

Enzyme-linked fluorescent immunoassay에 의한 가공식품 중 땅콩의 검출

김미혜 · 김현정 · 손동화*

한국식품연구원

Detection of Peanuts in Commercially Processed Foods by an Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay

Mi-Hye Kim, Hyun-Jung Kim, and Dong-Hwa Shon*

Korea Food Research Institute

Abstract In this study we analysed for peanuts in processed foods using an enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA), and compared the results with labeled ingredients. Crude peanut protein (CPP) was immunized into rabbits to produce specific antibodies(Ab). A sandwich ELFA was established using anti-CPP Ab and Ab-horseradish peroxidase (HRP) conjugate. The cross-reactivities of the Ab toward CPP, peanuts, almonds, soybeans, and walnuts were 100, 9.8, 1.1×10^{-2} , 4.4×10^{-3} , and 0%, respectively. The samples included 19 items consisting of biscuits, snacks, chocolates, and so on. The results from the sandwich ELFA showed that peanuts were contained in 7 of the processed food items, among which, 5 items were labeled as having peanuts present but 2 items were not. One of the 2 items that was peanut-detected but unlabeled was a biscuit labeled to contain almonds and assayed to contain $2.1 \times 10^{-3}\%$ peanuts, which might have been due to the weak cross-reactivity of the Ab toward almonds. The other item was a snack labeled to contain soybeans and assayed to contain 0.098% peanuts, which might have been due to peanut cross-contamination during processing, since the cross-reactivity of the Ab toward soybeans was very weak. These results suggest that ELFA is a good tool to detect peanuts in processed foods, and allergens in certain processed foods should be labeled correctly.

Key words: peanuts, detection, specific antibody, enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA)

서 론

음식물 섭취에 의하여 유발되는 식품알레르기는 천식, 가려움을 동반한 발진, 발열 등의 전신증상과 알레르기성 긴장이완증후군으로 대표되는 신경증상과 복통, 구토 등의 소화기 증상을 비롯하여 여러 증상을 일으킨다. 또한 만성증상으로서 아토피 피부염을 유발한다(1,2).

우유와 계란 알레르기는 소아에서 가장 흔한 식품알레르기이거나 연령이 증가할수록 면역관용이 생겨 우유의 경우에는 3세까지 약 80% 정도(3), 계란의 경우 약 5세까지 약 85% 정도(4) 면역관용을 획득하는 것으로 알려져 있다. 반면, 땅콩은 일생동안 알레르기 반응을 유지하며(5) 면역관용이 일어나지 않는 대표적인 알레르기식품으로 이로 인한 사망사례가 증가하고 있다(6).

한편, 식품위생법에는 우리나라 사람들에게 알레르기를 유발하는 것으로 알려진 주요 식품인 계란 등의 난류와 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토 등 12종을 함유하거나 이들로부터 추출한 성분을 원료로 사용했을 때는 함유된 양과 관계없이 원재료명을 표시하도록 하였다(7). 땅

콩 알레르기는 미량(100 µg)의 땅콩성분을 섭취하여도 신체적 손상을 일으킬 수 있는 질환이므로(8,9), 가공식품의 첨가물 표시에 있어서 이에 대한 첨가량 및 첨가여부에 대한 정확한 표기는 필수적이다. 식품 중 땅콩의 혼입여부를 분석하는 방법으로는 크게 단백질을 검출대상으로 하는 방법과 DNA를 검출대상으로 하는 방법으로 나눌 수 있고, 이때 이용되는 단백질은 땅콩의 주요 알레르겐인 Ara h1(63 kDa), Ara h2(17-20 kDa), 땅콩 조단백질 등이 사용되며 분석방법으로는 면역학적인 방법, 크로마토그래피, Mass spectrometry(MS) 등의 방법이 활용되고 있다(10,11). Enzyme-linked fluorescent immunoassay(ELFA)는, 오늘날 진단의학이나 농식품분야에 널리 사용되는 ELISA와 같이 최종적으로 효소반응을 이용함으로써 항원, 항체 반응을 민감하게 분석하는 방법이다. 하지만 ELISA는 효소반응에 의하여 나타나는 발색의 정도(흡광도)를 측정하는 반면에 ELFA의 경우에는 효소반응물의 형광을 측정하는 것이 근본적인 차이점이다(12,13). 그 결과 ELFA는 ELISA에 비하여 상대적으로 검출감도가 우수하며 검출농도의 범위가 넓은 특징을 가지고 있다(12,13).

본 연구에서는 가공식품 중 땅콩의 검출이 가능한 ELFA를 개발하였다. 또한, 이를 이용하여 시중에 유통되는 가공식품 시료 중의 땅콩을 분석하고, 그 결과가 표시내용과 일치하는지 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Phosphate buffered saline(PBS) with Tween 20(PBST), phosphate-

*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: dhs95@kfri.re.kr

Received July 23, 2008; revised November 22, 2008;
accepted December 1, 2008

citrate buffer (pH 5.0), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride (TMB), horseradish peroxidase(HRP), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's adjuvant, carbonate-bicarbonate buffer 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, 항체생산을 위한 토끼는 체중 3kg의 New Zealand White 종을 한림실험동물(Pyungtaek, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. ELFA의 경우 형광 microplate는 Nunc사의 FluoroNunc™(#437796)(Roskilde, Denmark)를 형광 microplate reader는 Labsystems사의 Fluoroskan Ascent® (Washington, D.C., USA)을 사용하였다. 가공식품시료는 2006년 9월 국내 제과회사 제품 중 비스킷류 7종, 스낵류 6종, 초콜릿 가공품 3종, 일반식사대용품 1종, 사탕류 1종, 아이스크림류 1종, 총 19종을 무작위로 수집, 확보하여 실험에 사용하였다.

면역원의 준비

항체 생산을 위한 면역원은 시판되는 볶은 땅콩으로부터 단백질을 추출하여 이용하였다. 간단히 알아보면, 땅콩 가루를 ether로 탈지한 후 10배(v/w)의 PBS(pH 7.4)를 첨가하고 4°C에서 24시간 교반한 후 10,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 여기서 얻어진 상정액을 3차 증류수에 대하여 24시간동안 투석하였다. 이후 동결건조하여 얻은 조단백질(CPP)을 냉동보관하면서 최종 항원을 얻었다. 준비된 CPP의 분자량분포를 확인하기 위해 Laemmli 방법(14)에 따라 분리 gel의 농도를 10%로한 SDS-PAGE를 실시하였다.

특이항체의 생산 및 정제

Kim 등(15)의 방법에 따라 특이항체를 생산하였다. 즉, 준비한 면역원(CPP) 500 µg씩을 Freund's complete adjuvant와 유탁액을 만들어 토끼의 등에 피하주사하였다. 이후 2주 간격으로 4차례 추가면역을 실시하였다. 단, 이때는 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 매 면역 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 항혈청을 분리하였다. 항혈청으로부터 항체의 정제는 T-Gel™ Purification Kit (Pierce Co., Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 행한 후, PBS에 대하여 투석하였다.

HRP-항체 복합물(HRP-Ab conjugate)의 제조

Tresca 등(16)의 방법을 참고하여 HRP 2 mg과 sodium periodate 21.4 mg을 증류수 1.1 mL에 용해시키고 상온에서 10분 반응 후 5 mM sodium acetate buffer(pH 4.0)에서 하룻밤 투석시켰다. 회수 후 0.2 M sodium carbonate buffer(pH 9.5)를 첨가하여 HRP 용액의 pH를 9.0으로 올린 다음 0.01 M sodium carbonate buffer(pH 9.0)에 대하여 투석한 항체용액(8 mg IgG/mL)과 함께 섞은 후 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 0.1 M sodium borohydride 100 µL를 첨가해 4°C에서 2시간동안 반응시킨 후 회수하여 PBS에 대하여 투석하였다.

ELFA(enzyme-linked fluorescent immunoassay)

항체의 역가를 측정하고자 비경합 간접방식에 의한 ELFA(non-competitive indirect ELFA)를 실시하였다. 즉, 형광 microplate에 면역원으로 사용한 CPP를 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.0)에 2 µg/mL로 희석하여 각 well당 100 µL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 정치하여 coating하였다. Washing buffer(PBST)로 150 µL씩 3회 세척한 다음, PBST로 1/3,000로 희석한 anti-CPP antibody를 각 well당 100 µL씩 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 3회 세척 후 2차 항체(goat anti-

rabbit IgG antibody HRP conjugate, 1/3,000)를 각 well당 100 µL씩 넣고 1시간 반응시킨 다음, washing buffer로 3회 세척하였다. 기질 용액(36 mM phenyl propionic acid/phosphate buffer pH 7.0, 최종농도가 0.002% 되게 H₂O₂ 첨가를 각 well당 100 µL씩 넣고 1시간 반응시켰다. 1 M NaOH-glycine(1 M glycine/ 1 M NaOH)을 각 well당 100 µL씩 넣어 반응을 중지시킨 후, 형광 microplate reader로 320/405 nm(Ex./Em.파장)에서의 형광을 측정하였다. 각 시료 당 3개씩의 well을 사용하여 분석하였다.

다음으로 땅콩의 검출을 위한 방법으로써 샌드위치 ELFA(sandwich ELFA; sELFA)를 실시하였다. 즉, 정제된 anti-CPP antibody를 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.0)에 2 µg/mL로 희석하여 각 well당 100 µL씩 분주하여 4°C에서 하룻밤 정치하여 coating하였다. Washing buffer로 사용하여 150 µL씩 3회 세척한 다음, PBST로 적당배율 희석한 시료를 각 well당 100 µL씩 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 2차 항체는 HRP-항체 복합물(1/1,000)을 사용하였고, 1시간 반응 후 세척하였다. 기질용액 처리 이후의 과정은 위 ELFA의 경우와 같이 하였다.

교차반응율의 산출

특이항체가 땅콩이외의 식품(견과류 등)에 대하여 반응하는 정도를 sELFA를 이용하여 조사하였다. 본 연구에서 특이항체의 교차반응율은 다음과 같은 식에 의하여 구하였다.

$$\text{교차반응율(\%)} = (C_{\text{FI 28}} \text{ of CPP} / C_{\text{FI 28}} \text{ of food}) \times 100$$

여기에서 C_{FI 28}는 sELFA의 형광수치(FI)가 28을 나타내는 시료의 농도를 나타내었다.

땅콩분석을 위한 시료의 전처리

시료를 1g씩 취한 후 PBS 10 mL을 첨가하고 homogenizer(Ultra-Turrax T125, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)를 이용하여 13,500 rpm에서 1분간 5회 균질화하였다. Microcentrifuge는 한일과학(Seoul, Korea)의 Micro 17TR을 이용하여 10,000 rpm, 5분간 원심분리 후 상정액을 회수하고 이를 PBST로 적당배율 희석하여 ELFA 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

특이항체의 생산 및 sELFA의 확립

땅콩으로부터 조단백질(CPP)을 '재료 및 방법'에 따라 분리하여 CPP의 분자량 분포를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과, 주요 band는 분자량 60 kDa 부근과 35-40 kDa 부근에서 나타났으나 31 kDa 이하의 band는 명확히 보여주지 못하였다(Fig. 1). 그렇지만 이들 중에는 땅콩 알레르겐으로 보고된 Ara h1(63kDa), Ara h2(17-20kDa), Ara h3(14-45kDa) 등이 포함되어 있는 것으로 생각되었다(17). 이를 더 이상 분리 및 정제하지 않고 특이항체의 생산을 위한 면역원으로 사용하였다. CPP를 면역하여 항체를 생산하였을 때 추가 면역을 실시할수록 대체로 높은 항체가를 나타내어 4차 혈청으로부터 T-gel column을 이용하여 정제한 특이항체를 분석용으로 사용하였다(data 생략). 또한 정제한 특이항체를 HRP와 공유결합시킴으로써 HRP-항체 복합물을 준비하였다. 이들 특이항체와 HRP-항체 복합물을 이용하여 sELFA의 제반조건을 확립하였으며 그 조건은 '재료 및 방법'에 명시한 바와 같다.

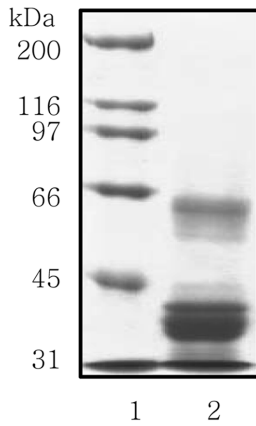


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of crude peanut protein(CPP). Electrophoresis was done on 10% acrylamide gel. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, CPP.

특이항체의 교차반응

sELFA에 의하여 땅콩, 콩, 호도, 아몬드 추출물에 대한 특이항체의 교차반응성을 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 콩류와 견과류의 종류에 따라 농도별 FI값의 유형이 각각 다르게 나타났으며, '재료 및 방법'에 명시한 바와 같이 FI값 28을 나타내는 각 콩류와 견과류의 농도를 서로 비교하여 그 반응율을 산출하였다(Table 1). 여기에서 FI값 28을 기준으로 한 것은 이 수치가 외삽법 없이 콩류와 견과류의 반응성을 비교하기 좋은 최대값이기 때문이었다. 그 결과 항CPP 항체의 CPP에 대한 반응성을 100%로 보았을 때 땅콩에 대한 반응성은 9.8%, 이와 같은 방식으로 아몬드, 콩 및 호도에 대한 반응성은 각각 $1.1 \times 10^{-2}\%$, $4.4 \times 10^{-3}\%$, 0%로 나타났다. 따라서 땅콩을 제외한 3종 시료에 대한 특이항체의 교차반응은 상당히 낮거나 거의 없었다. 다른 한편, Leon 등(18)은 땅콩 알레르기 환자 혈청의 IgE 항체가 아몬드, 브라질너트, 헤이즐너트와 같은 다른 견과류와 반응 한다고 보고 하였으며, 이들 간에는 IgE항체가 공통적으로 결합 가능한 에피토프가 존재하기 때문인 것으로 추정하였다.

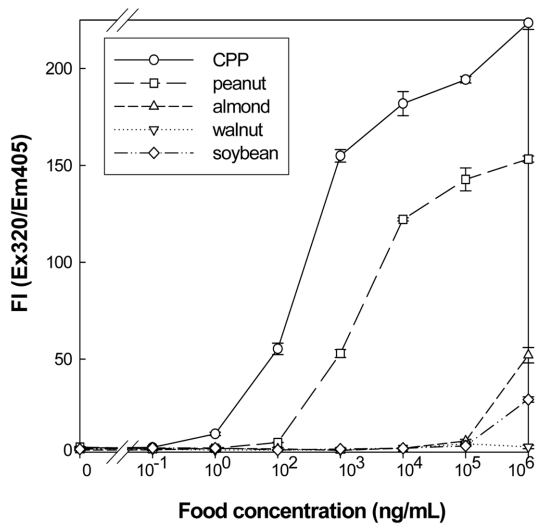


Fig. 2. Reactivity of anti-CPP antibody toward nuts and legumes determined by sELFA. Nut and legume samples were homogenized with PBS buffer (10 : 1, v/w), centrifuged, and serially diluted with PBST from 1 : 100.

Table 1. Cross reactivity of the anti-CPP antibody toward nuts and legumes as determined by sELFA

Compound	C _{FI28} ¹⁾ (ng/ml)	Reactivity (%) ²⁾
CPP	44	100
Peanut	450	9.8
Almond	400,000	1.1×10^{-2}
Soybean	1,000,000	4.4×10^{-3}
Walnut	∞	0

¹⁾The concentration of food which gives 28 of sandwich ELFA value (FI at Ex.320/Em.405) in Fig. 2.

²⁾Reactivity toward food (%) = (C_{FI 28} of CPP/ C_{FI 28} of food) × 100

sELFA에 의한 시판 가공식품 중 땅콩의 검출

시중에 유통되는 과자류 중 땅콩의 혼입여부를 앞서 확립된 sELFA에 의하여 분석하였다. sELFA표준곡선으로부터 CPP의 검출 한계는 30 ng/mL로 나타났으며(Fig. 3) 땅콩단백질이 땅콩의 9.8%를 차지하는 것(Table 1)으로 나타나 땅콩의 검출한계는 0.29 mg/kg으로 환산되었다. 일반적으로 식품내의 알레르겐의 검출을 위한 검출감도는 1-100 mg/kg 정도가 적합하다고 알려져 있는데(11) 이 범위보다 감도가 우수한 검출 방법으로 나타났다. 또한 Kiening 등의 sandwich ELISA를 이용한 분석법에서 땅콩을 기준으로 검출감도가 0.14 mg/kg인 것과 대체로 유사한 검출감도를 보였다(11).

시중 유통시료 19점 중 땅콩함량이 표시된 식품은 총 5종이었다. 분석결과 Table 2와 같이 땅콩이 검출된 식품은 19점 중 7점이었다. 이들 7점 중 원재료명에 땅콩함량이 표시된 것은 스낵류 3점, 가공초콜릿류 1점, 일반식사대용품 1점으로 총 5점이었으며 2점에는 땅콩의 함유가 전혀 표시되어 있지 않았다. 1번 스낵 시료의 경우는 땅콩이 8% 함유된 것으로 표시되어 있었는데, ELFA 분석에서 CPP함량이 4,500 μg/g으로 나타나 땅콩 함량은 4.5% (45 mg/g)에 해당되므로 분석회수율은 56.3%로 나타났다. 또한, 16번 가공초콜릿 시료의 경우에는 땅콩함량이 21%로 표시되어 있었는데, 분석에 의한 땅콩함량은 4.9%로 나타나 분석회수율은 23.3%였다. 가공식품의 특성상 시료의 소재에 따라서 ELFA의 회수율에 차이를 보였고 가공시료 중 땅콩함량의 분석치는 표시된 것 보다 다소 낮게 나타났다. 그럼에도 불구하고 땅콩 검출의 정성분석에는 충분히 활용할 수 있음을 확인하였다. 다음으로 나머

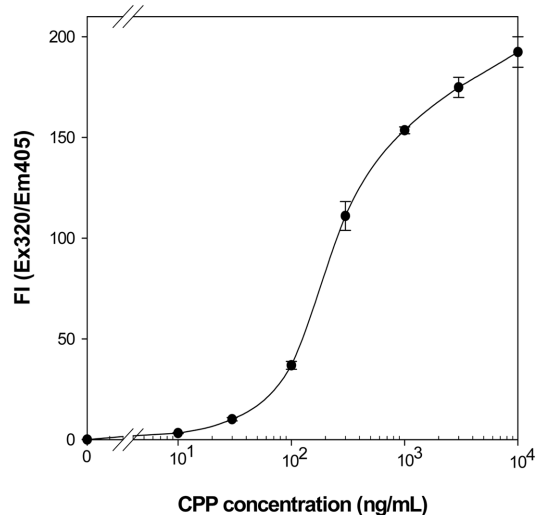


Fig. 3. Standard curve of CPP by sELFA.

Table 2. Concentration of peanuts in commercially processed foods determined by sELFA

Type of food	Item code	Company code	Labeled ingredient	Assay			Recovery ²⁾ (%)
				CPP ($\mu\text{g/g}$)	peanut ¹⁾ (mg/g) (%)		
Snack	1	A	peanut 8%	4,600±55	45	4.5	56.3
	2	B	peanut cream (peanut) ³⁾	390±6.4	3.8	0.38	-
	3	B	peanut cream (peanut), margarin (soybean)	1,400±26	13.7	1.37	-
	4	B	milk powder (milk, soybean)	100±0.7	0.98	0.098	-
	5	C	soy sauce powder (soybean, wheat)	N.D. ⁴⁾	N.D.	N.D.	-
	6	D	gratin seasoning 4.6% (milk, soybean, wheat)	N.D.	N.D.	N.D.	-
Biscuit	7	E	lecithin (soybean), almond 1.3%	2.1 ± 0.006	0.021	0.0021	-
	8	E	shortening (soybean)	N.D.	N.D.	N.D.	-
	9	E	shortening (soybean)	N.D.	N.D.	N.D.	-
	10	E	shortening (soybean)	N.D.	N.D.	N.D.	-
	11	E	black soybean powder 0.2%	N.D.	N.D.	N.D.	-
	12	E	-	N.D.	N.D.	N.D.	-
	13	F	-	N.D.	N.D.	N.D.	-
Processed chocolate	14	E	emulsifier (soybean)	N.D.	N.D.	N.D.	-
	15	E	-	N.D.	N.D.	N.D.	-
	16	G	peanut 21%	5,000±85	49	4.9	23.3
Dietary formula	17	A	peanut oil	5.9±0.07	0.058	0.0058	-
Candy	18	E	-	N.D.	N.D.	N.D.	-
Ice cream	19	E	-	N.D.	N.D.	N.D.	-

¹⁾Peanut content was deduced from the result of CPP concentration: CPP corresponds to 9.8% (w/w) of peanut (Table 1).

²⁾(Peanut content assayed/peanut content labeled) × 100

³⁾Food in parenthesis means the source of ingredient.

⁴⁾N.D.: not detected

지 3점은 함유량이 표시되어 있지 않아 회수율을 구할 수는 없었으나 대체적으로 $2.1 \times 10^{-3}\%$ 의 땅콩을 함유하고 있는 것으로 분석되었다.

땅콩함량이 표시되어 있지 않았으나 분석 상 땅콩이 검출된 2점 시료의 경우 콩과 아몬드 각각 원재료명에 표시되어 있었다. 이 중 하나는 아몬드를 함유하고 있다고 표시된 비스킷으로 분석 상 미량($2.1 \times 10^{-3}\%$)의 땅콩이 검출되었는데, 이는 앞서 조사한 교차반응에 의한 것으로 추측된다. 나머지 1점은 콩의 함유가 표시된 스낵으로 분석 상 0.1%의 땅콩이 검출되었는데 이 경우 콩에 대한 특이항체의 교차반응율이 매우 낮은 점을 감안하면 제조과정 상 생산라인에 남아있던 땅콩성분이 함께 섞여 들어간 것으로 추측된다.

이와 같이 이번 연구를 통해 sELFA를 이용하여 시판되는 가공식품 중 땅콩의 존재유무를 분석할 수 있었다. 또한 현재 유통되는 일부 가공식품 중에는 식품알레르겐이 함유되어 있음에도 불구하고 제대로 표시되지 않은 것이 있었다. 이러한 가공식품은 식품알레르기 환자에게 심각한 피해를 줄 수도 있으므로, 알레르겐의 함유를 정확하게 표시할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

Enzyme-linked fluorescent immunoassay(ELFA)를 이용하여 가공식품 중 땅콩을 분석하고, 그 결과가 표시내용과 일치하는지를 조사하였다. 땅콩으로부터 분리한 조단백질(CPP)을 토끼에게 면역하여 생산한 특이항체 및 horseradish peroxidase-항체 복합물을 이용하여 sandwich ELFA를 확립하였다. 특이항체의 교차반응은, CPP, 땅콩, 아몬드, 콩, 호도에 대하여 각각 100, 9.8, 1.1×10^2 , 4.4×10^3 , 0%로 나타났다. 시료로는 비스킷, 스낵, 초콜릿 등 19점을 사용하였다. 이들의 분석결과, 7점의 시료에서 땅콩이 검출되었

으며, 이 중 땅콩의 함유가 표시된 제품은 5점이었고 그렇지 않은 제품은 2점이었다. 이들 2점 중 하나는 아몬드를 함유하고 있다고 표시된 비스킷으로 분석 상 미량($2.1 \times 10^{-3}\%$)의 땅콩이 검출되었는데, 이는 교차반응 때문으로 추측된다. 나머지 1점은 대두의 함유가 표시된 스낵으로 분석 상 $9.8 \times 10^{-2}\%$ 의 땅콩이 검출되었다. 이는 대두의 매우 낮은 교차반응율을 감안하면 제조과정 상 땅콩의 교차오염 때문으로 추측된다. 이와 같이 ELFA에 의하여 가공식품 중 땅콩의 검출이 가능하였고, 현재 유통 되는 일부 가공식품 중 알레르겐의 표시를 정확히 할 필요가 있다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 “생명공학안전성평가기술개발사업(2005-2008)”으로 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사합니다.

참고문헌

- Shon DH. Food and allergy. Food Sci. Ind. 33: 1-8 (2000)
- Werfel T. Food allergy. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 6: 573-583 (2008)
- Host A, Haiken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first three years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. Allergy 45: 587-596 (1990)
- Sampson HA, McCaskill C. Food hypersensitivity in atopic dermatitis evaluation of 113 patients. J. Pediatr. 107: 669-675 (1985)
- Burks AW. Peanut allergy. Lancet 371: 1538-1546 (2008)
- Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. Engl. J. Med. 327: 380-384 (1992)
- Korea Food and Drug Administration. Labeling Standards for Foods etc. KFDA Notification No. 2008-31 (Amendment on Jun. 17, 2008) Available from: http://www.kfda.go.kr/open_content/

- data/food_view.php. Accessed Dec. 1, 2008.
8. Stephan O, Vieths S. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergic trace amounts of peanut(*Arachis hypogaea*) in processed foods. *J. Agr. Food Chem.* 52: 3754-3760 (2004)
 9. Pomes A, Helm RM, Bannon GA, Burks AW, Tsay A, Chapman MD. Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 12: 640-645 (2003)
 10. Poms RE, Klein CL, Anklam E. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Food Addit. Contam.* 21: 1-31 (2004)
 11. Kiening M, Niessner R, Drs E, Baumgartner S, Krska R, Bremer M, Tomkies V, Reece P, Danks C, Immer U, Weller MG. Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods. *J. Agr. Food Chem.* 53: 3321-3327 (2005)
 12. Yolken RH, Stopa PJ. Enzyme-Linked Fluorescence Assay: Ultra-sensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 10: 317-321 (1979)
 13. Zaitso K, Ohkura Y. New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: Rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Anal. Biochem.* 109: 109-113 (1980)
 14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
 15. Kim HJ, Shon DH. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cooked goat meat. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 538-543 (2000)
 16. Tresca JP, Ricoux R, Pontet M, Engler R. Comparative activity of peroxidase-antibody conjugates with periodate and glutaraldehyde coupling according to an enzyme immunoassay. *Ann. Biol. Clin.* 53: 227-231 (1995)
 17. Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, Knulst AC, Knol EF. Relevance of Ara h1, Ara h2, and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy* 34: 583-590 (2004)
 18. de Leon MP, Glaspole IN, Drew AC, Rolland JM, O'Hehir RE, Suphioglu C. Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin. Exp. Allergy* 33: 1273-1280 (2003)