他強度與荷質比符合 AD5H 之訊號，故判斷訊號 965.38 為 AD5H 之訊號。

使用多電荷之胜肽其中一個挑戰在於子離子圖譜之判讀。胜肽於碰撞後可能會於三個位置斷裂，產生 Roepstorff-Folmann-Biemann 命名法之 a、b、c 離子與其相對應之 x、y、z 離子如補充資料七。於質譜儀之胜肽碎片化最常發生於能量最低之鍵結-肽鍵上。若電荷殘留於 N 端之碎片，則產生 b 離子；反之殘留於 C 端碎片則產生 y 離子。通常二價之胰蛋白酶水解胜肽碎片化時會產生單價之 b 或 y 離子[259]。雖主要產生 b 或 y 離子，但仍會產生其他碎片(如 a、x、c、z 離子)，造成質譜圖上訊號數量非常多，而多電荷離子因為子離子亦可能帶有多價電荷，又進一步造成圖譜複雜度上升。

在選擇子離子時，通常選擇兩個子離子，一個做為定量依據，另一個作為定性依據確認胜肽專一性使用。定量子離子需具有高訊號，且訊號需穩定或與內標準品定量子離子比例上穩定。而定性子離子亦須具有高訊號值(較易偵測到)，同時本研究建議為了能提供更多證據來確認胜肽專一性，選擇定性子離子時，若定量子離子為 b 離子則定性子離子可選擇 y 離子，反之亦然，以便有最大的胜肽序列覆蓋率。

4. 標準曲線

(1) 標準曲線繪製及其單位探討

小分子化合物質譜定量時通常使用 ng/mL 或 ppb 等單位，然而於大分子化合物使用 ng/mL 或 ppb 等以重量計之單位，其實並不太適合。大分子化合物如胜肽，其序列長短差異大，依篩選條件來看，可接受之代表胜肽之分子量範圍 900–2000 Da，分子量差異大將造成同重量計之單位下分子數量少。本研究認為以分子計算之單位(如莫耳濃度)較適合分子量差異大之胜肽類。

(2) 方法確效及其法規探討

我國「食品化學檢驗方法之確效規範」中，其回收率與精密度依不同之濃度範圍有不同之規範，然而其濃度範圍使用 ppm 作為單位，但此單位存在著分子量不同之問題，同 ppm 單位下分子量越大分子數越少，而確效規範卻使用同標

準。對於質譜儀定量胜肽這種大分子待測物，游離化效率受分子數量影響，因游離化時分子間須彼此競爭爭取電荷，若以 ppm 訂定規範，則分子數量差距造成的游離化效率差異無法被評估，將造成無法準確進行方法確效。

AD11H 於確效試驗時 (表十五)，其於五個濃度僅偵測到三個濃度，而其變異係數、回收率皆不甚理想，皆超出我國之規範。造成此現象之原因可能為濃度，此確效試驗以奇異果中過敏原含量作為 100%，依此訂出五個濃度水平，而因預試驗中 Act d 11 測得之含量較低，故確效試驗所使用之濃度水平皆偏低，而因濃度較低故造成 AD11H 之訊號較低且不穩定。

三、 不同加工處理對奇異果過敏原之影響

1. 不同加工處理對奇異果過敏原之影響

本研究探討不同加工處理對奇異果過敏原之影響圖二十、圖二十一，於所有組別皆無偵測到 Act d 11 之存在，推測原因為奇異果內含量較低或 AD11H 反應量低之原故，造成訊號不佳無法定量。而 Act d 1 與 Act d 5 於各處理組中皆有成功定量出結果。於 Act d 1 含量最低之處理組為果醬，再來為熱風乾燥果乾，其他處理組間則無顯著差異，Act d 1 含量受加熱之影響，果醬加熱條件為高溫(100°C 以上)之短時間(~120 mins)，熱風乾燥果乾加熱條件為長時間(850 mins)中溫(60°C)，熱殺菌果汁、果泥加熱條件為低溫(60°C)短時間(30 mins)。因此推測高溫短時間加熱對於 Act d 1 破壞較大。於 Act d 5 含量則受熱影響較大，由熱加工製程做出之果汁、果泥、果乾過敏原含量皆顯著較低，而使用非熱加工技術如高靜水壓加工、冷凍乾燥技術製成之產品過敏原含量與新鮮水果無顯著差異。故高靜水壓加工、冷凍乾燥等技術雖能保持產品風味以及成分，但同時也保持了過敏原之含量。熱加工造成過敏原含量之降低可能因為熱加工會造成過敏原之萃取率降低、蛋白質水解效率降低。文獻指出食品加工流程對胜肽之影響難以預測，故發展食品過敏原質譜偵測法應評估加工流程對目標之影響[226]。

四、 結論與未來展望

本研究成功開發出兩種水果蛋白質萃取法 OPE 與 MPE，並將 MPE、蛋白水解法、標記法與樣品除鹽法整合優化為一套質譜樣品前處理法。蛋白質質譜定量分析中，最具挑戰之部分為樣品前處理方法，而本研究之前處理方法從蛋白質體學質譜分析法修正優化而來，但其試驗目的不同故要成為蛋白質質譜定量使用之前處理法仍有許多改進空間，像是苯酚法之清洗步驟，應在去除干擾物質與降低蛋白質損耗率間取捨；或於胰蛋白酶消化效率，仍缺乏簡單判斷各類型蛋白質消化效率之方法；於二甲基標記法，未來可發展兩種以上質量標記，使定量更準確之應用；於樣品除鹽法，目前仍非常勞力密集，若能改成線上管柱除鹽法，則不僅能加速分析過程，更能標準化減少樣品間之除鹽誤差。

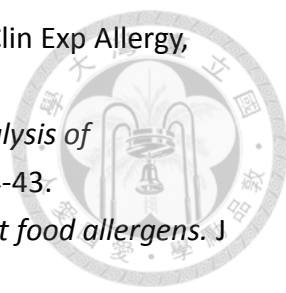
本研究成功建立奇異果過敏原絕對定量質譜分析法，其中困難點之一為代表胜肽之選擇，在多個篩選條件後時常無合適之胜肽，故使用具缺陷之胜肽為難以避免限制，而如何利用校正其缺陷帶來之定量誤差為重要之問題。本研究成功將此方法應用於八種奇異果食品中，雖能比較過敏原含量之高低，然而含量高低差異之原因仍需更深入研究與探討。


本研究可作為未來食品過敏原方法開發之範本，更換奇異果為其他致敏食物即能快速開發過敏原質譜絕對定量法，並能更深入探討與修正方法，提供更準確更穩定之方法，期望能應用於各國，協助食品安全之提升。

伍、參考文獻

1. Gendel, S.M., *The Regulatory Challenge of Food Allergens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(24): p. 5634-5637.
2. Luccioli, S., *Food allergy guidelines and assessing allergic reaction risks: a regulatory perspective*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2012. **12**(3): p. 323-330.
3. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2): p. S116-S125.
4. de Lafaille, M.A.C. and J.J. Lafaille, *Natural and Adaptive Foxp3(+) Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-635.
5. Ruitter, B. and W.G. Shreffler, *The role of dendritic cells in food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012. **129**(4): p. 921-928.
6. Cianferoni, A. and J.M. Spergel, *Food allergy: review, classification and diagnosis*. Allergol Int, 2009. **58**(4): p. 457-66.
7. Lee, L.A. and A.W. Burks, *Food allergies: Prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies*, in *Annual Review of Nutrition*. 2006, Annual Reviews: Palo Alto. p. 539-565.
8. Burks, A.W., et al., *ICON: Food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012. **129**(4): p. 906-920.
9. Asero, R., et al., *Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(2): p. 427-432.
10. Cohen, B.L., et al., *Development of a questionnaire to measure quality of life in families with a child with food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **114**(5): p. 1159-1163.
11. Flokstra-de Blok, B.M.J., et al., *Health-related quality of life of food allergic patients measured with generic and disease-specific questionnaires*. Allergy, 2010. **65**(8): p. 1031-1038.
12. Hughes, D.A. and C. Mills, *Food allergy: a problem on the increase*. Biologist (London), 2001. **48**(5): p. 201-4.
13. Fiocchi, A., *Food Allergy*. 2017.
14. Costa, J., et al., *Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(6): p. 1337-1349.
15. Fedorov, A.A., et al., *The molecular basis for allergen cross-reactivity: Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin*. Structure, 1997.

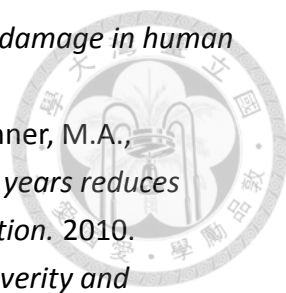
- 5(1): p. 33-45.
16. Blumstein, G.I. and L. Tuft, *Studies in food allergy*. Journal of Allergy, 1942.
 17. Wood, R.A., et al., *A phase 1 study of heat/phenol-killed, E.coli-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy*. Allergy, 2013. **68**(6): p. 803-808.
 18. Matricardi, P.M., et al., *EAACI Molecular Allergology User's Guide*. Pediatr Allergy Immunol, 2016. **27 Suppl 23**: p. 1-250.
 19. Shewry, P.R., et al., *The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002. **357**(1418): p. 133-42.
 20. Tatham, A.S. and P.R. Shewry, *Allergens to wheat and related cereals*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(11): p. 1712-26.
 21. Oda, Y., et al., *Tertiary and quaternary structures of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 angstrom resolution*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13503-13511.
 22. Salcedo, G., S. Quirce, and A. Diaz-Perales, *Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2011. **21**(2): p. 81-92.
 23. Moreno, F.J. and A. Clemente, *2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?* Open Biochem J, 2008. **2**: p. 16-28.
 24. Egger, M., et al., *The Role of Lipid Transfer Proteins in Allergic Diseases*. Current Allergy and Asthma Reports, 2010. **10**(5): p. 326-335.
 25. Lewit-Bentley, A. and S. Rety, *EF-hand calcium-binding proteins*. Current Opinion in Structural Biology, 2000. **10**(6): p. 637-643.
 26. Magler, I., et al., *Molecular metamorphosis in polcalcin allergens by EF-hand rearrangements and domain swapping*. Febs Journal, 2010. **277**(12): p. 2598-2610.
 27. Kuehn, A., et al., *Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**: p. 8.
 28. Radauer, C., et al., *Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis*. Clinical and Experimental Allergy, 2006. **36**(7): p. 920-929.
 29. Hauser, M., et al., *Panallergens and their impact on the allergic patient*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2010. **6**(1): p. 1.
 30. Reese, G., R. Ayuso, and S.B. Lehrer, *Tropomyosin: An Invertebrate Pan-Allergen*. International Archives of Allergy and Immunology, 1999. **119**(4): p. 247-258.

- 
31. Lopata, A.L., R.E. O'Hehir, and S.B. Lehrer, *Shellfish allergy*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(6): p. 850-8.
32. Willison, L.N., S.K. Sathe, and K.H. Roux, *Production and analysis of recombinant tree nut allergens*. Methods, 2014. **66**(1): p. 34-43.
33. Radauer, C. and H. Breiteneder, *Evolutionary biology of plant food allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(3): p. 518-25.
34. Radauer, C., P. Lackner, and H. Breiteneder, *The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 286.
35. Chiu, H.J., et al., *Structure of the first representative of Pfam family PF09410 (DUF2006) reveals a structural signature of the calycin superfamily that suggests a role in lipid metabolism*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010. **66**(Pt 10): p. 1153-9.
36. Hilger, C., A. Kuehn, and F. Hentges, *Animal lipocalin allergens*. Curr Allergy Asthma Rep, 2012. **12**(5): p. 438-47.
37. Virtanen, T., T. Kinnunen, and M. Rytönen-Nissinen, *Mammalian lipocalin allergens--insights into their enigmatic allergenicity*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(4): p. 494-504.
38. Castillo, R.M., et al., *A six-stranded double-psi β barrel is shared by several protein superfamilies*. Structure, 1999. **7**(2): p. 227-236.
39. Sampedro, J. and D.J. Cosgrove, *The expansin superfamily*. Genome Biol, 2005. **6**(12): p. 242.
40. Cosgrove, D.J., P. Bedinger, and D.M. Durachko, *Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(12): p. 6559-6564.
41. FAO, *Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies.*, FAO, Editor. 1995, FAO: Rome.
42. Harrop, J., et al., *Eczema, atopy and allergen exposure in adults: a population-based study*. Clinical and Experimental Allergy, 2007. **37**(4): p. 526-535.
43. Rance, F., X. Grandmottet, and H. Grandjean, *Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France*. Clinical and Experimental Allergy, 2005. **35**(2): p. 167-172.
44. Sampson, H.A., *9. Food allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **111**(2): p. S540-S547.
45. Ventura, M.T., et al., *Incidence of allergic diseases in an elderly population*. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2010. **32**(1): p. 165-170.
46. Wu, T.C., et al., *Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey*. Intern Med J, 2012. **42**(12): p. 1310-5.

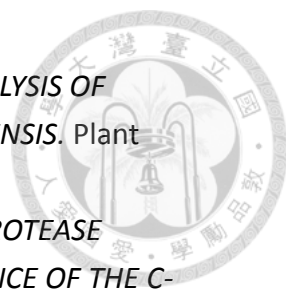
- 
47. Crevel, R.W.R., et al., *Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders*. *Allergy*, 2008. **63**(5): p. 597-609.
48. Zurzolo, G.A., et al., *Hidden Allergens in Foods and Implications for Labelling and Clinical Care of Food Allergic Patients*. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2012. **12**(4): p. 292-296.
49. Madsen, C.B., et al., *Can we define a tolerable level of risk in food allergy? Report from a EuroPrevall/UK Food Standards Agency workshop*. *Clinical and Experimental Allergy*, 2012. **42**(1): p. 30-37.
50. Pieretti, M.M., et al., *Audit of manufactured products: Use of allergen advisory labels and identification of labeling ambiguities*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009. **124**(2): p. 337-341.
51. Hefle, S.L., et al., *Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. **120**(1): p. 171-176.
52. Ford, L.S., et al., *Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010. **126**(2): p. 384-385.
53. Greenhawt, M. and C. Weiss, *Importance of establishing threshold levels for food allergens*. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 2013. **111**(3): p. 151-154.
54. Noimark, L., J. Gardner, and J.O. Warner, *Parents' attitudes when purchasing products for children with nut allergy: A UK perspective*. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2009. **20**(5): p. 500-504.
55. Crotty, M.P. and S.L. Taylor, *Risks associated with foods having advisory milk labeling*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010. **125**(4): p. 935-937.
56. Poms, R.E., C.L. Klein, and E. Anklam, *Methods for allergen analysis in food: a review*. *Food Additives and Contaminants*, 2004. **21**(1): p. 1-31.
57. Koeberl, M., D. Clarke, and A.L. Lopata, *Next Generation of Food Allergen Quantification Using Mass Spectrometric Systems*. *Journal of Proteome Research*, 2014. **13**(8): p. 3499-3509.
58. Schubert-Ullrich, P., et al., *Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. **395**(1): p. 69-81.
59. Huschek, G., et al., *Quantification of allergenic plant traces in baked products by targeted proteomics using isotope marked peptides*. *Lwt-Food Science and Technology*, 2016. **74**: p. 286-293.
60. Cucu, T., et al., *ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins*. *Food Additives and*

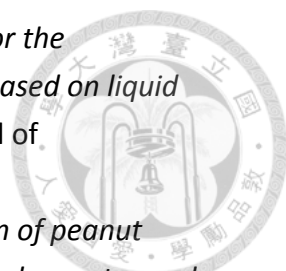
Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2011. **28**(1): p. 1-10.

61. Heick, J., et al., *Application of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Detection of Seven Allergenic Foods in Flour and Bread and Comparison of the Method with Commercially Available ELISA Test Kits*. Journal of Aoac International, 2011. **94**(4): p. 1060-1068.
62. Johnson, P.E., et al., *A multi-laboratory evaluation of a clinically-validated incurred quality control material for analysis of allergens in food*. Food Chemistry, 2014. **148**: p. 30-36.
63. Ferguson, A.R., *1904—the year that kiwifruit(Actinidia deliciosa)came to New Zealand*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2010. **32**(1): p. 3-27.
64. Nishiyama, I., et al., *Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(17): p. 5472-5.
65. Le, T.M. and A.C. Knulst, *Kiwifruit allergy across Europe*. Revue Francaise D Allergologie, 2015. **55**(7): p. 470-473.
66. Singletary, K., *Kiwifruit*. Nutrition Today, 2012. **47**(3): p. 133-147.
67. Stonehouse, W., et al., *Kiwifruit: our daily prescription for health*. Can J Physiol Pharmacol, 2013. **91**(6): p. 442-7.
68. Beck, K., et al., *Gold kiwifruit consumed with an iron-fortified breakfast cereal meal improves iron status in women with low iron stores: a 16-week randomised controlled trial*. Br J Nutr, 2011. **105**(1): p. 101-9.
69. Duttaroy, A.K. and A. Jorgensen, *Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers*. Platelets, 2004. **15**(5): p. 287-92.
70. Chang, W.H. and J.F. Liu, *Effects of kiwifruit consumption on serum lipid profiles and antioxidative status in hyperlipidemic subjects*. Int J Food Sci Nutr, 2009. **60**(8): p. 709-16.
71. Gammon, C.S., et al., *Kiwifruit consumption favourably affects plasma lipids in a randomised controlled trial in hypercholesterolaemic men*. Br J Nutr, 2013. **109**(12): p. 2208-18.
72. Brevik, A., et al., *Supplementation of a western diet with golden kiwifruits (Actinidia chinensis var.'Hort 16A:') effects on biomarkers of oxidation damage and antioxidant protection*. Nutr J, 2011. **10**: p. 54.
73. Karlsen, A., et al., *Kiwifruit decreases blood pressure and whole-blood platelet aggregation in male smokers*. J Hum Hypertens, 2013. **27**(2): p. 126-30.

- 
74. Collins, B.H., et al., *Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro*. *Nutr Cancer*, 2001. **39**(1): p. 148-53.
75. Adaim, A., Kruger, R., Stonehouse, W., Wohlers, M., and Skinner, M.A., *Consumption of ZESPRI GOLD kiwifruit by children aged 2–5 years reduces symptoms and the incidence of upper respiratory tract infection*. 2010.
76. Hunter, D.C., et al., *Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults*. *Br J Nutr*, 2012. **108**(7): p. 1235-45.
77. Popovic, M., M. Grozdanovic, and M. Gavrovic-Jankulovic, *Kiwifruit as a food allergen source*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2013. **78**(3): p. 333-352.
78. Han, J., et al., *Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness*. *Meat Science*, 2009. **82**(3): p. 324-330.
79. Ha, M., et al., *Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins*. *Food Chemistry*, 2012. **134**(1): p. 95-105.
80. Katsaros, G.I., G. Tavantzis, and P.S. Taoukis, *Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010. **11**(1): p. 47-51.
81. Zhang, B., et al., *Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides*. *Lwt-Food Science and Technology*, 2017. **78**: p. 1-7.
82. Mugita, N., et al., *Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 2017. **82**: p. 233-240.
83. Fine, A.J., *HYPERSENSITIVITY REACTION TO KIWI FRUIT (CHINESE GOOSEBERRY, ACTINIDIA-CHINENSIS)*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1981. **68**(3): p. 235-237.
84. Lucas, J.S.A., et al., *Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults*. *Clinical and Experimental Allergy*, 2004. **34**(7): p. 1115-1121.
85. Aleman, A., et al., *Allergy to kiwi: A double-blind, placebo-controlled food challenge study in patients from a birch-free area*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. **113**(3): p. 543-550.
86. Gavrovic-Jankulovic, M., et al., *Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*,

2002. **110**(5): p. 805-810.
87. Mattila, L., et al., *Food hypersensitivity among Finnish university students: association with atopic diseases*. *Clinical and Experimental Allergy*, 2003. **33**(5): p. 600-606.
88. Burney, P.G.J., et al., *The prevalence and distribution of food sensitization in European adults*. *Allergy*, 2014. **69**(3): p. 365-371.
89. Le, T.M., et al., *Kiwifruit allergy across Europe: Clinical manifestation and IgE recognition patterns to kiwifruit allergens*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013. **131**(1): p. 164-171.
90. Le, T.M., et al., *Differences in the allergenicity of 6 different kiwifruit cultivars analyzed by prick-to-prick testing, open food challenges, and ELISA*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011. **127**(3): p. 677-679.
91. Baker, E.N., *STRUCTURE OF ACTINIDIN, AFTER REFINEMENT AT 1.7-Å RESOLUTION*. *Journal of Molecular Biology*, 1980. **141**(4): p. 441-484.
92. Pastorello, E.A., et al., *Identification of the allergenic components of kiwi fruit and evaluation of their cross-reactivity with timothy and birch pollens*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1996. **98**(3): p. 601-610.
93. Podivinsky, E., R.L.S. Forster, and R.C. Gardner, *NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF ACTINIDIN, A KIWI FRUIT PROTEASE*. *Nucleic Acids Research*, 1989. **17**(20): p. 8363-8363.
94. Nieuwenhuizen, N.J., et al., *Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit*. *Functional Plant Biology*, 2007. **34**(10): p. 946-961.
95. Arcus, A.C., *PROTEOLYTIC ENZYME OF ACTINIDIA-CHINENSIS*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1959. **33**(1): p. 242-244.
96. McDowall, M.A., *ANIONIC PROTEINASE FROM ACTINIDIA-CHINENSIS - PREPARATION AND PROPERTIES OF CRYSTALLINE ENZYME*. *European Journal of Biochemistry*, 1970. **14**(2): p. 214-&.
97. Bublin, M., et al., *IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. **114**(5): p. 1169-1175.
98. Pastorello, E.A., et al., *Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1998. **101**(4): p. 531-537.
99. Bublin, M., et al., *The performance of a component-based allergen microarray for the diagnosis of kiwifruit allergy*. *Clinical and Experimental Allergy*, 2011. **41**(1): p. 129-136.
100. Bublin, M., et al., *Component-resolved diagnosis of kiwifruit allergy with purified natural and recombinant kiwifruit allergens*. *Journal of Allergy and*

- 
- Clinical Immunology, 2010. **125**(3): p. 687-694.
101. Praekelt, U.M., R.A. McKee, and H. Smith, *MOLECULAR ANALYSIS OF ACTINIDIN, THE CYSTEINE PROTEINASE OF ACTINIDIA-CHINENSIS*. Plant Molecular Biology, 1988. **10**(3): p. 193-202.
 102. Paul, W., et al., *CORRECT PROCESSING OF THE KIWIFRUIT PROTEASE ACTINIDIN IN TRANSGENIC TOBACCO REQUIRES THE PRESENCE OF THE C-TERMINAL PROPEPTIDE*. Plant Physiology, 1995. **108**(1): p. 261-268.
 103. Malone, L.A., et al., *Effects of kiwifruit (Actinidia deliciosa) cysteine protease on growth and survival of Spodoptera litura larvae (Lepidoptera : Noctuidae) fed with control or transgenic avidin-expressing tobacco*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2005. **33**(2): p. 99-105.
 104. Bonds, R.S., T. Midoro-Horiuti, and R. Goldblum, *A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2008. **8**(1): p. 82-86.
 105. Kaur, L., et al., *Actinidin Enhances Protein Digestion in the Small Intestine As Assessed Using an in Vitro Digestion Model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 5074-5080.
 106. Rutherford, S.M., et al., *Effect of actinidin from kiwifruit (Actinidia deliciosa cv. Hayward) on the digestion of food proteins determined in the growing rat*. Food Chemistry, 2011. **129**(4): p. 1681-1689.
 107. Tamburrini, M., et al., *Kiwellin, a novel protein from kiwi fruit. Purification, biochemical characterization and identification as an allergen*. Protein Journal, 2005. **24**(7-8): p. 423-429.
 108. Tuppo, L., et al., *Kiwellin, a modular protein from green and gold kiwi fruits: Evidence of in vivo and in vitro processing and IgE binding*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(10): p. 3812-3817.
 109. Ciardiello, M.A., et al., *Kissper, a kiwi fruit peptide with channel-like activity: Structural and functional features*. Journal of Peptide Science, 2008. **14**(6): p. 742-754.
 110. Bernardi, M.L., et al., *Physico-chemical features of the environment affect the protein conformation and the immunoglobulin E reactivity of kiwellin (Act d 5)*. Clinical and Experimental Allergy, 2010. **40**(12): p. 1819-1826.
 111. D'Avino, R., et al., *Kiwifruit Act d 11 is the first member of the ripening-related protein family identified as an allergen*. Allergy, 2011. **66**(7): p. 870-877.
 112. Radauer, C. and H. Breiteneder, *Evolutionary biology of plant food allergens*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007. **120**(3): p. 518-525.
 113. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Molecular Systems Biology, 2008. **4**: p. 14.

- 
114. Monaci, L. and A.J. van Hengel, *Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 2008. **1192**(1): p. 113-120.
115. Shefcheck, K.J., J.H. Callahan, and S.M. Musser, *Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(21): p. 7953-7959.
116. Careri, M., et al., *Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h 2 and Ara III 3/4 for food control by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(6): p. 1901-1907.
117. Rahman, A.M.A., et al., *Characterization and de novo sequencing of snow crab tropomyosin enzymatic peptides by both electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization QqToF tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(4): p. 372-381.
118. Rahman, A.M.A., et al., *Absolute quantification method and validation of airborne snow crab allergen tropomyosin using tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2010. **681**(1-2): p. 49-55.
119. Sealey-Voyksner, J.A., et al., *Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(25): p. 4167-4183.
120. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(4): p. 1017-1031.
121. Ong, S.E. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**(5): p. 252-262.
122. Oda, Y., et al., *Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(9): p. 2159-2165.
123. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-386.
124. Yao, X.D., et al., *Proteolytic O-18 labeling for comparative proteomics: Model studies with two serotypes of adenovirus*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(13): p. 2836-2842.
125. Reynolds, K.J., X.D. Yao, and C. Fenselau, *Proteolytic O-18 labeling for comparative proteomics: Evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent*. Journal of Proteome Research, 2002. **1**(1): p. 27-33.
126. Johnson, K.L. and D.C. Muddiman, *A method for calculating O-16/O-18*

- peptide ion ratios for the relative quantification of proteomes.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(4): p. 437-445.
127. Ramos-Fernandez, A., D. Lopez-Ferrer, and J. Vazquez, *Improved method for differential expression proteomics using trypsin-catalyzed O-18 labeling with a correction for labeling efficiency.* Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(7): p. 1274-1286.
128. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.* Nature Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 994-999.
129. Hansen, K.C., et al., *Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable C-13-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography.* Molecular & Cellular Proteomics, 2003. **2**(5): p. 299-314.
130. Li, J.X., H. Steen, and S.P. Gygi, *Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents - The yeast salinity stress response.* Molecular & Cellular Proteomics, 2003. **2**(11): p. 1198-1204.
131. Yi, E.C., et al., *Increased quantitative proteome coverage with C-13/C-12-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme.* Proteomics, 2005. **5**(2): p. 380-387.
132. Shen, M., et al., *Isolation and isotope labeling of cysteine- and methionine-containing tryptic peptides - Application to the study of cell surface proteolysis.* Molecular & Cellular Proteomics, 2003. **2**(5): p. 315-324.
133. Pasquarello, C., et al., *N-t-butylodoacetamide and iodoacetanilide: two new cysteine alkylating reagents for relative quantitation of proteins.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(1): p. 117-127.
134. Shi, Y., et al., *A simple solid phase mass tagging approach for quantitative proteomics.* Journal of Proteome Research, 2004. **3**(1): p. 104-111.
135. Shi, Y., et al., *Quantitative analysis of membrane proteins from breast cancer cell lines BT474 and MCF7 using multistep solid phase mass tagging and 2D LC/MS.* Journal of Proteome Research, 2005. **4**(4): p. 1427-1433.
136. Qiu, Y.C., et al., *Acid-labile isotope-coded extractants: A class of reagents for quantitative mass spectrometric analysis of complex protein mixtures.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(19): p. 4969-4979.
137. Sebastiano, R., et al., *A new deuterated alkylating agent for quantitative proteomics.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(21): p. 2380-2386.
138. Schmidt, A., J. Kellermann, and F. Lottspeich, *A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels.* Proteomics, 2005. **5**(1): p. 4-15.
139. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae*

- using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004. **3**(12): p. 1154-1169.
140. Thompson, A., et al., *Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(8): p. 1895-1904.
141. Glocker, M.O., et al., *MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SURFACE-TOPOLOGY IN PROTEIN TERTIARY STRUCTURES BY AMINO-ACYLATION AND MASS-SPECTROMETRIC PEPTIDE-MAPPING*. *Bioconjugate Chemistry*, 1994. **5**(6): p. 583-590.
142. Ji, J.Y., et al., *Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides*. *Journal of Chromatography B*, 2000. **745**(1): p. 197-210.
143. Che, F.Y. and L.D. Fricker, *Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(13): p. 3190-3198.
144. Zhang, X.L., et al., *N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002. **16**(24): p. 2325-2332.
145. Mason, D.E. and D.C. Liebler, *Quantitative analysis of modified proteins by LC-MS/MS of peptides labeled with phenyl isocyanate*. *Journal of Proteome Research*, 2003. **2**(3): p. 265-272.
146. Lee, Y.H., et al., *Isotope-coded N-terminal sulfonation of peptides allows quantitative proteomic analysis with increased de novo peptide sequencing capability*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004. **18**(24): p. 3019-3027.
147. Hsu, J.L., et al., *Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(24): p. 6843-6852.
148. Ji, C.J., N. Guo, and L. Li, *Differential dimethyl labeling of N-termini of peptides after guanidination for proteome analysis*. *Journal of Proteome Research*, 2005. **4**(6): p. 2099-2108.
149. Hsu, J.L., S.Y. Huang, and S.H. Chen, *Dimethyl multiplexed labeling combined with microcolumn separation and MS analysis for time course study in proteomics*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(18): p. 3652-3660.
150. Goodlett, D.R., et al., *Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001. **15**(14): p. 1214-1221.
151. Syka, J.E.P., et al., *Novel linear quadrupole ion trap/FT mass spectrometer:*

- Performance characterization and use in the comparative analysis of histone H3 post-translational modifications.* Journal of Proteome Research, 2004. **3**(3): p. 621-626.
152. Goshe, M.B., et al., *Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses.* Analytical Chemistry, 2001. **73**(11): p. 2578-2586.
153. Goshe, M.B., et al., *Phosphoprotein isotope-coded affinity tags: Application to the enrichment and identification of low-abundance phosphoproteins.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(3): p. 607-616.
154. Qian, W.J., et al., *Phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag approach for enrichment and quantitative analysis of phosphopeptides from complex mixtures.* Analytical Chemistry, 2003. **75**(20): p. 5441-5450.
155. Tao, W.A., et al., *Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry.* Nature Methods, 2005. **2**(8): p. 591-598.
156. Zhang, H., et al., *Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry.* Nature Biotechnology, 2003. **21**(6): p. 660-666.
157. Gerber, S.A., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(12): p. 6940-6945.
158. Ono, M., et al., *Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry.* Molecular & Cellular Proteomics, 2006. **5**(7): p. 1338-1347.
159. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.* Nature Biotechnology, 2001. **19**(3): p. 242-247.
160. Liu, H.B., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics.* Analytical Chemistry, 2004. **76**(14): p. 4193-4201.
161. Gilchrist, A., et al., *Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway.* Cell, 2006. **127**(6): p. 1265-1281.
162. Old, W.M., et al., *Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics.* Molecular & Cellular Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1487-1502.
163. Wu, Y., et al., *Five-plex isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics.* Chemical Communications, 2014. **50**(14): p. 1708-1710.
164. Zhou, Y., et al., *Mass Defect-Based Pseudo-Isobaric Dimethyl Labeling for*

- Proteome Quantification*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(22): p. 10658-10663.
165. Boersema, P.J., et al., *Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Nature Protocols, 2009. **4**(4): p. 484-494.
166. Raijmakers, R., et al., *Automated online sequential isotope labeling for protein quantitation applied to proteasome tissue-specific diversity*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(9): p. 1755-1762.
167. Cheng, H.L., et al., *Urinary CD14 as a potential biomarker for benign prostatic hyperplasia - discovery by combining MALDI-TOF-based biostatistics and ESI-MS/MS-based stable-isotope labeling*. Proteomics Clinical Applications, 2011. **5**(3-4): p. 121-132.
168. Sun, Z., et al., *Capture and Dimethyl Labeling of Glycopeptides on Hydrazide Beads for Quantitative Glycoproteomics Analysis*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(20): p. 8452-8456.
169. Chen, R.B., et al., *Quantitative Neuropeptidomics Study of the Effects of Temperature Change in the Crab Cancer borealis*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(12): p. 5767-5776.
170. D'Aguanno, S., et al., *p63 Isoforms Regulate Metabolism of Cancer Stem Cells*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(4): p. 2120-2136.
171. Chiou, S.H., C.H. Huang, and S.S. Liang, *From Chemistry to Translational Medicine: The Application of Proteomics to Cancer Biomarker Discovery and Diagnosis*. Journal of the Chinese Chemical Society, 2015. **62**(3): p. 217-226.
172. Li, C.H., et al., *Quantitative urinary proteomics using stable isotope labelling by peptide dimethylation in patients with prostate cancer*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(12): p. 3393-3404.
173. Swa, H.L.F., et al., *Mass spectrometry based quantitative proteomics and integrative network analysis accentuates modulating roles of annexin-1 in mammary tumorigenesis*. Proteomics, 2015. **15**(2-3): p. 408-418.
174. Sun, B., et al., *Quantitative Proteomic Profiling the Molecular Signatures of Annexin A5 in Lung Squamous Carcinoma Cells*. Plos One, 2016. **11**(9): p. 17.
175. Valdes, A., et al., *Comprehensive Proteomic Study of the Antiproliferative Activity of a Polyphenol-Enriched Rosemary Extract on Colon Cancer Cells Using Nanoliquid Chromatography-Orbitrap MS/MS*. Journal of Proteome Research, 2016. **15**(6): p. 1971-1985.
176. Valdes, A., et al., *Nano-liquid Chromatography-orbitrap MS-based Quantitative Proteomics Reveals Differences Between the Mechanisms of Action of Carnosic Acid and Carnosol in Co on Cancer Cells*. Molecular & Cellular Proteomics, 2017. **16**(1): p. 8-22.
177. Valdes, A., et al., *Shotgun proteomic analysis to study the decrease of*

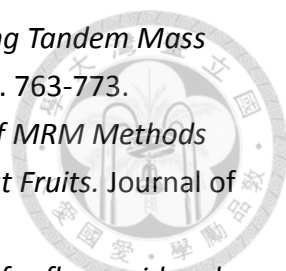
- xenograft tumor growth after rosemary extract treatment*. Journal of Chromatography A, 2017. **1499**: p. 90-100.
178. Zoumaro-Djayoon, A.D., et al., *Investigating the role of FGF-2 in stem cell maintenance by global phosphoproteomics profiling*. Proteomics, 2011. **11**(20): p. 3962-3971.
179. Klimmeck, D., et al., *Proteomic Cornerstones of Hematopoietic Stem Cell Differentiation: Distinct Signatures of Multipotent Progenitors and Myeloid Committed Cells*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(8): p. 286-302.
180. She, Y.M., et al., *Quantification of protein isoforms in mesenchymal stem cells by reductive dimethylation of lysines in intact proteins*. Proteomics, 2012. **12**(3): p. 369-379.
181. Halcsik, E., et al., *New insights in osteogenic differentiation revealed by mass spectrometric assessment of phosphorylated substrates in murine skin mesenchymal cells*. BMC Cell Biology, 2013. **14**: p. 19.
182. Melo-Braga, M.N., et al., *Comprehensive Quantitative Comparison of the Membrane Proteome, Phosphoproteome, and Sialome of Human Embryonic and Neural Stem Cells*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(1): p. 311-328.
183. Shan, B., et al., *Quantitative Proteomic Analysis Identifies Targets and Pathways of a 2-Aminobenzamide HDAC Inhibitor in Friedreich's Ataxia Patient iPSC-Derived Neural Stem Cells*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(11): p. 4558-4566.
184. Boersema, P., et al., *Large Scale Multiplex Stable Isotope Dimethyl Labeling Applied to the Quantitative Analysis of Tyrosine Phosphorylation*. Molecular & Cellular Proteomics, 2009: p. S47-S47.
185. Boersema, P.J., et al., *In-depth Qualitative and Quantitative Profiling of Tyrosine Phosphorylation Using a Combination of Phosphopeptide Immunoaffinity Purification and Stable Isotope Dimethyl Labeling*. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. **9**(1): p. 84-99.
186. Engholm-Keller, K., et al., *TiSH - a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC*. Journal of Proteomics, 2012. **75**(18): p. 5749-5761.
187. Giansanti, P., et al., *Interrogating cAMP-dependent Kinase Signaling in Jurkat T Cells via a Protein Kinase A Targeted Immune-precipitation Phosphoproteomics Approach*. Molecular & Cellular Proteomics, 2013. **12**(11): p. 3350-3359.
188. Huang, H.G., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of porcine muscle within 24 h postmortem*. Journal of Proteomics, 2014. **106**: p. 125-139.

189. Kettenbach, A.N., et al., *SPECHT - Single-stage phosphopeptide enrichment and stable-isotope chemical tagging: Quantitative phosphoproteomics of insulin action in muscle*. Journal of Proteomics, 2015. **114**: p. 48-60.
190. Lin, Y.T., et al., *Super-SILAC mix coupled with SIM/AIMS assays for targeted verification of phosphopeptides discovered in a large-scale phosphoproteome analysis of hepatocellular carcinoma*. Journal of Proteomics, 2017. **157**: p. 40-51.
191. Renvoise, M., et al., *Quantitative variations of the mitochondrial proteome and phosphoproteome during fermentative and respiratory growth in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Proteomics, 2014. **106**: p. 140-150.
192. Song, C.X., et al., *Improvement of the Quantification Accuracy and Throughput for Phosphoproteome Analysis by a Pseudo Triplex Stable Isotope Dimethyl Labeling Approach*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(20): p. 7755-7762.
193. Spat, P., B. Macek, and K. Forchhammer, *Phosphoproteome of the cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803 and its dynamics during nitrogen starvation*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**: p. 15.
194. Wakabayashi, M., et al., *Phosphoproteome Analysis of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue Sections Mounted on Microscope Slides*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(2): p. 915-924.
195. Wang, F.J., et al., *Phosphoproteome analysis of an early onset mouse model (TgCRND8) of Alzheimer's disease reveals temporal changes in neuronal and glia signaling pathways*. Proteomics, 2013. **13**(8): p. 1292-1305.
196. Wilson-Grady, J.T., W. Haas, and S.P. Gygi, *Quantitative comparison of the fasted and re-fed mouse liver phosphoproteomes using lower pH reductive dimethylation*. Methods, 2013. **61**(3): p. 277-286.
197. Wu, C.J., et al., *Mapping N-Terminus Phosphorylation Sites and Quantitation by Stable Isotope Dimethyl Labeling*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(3): p. 460-471.
198. Zhang, Y.Y., Y.J. Zhang, and Y.H. Yu, *Global Phosphoproteomic Analysis of Insulin/Akt/mTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes*. Journal of Proteome Research, 2017. **16**(8): p. 2825-2835.
199. Huang, J.F., et al., *A peptide N-terminal protection strategy for comprehensive glycoproteome analysis using hydrazide chemistry based method*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 15.
200. Lin, C.Y., et al., *A comparative study of glycoprotein concentration, glycoform profile and glycosylation site occupancy using isotope labeling and electrospray linear ion trap mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2012.

- 728**: p. 49-56.
201. Sun, Z., et al., *Identification of Chemoresistance-Related Cell-Surface Glycoproteins in Leukemia Cells and Functional Validation of Candidate Glycoproteins*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(3): p. 1593-1601.
202. Weng, Y.J., et al., *An integrated sample pretreatment platform for quantitative N-glycoproteome analysis with combination of on-line glycopeptide enrichment, deglycosylation and dimethyl labeling*. Analytica Chimica Acta, 2014. **833**: p. 1-8.
203. Yu, L.Y., et al., *Comprehensive quantification of N-glycoproteome in Fusarium graminearum reveals intensive glycosylation changes against fungicide*. Journal of Proteomics, 2016. **142**: p. 82-90.
204. Musunuri, S., et al., *Quantification of the Brain Proteome in Alzheimer's Disease Using Multiplexed Mass Spectrometry*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(4): p. 2056-2068.
205. Musunuri, S., et al., *Micellar extraction possesses a new advantage for the analysis of Alzheimer's disease brain proteome*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(4): p. 1041-1057.
206. Garcia-Santamarina, S., et al., *The oxidized thiol proteome in fission yeast- Optimization of an ICAT-based method to identify H₂O₂-oxidized proteins*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(11): p. 2476-2486.
207. Yu, C.L., et al., *Rapid Identification and Quantitative Validation of a Caffeine-Degrading Pathway in Pseudomonas sp. CES*. Journal of Proteome Research, 2015. **14**(1): p. 95-106.
208. Yu, C.L., et al., *Rapid Proteomics to Prospect and Validate Novel Bacterial Metabolism Induced by Environmental Burden*, in *Proteomics in Biology, Pt B*, A.K. Shukla, Editor. 2017. p. 379-411.
209. Ji, C.J., et al., *Effect of 2MEGA labeling on membrane proteome analysis using LC-ESI QTOF MS*. Journal of Proteome Research, 2006. **5**(10): p. 2567-2576.
210. Hu, L.Z., et al., *Analysis of Salmonella PhoP/PhoQ regulation by dimethyl-SRM-based quantitative proteomics*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2016. **1864**(1): p. 20-28.
211. Zhang, S., et al., *Partially isobaric peptide termini labeling assisted proteome quantitation based on MS and MS/MS signals*. Journal of Proteomics, 2015. **114**: p. 152-160.
212. Sui, P., et al., *Dimethyl-Labeling-Based Protein Quantification and Pathway Search: A Novel Method of Spinal Cord Analysis Applicable for Neurological Studies*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(5): p. 2245-2252.
213. Sui, P., et al., *Proteomics of Neuropathic Pain: Proteins and Signaling*

- Pathways Affected in a Rat Model*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(9): p. 3957-3965.
214. Lin, Y.R., et al., *A Proteomics Analysis to Evaluate Cytotoxicity in NRK-52E Cells Caused by Unmodified Nano-Fe₃O₄*. Scientific World Journal, 2014: p. 9.
215. Huang, H.J., et al., *Quantitative shot-gun proteomics and MS-based activity assay for revealing gender differences in enzyme contents for rat liver microsomes*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(12): p. 2734-2744.
216. Wan, J., et al., *Peptidome analysis of human skim milk in term and preterm milk*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **438**(1): p. 236-241.
217. Guo, K., C.J. Ji, and L. Li, *Stable-isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(22): p. 8631-8638.
218. Elf, K., et al., *Alterations in muscle proteome of patients diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis*. Journal of Proteomics, 2014. **108**: p. 55-64.
219. Chang, P.C., P.M. Reddy, and Y.P. Ho, *Quantification of genetically modified soya using strong anion exchange chromatography and time-of-flight mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(22): p. 5339-5346.
220. Li, L., et al., *Quantitative proteomic investigation employing stable isotope labeling by peptide dimethylation on proteins of strawberry fruit at different ripening stages*. Journal of Proteomics, 2013. **94**: p. 219-239.
221. Huang, S.Y., et al., *Global Disulfide Bond Profiling for Crude Snake Venom Using Dimethyl Labeling Coupled with Mass Spectrometry and RADAR Algorithm*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(17): p. 8742-8750.
222. Piovesana, S., et al., *Labeling and label free shotgun proteomics approaches to characterize muscle tissue from farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*)*. Journal of Chromatography A, 2016. **1428**: p. 193-201.
223. Kirsch, S., et al., *Quantitative methods for food allergens: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(1): p. 57-67.
224. Picariello, G., et al., *The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(42): p. 7386-7398.
225. Simon, R., et al., *Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*)*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(31): p. 5109-5115.
226. Sayers, R.L., et al., *The effect of thermal processing on the behaviour of*

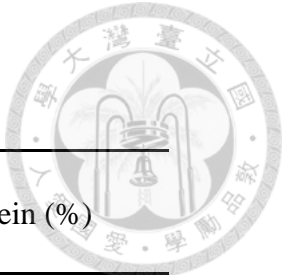
- peanut allergen peptide targets used in multiple reaction monitoring mass spectrometry experiments*. *Analyst*, 2016. **141**(13): p. 4130-4141.
227. Marzban, G., et al., *Mapping of fruit allergens by 2D electrophoresis and immunodetection*. *Expert Review of Proteomics*, 2008. **5**(1): p. 61-75.
228. Song, J., et al., *A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(15): p. 3144-3151.
229. Zheng, Q., et al., *Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(5): p. 1663-1673.
230. Sathe, S.K. and G.M. Sharma, *Effects of food processing on food allergens*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009. **53**(8): p. 970-978.
231. Poms, R.E., C. Capelletti, and E. Anklam, *Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004. **48**(6): p. 459-464.
232. Ippoushi, K., et al., *Absolute quantification of Pru av 2 in sweet cherry fruit by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with the use of a stable isotope-labelled peptide*. *Food Chemistry*, 2016. **204**: p. 129-134.
233. Ippoushi, K., et al., *Absolute quantification of protein NP24 in tomato fruit by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using stable isotope-labelled tryptic peptide standard*. *Food Chemistry*, 2015. **173**: p. 238-242.
234. Ippoushi, K., et al., *Quantification method of osmotin-like proteins in sweet pepper and eggplant by liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on the aqua technology*. *International Journal of Food Properties*, 2017. **20**(1): p. 213-219.
235. Isaacson, T., et al., *Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues*. *Nature Protocols*, 2006. **1**(2): p. 769-774.
236. Korte, R., S. Lepski, and J. Brockmeyer, *Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC-HRMS multi-method*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. **408**(12): p. 3059-3069.
237. Pavokovic, D., B. Kriznik, and M. Krsnik-Rasol, *Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues*. *Croatica Chemica Acta*, 2012. **85**(2): p. 177-183.
238. Lee, D.G., et al., *Mass spectrometry analysis of soybean seed proteins: optimization of gel-free quantitative workflow*. *Analytical Methods*, 2010. **2**(10): p. 1577-1583.

- 
239. Houston, N.L., et al., *Quantitation of Soybean Allergens Using Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Proteome Research, 2011. **10**(2): p. 763-773.
240. Martinez-Marquez, A., et al., *Development and Validation of MRM Methods to Quantify Protein Isoforms of Polyphenol Oxidase in Loquat Fruits*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(12): p. 5709-5722.
241. Song, J., et al., *Quantitative changes in proteins responsible for flavonoid and anthocyanin biosynthesis in strawberry fruit at different ripening stages: A targeted quantitative proteomic investigation employing multiple reaction monitoring*. Journal of Proteomics, 2015. **122**: p. 1-10.
242. Faeste, C.K., et al., *Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the quantitation of Anisakis simplex proteins in fish*. Journal of Chromatography A, 2016. **1432**: p. 58-72.
243. Ji, J., et al., *Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens*. Food Control, 2017. **74**: p. 79-88.
244. Parker, C.H., et al., *Multi-allergen Quantitation and the Impact of Thermal Treatment in Industry-Processed Baked Goods by ELISA and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(49): p. 10669-10680.
245. Locati, D., et al., *Preliminary approaches for the development of a high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the detection and label-free semi-quantitation of the main storage proteins of Lupinus albus in foods*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(8): p. 1305-1316.
246. Hu, X.T. and M.A. Owens, *Multiplexed Protein Quantification in Maize Leaves by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry: An Alternative Tool to Immunoassays for Target Protein Analysis in Genetically Engineered Crops*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(8): p. 3551-3558.
247. Resta, D., F. Brambilla, and A. Arnoldi, *HPLC-Chip-Multiple Reaction Monitoring (MRM) method for the label-free absolute quantification of gamma-conglutin in lupin: Proteotypic peptides and standard addition method*. Food Chemistry, 2012. **131**(1): p. 126-133.
248. Posada-Ayala, M., et al., *Novel liquid chromatography-mass spectrometry method for sensitive determination of the mustard allergen Sin a 1 in food*. Food Chemistry, 2015. **183**: p. 58-63.
249. Maddumage, R., et al., *Diversity and Relative Levels of Actinidin, Kiwellin, and Thaumatin-Like Allergens in 15 Varieties of Kiwifruit (Actinidia)*. Journal of

- Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(3): p. 728-739.
250. Saravanan, R.S. and J.K.C. Rose, *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues*. Proteomics, 2004. **4**(9): p. 2522-2532.
251. Wang, W., et al., *Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds*. Electrophoresis, 2003. **24**(14): p. 2369-2375.
252. Sun, S.S., et al., *Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers*. Analytical Biochemistry, 2014. **446**: p. 76-81.
253. Leon, I.R., et al., *Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis*. Molecular & Cellular Proteomics, 2013. **12**(10): p. 2992-3005.
254. Proc, J.L., et al., *A Quantitative Study of the Effects of Chaotropic Agents, Surfactants, and Solvents on the Digestion Efficiency of Human Plasma Proteins by Trypsin*. Journal of Proteome Research, 2010. **9**(10): p. 5422-5437.
255. Hao, P.L., et al., *Detection, Evaluation and Minimization of Nonenzymatic Deamidation in Proteomic Sample Preparation*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(10): p. 11.
256. Jover, A., F. Meijide, and E. Rodríguez Núñez, *Dynamic Rheology of Sodium Deoxycholate Gels*. Langmuir, 2002. **18**(4): p. 987-991.
257. Cucu, T., B. De Meulenaer, and B. Devreese, *MALDI based identification of soybean protein markers - Possible analytical targets for allergen detection in processed foods*. Peptides, 2012. **33**(2): p. 187-196.
258. Mirzaei, H. and F. Regnier, *Enhancing electrospray ionization efficiency of peptides by derivatization*. Anal Chem, 2006. **78**(12): p. 4175-83.
259. Steen, H. and M. Mann, *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 699-711.

表一 多次苯酚蛋白質萃取法之萃取效率

Table 1. Efficiency of multiple phenol protein extractions



Count of extraction	Protein content in gram of kiwi puree (mg)	Percentage of total extracted protein (%)
1	2.18 ± 0.025	73.72%
2	0.60 ± 0.15	20.17%
3	0.18 ± 0.028	6.11%
4	N.D.	0%
Sum	2.96	100%

表二 微量苯酚法優化之結果

Table 2 Result of optimization process of micro phenol protein extraction, MPE

Experiment	Treatments	Confirmation method	Means (mg)	STD
Precipitation time	>16 hrs.		3.8716	0.2833
	6 hrs.		3.8047	0.1978
	4 hrs.		4.7336	0.4341
	2 hrs.		3.1801	0.7105
Extraction assist method	Sonication		3.2771	0.1108
	Homogenization	Bradford protein assay	3.2535	0.2066
Weight of kiwi puree	0.02 g		4.5585	0.0133
	0.04 g		4.5787	0.0955
	0.06 g		4.7427	0.3762
	0.08 g		4.6954	0.2798
	0.1 g		3.0332	0.0824
Extraction temperature	15°C	AD1H	0.0765	0.0073
		AD5H	0.1465	0.0136
		AD11H	0.0195	0.0043
	40°C	AD1H	0.0969	0.0009
		AD5H	0.2068	0.0062
		AD11H	0.0133	0.0029

表 三 最佳化苯酚蛋白質萃取法 (OPE) 及微量苯酚蛋白質萃取法 (MPE) 方法性質

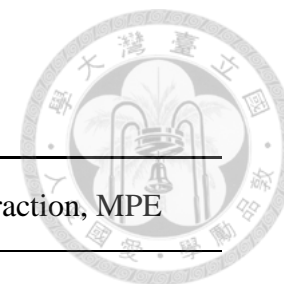


Table 3 Properties of OPE, MPE method

Method	Optimized phenol extraction, OPE	Micro phenol extraction, MPE
Protein extraction efficiency	High (4.46 ± 0.091 mg/ g of puree)	High (4.47 ± 0.24 mg / g of puree)
Weight of kiwifruit	1.5 g	0.07 g
Total extracted protein	6.7133 ± 0.12 mg	0.4235 ± 0.044 mg
Cost	High	Low (1/30)
Time	3 days	1 day
Labor	High	Less
Transition steps to digestion	2	0

表 四 胰蛋白酶溶液內消化方法之優化

Table 4 Result of experimental parameter optimization of in-solution trypsin digestion

	Treatments	Quant. method	Means	STDEV
Digestion matrix	SDC	AD1H	0.0969	0.0009
		AD5H	0.2068	0.0062
		AD11H	0.0133	0.0029
	Urea	AD1H	0.0683	0.0147
		AD5H	0.1988	0.0393
		AD11H	0.0180	0.0033
Digestion time	7	AD1H	0.0969	0.0009
		AD5H	0.2068	0.0062
		AD11H	0.0133	0.0029
	16	AD1H	0.0669	0.0078
		AD5H	0.1742	0.0087
		AD11H	0.0127	0.0037



表 五 複雜蛋白質定序辨認到之奇異果蛋白質

本表整理自補充資料六

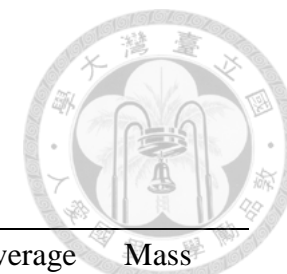
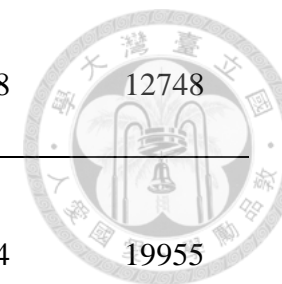


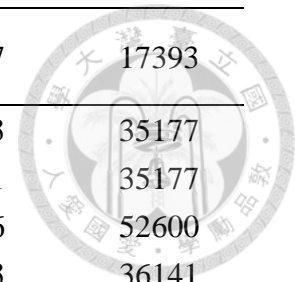
Table 5 Identified kiwi proteins from protein sequencing, results are from supplementary data 6

Name	No.	gi number	Description	Score	Coverage	Mass
	1	gi 146215974	actinidin Act1a [Actinidia deliciosa]	1577	47.9	42083
	2	gi 166317	actinidin [Actinidia deliciosa]	1529	47.9	42115
	3	gi 193806686	RecName: Full=Actinidain; Short=Actinidin; AltName: Full=Allergen Act d 1; AltName: Allergen=Act d 1; Flags: Precursor	658	60	42083
Act d 1	4	gi 2144501	actinidain (EC 3.4.22.14) precursor - kiwi fruit	638	60	42115
	5	gi 157829826	Chain A, Crystal Structure Of Actinidin-E-64 Complex+	585	95.9	23543
	6	gi 146215980	actinidin Act2a [Actinidia deliciosa]	509	30.7	41619
	7	gi 313507179	Chain A, Crystallographic Refinement Of The Structure Of Actinidin At 1.7 Angstroms Resolution By Fast Fourier Least-Squares Methods	497	51.8	23668
	8	gi 71057064	thaumatin-like protein [Actinidia deliciosa]	906	60.9	24205
	9	gi 550544357	Chain A, Crystal Structure Of Kiwi-fruit Allergen Act D 2	780	60.2	21600
Act d 2	10	gi 190358875	RecName: Full=Thaumatin-like protein; AltName: Allergen=Act d 2; Flags: Precursor	744	54.2	24205
	11	gi 441482376	thaumatin-like protein [Actinidia deliciosa]	232	25.9	26925
	12	gi 441482374	thaumatin-like protein [Actinidia deliciosa]	132	21	26953
Act d 4	13	gi 40807635	phytolectin [Actinidia deliciosa]	287	44.8	12748

	14	gi 75224035	RecName: Full=Cysteine proteinase inhibitor 1; Short=KCPI1; AltName: Full=Phytocystatin; AltName: Allergen=Act d 4; Flags: Precursor [Actinidia deliciosa]	196	44.8	
	15	gi 85701136	RecName: Full=Kiwellin; AltName: Allergen=Act d 5; Contains: RecName: Full=Kissper; Contains: RecName: Full=KiTH-3; Contains: RecName: Full=KiTH-1; Contains: RecName: Full=KiTH-2	1469	71.4	
Act d 5	16	gi 906848987	Chain A, Crystal Structure Of The Kiwifruit Allergen Act D 5	1445	71.4	19877
	17	gi 441482346	kiwellin [Actinidia deliciosa]	784	72.3	22198
	18	gi 441482348	kiwellin [Actinidia deliciosa]	751	72.3	22229
	19	gi 441482350	kiwellin [Actinidia deliciosa]	740	71.4	22224
	20	gi 672886569	Chain A, Crystal Structure Of Kiwellin	686	75.7	19736
	21	gi 441482352	kiwellin [Actinidia deliciosa]	644	72.3	22228
Act d 6	22	gi 158518418	RecName: Full=Pectinesterase inhibitor; AltName: Full=AdPMEI; Short=PMEI; AltName: Full=Pectin methylesterase inhibitor; Flags: Precursor [Actinidia deliciosa]	511	42.7	19880
	23	gi 27544454	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	452	41.6	19878
	24	gi 27544452	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	412	42.7	19880
	25	gi 27544456	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	287	33.3	15731
Act d 7	26	gi 160419153	RecName: Full=Pectinesterase; Short=PE; AltName: Full=Pectin methylesterase [Actinidia deliciosa]	320	26.2	35346
Act d 10	27	gi 378405189	RecName: Full=Non-specific lipid-transfer protein 1; Short=LTP1; Short=nsLTP1; AltName: Allergen=Act d 10.01	41	14.1	9452



Act d 11	28	gi 332319679	RecName: Full=Kirola; AltName: Allergen=Act d 11 [Actinidia deliciosa]	437	58.7	17393
-	29	gi 1170601	RecName: Full=Fruit protein pKIWI502 [Actinidia deliciosa]	677	60.3	35177
-	30	gi 450237	pKIWI502 [Actinidia deliciosa var. deliciosa]	490	57.1	35177
-	31	gi 675272222	glycosyltransferase [Actinidia deliciosa]	267	18.6	52600
-	32	gi 1143381	polygalacturonase inhibitor [Actinidia deliciosa]	248	26.3	36141
-	33	gi 166863966	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [Actinidia deliciosa var. chlorocarpa]	154	41.7	13842
-	34	gi 343794768	ACC oxidase 3 [Actinidia deliciosa]	144	28.5	36242
-	35	gi 166864002	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [Actinidia deliciosa]	121	37.1	13923
-	36	gi 166864084	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [Actinidia deliciosa var. chlorocarpa]	109	31.1	13869
-	37	gi 973583631	PDC1 [Actinidia deliciosa]	99	6.8	65212
-	38	gi 398363593	sucrose synthase [Actinidia deliciosa]	81	17.8	92539
-	39	gi 146216004	cysteine protease Cp6 [Actinidia deliciosa]	58	3	50759
-	40	gi 61741088	elongation factor 1 alpha [Actinidia deliciosa]	49	2.7	49233
-	41	gi 744515973	ATP synthase beta subunit, partial [Actinidia deliciosa]	45	9.3	35061
-	42	gi 149938964	ACT1 [Actinidia deliciosa]	41	5.3	41637
-	43	gi 40807637	cystatin [Actinidia deliciosa]	29	22.6	12890
-	44	gi 146215996	cysteine protease Cp2 [Actinidia deliciosa]	24	7.4	41453
-	45	gi 744515977	ATP/ADP carrier protein, partial [Actinidia deliciosa]	22	9.7	22206
-	46	gi 82697965	CXE carboxylesterase [Actinidia deliciosa]	20	3.5	34821



-	47	gi 27524403	photosystem II protein, partial (chloroplast) [Actinidia deliciosa var. deliciosa]	20	8.9	
-	48	gi 757815335	photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein (chloroplast) [Actinidia deliciosa]	18	6.9	
-	49	gi 2274778	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, partial [Actinidia deliciosa]	17	12.9	
-	50	gi 95981853	CTR1, partial [Actinidia deliciosa]	16	7.6	16705
-	51	gi 318136853	alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase, partial [Actinidia deliciosa var. deliciosa]	16	7.3	68609
-	52	gi 98979405	lipoxygenase 5, partial [Actinidia deliciosa]	16	2	51336



表 六 代表胜肽之篩選條件

Table 6 Rules for choosing signature peptides

No.	Rules	Cause	Reference
1	胜肽長度於 8 ~ 19 之間	質譜儀荷質比限制	
2	不含半胱氨酸 (cysteine) 和甲硫氨酸 (methionine)	後轉譯修飾效率	[239]
3	不含胰蛋白酶 (trypsin)切點	消化效率	
4	不含有相連的切點 (Ragged end) , 如-RK	消化效率	
5	胜肽分數	可信度	-
6	胜肽序列可概括全部之亞型蛋白 (isoforms)	避免偽陰性	-



表 七 目標過敏原之複雜蛋白質定序辨認到之胜肽結果

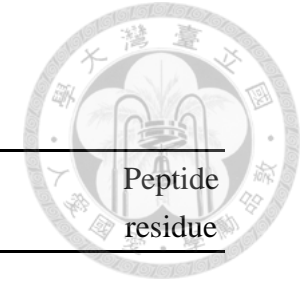


Table 7 Properties of identified peptides from result of protein sequencing

Protein name	Allergen name	No.	M/z	Z	Miss cleavage	Peptide score	Peptide sequence	Peptide residue
actinidin	Act d 1	1	1085.011	4	0	36.36	YVTIDTYENVPYNNEWALQTA V TYQPVSVALDAAGDAFK	<u>39</u>
		2	709.8796	2	0	<u>13.99</u>	VGQVLPSYVDWR	12
		3	430.2636	2	0	44.71	SAGAVVDIK	9
		4	420.255	2	<u>1</u>	20.7	RFEIFK	<u>6</u>
		5	866.3525	2	0	53.16	NSWDTTWGEEGY <u>M</u> R	14
kiwellin	Act d 5	1	936.9706	2	0	79.85	NNIVDGSNAVWSALGLDK	18
		2	740.8836	2	0	105.56	IVALSTGWYNGGSR	14
		3	646.33	2	0	30.61	NVGVDITWS <u>M</u> A	12
kirola	Act d 11	1	964.497	2	0	25.09	QVEILSDGIVFYEIFR. <u>YR</u>	16
		2	578.9425	3	0	25.84	GEHNSVTWTFHYEK	14
		3	631.3196	2	0	47.27	<u>DIVEAIDEETK</u>	11
		4	509.776	2	0	<u>12.24</u>	DIETYHLK	8
		5	655.3475	2	0	75.5	IVEGDLM <u>E</u> LYK	11
		6	781.3914	2	<u>1</u>	37.41	TAKDIVEAIDEETK	14
		7	789.3898	3	<u>1</u>	16.1	LKEDVEEPNTLMNFCIEITK	<u>20</u>

其中底線為不符合表五篩選條件之項目；粗體為候選胜肽後續進行 BLAST 之序列。含有轉譯後修飾之胜肽片段已先被篩選掉

表 八 候選胜肽之 BLAST 結果

Table 8 BLAST result of candidate peptides with 100% identity and query coverage of non *Actinidia*

No.	Peptide	Non <i>Actinidia</i> blast result description	Accession No.
Act d 1 -3	SAGAVVDIK	-	-
Act d 5 - 1	NNIVDGSNAVWSALGLDK	-	-
		hypothetical protein CUMW_196950 [Citrus unshiu]	GAY59757.1
		LOW QUALITY PROTEIN: kiwellin-like [Durio zibethinus]	XP_022728684.1
Act d 5 - 2	IVALSTGWYNGGSR	kiwellin-like [Cucurbita moschata]	XP_022944086.1
		kiwellin-like [Cucurbita maxima]	XP_022986161.1
		kiwellin-like [Cucurbita pepo subsp. pepo]	XP_023512884.1
		... and more (+26)	
Act d 11 - 2	GEHNSVTWTFHYEK	-	-

表中所列之結果為非獼猴桃屬、身分 (identity) 及查詢覆蓋率 (query coverage) 皆為 100% 之結果

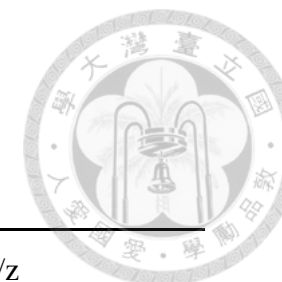


表 九 目標過敏原與代表胜肽之性質

Table 9 Properties of selected allergens and signature peptides

Protein name	Actinidin	Kiwellin	Kirola
IUIS name	Act d 1	Act d 5	Act d 11
Uniprot No#	P00785	P84527	P85524
Length of protein	380	189	150
Mw	42172	19967.9	17404
Theor. pI	4.92	5.83	4.69
Q-ToF coverage	42%	55%	58%
Standard peptide sequence	¹³⁵ SAGAVVDIK ¹⁴³	¹⁸⁴ NNIVDGSNAVWSALGLDK ²⁰¹	¹⁰⁹ GEHNSVTWTFHYEK ¹²²





表十 代表胜肽及其二甲基標記（氫和氘）胜肽之性質

Table 10 Properties of signature peptides and its dimethyl labeled (hydrogen and deuterium) peptides

Code	Mother ion sequence	Z	Expect M/z	Obsv. M/z	$\Delta M/z$	CV*	M/z shift	Mr shift
AD1	SAGAVVDIK	1	859.48	-	-	-	-	-
AD1H	(CH ₂) ₂ -SAGAVVDIK-(CH ₂) ₂	1	915.48	915.47	0.01	55	+56	+56
AD1D	(CD ₂) ₂ -SAGAVVDIK-(CD ₂) ₂	1	923.48	923.54	-0.06	55	+64	+64
AD5	NNIVDGSNAVWSALGLDK	2	936.97	-	-	-	-	-
AD5H	(CH ₂) ₂ -NNIVDGSNAVWSALGLDK-(CH ₂) ₂	2	964.97	965.38	-0.41	65	+28	+56
AD5D	(CD ₂) ₂ -NNIVDGSNAVWSALGLDK-(CD ₂) ₂	2	968.97	969.1	-0.13	65	+32	+64
AD11	GEHNSVTWTFHYEK	3	578.93	-	-	-	-	-
AD11H	(CH ₂) ₂ -GEHNSVTWTFHYEK-(CH ₂) ₂	3	597.59	597.69	-0.1	50	+18.66	+55.99
AD11D	(CD ₂) ₂ -GEHNSVTWTFHYEK-(CD ₂) ₂	3	600.26	600.47	-0.21	45	+21.33	+63.99

*CV = cone voltage

表 十一 代表胜肽之定量子離子性質

Table 11 Properties of quantitative daughter ions of signature peptides

Code	Quantitative daughter ion	FI*	z	Expect M/z	Obsv. M/z	$\Delta M/z$	CE*
AD1H	IK-(CH ₂) ₂	y2	1	288.196	288.42	-0.22309	45
AD1D	IK-(CD ₂) ₂	y2	1	292.196	292.44	-0.24309	40
AD5H	GLDK-(CH ₂) ₂	y4	1	460.245	460.40	-0.15468	30
AD5D	WSALGLDK-(CD ₂) ₂	y8	1	921.477	921.68	-0.20216	40
AD11H	(CH ₂) ₂ -GEHN	b4	1	466.173	466.44	-0.26678	25
AD11D	HNSVTWTFHYEK-(CD ₂) ₂	y12	3	527.579	527.74	-0.16077	20

*FI = fragment ion; CE = collision energy

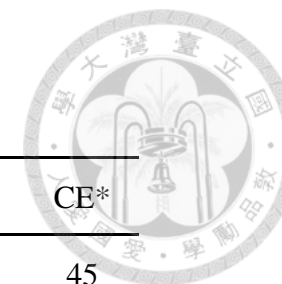


表 十二 代表胜肽之定性子離子性質

Table 12 Properties of qualitative daughter ions of signature peptides

Code	Qualitative daughter ion	FI.	z	Expect M/z	Obsv. M/z	$\Delta M/z$	CE*
AD1H	$(CH_2)_2$ -SAGAVVD	b7	1	628.298	628.54	-0.24119	40
AD1D	$(CD_2)_2$ -SAGAVVD	b7	1	632.298	632.63	-0.33119	40
AD5H	$(CH_2)_2$ -NNIVD	b5	1	584.273	584.30	-0.0298	25
AD5D	VDGSNAVWSALGLDK- $(CD_2)_2$	y15	1	1563.775	1564.05	-0.27486	35
AD11H	HYEK- $(CH_2)_2$	y4	2	302.642	302.35	0.2925	30
AD11D	EHNSVTWTFHYEK- $(CD_2)_2$	y13	2	855.386	855.41	-0.02352	20

*FI = fragment ion; CE = collision energy

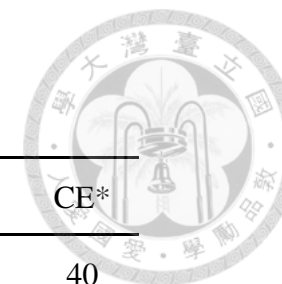


表 十三 AD1H 之確效結果

Table 13 Validation results of AD1H

Peptide	#	Spiked amount (ng/mL)	Mean of determined amount (ng/mL)	CV (%)	Recovery (%)
AD1H	A	125000	137410.21	1.86%	109.93
	B	15625	13106.67	5.11%	83.88
	C	12500	9862.50	9.92%	78.90
	D	10000	7561.04	8.51%	75.61
	E	1250	818.75	7.67%	65.50
	平均			6.61%	82.76

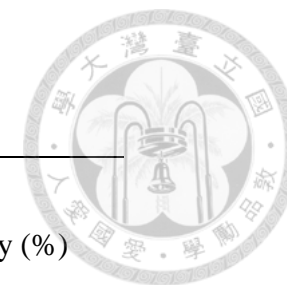
確效方法依 ICH Q2(R1) 文件，n = 3，**粗體**為超過我國公定分析方法確效規範之數值

Validation experiment followed guild lines of ICH Q2(R1) document, n = 3. Results that are out of range of specification of document

“validation standard of food safety analytical method” are **bolded**

表 十四 AD5H 之確效結果

Table 14 Validation results of AD5H



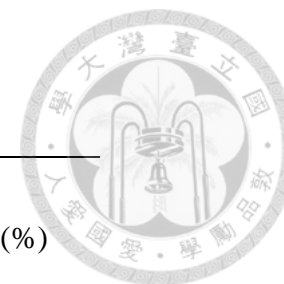
Peptide	#	Spiked amount (ng/mL)	Mean of determined amount (ng/mL)	CV (%)	Recovery (%)
AD5H	A	250000	189429.58	3.44%	75.77
	B	31250	26970.00	3.87%	86.30
	C	25000	21221.67	9.37%	84.89
	D	20000	14499.17	9.55%	72.50
	E	2500	2445.83	17.21%	97.83
	平均				8.69%

確效方法依 ICH Q2(R1) 文件，n = 3，**粗體**為超過我國公定分析方法確效規範之數值

Validation experiment followed guild lines of ICH Q2(R1) document, n = 3. Results that are out of range of specification of document “validation standard of food safety analytical method” are **bolded**

表 十五 AD11H 之確效結果

Table 15 Validation results of AD11H



Peptide	#	Spiked amount (ng/mL)	Mean of determined amount (ng/mL)	CV (%)	Recovery (%)
AD11H	A	12500	4979.38	11.67%	39.84
	B	1562.5			
	C	1250	858.33	36.39%	68.67
	D	1000	3418.75	72.32%	341.88
	E	125			
	平均			40.13%	150.13

確效方法依 ICH Q2(R1) 文件，n = 3，**粗體**為超過我國公定分析方法確效規範之數值

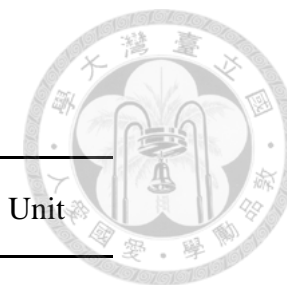
Validation experiment followed guild lines of ICH Q2(R1) document, n = 3. Results that are out of range of specification of document

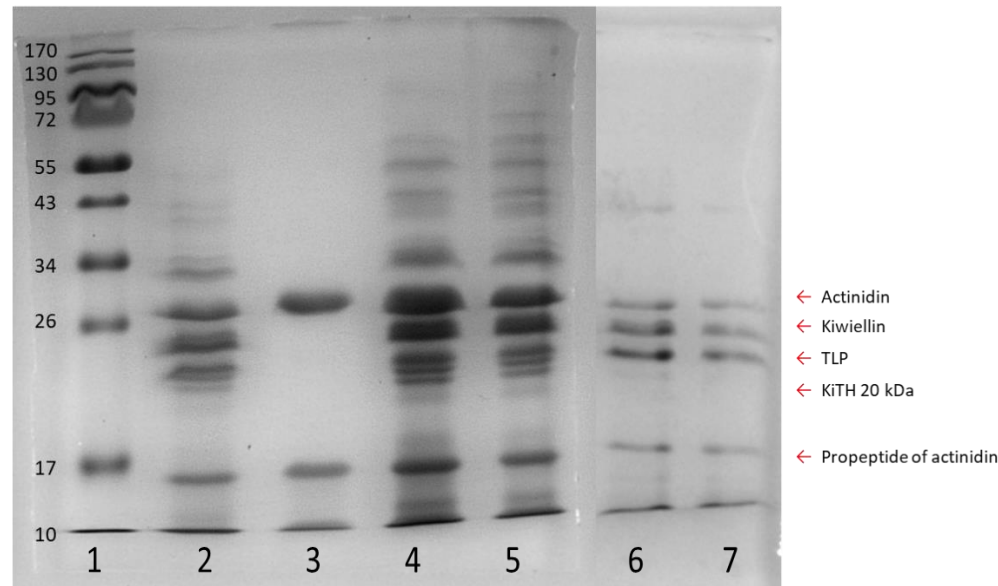
“validation standard of food safety analytical method” are **bolded**

表 十六 代表胜肽測定方法之確效性質

Table 16 Result of validation of signature peptides

Peptide	AD1H	AD5H	AD11H	Unit
定量範圍 (Range)	125000 - 1250	250000 - 2500	-	ng/mL
準確度 (Accuracy)	82.76	83.46	-	%
重複性 (Repeatability)	6.61	8.69	-	%
儀器定量極限 (Instrumental quantification limits, IQLs)	0.008	8	20	ng/mL
儀器偵測極限 (Instrumental detection limits, IDLs)	0.008	4	8	ng/mL
專一性 (Specificity)	high	high	high	
線性 (Linearity)	$R^2 = 0.9981$	$R^2 = 0.9937$	-	



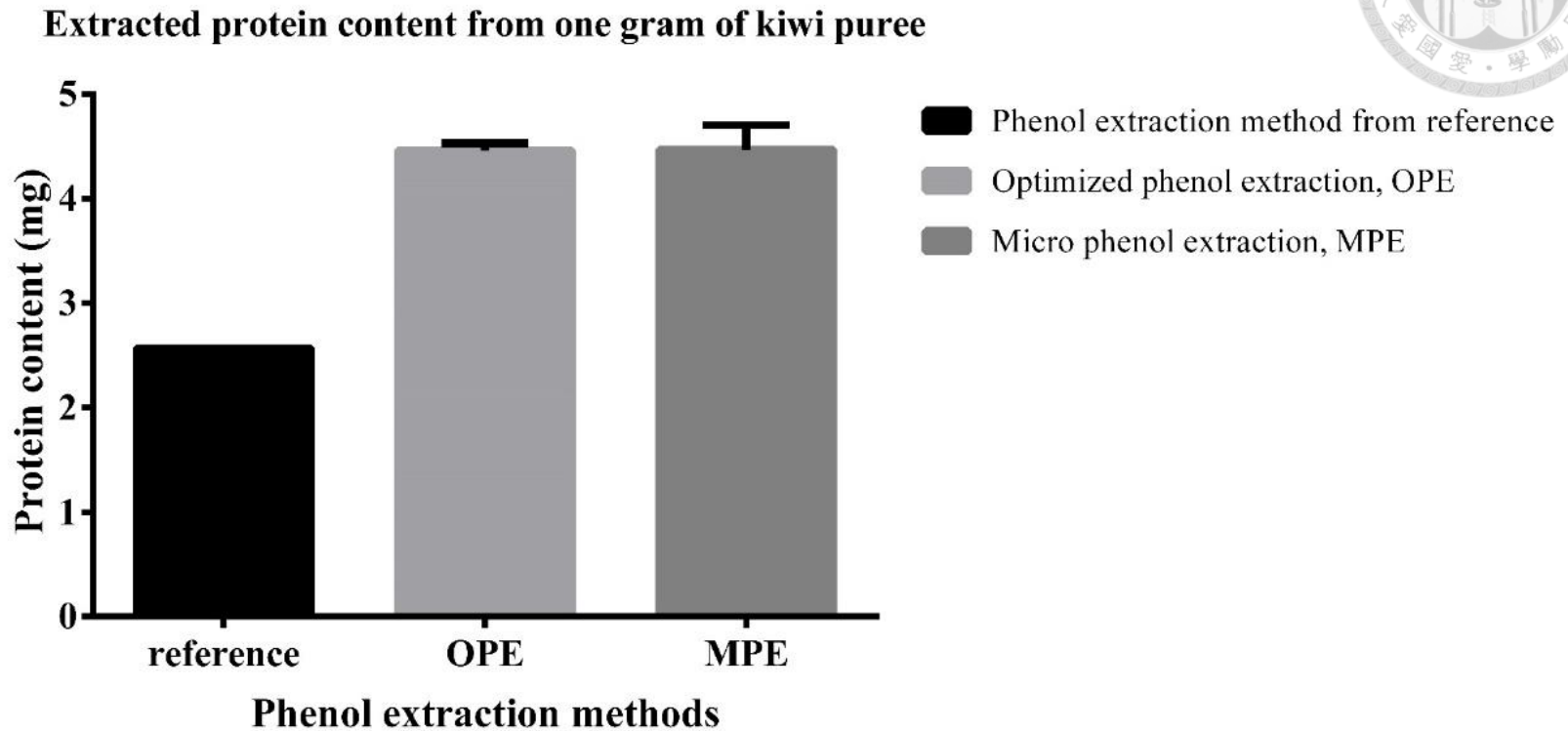


圖一 不同蛋白質準備法之 SDS-PAGE

泳道 1：為標準蛋白液；泳道 2：苯酚萃取法的全蛋白質；泳道 3：硫酸銨沉澱法的全蛋白質；泳道 4 和 5：TCA 法的全蛋白質；泳道 6 和 7：鹽萃取法的全蛋白質。右側條帶箭頭標記由上至下分別為 actinidin (30 kDa)、kiwiellin (26 kDa)、thaumatin like protein, TLP (24 kDa)、KiTH peptide (20 kDa)、propeptide of actinidin (17 kDa)

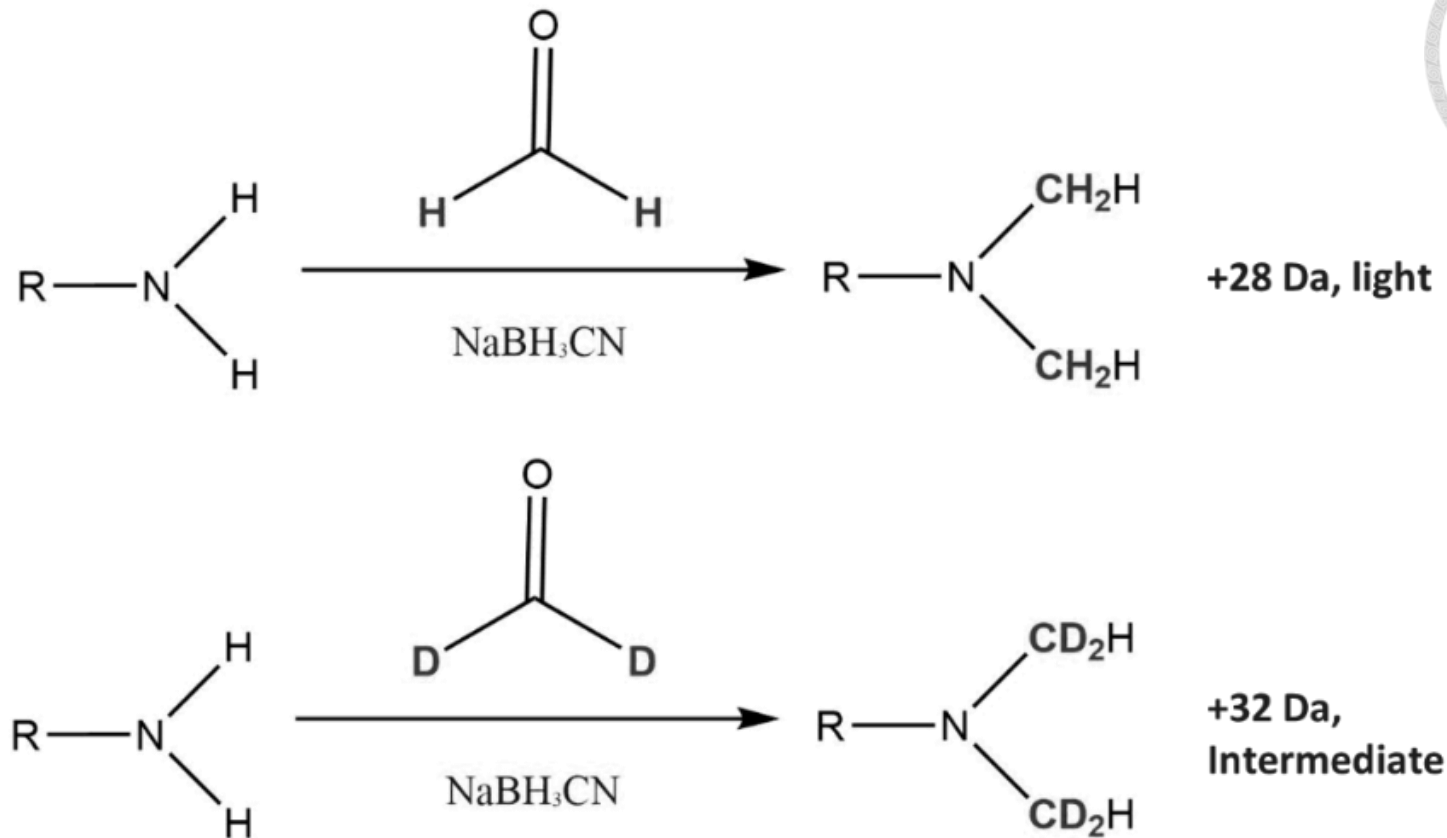
Figure 1 SDS-PAGE of different proteins prepared using various methods.

Lane 1: protein ladder; Lane 2: phenol extraction method, Lane 3: ammonium sulfate protein precipitation method; Lane 4 and 5: TCA extraction method; Lane 6 and 7: salt extraction method. Arrow indicator on the right are actinidin (30 kDa), kiwiellin (26 kDa), thaumatin like protein, TLP (24 kDa), KiTH peptide (20 kDa), propeptide of actinidin (17 kDa), respectively



圖二 文獻之苯酚蛋白質萃取法、最佳化苯酚蛋白質萃取法 (OPE) 及微量苯酚蛋白質萃取法 (MPE) 萃取效率比較

Figure 2 Comparism of extraction efficiency of phenol extraction method from reference, optimized phenol extraction method, and micro phenol extraction method



圖三 二甲基同位素標記法氫與氘標記之反應式及其產物

Figure 3 Chemical reaction and products of hydrogen and deuterium dimethyl labeling method

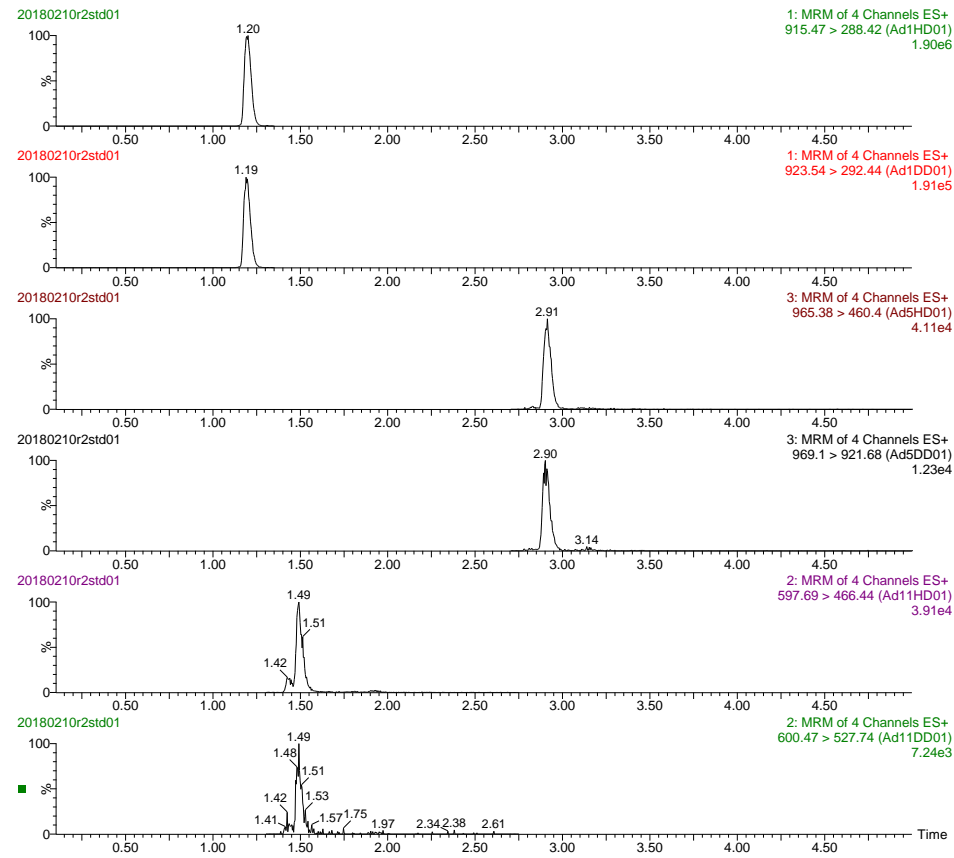
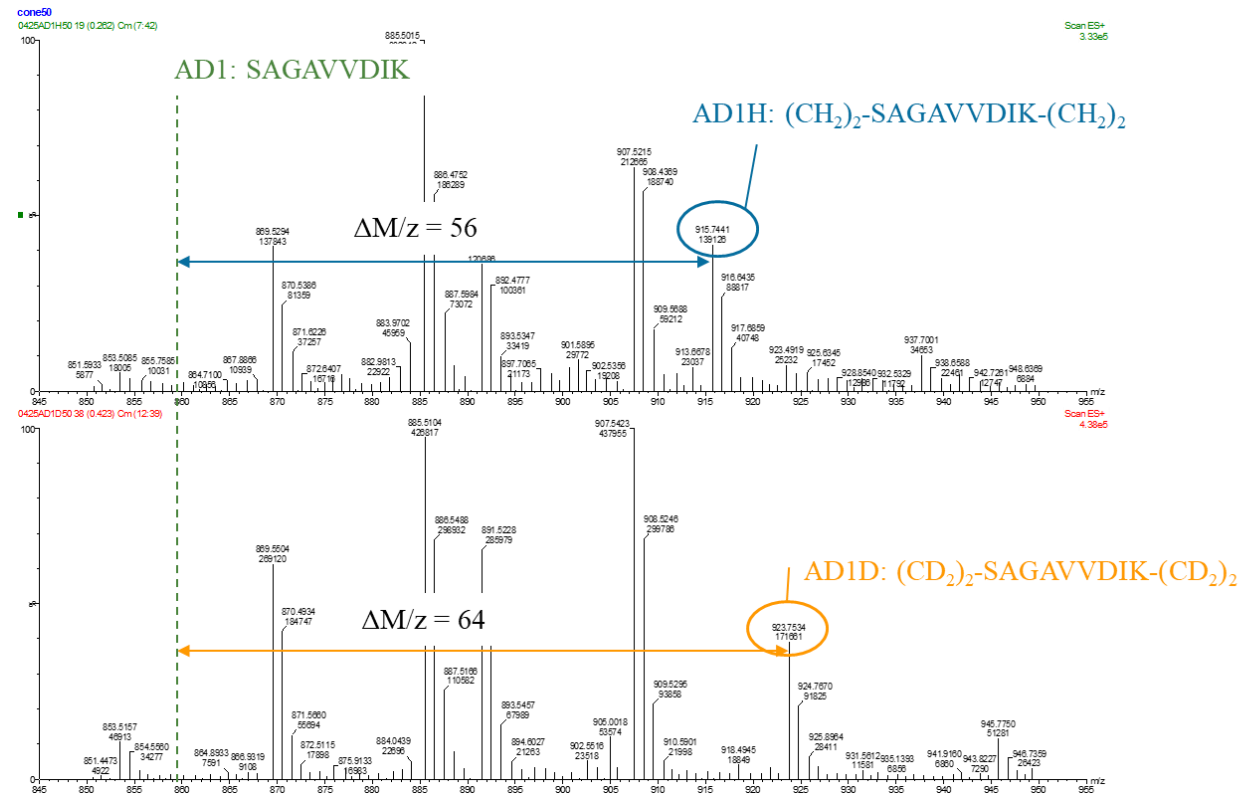


圖 四 代表胜肽之同位素效應

圖由下而上依序為 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H、AD11D 之層析圖

Figure 4 Isotopic effect of signature peptides

Figures from bottom to top are chromatogram of AD1H, AD1D, AD5H, AD5D, AD11H, AD11D

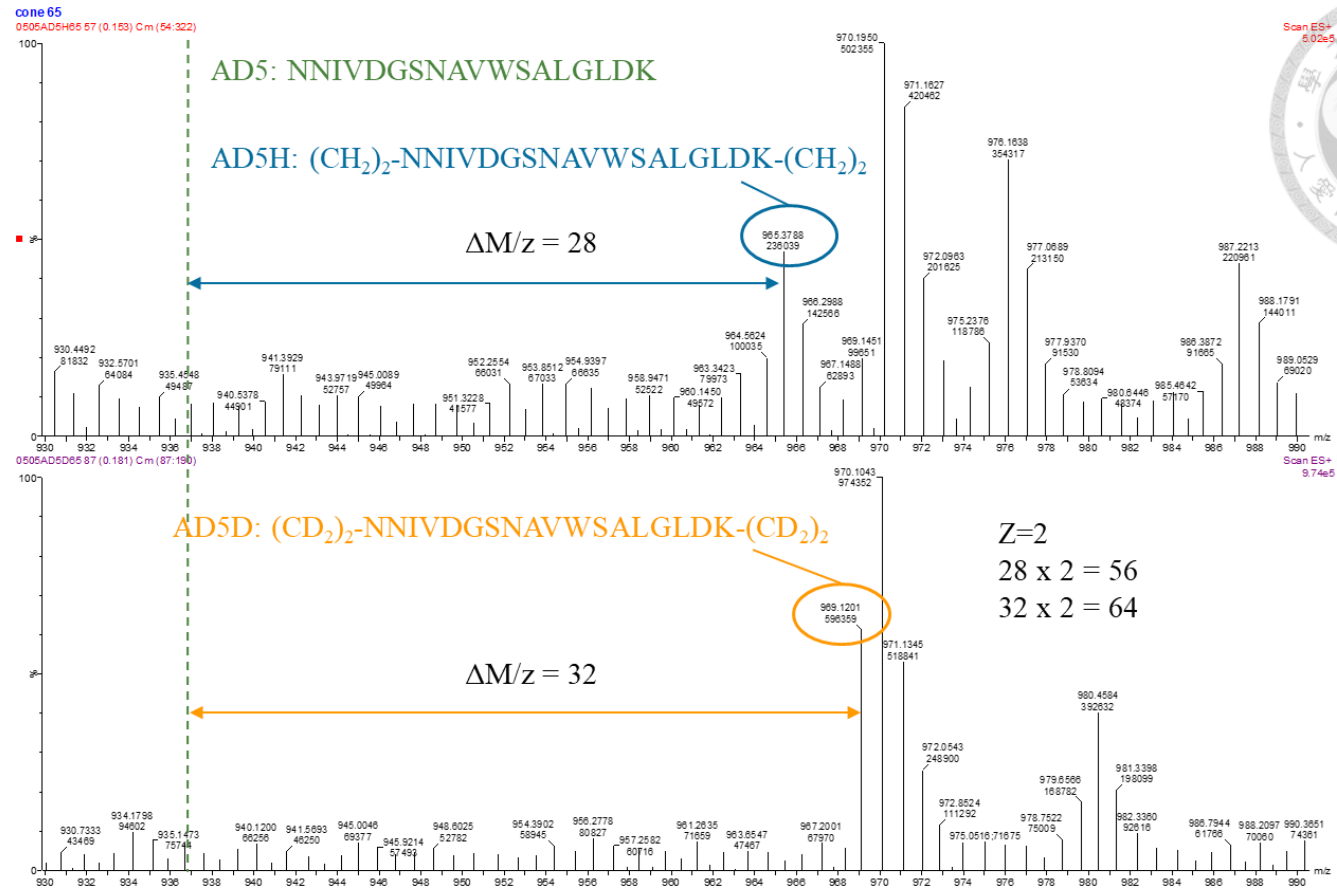


圖五 AD1H 與 AD1D 之質譜圖

虛線處為無標記之原胜肽 AD1 之荷質比，雙箭頭標示出標記前後荷質比差異

Figure 5 MS spectrum of AD1H and AD1D

Dotted line represent M/z of unlabeled peptide AD1. Double arrow show change of M/z after label

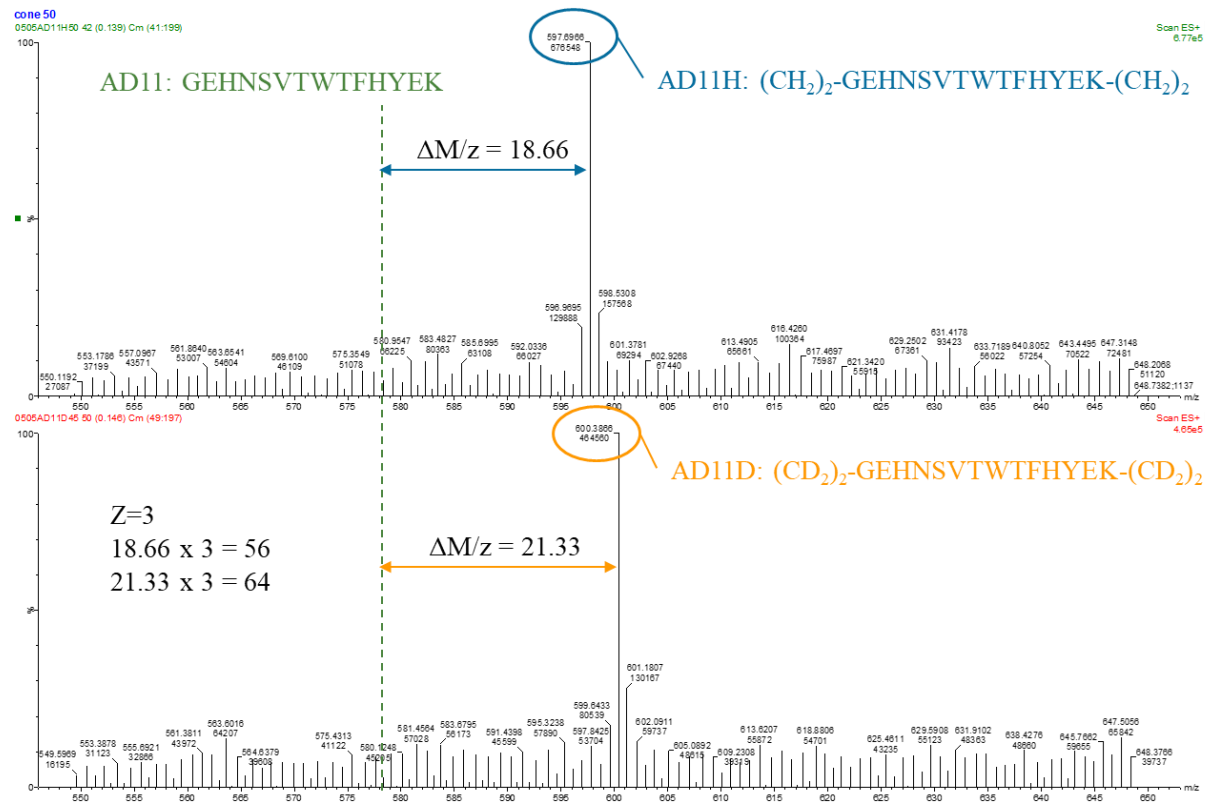


圖六 AD5H 與 AD5D 之質譜圖

虛線處為無標記之原胜肽 AD5 之荷質比，雙箭頭標示出標記前後荷質比差異

Figure 6 MS spectrum of AD5H and AD5D

Dotted line represent M/z of unlabeled peptide AD5. Double arrow show change of M/z after label



圖七 AD11H 與 AD11D 質譜圖

虛線處為無標記原胜肽 AD11 之荷質比，雙箭頭標示出標記前後荷質比差異

Figure 7 MS spectrum of AD11H and AD11D

Dotted line represent M/z of unlabeled peptide AD11. Double arrow show change of M/z after label

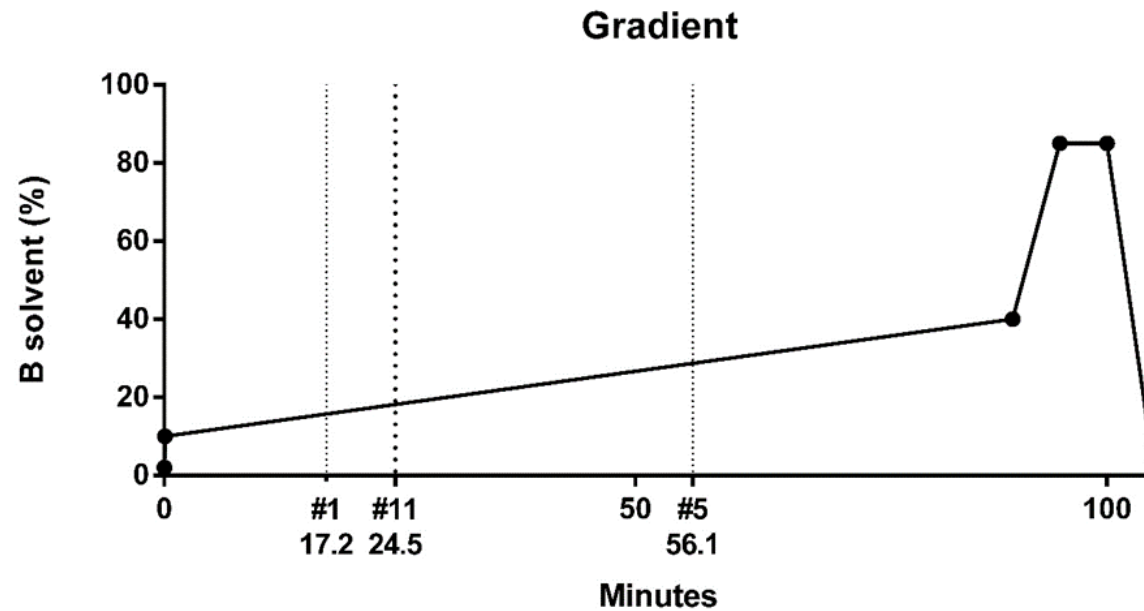
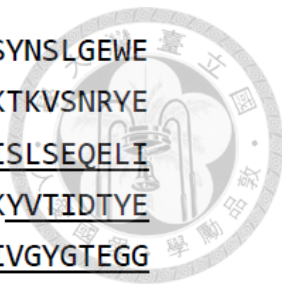


圖 八 蛋白質複雜定序時使用之液相層析梯度圖

圖中標示之#1、#5、#11 分別為目標過敏原代表胜肽 AD1、AD5、AD11 之滯留時間。B solvent 為 100%之乙腈，A solvent 為 0.1% 甲酸水溶液

Figure 8 Gradient of liquid chromatography in protein sequencing process

#1, #5, and #11 show retention time of signature peptides AD1, AD5, and AD11, respectively. B solvent compose of 100% ACN, A solvent compose of 0.1% FA in DI water



(a)

1 MGLPKSFVMSLLFFSTLLILSLAFNAKNTQRTNDEVKAMYESWLIKYGKSYNSLGWE
61 RRFEIFKETLRFIDEHNADTNRSYKVGLNQFADLTDEEFRSTYLRF TSGSNKTKVSNRYE
121 PRVGQVLPSYVDWRS**SAGAVVDIK**SQGECCGWFSAIATVEGINKIVTGVLISLSEQELI
181 DCGRTQNTRGCNGGYITDGFQFIINNGGINTEENYPYTAQDGECNVDLQNEKYVTIDTYE
241 NVPYNNEWALQTAVTYQPVSVALDAAGDAFKQYSSGIFTGPCGTAVDHAVTIVGYGTEGG
301 IDYWIVKNSWDTTWGEEGYMRILRNVGGAGTCGIATMPSYPVKYNNQNHPKPYSSLINPP
361 AFSMSKDGPVGVDDGQRYS

(b)

1 MAQLALLLLSLFLTLISLAPPGASISSCNGPCRDLNDCDGQLICIKGKCNDDPQVGTHIC
61 RGTTPSPQPGGCKPSGTLTCRGKSYPTYDCSPVTSSTPAKLTNNDFSEGGDGGGPSECD
121 ESYHSNNERIVALSTGWYNGGSRCGKMIRITASNGKSVSAKVVDECDSRHGCDKEHAGQP
181 PCRNNIVDGSNAVWSALGLDKNVGVVDITWSMA

(c)

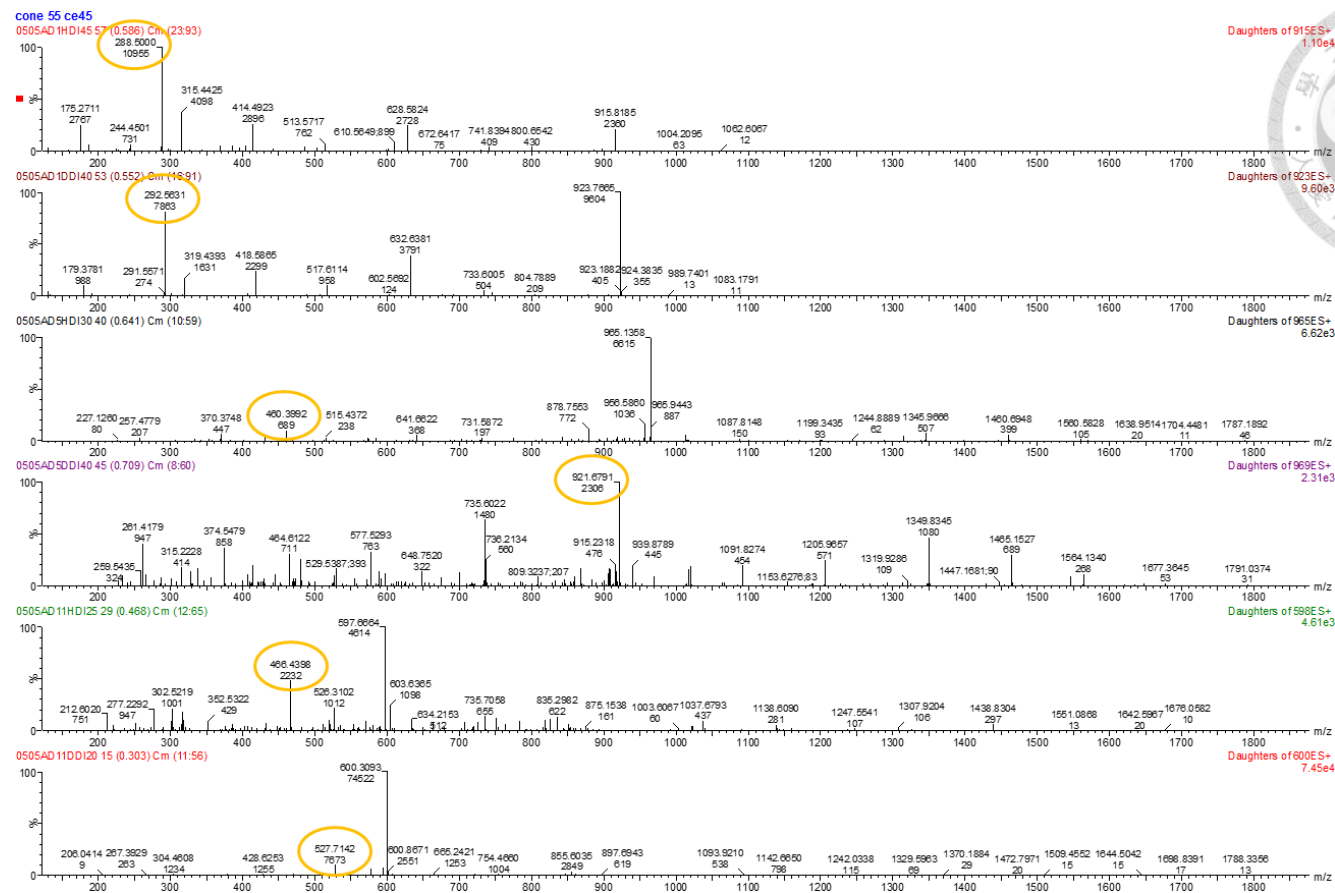
1 MDLSGKMKVQVEILSDGIVFYEIFRYRLYLISEMSPVNIQVDLLEGNWGTVGSVIFFKY
61 TIDGKEKTAKDIVEAIDEETKSVTFKIVEGDLMELYKTFIIIVQVDTKGEHNSVTWTFHY
121 EKLKEDVEEPNTLMNFCIEITKDIETYHLK

圖 九 目標過敏原之複雜蛋白質定序覆蓋率

圖 a、b、c 分別為 Act d 1、Act d 5、Act d 11，底線標記之序列為複雜蛋白質定序辨認到之胜肽片段，虛底線標記之序列為 kissper 胜肽，**粗體**標記為選擇之代表胜肽

Figure 9 Coverage of selected allergens from results of protein sequencing

figure a, b, and c are coverage of Act d 1、Act d 5、Act d 11, respectively



圖十 代表胜肽定量子離子之二次質譜圖

圈出來之值為定量子離子之荷質比。圖從上至下分別為 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H、AD11D

Figure 10 MS/MS spectrum of signature peptides

Quantitative daughter ions are circled out. Figures from top to bottom are AD1H, AD1D, AD5H, AD5D, AD11H, AD11D, respectively

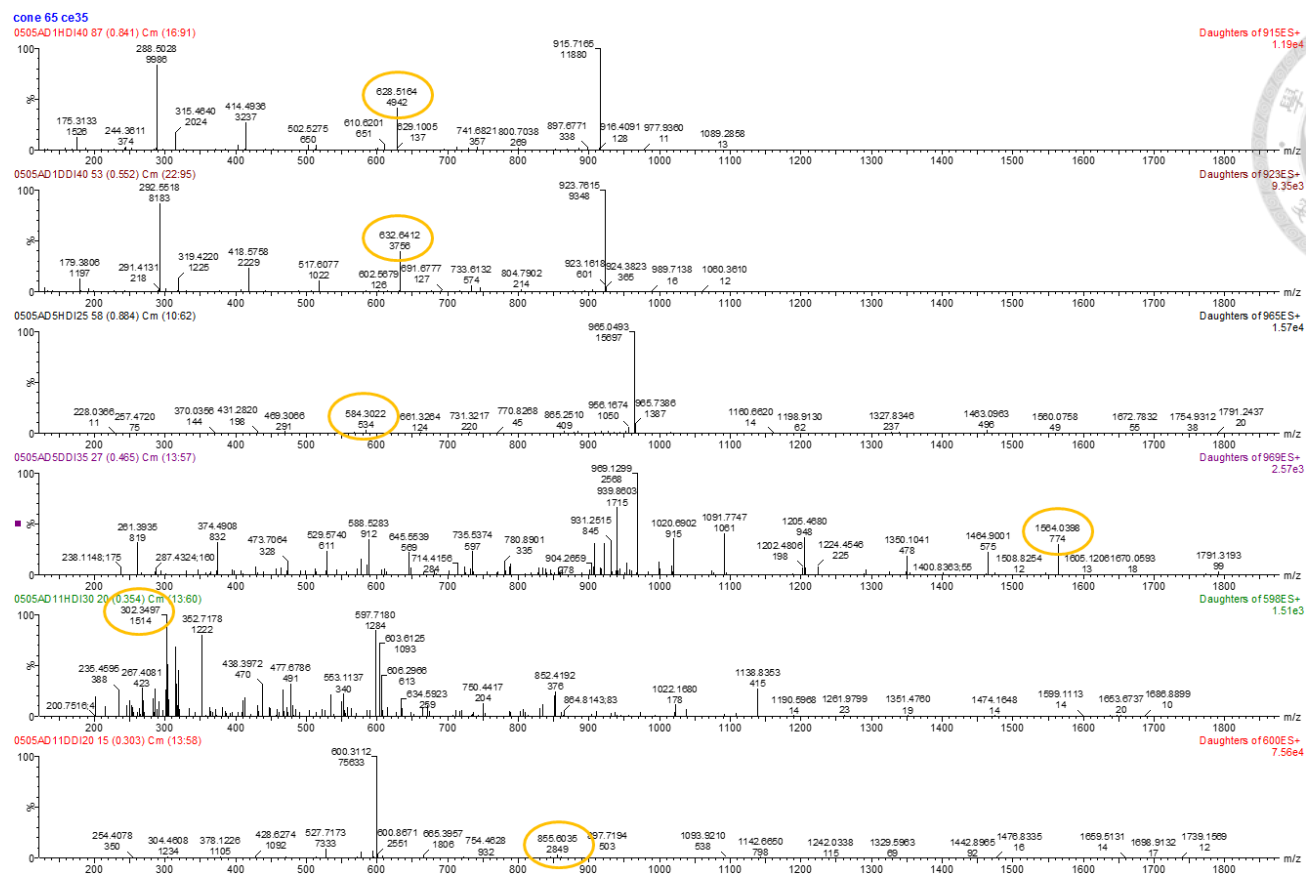


圖 十一 代表胜肽定性子離子之二次質譜圖

圈出來之值為定性子離子之荷質比。圖從上至下分別為 AD1H、AD1D、AD5H、AD5D、AD11H、AD11D

Figure 11 MS/MS spectrum of signature peptides

Qualitative daughter ions are circled out. Figures from top to bottom are AD1H, AD1D, AD5H, AD5D, AD11H, AD11D, respectively

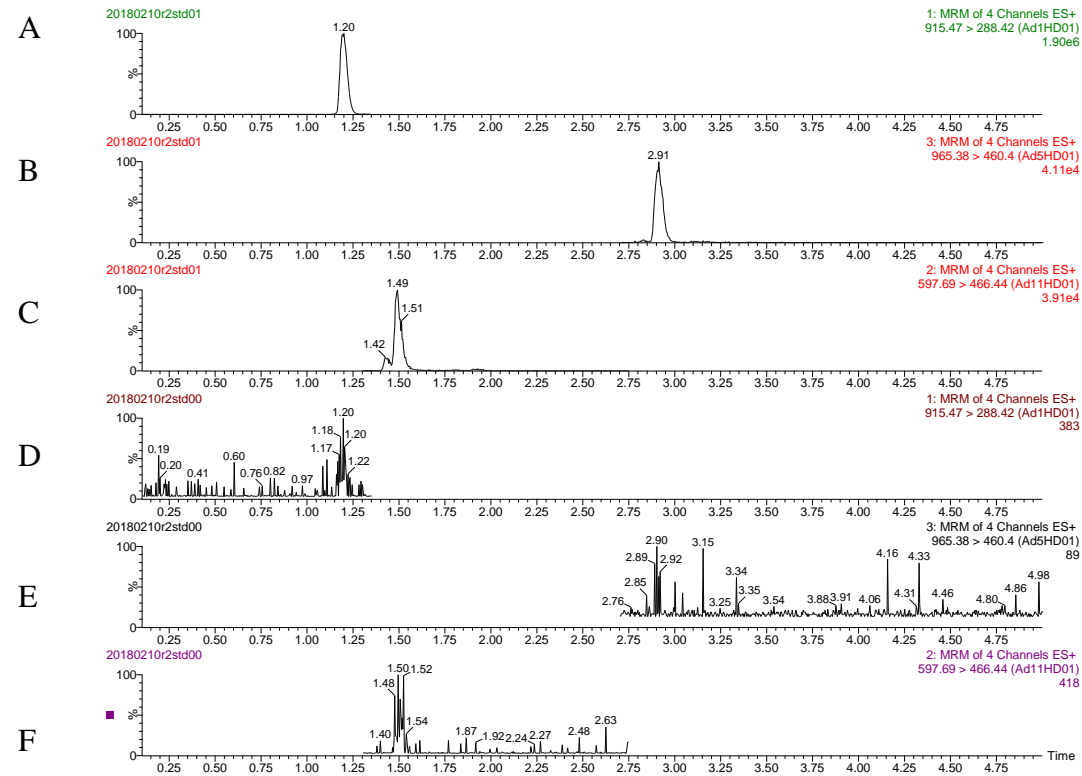


圖 十二 液相層析梯度圖之殘留量確認

圖 A, B, C 分別為標準品之 AD1H (915.47 > 288.42)、AD5H (965.38 > 460.4)、AD11H (597.69 > 466.44) 定量離子層析圖。圖 D, E, F 分別為空白樣品之 AD1H (915.47 > 288.42)、AD5H (965.38 > 460.4)、AD11H (597.69 > 466.44) 定量離子層析圖

Figure 12 Confirmation of residual level in LC gradient

Respectively, A, B, and C are chromatograms of first daughter ion of standard AD1H (915.47 > 288.42), AD5H (965.38 > 460.4), and AD11H (597.69 > 466.44). Respectively, D, E, and F are chromatograms of first daughter ion of blank sample AD1H (915.47 > 288.42), AD5H (965.38 > 460.4), and AD11H (597.69 > 466.44)

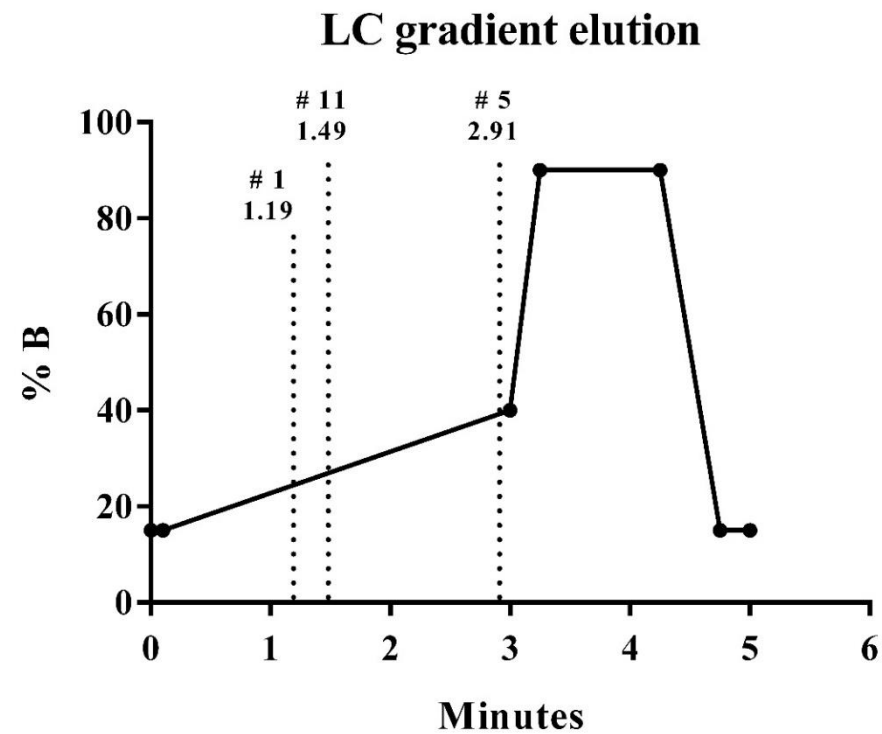


圖 十三 液相層析梯度圖與標記胜肽之滯留時間

1 為 AD1H 與 AD1D 之滯留時間；# 5 為 AD5H 與 AD5D 之滯留時間；# 11 為 AD11H 與 AD11D 之滯留時間。流動相 A 為 0.1% 甲酸 5 mM 醋酸銨水溶液，流動相 B 為 0.1% 甲酸乙腈溶液

Figure 13 Gradient of liquid chromatography and retention time labeled peptides

Retention time of AD1H, AD1D are #1. Retention time of AD5H, AD5D are #5. Retention time of AD11H, AD11D are #11. Solvent A are 5mM ammonium acetate 0.1% Formic acid in DI water. Solvent B are 0.1% Formic acid in ACN

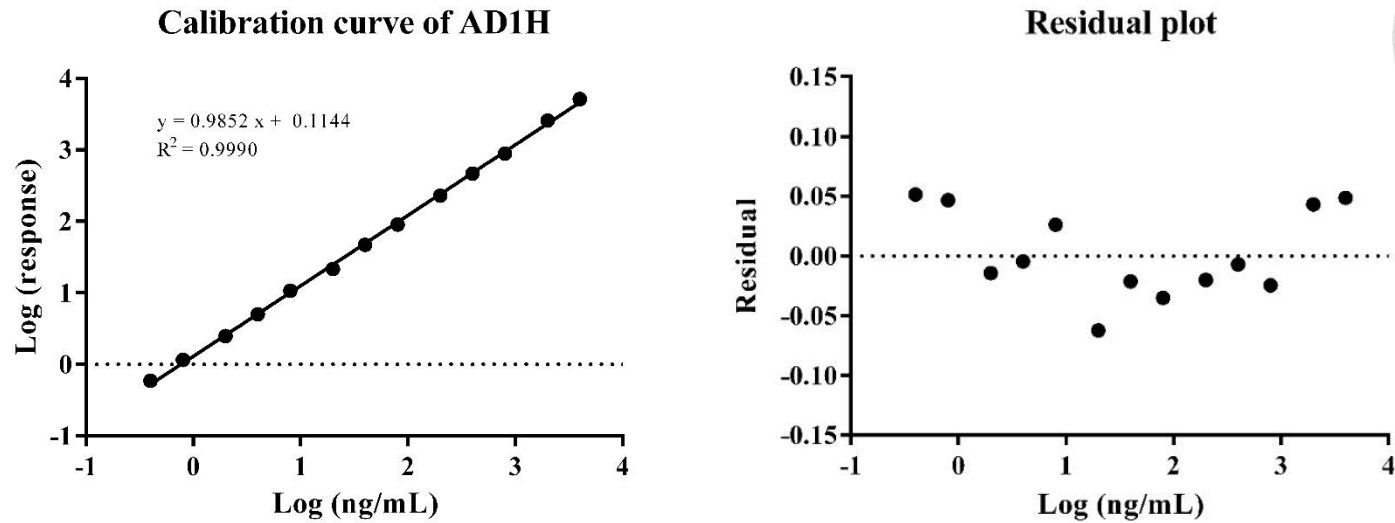


圖 十四 AD1H 胜肽之校正曲線與殘差圖

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD1H 面積 * (AD1D 濃度 / AD1D 面積)

Figure 14 Calibration curve and residual plot of AD1H

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = Area_{AD1H} * (Concentration_{AD1D} / Area_{AD1D})

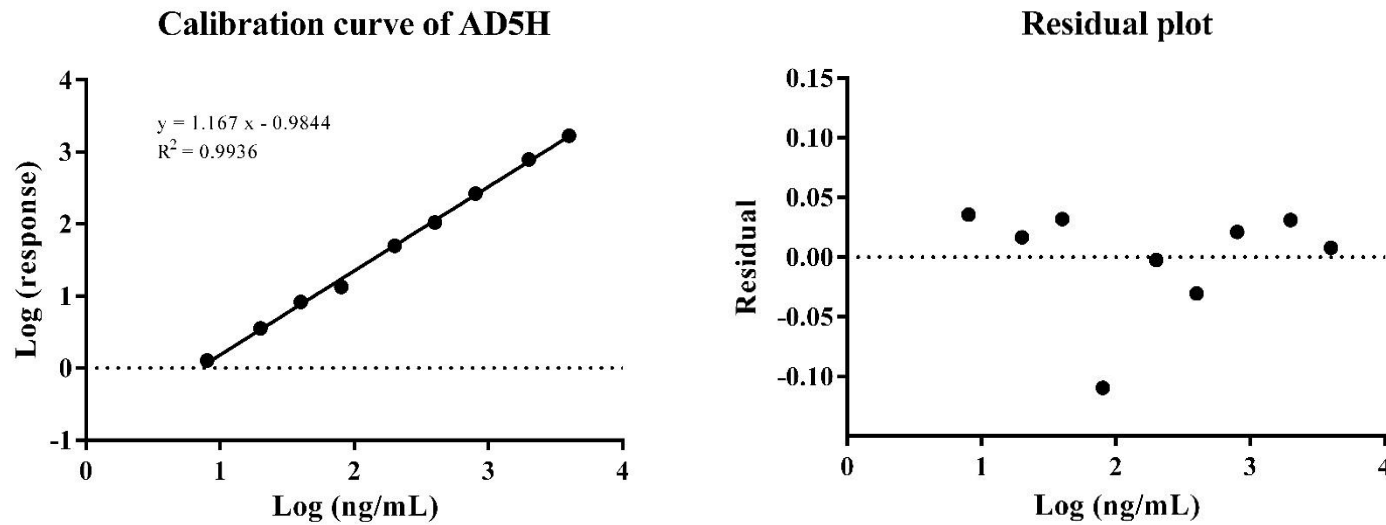


圖 十五 AD5H 胜肽之校正曲線與殘差圖

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD5H 面積 * (AD5D 濃度 / AD5D 面積)

Figure 15 Calibration curve and residual plot of AD5H

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = $\text{Area}_{\text{AD5H}} * (\text{Concentration}_{\text{AD5D}} / \text{Area}_{\text{AD5D}})$

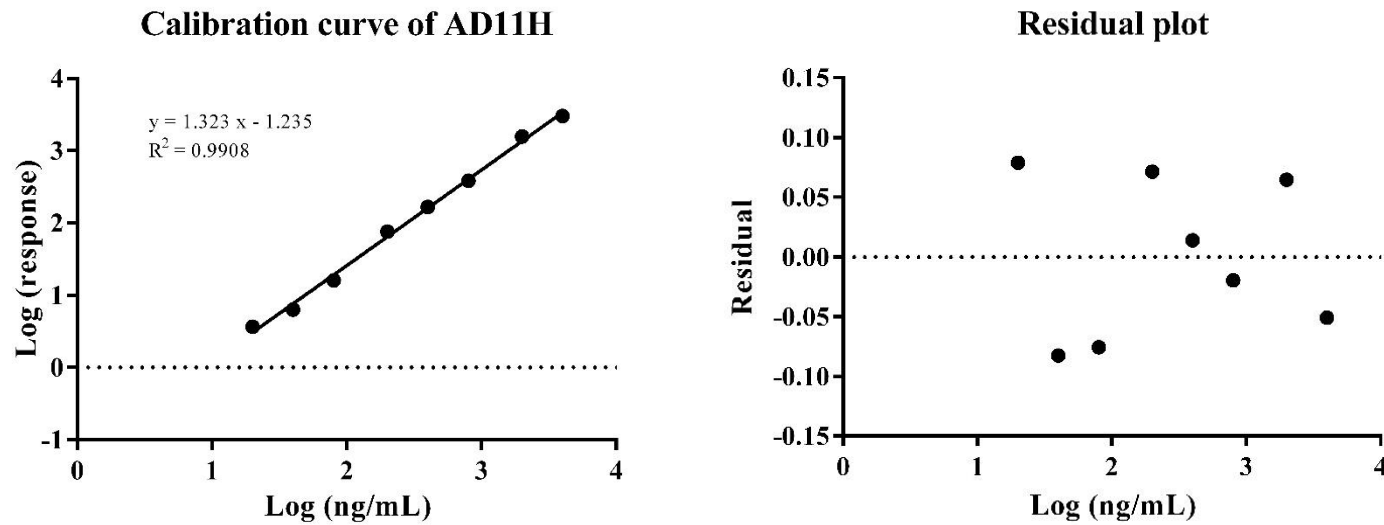


圖 十六 AD11H 胜肽之校正曲線與殘差圖

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD11H 面積 * (AD11D 濃度 / AD11D 面積)

Figure 16 Calibration curve and residual plot of AD11H

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = Area_{AD11H} * (Concentration_{AD11D} / Area_{AD11D})

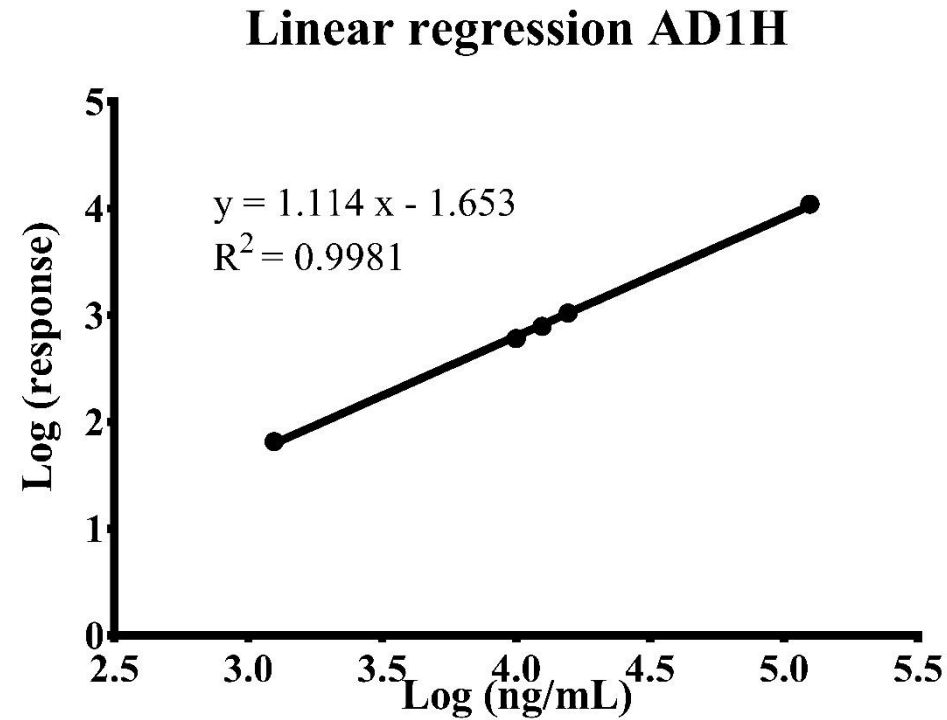


圖 十七 AD1H 於適用範圍之線性

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD1H 面積 * (AD1D 濃度 / AD1D 面積)

Figure 17 Linearity of AD1H in method range

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = Area_{AD1H} * (Concentration_{AD1D} / Area_{AD1D})

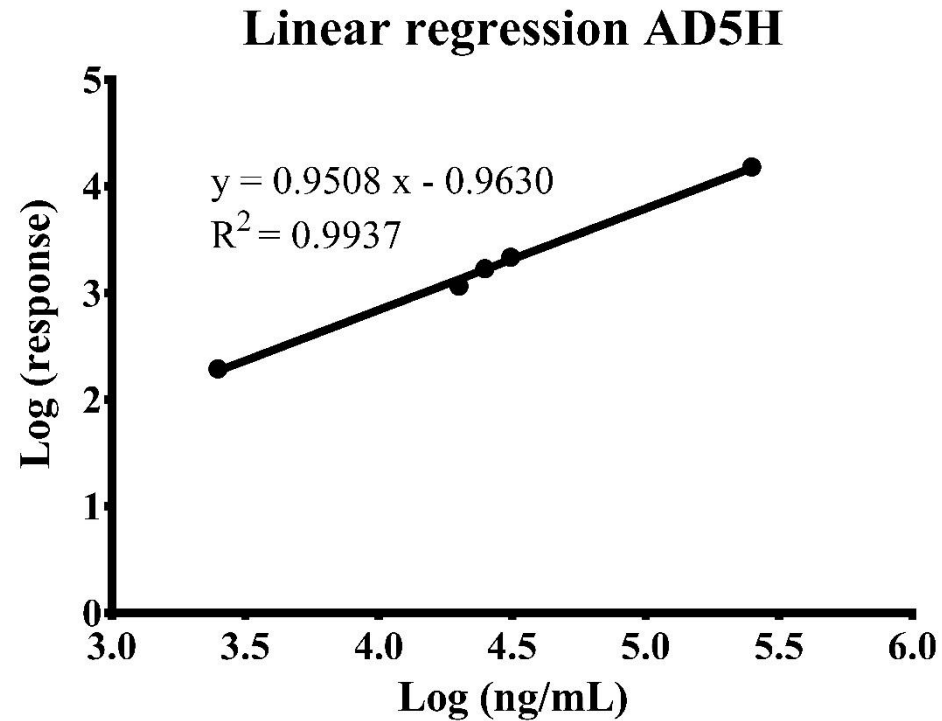


圖 十八 AD5H 於適用範圍之線性

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD5H 面積 * (AD5D 濃度 / AD5D 面積)

Figure 18 Linearity of AD5H in method range

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = Area_{AD5H} * (Concentration_{AD5D} / Area_{AD5D})

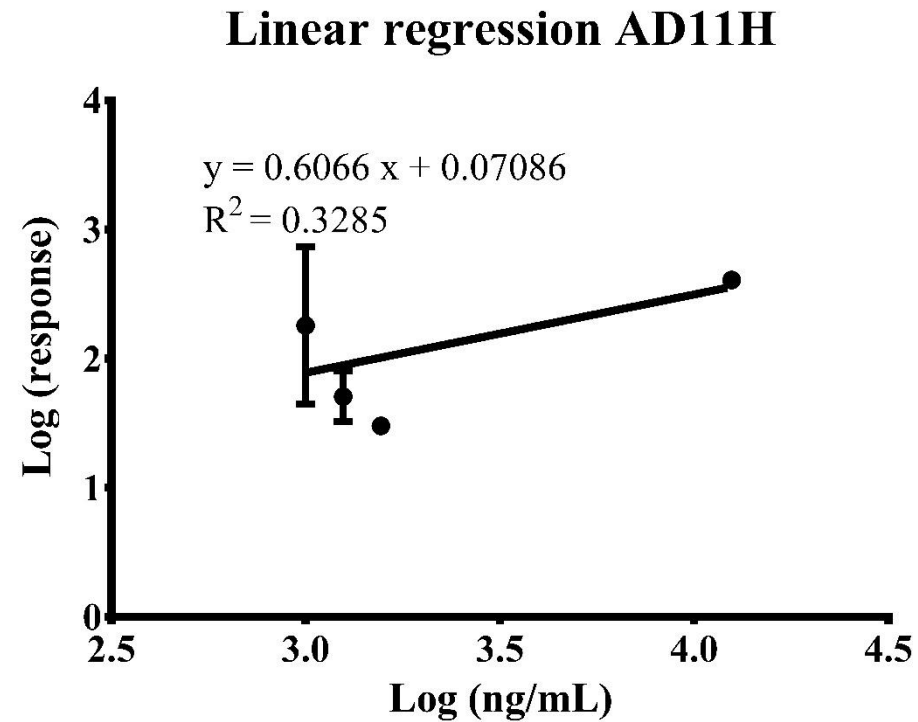


圖 十九 AD11H 於適用範圍之線性

X 軸為對數變換後之濃度，y 軸為對數變換後之反應量。反應量 = AD11H 面積 * (AD11D 濃度 / AD11D 面積)

Figure 19 Linearity of AD11H in method range

X-axis are log transformation of concentration. Y-axis are log transformation of response. Response = Area_{AD11H} * (Concentration_{AD11D} / Area_{AD11D})

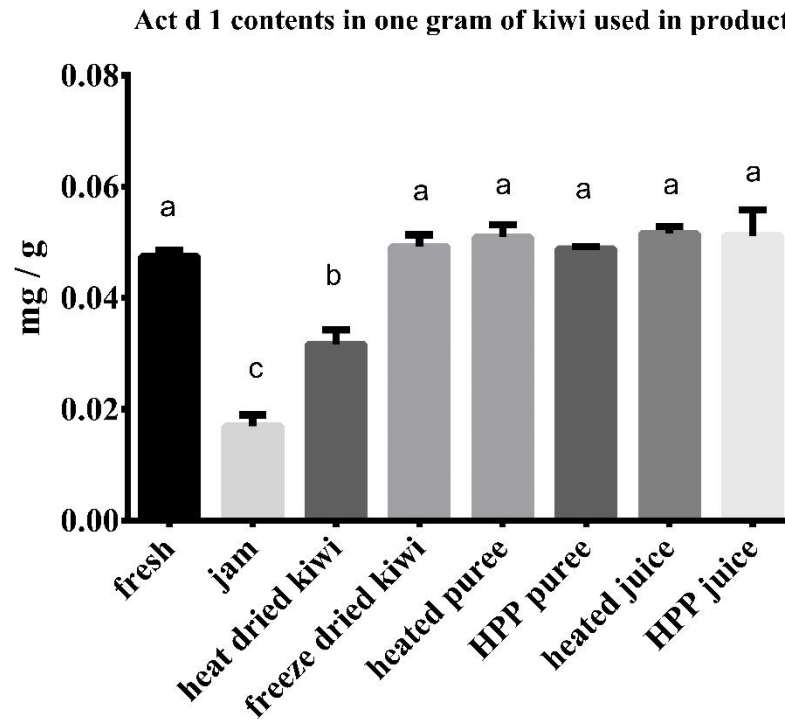


圖 二十 每克經過不同加工處理後之奇異果中 Act d 1 之含量

同樣字母間代表無顯著差異。P < 0.05 n = 3

Figure 20 Act d 1 content in one gram of different method processed kiwi fruit

No significant difference between treatments with same letter. p value < 0.05. n = 3

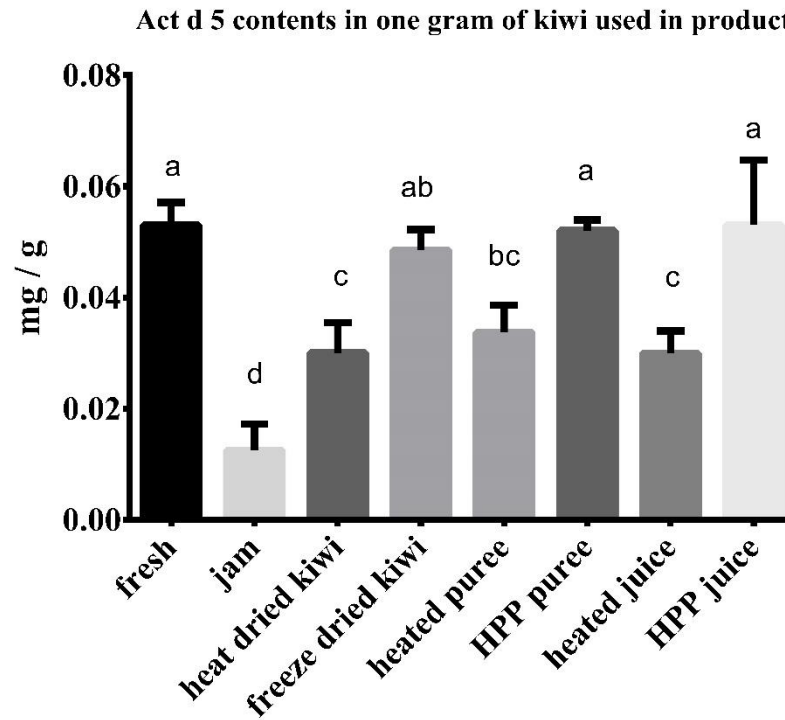


圖 二十一 每克經過不同加工處理後之奇異果中 Act d 5 之含量

同樣字母間代表無顯著差異。P < 0.05 n = 3

Figure 21 Act d 5 content in one gram of different method processed kiwi fruit

No significant difference between treatments with same letter. p value < 0.05. n = 3.

補充資料一 Q-ToF 之機器參數

Supplementary data 1. Parameter of Q-ToF

Acquisition Experiment Report

File:c:\masslynx\shih

qtof.pro\20160803_ms20160729_w034_w01_c1.raw

Note: This file contains a record of the instrument parameters used at the start of the acquisition.

Note: Where parameters are varied through the experimental method refer to that method or the spectrum header for details. These include, but are not limited to Use of LockSpray, Use of EDC, Collision Energy ramping, Pusher frequency.

Header

Acquired File Name:

20160803_MS20160729_W034_W01_C1

Acquired Date: 04-Aug-2016

Acquired Time: 23:06:53

Job Code: 2016-Q3

Task Code:

User Name:

Laboratory Name:

Instrument: SYNAPT-G2#NotSet

Conditions:

Submitter:

SampleID:

Bottle Number: 1:C,1

Description:

Instrument Calibration:

Calibration File:

Parameters

MS1 Static: None

MS1 Scanning:

Mass: 50 Da to 2000 Da.

Resolution: 0.0/0.0

Ion Energy: 0.0

Reference File: ESI_GFP_MSMS

Acquisition File: 20160617_GFP-2016-06-17-12-05-1

MS1 Scan Speed Compensation: None

MS2 Static: None

MS2 Scanning: None

MS2 Scan Speed Compensation: None

Calibration Time: 12:24

Calibration Date: 06/17/16

Coefficients



MS1 Static: None
 MS2 Static: None
 Function 1: $-0.000000000328*x^5 + 0.000000035128*x^4 + -0.000001431124*x^3 + 0.000027643585*x^2 + 0.999433471745*x + 0.010239333975$,
 Root Mass
 Function 2: $-0.000000000328*x^5 + 0.000000035128*x^4 + -0.000001431124*x^3 + 0.000027643585*x^2 + 0.999433471745*x + 0.010239333975$,
 Root Mass
 Function 3: $-0.000000000328*x^5 + 0.000000035128*x^4 + -0.000001431124*x^3 + 0.000027643585*x^2 + 0.999433471745*x + 0.010239333975$,
 Root Mass
 Function 4: $-0.000000000328*x^5 + 0.000000035128*x^4 + -0.000001431124*x^3 + 0.000027643585*x^2 + 0.999433471745*x + 0.010239333975$,
 Root Mass
 Function 5: $-0.000000000328*x^5 + 0.000000035128*x^4 + -0.000001431124*x^3 + 0.000027643585*x^2 + 0.999433471745*x + 0.010239333975$,
 Root Mass

Parameters for D:\Masslynx

PRO\KC_proteomics.PRO\ACQUDB\Survey_peptide_120min_LockRealTime_500int.EXP
 Created by Masslynx v4.1



Lock Spray Configuration:
 Reference Scan Frequency(sec) 60.000
 Reference Cone Voltage(V) 40.000
 Reference Capillary Voltage(kV) 0.000
 Reference Trap Collision Energy 6.000

Temperature Correction:
 Temperature Correction Disabled

Instrument Configuration:
 Lteff 1800.0
 Veff 7218.60
 Resolution 10000
 Min Points in Peak 2
 Acquisition Device WatersADC
 ADC Trigger Threshold (V) 1.50
 ADC Input Offset (V) -1.51
 Average Single Ion Intensity 25
 ADC Amplitude Threshold 2
 ADC Centroid Threshold -1

ADC Ion Area Threshold	3
ADC Ion Area Offset	10
ADC Pushes Per IMS Increment	1
EDC Delay Coefficient	1.5800
EDC Delay Offset	-2.2000
Tof Emulation Transfer Pulse Height (V)	0.1
Experimental Instrument Parameters	
Instrument Parameter Filename	D:\Masslynx
PRO\KC_proteomics.PRO\ACQUDB\20160803_nanoESI_pos.IP	
R	
Polarity	ES+
Analyser	Sensitivity Mode
Capillary (kV)	2.5000
Source Temperature (°C)	100
Sampling Cone	40.0000
Extraction Cone	4.0000
Source Gas Flow (mL/min)	0.00
Desolvation Temperature (°C)	300
Cone Gas Flow (L/Hr)	20.0
Nanoflow Gas Pressure (Bar)	0.2
Purge Gas Flow (mL/h)	500.0
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	500.0
LM Resolution	4.7

HM Resolution	15.0
Aperture 1	0.0
Pre-filter	2.0
Ion Energy	1.0
Manual Trap Collision Energy	FALSE
Trap Collision Energy	4.0
Manual Transfer Collision Energy	FALSE
Transfer Collision Energy	0.0
Manual Gas Control	FALSE
Trap Gas Flow (mL/min)	2.00
HeliumCellGasFlow	180.00
IMS Gas Flow (mL/min)	90.00
Detector	3275
DetectorCache	2300
Sample Infusion Flow Rate (無/min)	0
Sample Flow State	Infusion
Sample Fill Volume (無)	250
Sample Reservoir	C
LockSpray Infusion Flow Rate (無/min)	1
LockSpray Flow State	Infusion
LockSpray Reservoir	A
LockSpray Capillary (kV)	2.70
Use Manual LockSpray Collision Energy	FALSE
Collision Energy	4.0



Acceleration1	70.0
Acceleration2	200.0
Aperture2	40.0
Transport1	70.0
Transport2	70.0
Steering	0.0
Tube Lens	20
Pusher	1900.0
Pusher Offset	-0.32
Puller	1370.0
Collector	50
Collector Pulse	10.0
Stopper	10
Stopper Pulse	20.0
Entrance	62
Static Offset	120
Puller Offset	0.00
Reflectron Grid (kV)	1.500
Flight Tube (kV)	10.00
Reflectron (kV)	3.780
Use Manual Trap DC	FALSE
Trap DC Entrance	2.0
Trap DC Bias	2.0
Trap DC	0.0

Trap DC Exit	0.0
Use Manual IMS DC	FALSE
IMS DC Entrance	-20.0
Helium Cell DC	1.0
Helium Exit	-20.0
IMSBias	2.0
IMS DC Exit	20.0
USE Manual Transfer DC	FALSE
Transfer DC Entrance	5.0
Transfer DC Exit	15.0
Source Manual Control	OFF
Source Wave Velocity (m/s)	200
Source Wave Height (V)	0.2
Trap Manual Control	OFF
Trap Wave Velocity (m/s)	300
Trap Wave Height (V)	0.5
IMS Manual Control	OFF
IMS Wave Velocity (m/s)	300
IMS Wave Height (V)	0.0
Transfer Manual Control	OFF
Transfer Wave Velocity (m/s)	247
Transfer Wave Height (V)	0.2
Target Enhancement Enabled	FALSE
Target Enhancement Mode	EDC



Target Enhancement Mass	556.0
Target Enhancement Trap Height (V)	20.0
Target Enhancement Extract Height (V)	15.0
Mobility Trapping Manual Release Enabled	FALSE
Mobility Trapping Release Time (盜)	200
Mobility Trap Height (V)	15.0
Mobility Extract Height (V)	0.0
Trag Gate LUT table enabled	FALSE
TriWave Trap Gate LookUp Table	
Using Drift Time Trimming	FALSE
Drift Time Bins	0
Using Mobility Delay after Trap Release	TRUE
IMS Wave Delay (盜)	450
Variable Wave Height Enabled	FALSE
Wave Height Ramp Type	Linear
Wave Height Start (V)	8.0
Wave Height End (V)	20.0
Wave Height Using Full IMS	TRUE
Wave Height Ramp (%)	100.0
Wave Height Look Up Table	
Variable Wave Velocity Enabled	FALSE
Wave Velocity Ramp Type	Linear
Wave Velocity Start (m/s)	300.0
Wave Velocity End (m/s)	600.0

Wave Velocity Using Full IMS	TRUE
Wave Velocity Ramp (%)	100.0
Wave Velocity Look Up Table	
Backing	1.55e0
Source	9.71e-4
Sample Plate	1.00e-6
Trap	6.17e-3
Helium Cell	7.98e-5
IMS	8.03e-5
Transfer	1.00e-6
TOF	7.46e-7
SourceRFOffset	350
IMSRFOffset	350
IMSMobilityRFOffset	250
TrapRFOffset	300
TransferRFOffset	380
MS Profile Type	Auto P
MSProfileMass1	100
MSProfileDwellTime1	20
MSProfileRampTime1	20
MSProfileMass2	300
MSProfileDwellTime2	20
MSProfileRampTime2	40
MSProfileMass3	500



LockMassValidSigma 5

Acquisition mass range

Start mass 350.000

End mass 1700.000

Calibration mass range

Start mass 0.000

End mass 0.000

Experiment Reference Compound Name: GFP

Function Parameters - Function 1 - TOF SURVEY FUNCTION

[ACQUISITION]

Survey Start Time 0.00

Survey End Time 120.00

[MS SURVEY]

Survey Start Mass 350.0000

Survey End Mass 1700.0000

Discard uninteresting scans NO

Switch to MS/MS when Intensity rising above threshold

Intensity Threshold 500.0

Survey Scan Time 1.000

Survey Interscan Time 0.024

Survey Data Format Continuum

ADC Sample Frequency (GHz) 3.0

[MS/MS]

MSMS Start Mass 50.0

MSMS End Mass 2000.0

Number of components 3

Switchback threshold (intensity / second) 10.0

Use MSMS to MS Switch After Time YES

MSMS Switch After Time (sec) 10.0

Use MSMS to MS Switch After 1 Scan NO

Use MSMS to MS Switch After N Scans YES

MSMS Switch After Scans 1.0

MSMS Scan Time (sec) 1.000

MSMS Interscan Time (sec) 0.024

MSMS Data Format Continuum

Use MS/MS ipr File NO

[PEAK DETECTION]

Use Include By Charge State YES

Peak Detection Window 3.0

Charge State(s) 2,3,4,5

Number Of Include Components 60

Charge State Tolerance Window 3.0

Charge State Extraction Window 2.0

Deisotope Peak Selection YES



Charge State Tolerance Window 3.0
 Charge State Extraction Window 2.0
 Deisotope Tolerance Window 3.0
 Deisotope Extraction Window 2.0
 [COLLISION ENERGY]
 Using MS Auto Trap Collision Energy (eV) 4.000000
 Using MS Auto Transfer Collision Energy (eV) 0.000000
 [CONE VOLTAGE]
 Survey Use Tune Page CV YES
 Use Tune Page Cone Voltage YES
 [INCLUDE]
 Precursor Selection Everything
 [EXCLUDE]
 Detected Precursor Inclusion Using Real Time
 Exclusion
 Detected Precursor Inclusion Include After Time
 Include After Time (s) 120.0
 Use Exclude Masses List NO
 Use Exclude File Masses NO
 Exclude Window +/- (mDa) 100.0
 FragmentationMode CID
 Calibration Dynamic 1

 Function Parameters - Function 2 - TOF SURVEY FUNCTION

Scan Time (sec) 1.000
 Interscan Time (sec) 0.024
 Set Mass 535.5
 Start Mass 50.0
 MSMS End Mass 2000.0
 Start Time (mins) 0.00
 End Time (mins) 120.00
 Data Format Continuum
 ADC Sample Frequency (GHz) 3.0
 Use Tune Page Cone Voltage YES
 Use Auto Trap Collision Energy NO
 Using Trap Collision Energy Profile YES
 CE Profile Filename
 Using Auto Transfer Collision Energy (eV) 0.000000
 Sensitivity Normal
 Dynamic Range Normal
 Save Collapsed Retention Time Data No
 Use Rule File Filtering No
 FragmentationMode CID
 Calibration Dynamic 2

 Function Parameters - Function 3 - TOF SURVEY FUNCTION
 Scan Time (sec) 1.000
 Interscan Time (sec) 0.024



Set Mass	414.4
Start Mass	50.0
MSMS End Mass	2000.0
Start Time (mins)	0.00
End Time (mins)	120.00
Data Format	Continuum
ADC Sample Frequency (GHz)	3.0
Use Tune Page Cone Voltage	YES
Use Auto Trap Collision Energy	NO
Using Trap Collision Energy Profile	YES
CE Profile Filename	
Using Auto Transfer Collision Energy (eV)	0.000000
Sensitivity	Normal
Dynamic Range	Normal
Save Collapsed Retention Time Data	No
Use Rule File Filtering	No
FragmentationMode	CID
Calibration	Dynamic 2
Function Parameters - Function 4 - TOF SURVEY FUNCTION	
Scan Time (sec)	1.000
Interscan Time (sec)	0.024
Set Mass	648.8
Start Mass	50.0

MSMS End Mass	2000.0
Start Time (mins)	0.00
End Time (mins)	120.00
Data Format	Continuum
ADC Sample Frequency (GHz)	3.0
Use Tune Page Cone Voltage	YES
Use Auto Trap Collision Energy	NO
Using Trap Collision Energy Profile	YES
CE Profile Filename	
Using Auto Transfer Collision Energy (eV)	0.000000
Sensitivity	Normal
Dynamic Range	Normal
Save Collapsed Retention Time Data	No
Use Rule File Filtering	No
FragmentationMode	CID
Calibration	Dynamic 2
Function Parameters - Function 5 - REFERENCE	
Scan Time (sec)	1.00
Interval	60
Reference Cone Voltage	40.0
Trap Collision Energy (eV)	6.0
Calibration	Dynamic 1



ACE Experimental Record

Inlet Method File: d:\masslynx
pro\kc_proteomics.pro\acqddb\peptide_120min_250ul_a25cm

----- Run method parameters -----

Waters GI Pump

1 -----

Application Mode: Single Pump Trapping

Pump Type: BSM1

Run Time: 120.00 min

Solvent Selection A: A1

Solvent Selection B: B1

Seal Wash: 15.0 min

Switch 1: No Change

Switch 2: No Change

Switch 3: No Change

Chart Out 1: System Pressure

Chart Out 2: %B

Run Events: No

[Gradient Table]

Time(min) Flow Rate(uL/min) %A %B Curve

1. Initial 0.250 98.0 2.0

2. 0.10 0.250 90.0 10.0 6
3. 90.00 0.250 60.0 40.0 6
4. 95.00 0.250 15.0 85.0 6
5. 100.00 0.250 15.0 85.0 6
6. 105.00 0.250 98.0 2.0 6

Analytical Low Pressure Limit: 0 psi
Analytical High Pressure Limit: 10000 psi
Sample Loading Time: 3.00 min
Trapping Flow Rate: 5.000 uL/min
Trapping %A: 98.0
Trapping %B: 2.0
Trapping Low Pressure Limit: 0 psi
Trapping High Pressure Limit: 5000 psi
Flow Rate A Data Channel: No
Flow Rate B Data Channel: No
Solvent Name A: Water
Solvent Name B: Acetonitrile
Comment:
System Pressure Data Channel: Yes
Flow Rate Data Channel: No
%A Data Channel: No
%B Data Channel: No
Primary A Pressure Data Channel: No
Accumulator A Pressure Data Channel: No



Primary B Pressure Data Channel: No
Accumulator B Pressure Data Channel: No
Degasser Pressure Data Channel: No

3 -----

Run Time: 120.00 min

Pump A...

Aux Pump Role: Auxiliary
Aux Solvent Name: Water
Aux Flow Rate: 0.000 uL/min
Aux Solvent Selection: A1
Aux Low Pressure Limit: 0 psi
Aux High Pressure Limit: 10000 psi

Pump B...

Aux Pump Role: Lock Mass
Aux Solvent Name: Water
Aux Flow Rate: 0.000 uL/min
Aux Solvent Selection: B1
Aux Low Pressure Limit: 0 psi
Aux High Pressure Limit: 10000 psi

Waters Acquity AutoSampler

Run Time: 120.00 min

Comment:

Loop Option: Partial Loop

LoopOffline: Disable
Weak Wash Solvent Name: Water
Weak Wash Volume: 600 uL
Strong Wash Solvent Name: Acetonitrile
Strong Wash Volume: 200 uL
Target Column Temperature: 40.0 C
Column Temperature Alarm Band: Disabled
Target Sample Temperature: 15.0 C
Sample Temperature Alarm Band: Disabled
Full Loop Overfill Factor: Automatic
Syringe Draw Rate: Automatic
Needle Placement: 1.0
Pre-Aspirate Air Gap: Automatic
Post-Aspirate Air Gap: Automatic
Column Temperature Data Channel: No
Ambient Temperature Data Channel: No
Sample Temperature Data Channel: No
Sample Pressure Data Channel: No
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change
Switch 4: No Change
Chart Out: Sample Pressure
Sample Temp Alarm: Disabled



Column Temp Alarm: Disabled
Run Events: No
SampleLoop: 5.000

Sample Run Injection Parameter

Injection Volume (ul) - 5.00

----- oOo -----

End of experimental record.

----- Waters GI Pump Postrun Report -----

----- oOo -----

----- Waters Acquity SM Postrun Report -----

Software Version: 1.41.1164

Firmware Version: 1.41.215 (Feb 16 2009)

Checksum: 0xb9e98c4c

Serial Number: L09NPS638M

Sample Syringe Size: 100.0

Sample Loop Size: 5.0

NeedleType: PEEK

Minimum Sample Temperature: 0.0

Maximum Sample Temperature: 0.0

Average Sample Temperature: 0.0

Minimum Column Temperature: 22.1

Maximum Column Temperature: 40.1

Average Column Temperature: 0.0

Measured Loop Volume: 6.290

Measured Loop Volume No Pressure: 6.260



----- oOo -----

Function 1

Scans in function: 3956
Cycle time (secs): 1.024
Scan duration (secs): 1.000
Inter Scan Delay (secs): 0.024
Start and End Time(mins): 0.000 to 120.000
Ionization mode: ES+
Data type: Enhanced Mass
Function type: TOF MS
Mass range: 350 to 1700

Function 2

Scans in function: 990
Cycle time (secs): 1.024
Scan duration (secs): 1.000
Inter Scan Delay (secs): 0.024
Start and End Time(mins): 0.000 to 120.000
Ionization mode: ES+
Data type: Enhanced Mass
Function type: TOF Daughter
Mass range: 50 to 2000
Collision Energy: 0.0

Function 3

Scans in function: 703
Cycle time (secs): 1.024
Scan duration (secs): 1.000
Inter Scan Delay (secs): 0.024
Start and End Time(mins): 0.000 to 120.000
Ionization mode: ES+
Data type: Enhanced Mass
Function type: TOF Daughter
Mass range: 50 to 2000
Collision Energy: 0.0

Function 4

Scans in function: 1242
Cycle time (secs): 1.024
Scan duration (secs): 1.000
Inter Scan Delay (secs): 0.024
Start and End Time(mins): 0.000 to 120.000
Ionization mode: ES+
Data type: Enhanced Mass
Function type: TOF Daughter
Mass range: 50 to 2000
Collision Energy: 0.0



Function 5

Scans in function: 118
Cycle time (secs): 1.100
Scan duration (secs): 1.000
Inter Scan Delay (secs): 0.100
Start and End Time(mins): 0.000 to 120.000
Ionization mode: ES+
Data type: Enhanced Accurate Mass
Function type: TOF MS
Mass range: 350 to 1700



補充資料二 合成胜肽之資訊

Supplementary data 2. Information of synthetic peptides



國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所
核心設施服務平台 (NIIDV Core Facility)

Peptide Data Sheet

Date released: 2017/4/7

Peptide Data Sheet				
Name	Sequence	Weight (mg)	Purity	MS data
AD1	SAGAVVDIK	5 mg	97.5%	859.6 Da (+1)
AD5	NNIVDGSNAVWSALGLDK	5 mg	90.4%	1873.8 Da (+1)
AD11	GEHNSVTWTFHYEK	5 mg	94.6%	1734.4 Da (+1)

Note:
1. Lyophilized peptides are stable at room temperature for days to weeks, but for longer-term storage, it is safer to store at -20°C or colder.

Prepared by 江盛國

Checked by _____

宋旺洲

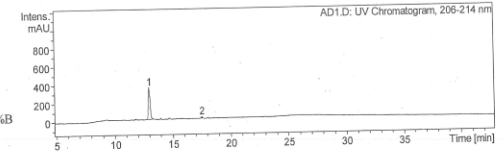
(PI or Manager)

Display Report - All Windows All Analyses

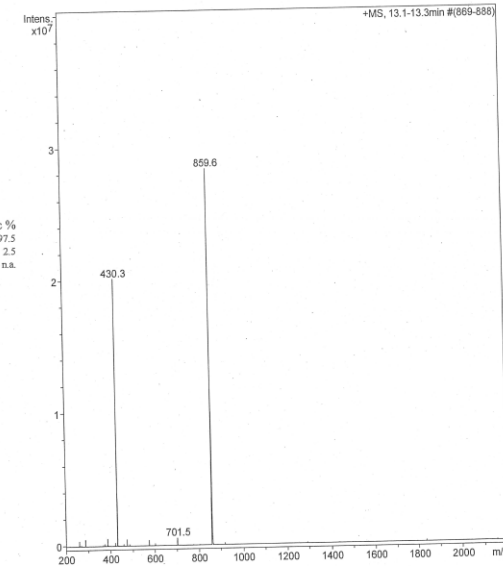
Print Date: 03/28/2017 09:30:49 AM
Acq. Date: 03/27/2017 02:48:26 PM

Analysis In

file:20170327/AD1
MW=859.0 Da
LCMSD test
Waters T3 column
B=H2O/0.1%FA,C=ACN/0.1%FA
2min/98%B,42min/15%B,43min/0%B
method=B98-15
ult_scn mode, 250-2200



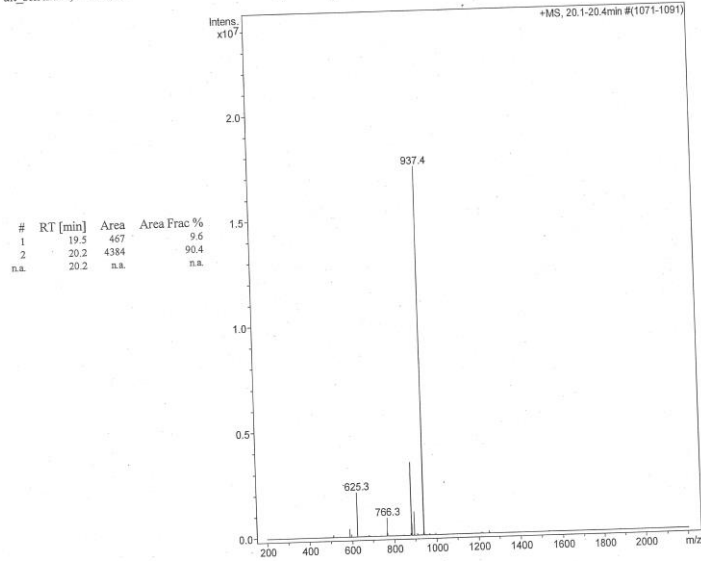
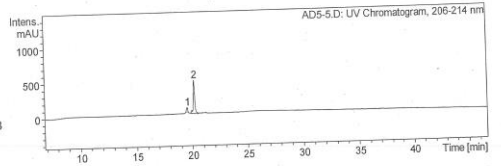
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	12.9	3909	97.5
2	17.5	100	2.5
n.a.	13.2	n.a.	n.a.



Display Report - All Windows All Analyses

Print Date: 03/30/2017 02:37:16 PM
 Acq. Date: 03/30/2017 12:46:41 PM

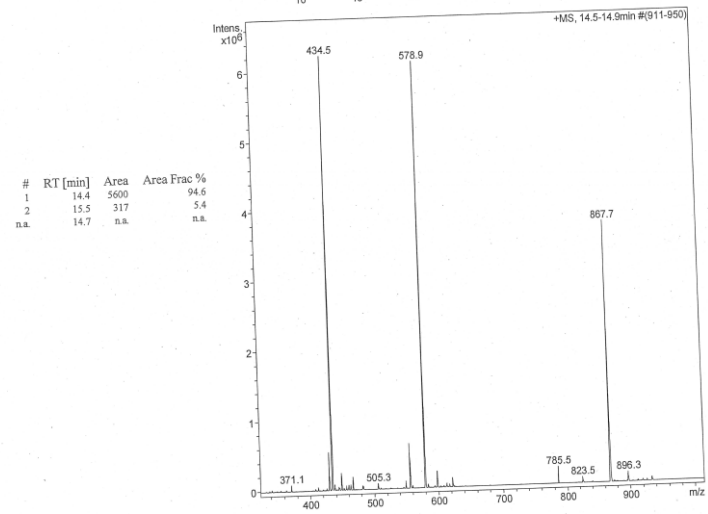
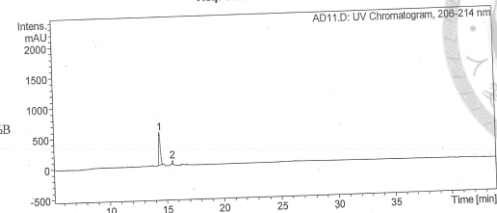
Analysis In
 file:20170330/AD5
 MW=1873.08 Da
 LCMSTD test
 Waters T3 column
 B=H₂O/0.1%FA,C=ACN/0.1%FA
 2min/98%B,4.2min/15%B,45min/0%B
 method=B98-15
 ult_scn mode, 250-2200



Display Report - All Windows All Analyses

Print Date: 03/28/2017 03:25:19 PM
 Acq. Date: 03/28/2017 10:40:38 AM

Analysis In
 file:20170327/AD11
 MW=1733.9 Da
 LCMSTD test
 Waters T3 column
 B=H₂O/0.1%FA,C=ACN/0.1%FA
 2min/98%B,4.2min/15%B,45min/0%B
 method=B98-15
 ult_scn mode, 250-2200



補充資料三 QqQ MS 之機器參數

Supplementary data 3. Parameter of QqQ MS

Acquisition Experiment Report

File:c:\masslynx\Oshih.pro\data\20180520r1s01.raw

Header

Acquired File Name: 20180520R1S01

Acquired Date: 20-May-2018

Acquired Time: 18:41:59

Job Code: 20180520

Task Code:

User Name:

Laboratory Name:

Instrument:

Conditions:

Submitter:

SampleID:

Bottle Number: 1:A,1

Description:

Instrument Calibration:

Calibration File: C:\MassLynx\Waters

PM.PRO\ACQUDB\Cal_20171110.cal

Parameters

MS1 Static:

Mass: 20 Da to 1974 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 1.0

Reference File: Naics2

Acquisition File: STATMS1

MS1 Scanning:

Mass: 10 Da to 2010 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 1.0

Reference File: Naics2

Acquisition File: SCNMS1

MS1 Scan Speed Compensation:

Scan: 100 to 2000 amu/sec.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 1.0

Reference File: Naics2

Acquisition File: FASTMS1

MS2 Static:

Mass: 20 Da to 1974 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 1.0



Reference File: Naics2
 Acquisition File: STATMS2
 MS2 Scanning:
 Mass: 10 Da to 2010 Da.
 Resolution: 15.0/15.0
 Ion Energy: 1.0
 Reference File: Naics2
 Acquisition File: SCNMS2
 MS2 Scan Speed Compensation:
 Scan: 100 to 2000 amu/sec.
 Resolution: 15.0/15.0
 Ion Energy: 1.0
 Reference File: Naics2
 Acquisition File: FASTMS2
 Calibration Time: 09:57
 Calibration Date: 11/10/17
 Coefficients
 MS1 Static: $-0.000000000000*x^4 + 0.000000001979*x^3 + -0.000003196711*x^2 + 1.002369031773*x + -0.482250194984$
 MS2 Static: $-0.000000000000*x^4 + 0.000000000874*x^3 + -0.000001445358*x^2 + 1.001225281950*x + -0.253196256198$
 Function 1: None

Function 2: None
 Function 3: None



Parameters for
 C:\MassLynx\0SHIH.PRO\ACQUDB\kiwifinalmethod.EXP

Data Processing:
 SIR / MRM Chromatogram Spike Removal OFF
 SIR / MRM Smoothing OFF
 Smoothing window size (scans) 3
 Number of smooths 2

Prescan Statistics:
 Initial Average Intensity 14.0390
 Initial Average Std Dev 2.5531
 Bunch Zero Level 0.0014
 Bunch Std Dev 0.0068
 Bunch Threshold 0.0545
 Spike Removal Std Dev 2.5528

Instrument Parameters - Function 1:
 Ionization Mode ES+
 Calibration Static 2
 Capillary (kV) 2.80 2.74

Cone (V) 55 67
 Extractor (V) 3 3
 RF Lens (V) 0.0
 Source Temperature (°C) 120 119
 Desolvation Temperature (°C) 450 442
 Cone Gas Flow (L/Hr) 150 148
 Desolvation Gas Flow (L/Hr) 700 697
 LM 1 Resolution 15.0
 HM 1 Resolution 15.0
 Ion Energy 1 1.0
 Entrance 0 -34
 Collision 0 -34
 Exit 0.0 -34.3
 LM 2 Resolution 15.0
 HM 2 Resolution 15.0
 Ion Energy 2 1.0
 Multiplier (V) 550 -556
 Syringe Pump Flow (uL/min) 100
 Pressure (m bar) 3.66e-3
 Collision Gas Flow (mL/Min) 0.20 0.20
 Source T-WAVE Parameters

Automated

Collision Cell T-WAVE Parameters

Automated

Instrument Parameters - Function 2:

Ionization Mode ES+
 Calibration Static 2
 Capillary (kV) 2.80 2.74
 Cone (V) 55 67
 Extractor (V) 3 3
 RF Lens (V) 0.0
 Source Temperature (°C) 120 119
 Desolvation Temperature (°C) 450 442
 Cone Gas Flow (L/Hr) 150 148
 Desolvation Gas Flow (L/Hr) 700 697
 LM 1 Resolution 15.0
 HM 1 Resolution 15.0
 Ion Energy 1 1.0
 Entrance 0 -34
 Collision 0 -34
 Exit 0.0 -34.3
 LM 2 Resolution 15.0
 HM 2 Resolution 15.0
 Ion Energy 2 1.0
 Multiplier (V) 550 -556
 Syringe Pump Flow (uL/min) 100



Pressure (m bar) 3.66e-3
 Collision Gas Flow (mL/Min) 0.20 0.20
 Source T-WAVE Parameters
 Automated

 Collision Cell T-WAVE Parameters
 Automated

 Instrument Parameters - Function 3:
 Ionization Mode ES+
 Calibration Static 2
 Capillary (kV) 2.80 2.74
 Cone (V) 55 67
 Extractor (V) 3 3
 RF Lens (V) 0.0
 Source Temperature (°C) 120 119
 Desolvation Temperature (°C) 450 442
 Cone Gas Flow (L/Hr) 150 148
 Desolvation Gas Flow (L/Hr) 700 697
 LM 1 Resolution 15.0
 HM 1 Resolution 15.0
 Ion Energy 1 1.0
 Entrance 0 -34
 Collision 0 -34

Exit 0.0 -34.3
 LM 2 Resolution 15.0
 HM 2 Resolution 15.0
 Ion Energy 2 1.0
 Multiplier (V) 550 -556
 Syringe Pump Flow (uL/min) 100
 Pressure (m bar) 3.66e-3
 Collision Gas Flow (mL/Min) 0.20 0.20
 Source T-WAVE Parameters
 Automated

Collision Cell T-WAVE Parameters
 Automated

ACE Experimental Record

Inlet Method File: c:\masslynx\0shih.pro\acqddb\kiwifinalmethod

----- Run method parameters -----

Waters Acquity SDS
 Run Time: 5.00 min
 Comment:
 Solvent Selection A: A2



Solvent Selection B: B1
 Low Pressure Limit: 0 psi
 High Pressure Limit: 10000 psi
 Solvent Name A: 5mM Ammonium acetate
 Solvent Name B: Acetonitrile
 Switch 1: No Change
 Switch 2: No Change
 Switch 3: No Change
 Seal Wash: 5.0 min
 Chart Out 1: System Pressure
 Chart Out 2: %B
 System Pressure Data Channel: No
 Flow Rate Data Channel: No
 %A Data Channel: Yes
 %B Data Channel: Yes
 Primary A Pressure Data Channel: No
 Accumulator A Pressure Data Channel: No
 Primary B Pressure Data Channel: No
 Accumulator B Pressure Data Channel: No
 Degasser Pressure Data Channel: No

[Gradient Table]

Time(min) Flow Rate %A %B Curve
 1. Initial 0.250 85.0 15.0
 2. 0.10 0.250 85.0 15.0 6

3. 3.00 0.250 60.0 40.0 6
 4. 3.25 0.250 10.0 90.0 6
 5. 4.25 0.250 10.0 90.0 6
 6. 4.75 0.250 85.0 15.0 6
 7. 5.00 0.250 85.0 15.0 6
 Run Events: Yes



Waters Acquity AutoSampler

Run Time: 5.00 min
 Comment:
 Load Ahead: Disabled
 Loop Option: Full Loop
 LoopOffline: 3.30
 Weak Wash Solvent Name: 10% ACN
 Weak Wash Volume: 3000 uL
 Strong Wash Solvent Name: 60% ACN/20% MeOH/20% Water
 Strong Wash Volume: 1000 uL
 Target Column Temperature: 40.0 C
 Column Temperature Alarm Band: Disabled
 Target Sample Temperature: 4.0 C
 Sample Temperature Alarm Band: Disabled
 Full Loop Overfill Factor: Automatic
 Syringe Draw Rate: Automatic
 Needle Placement: Automatic

Pre-Aspirate Air Gap: Automatic
Post-Aspirate Air Gap: Automatic
Column Temperature Data Channel: No
Ambient Temperature Data Channel: No
Sample Temperature Data Channel: No
Sample Organizer Temperature Data Channel: No
Sample Pressure Data Channel: No
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change
Switch 4: No Change
Chart Out: Sample Pressure
Sample Temp Alarm: Disabled
Column Temp Alarm: Disabled
Run Events: Yes
Needle Overfill Flush: Automatic

Sample Run Injection Parameter

Injection Volume (ul) - 10.00

----- oOo -----

End of experimental record.

----- Waters Acquity SDS Postrun Report -----

Software Version: 1.30.2075

Firmware Version: 1.30.145 (May 9 2007)

Checksum: 0x683fc9b6

Serial Number: H07UPB852M

Associated ASM ID (if configured as BSM):

Specific configured type of Solvent Manager: Acquity

Scale of flow (based on configured type of Solvent Manager):
Normal

Minimum System Pressure: 1573.8

Maximum System Pressure: 3210.3

Average System Pressure: 2766.4



Minimum Degasser Pressure: 0.5

Maximum Degasser Pressure: 0.5

Average Degasser Pressure: 0.5

----- oOo -----

----- Waters Acquity SM Postrun Report -----

Software Version: 1.30.2203

Firmware Version: 1.30.191 (May 31 2007)

Checksum: 0xd04e0aad

Serial Number: G07UPA685M

Sample Syringe Size: 100.0

Sample Loop Size: 10.0

NeedleType: PEEK

Minimum Sample Temperature: 0.0

Maximum Sample Temperature: 0.0

Average Sample Temperature: 0.0

Minimum Column Temperature: 21.9

Maximum Column Temperature: 55.4

Average Column Temperature: 0.0

----- oOo -----

Function 1

Scans in function: 330

Cycle time (secs): 0.220

Inter Scan Delay (secs): 0.005

Inter Channel Delay (secs):0.005

Span (Da): 0.100

Start and End Time(mins): 0.000 to 1.350

Ionization mode: ES+

Data type: SIR or MRM data

Function type: MRM of 4 channels



Chan Reaction	Dwell(secs)	Cone Volt.
Col.Energy Delay(secs) Compound		
1 : 915.47 > 288.42	0.050	55.0
0.005 Ad1HD01		
2 : 915.47 > 628.54	0.050	55.0
0.005 Ad1HD02		
3 : 923.54 > 292.44	0.050	55.0
0.005 Ad1DD01		
4 : 923.54 > 632.63	0.050	55.0
0.005 Ad1DD02		

Function 2

Scans in function: 378
 Cycle time (secs): 0.220
 Inter Scan Delay (secs): 0.005
 Inter Channel Delay (secs):0.005
 Span (Da): 0.100
 Start and End Time(mins): 1.300 to 2.750
 Ionization mode: ES+
 Data type: SIR or MRM data
 Function type: MRM of 4 channels

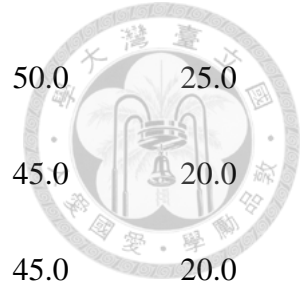
Chan Reaction	Dwell(secs)	Cone Volt.
Col.Energy Delay(secs) Compound		
1 : 597.69 > 302.35	0.050	50.0

0.005 Ad11HD02		
2 : 597.69 > 466.44	0.050	50.0
0.005 Ad11HD01		
3 : 600.47 > 527.74	0.050	45.0
0.005 Ad11DD01		
4 : 600.47 > 855.41	0.050	45.0
0.005 Ad11DD02		

Function 3

Scans in function: 614
 Cycle time (secs): 0.220
 Inter Scan Delay (secs): 0.005
 Inter Channel Delay (secs):0.005
 Span (Da): 0.100
 Start and End Time(mins): 2.700 to 5.000
 Ionization mode: ES+
 Data type: SIR or MRM data
 Function type: MRM of 4 channels

Chan Reaction	Dwell(secs)	Cone Volt.
Col.Energy Delay(secs) Compound		
1 : 965.38 > 460.40	0.050	65.0
0.005 Ad5HD01		
2 : 965.38 > 584.30	0.050	65.0
0.005 Ad5HD02		



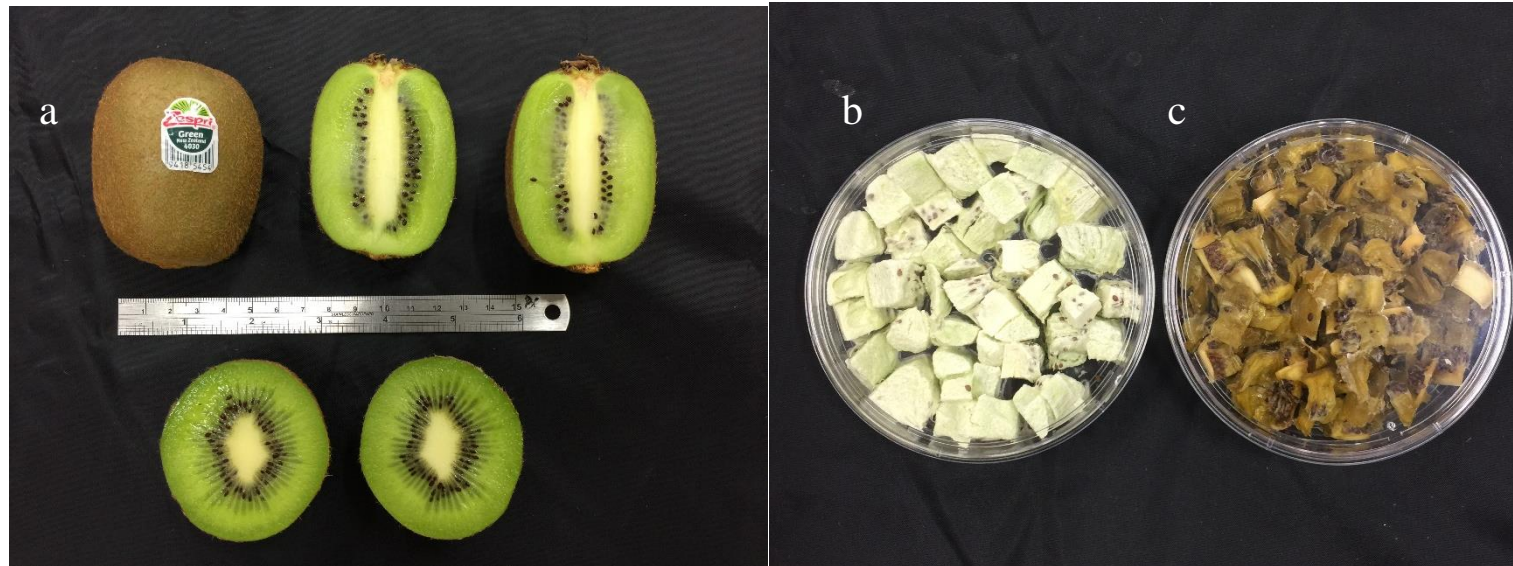
3	: 969.10 > 921.68	0.050	65.0	40.0
0.005	Ad5DD01			
4	: 969.10 > 1564.05	0.050	65.0	35.0
0.005	Ad5DD02			





補充資料四 奇異果果實與果乾外觀，a、b、c 分別為果實外觀、冷凍乾燥奇異果乾、熱風乾燥奇異果乾

Supplementary data 4. Appearance of kiwi fruit and dried fruit



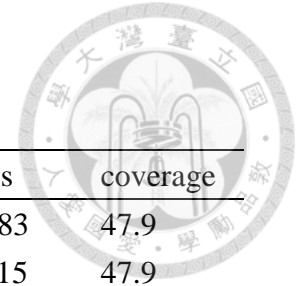


補充資料五 各產品製作使用果實之可溶性固形物與重量

Supplementary data 5. Soluble solids and weight of fruits used in kiwi product preparation

Product	#	Soluble solids (°Brix)	Fruit weight (g)
Heat dried kiwi,	1	14	122.1
Freeze dried kiwi	2	15	124.1
	3	13	121.74
	4	14.5	123.89
	5	13.5	119.4
	Jam	1	12.5
2		10	120.72
3		11.5	124.98
4		13.5	123.23
Fresh, Heated puree, HPP puree, Heated juice, HPP juice	1	13	117.6
	2	13.5	122.3
	3	12.5	123.26
	4	12	117.8
	5	13.5	117.94
	6	12	116.13
	7	13.5	118.89
	8	13	124.93

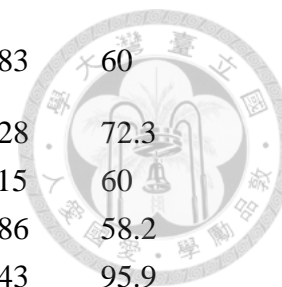
補充資料六 Q-ToF 複雜蛋白質定序結果



Supplementary data 6. Results of protein sequencing result from Q-ToF

No.	gi number	description	score	mass	coverage
1	gi 146215974	actinidin Act1a [Actinidia deliciosa]	1577	42083	47.9
2	gi 166317	actinidin [Actinidia deliciosa] RecName: Full=Kiwellin; AltName: Allergen=Act d 5; Contains: RecName:	1529	42115	47.9
3	gi 85701136	Full=Kissper; Contains: RecName: Full=KiTH-3; Contains: RecName: Full=KiTH-1; Contains: RecName: Full=KiTH-2	1469	19955	71.4
4	gi 906848987	Chain A, Crystal Structure Of The Kiwifruit Allergen Act D 5	1445	19877	71.4
5	gi 82469930	11S globulin-like protein [Actinidia chinensis]	1153	52515	57.6
6	gi 71057064	thaumatin-like protein [Actinidia deliciosa]	906	24205	60.9
7	gi 441482346	kiwellin [Actinidia deliciosa]	784	22198	72.3
8	gi 550544357	Chain A, Crystal Structure Of Kiwi-fruit Allergen Act D 2	780	21600	60.2
9	gi 441482348	kiwellin [Actinidia deliciosa] RecName: Full=Thaumatococcus diguana; AltName: Allergen=Act d 2; Flags:	751	22229	72.3
10	gi 190358875	Precursor	744	24205	54.2
11	gi 441482350	kiwellin [Actinidia deliciosa]	740	22224	71.4
12	gi 82469932	11S globulin-like protein [Actinidia chinensis]	692	31530	62.4
13	gi 672886569	Chain A, Crystal Structure Of Kiwellin	686	19736	75.7
14	gi 1170601	RecName: Full=Fruit protein pKIWI502 [Actinidia deliciosa]	677	35177	60.3
15	gi 312451836	actinidin [Actinidia chinensis]	661	42080	60
16	gi 190358935	RecName: Full=Actinidain; Short=Actinidin; AltName: Allergen=Act c 1; Flags: Precursor [Actinidia chinensis]	659	42145	60

17	gi 193806686	RecName: Full=Actinidain; Short=Actinidin; AltName: Full=Allergen Act d 1; AltName: Allergen=Act d 1; Flags: Precursor	658	42083	60
18	gi 441482352	kiwellin [Actinidia deliciosa]	644	22228	72.3
19	gi 2144501	actinidain (EC 3.4.22.14) precursor - kiwi fruit	638	42115	60
20	gi 441482356	kiwellin [Actinidia eriantha]	624	22286	58.2
21	gi 157829826	Chain A, Crystal Structure Of Actinidin-E-64 Complex+ RecName: Full=Pectinesterase inhibitor; AltName: Full=AdPMEI;	585	23543	95.9
22	gi 158518418	Short=PMEI; AltName: Full=Pectin methylesterase inhibitor; Flags: Precursor [Actinidia deliciosa]	511	19880	42.7
23	gi 146215980	actinidin Act2a [Actinidia deliciosa]	509	41619	30.7
24	gi 313507179	Chain A, Crystallographic Refinement Of The Structure Of Actinidin At 1.7 Angstroms Resolution By Fast Fourier Least-Squares Methods	497	23668	51.8
25	gi 450237	pKIWI502 [Actinidia deliciosa var. deliciosa]	490	35177	57.1
26	gi 27544454	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	452	19878	41.6
27	gi 332319679	RecName: Full=Kirola; AltName: Allergen=Act d 11 [Actinidia deliciosa]	437	17393	58.7
28	gi 27544452	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	412	19880	42.7
29	gi 441482370	thaumatin-like protein [Actinidia chinensis]	370	24251	36.4
30	gi 356516587	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like [Glycine max]	363	36714	30.2
31	gi 593331620	hypothetical protein PHAVU_008G012600g [Phaseolus vulgaris]	361	70773	13.3
32	gi 566146990	heat shock protein 70 cognate [Populus trichocarpa]	351	71837	11.3
33	gi 695052519	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	336	71160	14
34	gi 160419153	RecName: Full=Pectinesterase; Short=PE; AltName: Full=Pectin	320	35346	26.2



		methylesterase [Actinidia deliciosa]			
35	gi 697124150	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like [Nicotiana tomentosiformis]	312	36715	28.2
36	gi 568214447	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like [Solanum tuberosum]	300	36701	27
37	gi 595971302	hypothetical protein PRUPE_ppa022368mg [Prunus persica]	288	36545	20.2
38	gi 27544456	pectinmethylesterase inhibitor [Actinidia deliciosa]	287	15731	33.3
39	gi 40807635	phytocystatin [Actinidia deliciosa]	287	12748	44.8
40	gi 146215982	actinidin Act2b [Actinidia eriantha]	286	41917	19
41	gi 590646878	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2 [Theobroma cacao]	279	36685	18.4
42	gi 675272222	glycosyltransferase [Actinidia deliciosa]	267	52600	18.6
43	gi 763782358	hypothetical protein B456_008G119200 [Gossypium raimondii]	267	66897	9.6
44	gi 297733609	unnamed protein product [Vitis vinifera]	267	37420	26.2
45	gi 224055669	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase family protein [Populus trichocarpa]	267	36556	31.8
46	gi 146215978	actinidin Act1c [Actinidia eriantha]	264	40818	14.1
47	gi 1143381	polygalacturonase inhibitor [Actinidia deliciosa]	248	36141	26.3
48	gi 672160369	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic [Phoenix dactylifera]	244	36988	20.3
49	gi 146215986	actinidin Act2d [Actinidia eriantha]	243	42572	16
50	gi 353259703	glyeraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Rosa multiflora]	243	36368	27.1
51	gi 388514675	unknown [Lotus japonicus]	243	36366	27
52	gi 720081635	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic [Nelumbo nucifera]	243	36497	27



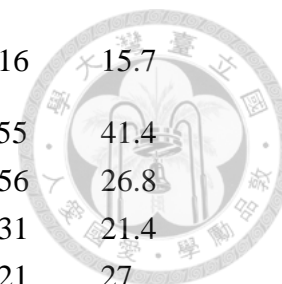
53	gi 262317107	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Manihot esculenta</i>]	241	13226	38.4
54	gi 661890488	unnamed protein product [<i>Coffea canephora</i>]	237	36773	17.1
55	gi 332651142	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Jacaranda mimosifolia</i>]	236	21240	35.6
56	gi 672206251	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic, partial [<i>Phoenix dactylifera</i>]	235	35600	22
57	gi 575074860	glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase [<i>Acacia mangium</i>]	234	36756	17.8
58	gi 346682873	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C [<i>Scoparia dulcis</i>]	234	36597	21.4
59	gi 111162635	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Nicotiana attenuata</i>]	234	21685	30.9
60	gi 441482376	thaumatin-like protein [<i>Actinidia deliciosa</i>]	232	26925	25.9
61	gi 902209207	hypothetical protein SOVF_091780 [<i>Spinacia oleracea</i>]	223	36908	19.7
62	gi 602617354	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Ipomoea nil</i>]	222	36952	14.5
63	gi 12274936	osmotin-like protein [<i>Fagus sylvatica</i>]	219	13761	24
64	gi 225430200	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100252479 [<i>Vitis vinifera</i>]	218	40308	10.9
65	gi 697149119	PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 16, chloroplastic-like [<i>Nicotiana tomentosiformis</i>]	214	28274	36.5
66	gi 743762094	PREDICTED: thaumatin-like protein [<i>Elaeis guineensis</i>]	213	19567	29.3
67	gi 573956655	PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic-like [<i>Oryza brachyantha</i>]	211	27806	36.9
68	gi 922074392	Thaumatin-like protein, partial [<i>Cryptostegia grandiflora</i>]	210	22036	20.7
69	gi 133917261	major chlorophyll a/b binding protein LHCB1.2 [<i>Spinacia oleracea</i>]	204	28321	36.3
70	gi 120676	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic, partial [<i>Nicotiana tabacum</i>]	203	35511	14.7
71	gi 743877054	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1 [<i>Elaeis guineensis</i>]	203	37073	21.4



72	gi 343794766	ACC oxidase 3 [Actinidia chinensis]	202	36230	25.1
73	gi 697176947	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [Nicotiana tomentosiformis]	202	36614	17.2
74	gi 460376914	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101245729 [Solanum lycopersicum]	202	58825	18.6
75	gi 262316963	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Manihot angustiloba]	202	13293	38.4
76	gi 529280061	thaumatin protein [Actinidia eriantha]	200	24275	20
77	gi 75224035	RecName: Full=Cysteine proteinase inhibitor 1; Short=KCPI1; AltName: Full=Phytocystatin; AltName: Allergen=Act d 4; Flags: Precursor [Actinidia deliciosa]	196	12748	44.8
78	gi 257815169	NAD-dependent glyceraldehyde 3-P dehydrogenase [Solanum chacoense]	195	36648	22.8
79	gi 629095094	hypothetical protein EUGRSUZ_H03863 [Eucalyptus grandis]	188	22830	29.2
80	gi 720019903	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104600806 [Nelumbo nucifera]	187	104625	4.1
81	gi 460367572	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101251618 [Solanum lycopersicum]	187	43683	7.7
82	gi 562006	PsHSP71.2 [Pisum sativum]	186	71122	8.6
83	gi 502088397	PREDICTED: elongation factor 2 [Cicer arietinum]	185	94048	13
84	gi 115820	RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B, chloroplastic; AltName: Full=Chlorophyll a-b binding protein type II 1B; Short=CAB; AltName: Full=LHCP; Flags: Precursor [Pinus sylvestris]	183	29014	35.4
85	gi 702296909	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104437065 [Eucalyptus grandis]	182	40138	12.7
86	gi 146215984	actinidin Act2c [Actinidia arguta]	181	42036	8.7
87	gi 743762086	PREDICTED: thaumatin-like protein [Elaeis guineensis]	181	17491	34.1
88	gi 697131596	PREDICTED: luminal-binding protein 4-like [Nicotiana tomentosiformis]	180	73297	6.2



89	gi 658055683	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: polyubiquitin-like [Malus domestica]	180	50516	15.7
90	gi 899115	polyubiquitin, partial [Solanum tuberosum]	180	11055	41.4
91	gi 1480012	putative ubiquitin extension protein [Brassica rapa]	179	12856	26.8
92	gi 33338347	osmotin-like pathogenesis-related protein [Gossypium hirsutum]	177	26031	21.4
93	gi 73747822	ubiquitin monomer protein [Morus mongolica]	177	17021	27
94	gi 3789940	tetra-ubiquitin [Saccharum hybrid cultivar H32-8560]	176	34202	16.4
95	gi 657990784	PREDICTED: polyubiquitin 3 [Malus domestica]	176	34346	13.4
96	gi 194700378	unknown [Zea mays]	175	28066	33.5
97	gi 115786	RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic; AltName: Full=LHCII type I CAB; Short=LHCP; Flags: Precursor	175	27977	23.4
98	gi 802555724	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105628728 [Jatropha curcas]	174	39640	9.3
99	gi 3789942	polyubiquitin [Saccharum hybrid cultivar H32-8560]	174	42642	10.8
100	gi 6706333	NADP-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating) [Apium graveolens]	173	63211	14.9
101	gi 658020066	PREDICTED: polyubiquitin-like [Malus domestica]	173	51146	9
102	gi 225435367	PREDICTED: kiwellin-like [Vitis vinifera]	171	22602	14.8
103	gi 460391793	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [Solanum lycopersicum]	169	36661	22.8
104	gi 255540341	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	168	36816	16.6
105	gi 3023814	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [Craterostigma plantagineum]	167	36454	16.6
106	gi 1657859	chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor [Triticum aestivum]	166	28206	25.6
107	gi 149391359	polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers, partial [Oryza sativa Indica]	166	22628	14.9



		Group]			
108	gi 2196774	chlorophyll a/b-binding protein [Mesembryanthemum crystallinum]	165	28391	25.5
109	gi 902177258	hypothetical protein SOVF_158250 [Spinacia oleracea]	164	36716	17.8
110	gi 698451870	PREDICTED: malate dehydrogenase, chloroplastic isoform X1 [Nicotiana sylvestris]	163	46614	12.2
111	gi 297306780	light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	162	28200	25.6
112	gi 302770174	hypothetical protein SELMODRAFT_169833 [Selaginella moellendorffii]	162	37420	12.9
113	gi 698467578	PREDICTED: ubiquitin-like, partial [Nicotiana sylvestris]	162	13440	25.2
114	gi 380505028	GAPDH2 [Ipomoea purpurea]	161	36843	13.4
115	gi 659130004	PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Cucumis melo]	160	84601	5.2
116	gi 848900783	PREDICTED: transcription initiation factor TFIID subunit 1 [Erythranthe guttatus]	158	87415	3.3
117	gi 674231974	hypothetical protein AALP_AA8G018200 [Arabis alpina]	157	120413	4.4
118	gi 657956519	PREDICTED: polyubiquitin-like [Malus domestica]	157	51000	6.6
119	gi 6097875	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cucumis melo]	154	11383	31.5
120	gi 166863966	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [Actinidia deliciosa var. chlorocarpa]	154	13842	41.7
121	gi 209865725	cell division cycle protein [Dimocarpus longan]	153	89525	5.6
122	gi 470125977	PREDICTED: cell division cycle protein 48 homolog [Fragaria vesca subsp. vesca]	153	89968	5.5
123	gi 720072061	PREDICTED: enolase 1-like [Nelumbo nucifera]	152	47900	20.9
124	gi 848902662	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	152	36731	15.4



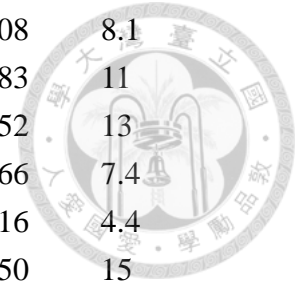
		[<i>Erythranthe guttatus</i>]			
125	gi 802741987	PREDICTED: protein P21-like [<i>Jatropha curcas</i>]	152	24254	21.8
126	gi 720100552	PREDICTED: elongation factor 1-alpha, partial [<i>Nelumbo nucifera</i>]	151	42234	9.4
127	gi 674241778	hypothetical protein AALP_AA5G159700 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	151	47512	20.3
128	gi 697153336	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104120779 [<i>Nicotiana glauca</i> subsp. <i>tomentosiformis</i>]	150	39784	6
129	gi 425194	heat shock protein [<i>Spinacia oleracea</i>]	148	70825	10.8
130	gi 920715425	hypothetical protein LR48_Vigan10g140500 [<i>Vigna angularis</i>]	147	27992	33.7
131	gi 502152034	PREDICTED: malate dehydrogenase, chloroplastic [<i>Cicer arietinum</i>]	147	43041	8.6
132	gi 674882733	BnaC06g01970D [<i>Brassica napus</i>]	147	54664	4.8
133	gi 38228695	taumatin [<i>Fagus sylvatica</i>]	146	17063	23.1
134	gi 255073915	malate dehydrogenase [<i>Micromonas sp. RCC299</i>]	145	33424	3.8
135	gi 270271313	pathogenesis-related thaumatin, partial [<i>Populus deltoides</i>]	145	26179	12.4
136	gi 343794768	ACC oxidase 3 [<i>Actinidia deliciosa</i>]	144	36242	28.5
137	gi 641827540	hypothetical protein CISIN_1g003165mg [<i>Citrus sinensis</i>]	143	83581	12
138	gi 226263	chlorophyll a/b binding protein	142	26194	33.1
139	gi 731343396	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>]	142	36966	13.2
140	gi 728813961	Elongation factor 2 [<i>Gossypium arboreum</i>]	142	94023	12.1
141	gi 573916676	PREDICTED: luminal-binding protein-like [<i>Oryza brachyantha</i>]	141	79609	3.7
142	gi 567922868	hypothetical protein CICLE_v10010751mg [<i>Citrus clementina</i>]	140	24886	19.1
143	gi 83839213	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Lilium longiflorum</i>]	140	35065	17.2
144	gi 255579310	pyruvate decarboxylase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	140	65328	7.1
145	gi 470133355	PREDICTED: pyruvate decarboxylase 2 [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]	140	65067	7.1



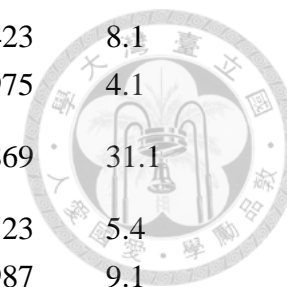
146	gi 40807639	cystatin [<i>Actinidia eriantha</i>]	140	12704	29.6
147	gi 227139	chlorophyll a/b binding protein P27	139	24986	23.2
148	gi 558695306	osmotin, partial [<i>Morus alba</i>]	139	25318	7.4
149	gi 357112708	PREDICTED: pyruvate decarboxylase 2 [<i>Brachypodium distachyon</i>]	139	64711	7.1
150	gi 225425884	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	137	36736	18.9
151	gi 731312995	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein-like [<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>]	136	69676	6.8
152	gi 2911148	NADP-malic enzyme [<i>Aloe arborescens</i>]	136	65120	6.6
153	gi 258598075	pathogenesis-related protein 5 [<i>Panax ginseng</i>]	135	27523	19.9
154	gi 255553512	conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	133	39587	6.8
155	gi 441482374	thaumatin-like protein [<i>Actinidia deliciosa</i>]	132	26953	21
156	gi 658008796	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial [<i>Malus domestica</i>]	131	60001	10.4
157	gi 595864955	hypothetical protein PRUPE_ppa010081mg [<i>Prunus persica</i>]	130	28111	22.6
158	gi 6716783	chlorophyll a/b binding protein precursor [<i>Euphorbia esula</i>]	129	28428	22.4
159	gi 227138	chlorophyll a/b binding protein P25	129	24379	14.6
160	gi 474238080	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic [<i>Triticum urartu</i>]	129	34579	10.2
161	gi 359754905	chloroplast photosystem II light harvesting complex protein type I, partial [<i>Oxytropis maydelliana</i>]	128	25419	25.2
162	gi 255549002	conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	128	39980	8.5
163	gi 115780	RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic; AltName: Full=LHCII type I CAB; Short=LHCP; Flags: Precursor [<i>Spinacia oleracea</i>]	128	28406	22.5
164	gi 543177087	hypothetical protein [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	127	37276	6.7
165	gi 557480652	NADP-malic enzyme [<i>Malus domestica</i>]	127	55357	15.7



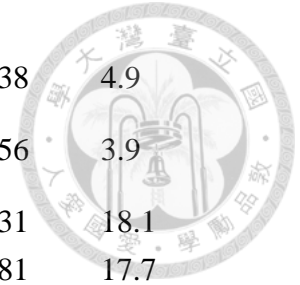
166	gi 148906365	unknown [<i>Picea sitchensis</i>]	126	48108	8.1
167	gi 565466512	hypothetical protein CARUB_v10017251mg [<i>Capsella rubella</i>]	126	47683	11
168	gi 34334177	osmotin-like pathogenesis-related protein 5 [<i>Gossypium hirsutum</i>]	125	22752	13
169	gi 146215976	actinidin Act1b [<i>Actinidia arguta</i>]	124	41966	7.4
170	gi 568865464	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein-like [<i>Citrus sinensis</i>]	123	75016	4.4
171	gi 703148997	hypothetical protein L484_007509 [<i>Morus notabilis</i>]	123	22650	15
172	gi 15221761	eukaryotic initiation factor 4A-2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	123	46733	8
173	gi 685265942	PREDICTED: eukaryotic initiation factor 4A-1-like [<i>Brassica rapa</i>]	123	46575	8.5
174	gi 703102348	hypothetical protein L484_003208 [<i>Morus notabilis</i>]	122	40553	6.1
175	gi 224059642	adenine nucleotide translocator family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	122	42074	6.2
176	gi 685377861	PREDICTED: ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial-like [<i>Brassica rapa</i>]	122	40728	6.4
177	gi 166864002	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Actinidia deliciosa</i>]	121	13923	37.1
178	gi 71000469	methionine synthase [<i>Beta vulgaris</i>]	120	87748	6.8
179	gi 388505572	unknown [<i>Lotus japonicus</i>]	120	46707	8
180	gi 475604106	Heat shock cognate 70 kDa protein [<i>Aegilops tauschii</i>]	120	70244	3.9
181	gi 299152362	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C [<i>Thymus vulgaris</i>]	119	19368	20.5
182	gi 697110354	PREDICTED: protein P21-like [<i>Nicotiana tomentosiformis</i>]	119	25281	19
183	gi 922339163	heat shock cognate 70 kDa protein [<i>Medicago truncatula</i>]	117	38286	12.5
184	gi 659067435	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like [<i>Cucumis melo</i>]	116	36357	19
185	gi 347361140	methionine synthase [<i>Camellia sinensis</i>]	115	84781	6.5
186	gi 62631798	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Spathandra blakeoides</i>]	115	13153	39.5
187	gi 566167529	hypothetical protein POPTR_0004s20220g [<i>Populus trichocarpa</i>]	114	90366	6.1
188	gi 158668032	pathogenesis-related thaumatin-like protein [<i>Coffea arabica</i>]	112	12916	19.8



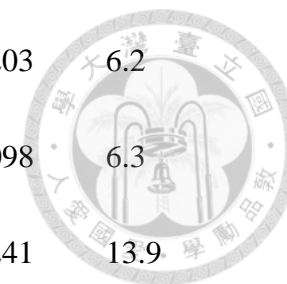
189	gi 902236560	hypothetical protein SOVF_015940 [<i>Spinacia oleracea</i>]	110	49423	8.1
190	gi 13897312	luminal binding protein, BiP, partial [<i>Scherffelia dubia</i>]	109	72975	4.1
191	gi 166864084	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Actinidia deliciosa</i> var. <i>chlorocarpa</i>]	109	13869	31.1
192	gi 719994898	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104595325 [<i>Nelumbo nucifera</i>]	109	40523	5.4
193	gi 729334303	PREDICTED: elongation factor 2-like [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	108	93987	9.1
194	gi 567893111	hypothetical protein CICLE_v10031881mg [<i>Citrus clementina</i>]	108	39848	6.8
195	gi 729436502	PREDICTED: osmotin-like protein OSM34 [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	108	26358	12.3
196	gi 138352662	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Prosopis argentina</i>]	108	9492	31.5
197	gi 593263318	hypothetical protein PHAVU_011G213200g [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	108	41699	6.2
198	gi 734366716	NADP-dependent malic enzyme [<i>Glycine soja</i>]	106	64057	7.7
199	gi 702324477	PREDICTED: thaumatin-like protein [<i>Eucalyptus grandis</i>]	105	45595	5.6
200	gi 502124745	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101508759 [<i>Cicer arietinum</i>]	105	39731	7.1
201	gi 310942958	Chain A, Actinidin From <i>Actinidia Arguta</i> Planch (Sarusashi)	104	23956	17.7
202	gi 593697638	hypothetical protein PHAVU_005G058100g [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	104	92531	9.3
203	gi 14290147	thaumatin-like protein [<i>Sambucus nigra</i>]	104	24399	7.5
204	gi 300078580	peroxiredoxin [<i>Jatropha curcas</i>]	102	24884	20.5
205	gi 760449679	Cell division control protein 48-like protein E [<i>Auxenochlorella protothecoides</i>]	102	104853	3.2
206	gi 83656805	osmotin [<i>Rosa roxburghii</i>]	101	19169	16.9
207	gi 255581663	alpha-glucosidase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	101	103335	2.4
208	gi 4456760	osmotin-like protein [<i>Quercus suber</i>]	101	13805	31
209	gi 645267081	PREDICTED: protein P21-like [<i>Prunus mume</i>]	101	24211	21.2
210	gi 698574254	PREDICTED: protein ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 2-like	100	52401	5.7



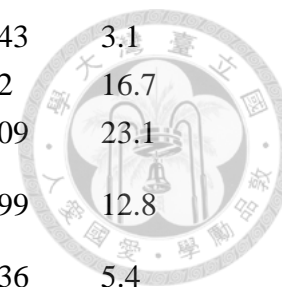
		[<i>Nicotiana glauca</i>]			
211	gi 38455496	cell division cycle protein 48 [<i>Pseudochlorella pringsheimii</i>]	100	67538	4.9
212	gi 586642479	PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 [<i>Amborella trichopoda</i>]	100	84656	3.9
213	gi 195626524	2-cys peroxiredoxin BAS1 [<i>Zea mays</i>]	99	28131	18.1
214	gi 255578581	peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3, putative [<i>Ricinus communis</i>]	99	29281	17.7
215	gi 48596901	ribosomal protein [<i>Bromus inermis</i>]	99	29912	9.1
216	gi 973583631	PDC1 [<i>Actinidia deliciosa</i>]	99	65212	6.8
217	gi 357144509	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic-like [<i>Brachypodium distachyon</i>]	98	36420	12.2
218	gi 1076408	seed storage protein beta-chain 3 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	98	2124	52.6
219	gi 17367482	RecName: Full=40S ribosomal protein S4 [<i>Prunus armeniaca</i>]	96	29548	12.3
220	gi 357528277	GAPDH1, partial [x <i>Doritaenopsis</i> hybrid cultivar]	96	31345	11.7
221	gi 302172047	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Schiedea globosa</i>]	96	8203	27.4
222	gi 326515998	predicted protein, partial [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>]	95	67780	3.5
223	gi 999396	heat-shock Protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	94	79986	2
224	gi 118498766	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Urochloa decumbens</i>]	94	29882	14.3
225	gi 743788762	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2-3 [<i>Elaeis guineensis</i>]	94	54497	2.3
226	gi 763741684	hypothetical protein B456_001G128200 [<i>Gossypium raimondii</i>]	94	69930	4.1
227	gi 77157635	chlorophyll a/b binding protein [<i>Panax ginseng</i>]	93	28624	9.4
228	gi 152963649	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Bruguiera gymnorhiza</i>]	92	11580	31.8
229	gi 33342046	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Houttuynia cordata</i>]	91	23963	17
230	gi 485819595	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Schiedea globosa</i>]	91	8049	44.4
231	gi 1362117	ribosomal protein S5 homolog - common tobacco (fragment)	90	5350	30.6



232	gi 848849029	PREDICTED: ADP,ATP carrier protein, mitochondrial-like [Erythranthe guttatus]	90	42203	6.2
233	gi 657966931	PREDICTED: ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial-like [Malus domestica]	89	42098	6.3
234	gi 460365357	PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic [Solanum lycopersicum]	88	29241	13.9
235	gi 567203497	hypothetical protein EUTSA_v10020127mg [Eutrema salsugineum]	88	84711	3.5
236	gi 604321228	hypothetical protein MIMGU_mgv1a021736mg, partial [Erythranthe guttata]	88	13550	13.6
237	gi 695044145	PREDICTED: protein P21-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	87	23363	10.9
238	gi 148909783	unknown [Picea sitchensis]	87	44717	4.2
239	gi 719973942	PREDICTED: enolase 1 [Nelumbo nucifera]	87	47907	9.5
240	gi 729292267	PREDICTED: 40S ribosomal protein S4-3-like [Tarenaya hassleriana]	86	29740	12.2
241	gi 62526575	cysteine protease CP1 [Manihot esculenta]	86	51516	3
242	gi 727440429	PREDICTED: zingipain-2-like [Camelina sativa]	86	37061	4.2
243	gi 302172079	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Schiedea adamantis]	86	8245	30.1
244	gi 1703374	RecName: Full=ADP-ribosylation factor 1	83	20690	15.5
245	gi 901826721	ADP-ribosylation factor 1 [Zostera marina]	83	21421	14.7
246	gi 743905377	PREDICTED: kiwellin-like [Populus euphratica]	82	22941	6.5
247	gi 398363593	sucrose synthase [Actinidia deliciosa]	81	92539	17.8
248	gi 565461088	hypothetical protein CARUB_v10001823mg [Capsella rubella]	80	26539	10.2
249	gi 427338779	ribosomal protein L2, partial [Cyrtrandra sp. Kului 2]	79	13056	20.5
250	gi 697110983	PREDICTED: eukaryotic initiation factor 4A-6-like, partial [Nicotiana tomentosiformis]	78	12522	31.5
251	gi 158998780	11S legumin protein [Carya illinoensis]	75	57981	2.6



252	gi 386278580	legumin B precursor, partial [<i>Vernicia fordii</i>]	75	46543	3.1
253	gi 224593205	translation elongation factor-1 alpha [<i>Valonia utricularis</i>]	75	7722	16.7
254	gi 506956839	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Convolvulus tricolor</i>]	73	19809	23.1
255	gi 747101397	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like [<i>Sesamum indicum</i>]	73	36499	12.8
256	gi 11131766	RecName: Full=Calnexin homolog; Flags: Precursor [<i>Helianthus tuberosus</i>]	72	61236	5.4
257	gi 764602731	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101306247 isoform X1 [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]	71	40663	7
258	gi 259661866	NADP-dependent malic enzyme, partial [<i>Echinochloa crus-galli</i>]	70	40067	11.5
259	gi 148909881	unknown [<i>Picea sitchensis</i>]	70	85318	5.1
260	gi 802717867	PREDICTED: legumin A-like [<i>Jatropha curcas</i>]	70	54551	2.6
261	gi 38345426	OSJNBb0091E11.17 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	70	40154	2.7
262	gi 4995854	H(+)-transporting ATP synthase [<i>Thymelaea hirsuta</i>]	69	52450	2.7
263	gi 14717940	ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [<i>Ardisia crenata</i>]	69	30107	4.6
264	gi 221255555	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [<i>Populus balsamifera</i>]	69	11558	13
265	gi 702439073	PREDICTED: cysteine proteinase COT44-like [<i>Eucalyptus grandis</i>]	69	42502	3.6
266	gi 697130756	PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [<i>Nicotiana tomentosiformis</i>]	69	84543	5.2
267	gi 118484187	unknown [<i>Populus trichocarpa</i>]	68	23096	6
268	gi 357129421	PREDICTED: germin-like protein 5-1 [<i>Brachypodium distachyon</i>]	68	23292	5.8
269	gi 802571528	PREDICTED: low-temperature-induced cysteine proteinase-like [<i>Jatropha curcas</i>]	68	51751	7.7
270	gi 541135687	NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase short paralog, partial [<i>Monogramma graminea</i>]	67	10116	14.6



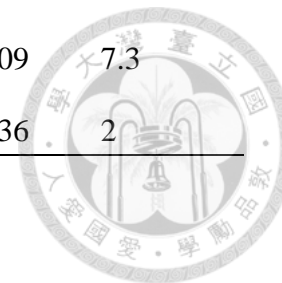
271	gi 974782	cobalamine-independent methionine synthase [Solenostemon scutellarioides]	67	86717	5.1
272	gi 356514027	PREDICTED: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like isoform X1 [Glycine max]	66	84643	6.5
273	gi 224284436	unknown [Picea sitchensis]	66	28049	4.6
274	gi 15230582	germin-like protein 8 [Arabidopsis thaliana]	66	23018	5.9
275	gi 40949663	germin-like protein [Nicotiana attenuata]	66	23276	5.9
276	gi 700254805	LOS4, partial [Lilium brownii]	64	47422	2.4
277	gi 17682	Wilm~s tumor suppressor homologue [Arabidopsis thaliana]	63	24841	5
278	gi 672159841	PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic [Phoenix dactylifera]	63	30062	13.6
279	gi 464621	RecName: Full=60S ribosomal protein L6; AltName: Full=YL16-like [Mesembryanthemum crystallinum]	61	25985	6.4
280	gi 159463286	ribosomal protein L6, component of cytosolic 80S ribosome and 60S large subunit [Chlamydomonas reinhardtii]	61	24357	6.7
281	gi 968902	ribosomal protein S8 [Oryza sativa Japonica Group]	61	24909	6.8
282	gi 17367479	RecName: Full=40S ribosomal protein S8 [Prunus armeniaca]	61	24706	6.8
283	gi 9759565	40S ribosomal protein S4 [Arabidopsis thaliana]	61	29983	4.9
284	gi 81237625	14-3-3 protein [Dunaliella salina]	61	29266	11.2
285	gi 15218877	thioredoxin-dependent peroxidase 1 [Arabidopsis thaliana]	60	17417	6.2
286	gi 798818	60S ribosomal protein L2 [Arabidopsis thaliana]	60	27723	4.7
287	gi 695074833	PREDICTED: 60S ribosomal protein L8-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	60	28283	4.6
288	gi 6094431	RecName: Full=Tubulin alpha-3 chain; AltName: Full=Alpha-3-tubulin [Eleusine indica]	59	49581	3.1
289	gi 225441593	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain [Vitis vinifera]	59	49266	3.1



290	gi 224134573	embryo-specific family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	59	21429	5.9
291	gi 146216004	cysteine protease Cp6 [<i>Actinidia deliciosa</i>]	58	50759	3
292	gi 242041393	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g039450 [<i>Sorghum bicolor</i>]	58	61020	2.7
293	gi 357503371	heat shock cognate 70 kDa protein [<i>Medicago truncatula</i>]	58	72178	2.3
294	gi 225435794	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	57	64568	1.8
295	gi 14517542	F2G19.31/F2G19.31 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	56	50963	3
296	gi 255538210	cysteine protease, putative [<i>Ricinus communis</i>]	56	52080	3
297	gi 1351856	RecName: Full=Aconitate hydratase, cytoplasmic; Short=Aconitase; AltName: Full=Citrate hydro-lyase	55	97943	1.9
298	gi 61741088	elongation factor 1 alpha [<i>Actinidia deliciosa</i>]	49	49233	2.7
299	gi 744515973	ATP synthase beta subunit, partial [<i>Actinidia deliciosa</i>]	45	35061	9.3
300	gi 149938964	ACT1 [<i>Actinidia deliciosa</i>]	41	41637	5.3
301	gi 378405189	RecName: Full=Non-specific lipid-transfer protein 1; Short=LTP1; Short=nsLTP1; AltName: Allergen=Act d 10.01	41	9452	14.1
302	gi 40807637	cystatin [<i>Actinidia deliciosa</i>]	29	12890	22.6
303	gi 146215996	cysteine protease Cp2 [<i>Actinidia deliciosa</i>]	24	41453	7.4
304	gi 744515977	ATP/ADP carrier protein, partial [<i>Actinidia deliciosa</i>]	22	22206	9.7
305	gi 82697965	CXE carboxylesterase [<i>Actinidia deliciosa</i>]	20	34821	3.5
306	gi 27524403	photosystem II protein, partial (chloroplast) [<i>Actinidia deliciosa</i> var. <i>deliciosa</i>]	20	20722	8.9
307	gi 757815335	photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein (chloroplast) [<i>Actinidia deliciosa</i>]	18	55991	6.9
308	gi 2274778	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, partial [<i>Actinidia deliciosa</i>]	17	35971	12.9
309	gi 95981853	CTR1, partial [<i>Actinidia deliciosa</i>]	16	16705	7.6



310	gi 318136853	alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase, partial [Actinidia deliciosa var. deliciosa]	16	68609
311	gi 98979405	lipoxygenase 5, partial [Actinidia deliciosa]	16	51336



補充資料七 胜肽碎片離子 Roepstorff-Folmann-Biemann 命名法

Supplementary data 7. Peptide fragmentation nomenclature of Roepstorff-Folmann-Biemann

