

菲律宾蛤仔过敏原原肌球蛋白的鉴定与分子克隆

吕良涛, 蔺海鑫, 高 卿, 林 洪, 李振兴*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘 要: **目的** 了解菲律宾蛤仔中过敏原的情况, 对其主要过敏原进行鉴定和分子克隆。**方法** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹验证原肌球蛋白, 双向电泳对蛋白等电点进一步确定。利用差示扫描量热法对蛋白的热性能测定以及蛋白克隆和测序来分析原肌球蛋白。**结果** 菲律宾蛤仔原肌球蛋白的分子量在 37 kDa 左右, 等电点为 5.1, 热稳定性较强。原肌球蛋白的基因序列全长为 855 bp, 编码 284 个氨基酸, 对序列进行同源对比, 相似性较高。**结论** 本实验证实了原肌球蛋白为菲律宾蛤仔的过敏原, 为认识菲律宾蛤仔过敏原提供基础数据。

关键词: 过敏原; 菲律宾蛤仔; 原肌球蛋白; 免疫学技术

Identification and molecular cloning of the allergen tropomyosin from *Ruditapes philippinarum*

LV Liang-Tao, LIN Hai-Xin, GAO Qing, LIN Hong, LI Zhen-Xing*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the *Ruditapes philippinarum* allergen, and identify and clone the main allergens. **Methods** Tropomyosin was identified by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting, and isoelectric point was further analyzed by two dimensional electrophoresis. Thermal stability analysis was determined by differential scanning calorimetry, and tropomyosin was analyzed by cloning and sequencing of proteins. **Results** The major allergen protein tropomyosin with the molecular weight 37 kDa was extracted. The isoelectric point was 5.1. The tropomyosin of *R.philippinarum* was stable in the process of thermal treatment. The full-length cDNAs encoding tropomyosin was composed of 855 bp coding for 284 amino acid residues. The similarity of sequence was high through homologous comparison. **Conclusion** The tropomyosin is the allergen of *R.philippinarum*. This research is helpful to provide the basic date to understand *R.philippinarum* allergen.

KEY WORDS: allergen; *Ruditapes philippinarum*; tropomyosin; immunological technique

1 引 言

食物过敏(food allergy)作为食源性疾病的一种,

是机体的免疫系统对摄入的特定的食物成分的不良免疫应答, 对人们的身体造成严重的伤害。常见的过敏症状主要有皮肤潮红、发痒、皮疹、哮喘、喷嚏、

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371730)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371730)

*通讯作者: 李振兴, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LI Zhen-Xing, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, No 5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266003, China. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

腹痛、腹泻等。涉及到呼吸系统、肠胃系统、中枢神经系统、皮肤、骨骼和肌肉等组织, 严重者可出现过敏性休克甚至死亡。软体类水产品及其制品深受我国消费者喜爱, 同时也是水产品中易于引发过敏症的食物种类。Motoyama 等^[1]研究早已表明原肌球蛋白是存在于软体动物的主要过敏原。除了原肌球蛋白外, 也有其他被报道的软体类过敏原。但从分子水平上确证的只有原肌球蛋白和副肌球蛋白^[2]。自从 Hoffman 等^[3]报道原肌球蛋白为棕虾(*Penaeus aztecus*)的主要过敏原以来, 大量的科学研究都表明, 原肌球蛋白存在于各种虾类中^[4,5]。同时, 原肌球蛋白也是很多节肢类动物, 如软体动物^[6-8]、蟑螂^[9]及尘螨类^[10]的主要过敏原。近年来, 国内外学者对甲壳类原肌球蛋白的研究较为详尽^[11], 包括分离纯化、克隆及生物信息学研究等方面。

软体类动物种类繁多, 但相对于甲壳类研究而言, 国内外对软体类动物的研究较少。国内曾报道过有关牡蛎和扇贝等软体类的致敏病例^[12,13], 刘志刚等^[14]也研究了虾夷扇贝原肌球蛋白, Lee 等^[15]研究指出, 从北蛾螺(*Buccinum undatum*)中分离出 40、71、82 kDa 3 种蛋白, 抗原性强、对热稳定, 但不能与虾原肌球蛋白产生交叉反应现象。然而, 国内外几乎没有菲律宾蛤仔原肌球蛋白及其致敏性的研究报道。

本研究以菲律宾蛤仔为研究对象, 对过敏组分进行分离纯化, 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹方法进行鉴定并确认其致敏性。通过双向电泳、差示扫描量热等方法对其性质进行分析研究, 利用 RACE 技术克隆获取原肌球蛋白基因序列, 旨在对其理化性质有更全面具体的了解。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

电泳仪 (DYY-12)、半干式碳板转印仪 (DYCP-40C)(北京六一仪器厂); 自动超纯水仪 (Ro DI digital)(北京康铭泰克科技发展有限公司); 固相 pH 梯度等电聚焦电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 天能凝胶成像系统 (上海天能公司); 精密 pH 计 (上海精密科学仪器); 离心机 (美国 sigma 公司); 惠普 G4050 扫描仪 (中国惠普)。

动物总 RNA 提取试剂盒 Easy Pure RNA Kit, 反转录 TAKARA PimeScript RT-TCR Kit (北京全式金生

物技术有限公司); DNA 胶回收和纯化试剂盒 (DNA 胶回收和纯化试剂盒)、快速限制性内切酶 Fast Digest (Fermentas); PCR 试剂盒 (大连宝生物公司 TaKaRa); 低熔点琼脂糖 (Sigma 公司); Pierce ECL 蛋白印迹底物 (Thermo Scientific 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (中杉金桥公司); IPG 预制胶条 (pH 3~10, 7 cm)、两性电解质 (Bio-Lyte, pH 3-10) (美国 Bio-Rad 公司); 3-[(3-胆酰胺丙基)二乙胺]-丙磺酸 (CHAPS)、二硫苏糖醇 (DTT) (美国 Sigma 分装)。

实验用新鲜蛤蜊购于青岛市家乐福超市。

2.2 实验方法

2.2.1 菲律宾蛤仔原肌球蛋白纯化制备

将新鲜的蛤蜊烘热至开壳后室温冷却。取 50 g 蛤蜊肉样品与缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl) 混合后匀浆 ($m:V=1:2$), 在 4 °C 条件下 4000 r/min, 离心 15 min 后弃掉上清取沉淀。再加入相同的缓冲液重复离心两次。最终沉淀用蛋白抽提液 (1 mol/L KCl) 匀浆, 置于 4 °C 条件下搅拌过夜抽提。抽提后 8000 r/min, 离心 15 min 后取上清, 用 40% 硫酸铵沉淀得到的上清液, 再用 50% 硫酸铵沉淀, 取最终沉淀物于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中复溶, 4 °C 纯水透析 24 h, 期间换水 3~4 次。蛋白溶液冷冻干燥, -80 °C 存放备用。

2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参考王秀丹等^[16]的方法略改动。实验中所用到的分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。上样量 5 μ g, 电泳结束后使用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2 h, 换用脱色液进行脱色, 拍照保存。

2.2.3 免疫印迹

蛋白样品进行 SDS-PAGE 后, 通过半干法电转移过程, 恒流 100 mA 转印 1 h, 将目的蛋白转移到活化的 PVDF 膜上^[17]。用 5% 的脱脂奶粉作为封闭液和一抗二抗的稀释溶液, 其中一抗采用兔抗蛤蜊原肌球蛋白血清 (1:100000 稀释); 二抗采用 HRP 标记的羊抗兔血清 (1:5000 稀释)。然后使 PVDF 膜完全浸没于 ECL 蛋白印迹底物显色液中, 孵育 2 min, 曝光 4 ms, 在天能凝胶成像仪下拍照保存。

2.2.4 双向电泳

实验所用到的 IPG 胶条 7 cm, pH 范围 3~10, 分别进行胶条的等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤^[18], 停止后选用改良考马斯亮蓝染色液进行染色,

将凝胶置于 12%三氯乙酸(TCA)溶液中固定 1 h 后,经纯水清洗凝胶置于染色液中 12~15 h,用 3%的冰醋酸溶液作为脱色液进行脱色至背景干净,纯水脱色后凝胶成像仪拍照保存。

2.2.5 差示扫描量热法测定蛋白的热性能

实验方法参考 Lv 等^[19]测定菲律宾蛤仔原肌球蛋白热性能,用空铝坩埚作为参比物,装样量为 10~15 mg,测量温度范围 20~220 °C,升温速度设定 8 K/min,以氮气作为保护气体。

2.2.6 蛋白克隆及测序

(1) 取新鲜菲律宾蛤仔 10~20 mg 肌肉,液氮中彻底研磨成粉末;

(2) 按照动物总 RNA 提取试剂盒 Easy Pure RNA Kit 说明书步骤进行总 RNA 的提取;

(3) 取 5 μ L RNA 溶液,采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳方法进行检测;

(4) 按照反转录试剂盒 TAKARA PimeScript RT-TCR Kit 说明书步骤进行第一链 cDNA 的合成,得到的 cDNA 单链保存在-20 °C冰箱中备用;

(5) 运用 Bioedit 软件对 NCBI 网站 Genbank 数据库里 4 种贝类原肌球蛋白 cDNA 序列作对比:缢蛏(*Sinonovacula constricta*)EU082209、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)M85199.1、散大蜗牛(*Helix aspersa*)Y14855.1、耳鲍(*Haliotis asinina*)AY320360.1。据其序列保守区设计一对引物。

(6) PCR 扩增产物的纯化、转化及测序参考黄榕芳的方法^[2]。

3 结果与讨论

3.1 菲律宾蛤仔原肌球蛋白的纯化鉴定

菲律宾蛤仔可食用部分经过加热和盐溶液抽提得到的肌原纤维,经过 40%~50%硫酸铵沉淀步骤,能有效除去杂蛋白,得到高纯度的 37 kDa 的目的蛋白。将经过电泳分离的菲律宾蛤仔蛋白质凝胶利用免疫印迹实验进行过敏原活性定性分析,主要采用兔抗蛤蜊原肌球蛋白多克隆抗体对纯化的目的蛋白进行检测。将蛋白质阳性反应条带与菲律宾蛤仔蛋白质电泳分离图谱进行匹配,结果如图 1。图 1 结果显示,纯化的目的蛋白可以与相应的抗体产生免疫反应,说明所纯化的 37 kDa 蛋白确实为菲律宾蛤仔原肌球蛋白。

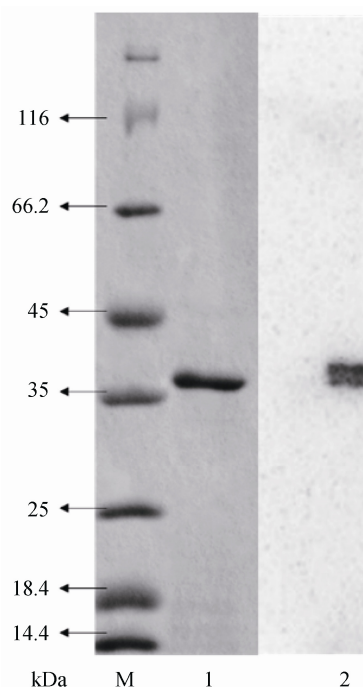


图 1 纯化的菲律宾蛤仔 37 kDa 目的蛋白鉴定

Fig. 1 Identification of the purified 37 kDa protein from

Ruditapes philippinarum

M: 标准蛋白; 1: 聚丙烯酰胺凝胶电泳条带; 2: 免疫印迹条带

M: marker; 1: SDS-PAGE of purified 37 kD; 2: Western-blot of purified 37 kD

3.2 菲律宾蛤仔原肌球蛋白等电点测定

采用双向电泳对提取的蛋白进行等电点的测定。据报道^[20],原肌球蛋白的等电点大多位于 pH 4~6 范围内,故选取 pH 3~10 的 IPG 预制胶条更广泛的用于一维等电点聚焦分离,再根据分子量的大小进行垂直电泳分离,使得蛋白质高效分离。结果如图 2 所示,纯化的菲律宾蛤仔原肌球蛋白呈现了一个单一的点,分子量大小约为 37 kDa,与前面的 SDS-PAGE 结果相符。蛋白的等电点在 5.1 左右,接近同属软体动物类的鱿鱼原肌球蛋白等电点 5.6^[3],进一步得到验证。

3.3 菲律宾蛤仔原肌球蛋白热性能

差示扫描量热法作为一种热分析技术,广泛用于蛋白质热变性的研究。蛋白的热稳定性可以由蛋白的热收缩温度显示出来,当达到一定温度时,蛋白会突然收缩发生变性^[21]。菲律宾蛤仔原肌球蛋白热性能变化如图 3 所示,热吸收峰为 109.98 °C,由结果可知原肌球蛋白热稳定性较高。Lv 等^[19]也曾报道过虾原肌球蛋白有较高的热稳定性。

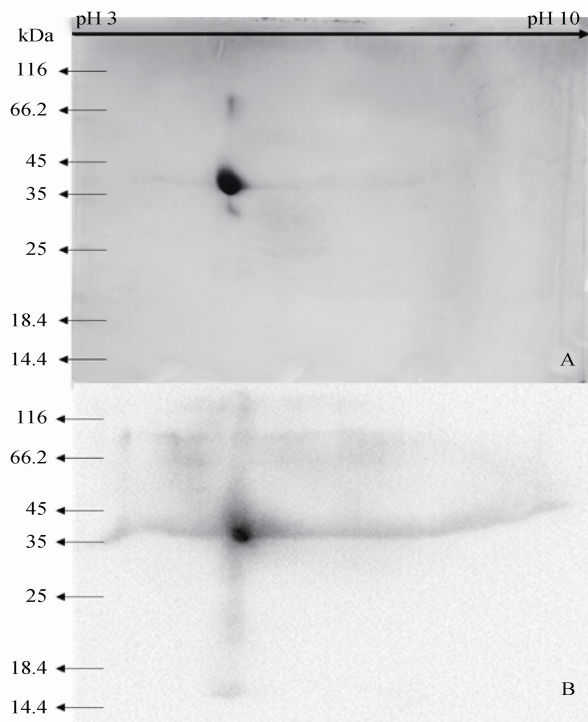


图 2 菲律宾蛤仔原肌球蛋白等电点分析

Fig. 2 Isoelectric point of purified tropomyosin from *Ruditapes philippinarum*

A: 双向电泳; B: 双向电泳后免疫印迹

A: 2-dimensional electrophoresis; B: Western-blot result after 2-dimensional electrophoresis

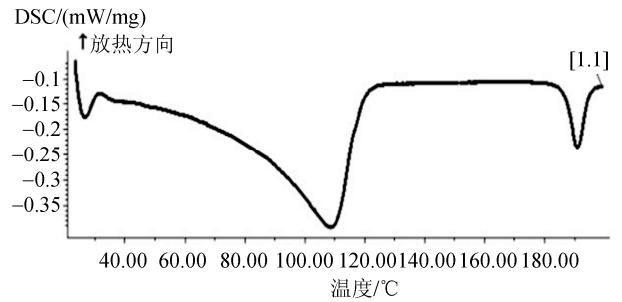


图 3 菲律宾蛤仔原肌球蛋白 DSC 曲线图

Fig. 3 Thermal transition curve of tropomyosin from *Ruditapes philippinarum* by DSC

3.4 菲律宾蛤仔原肌球蛋白克隆及测序

对比缢蛭(*Sinonovacula constricta*)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)、散大蜗牛(*Helix aspersa*)、耳鲍(*Haliotis asinina*)4 个 cDNA 序列, 结果如图 4。原肌球蛋白 cDNA 序列均为 855 bp, 较为保守。

正向引物 TR1: 5'- ATGGATGCMATCAAGAAG AAG-3'; 反向引物 TR3: 5'- ATCGTATTTGCGSTCAG CMTC-3'。(M、S 为兼并碱基: M=A 或 C; S=C 或 G)

由于菲律宾蛤仔组织总 RNA 的纯度和完整性会直接影响后续克隆, 因此对 RNA 质量要求较高。利

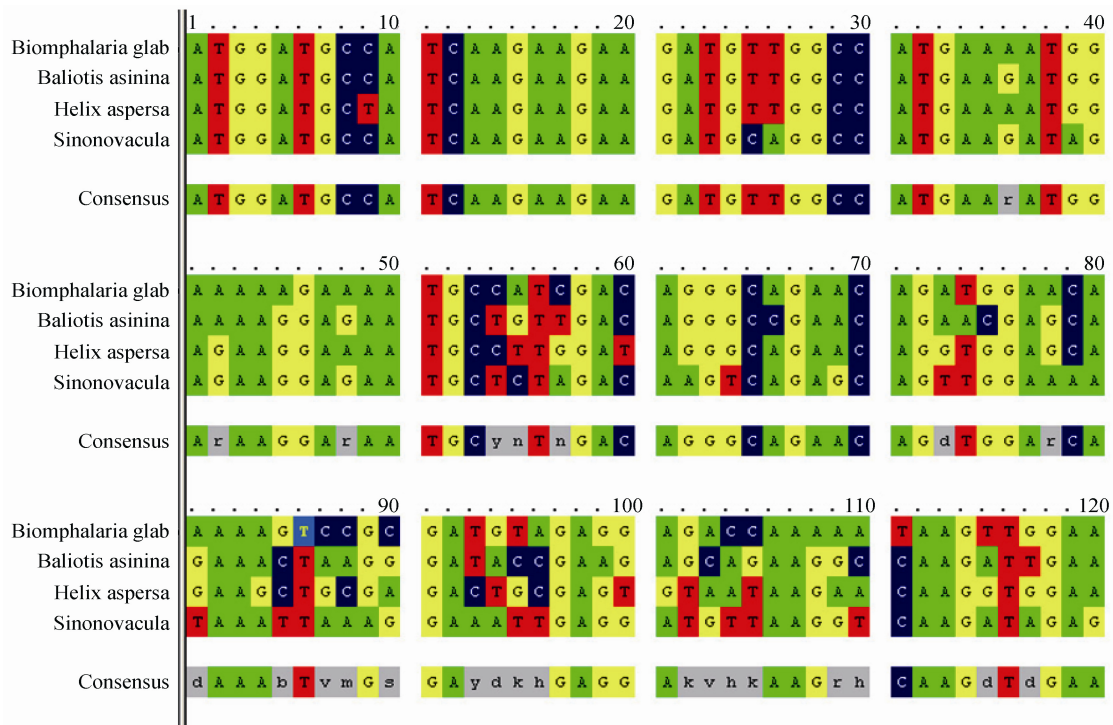


图 4 4 种原肌球蛋白 cDNA 序列起始部分

Fig. 4 The first part of the blast of tpromyosin sequences from 4 molluscs

用 NanoDrop 2000c 检测菲律宾蛤仔总 RNA 纯度, $A_{260}/A_{280}=1.98$, 说明总 RNA 的纯度较高。样品琼脂糖凝胶电泳结果如图 5-A, 两个平行样品均出现拖尾, 但条带清晰且亮度高, 28s rRNA 亮度达到 18s rRNA 亮度的 2 倍, 表明 RNA 提取后虽有些微降解但符合 RACE 扩增的质量要求。mRNA 反转录为 cDNA 第一链, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 5-B。3 个平行样品中 1 和 2 的 cDNA 片段大小一致, 呈现轻微拖尾, 3 的片段太小, 降解严重。选取片段 1 和片段 2 为模板进行 RACE 扩增。

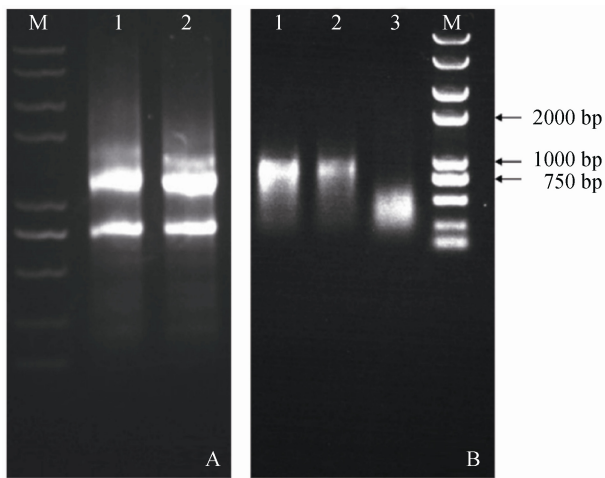


图 5 A: 菲律宾蛤仔组织总 RNA 提取; B: 总 RNA 反转录结果

Fig. 5 A: Total RNA of *Ruditapes philippinarum*;
B: Reverse transcription result

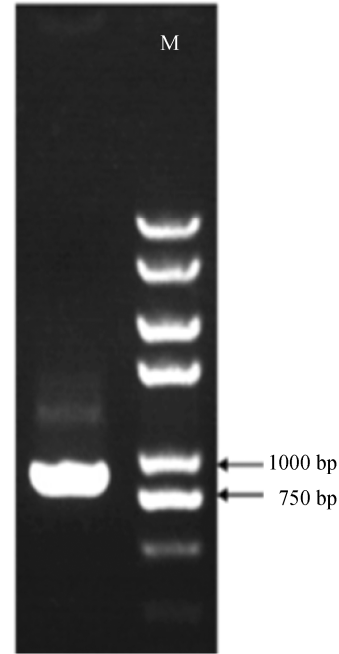


图 6 原肌球蛋白基因克隆电泳结果

Fig. 6 Agarose electropherogram of tropomyosin gene clone

菲律宾蛤仔原肌球蛋白的 cDNA 共 855 bp, 编码 284 个氨基酸。PCR 扩增如图 6。测序结果如下(*代表终止密码):

```

1 ATGGATGCCATCAAGAAGAAGATGCAGGCAATGAAATTGGAAAAGGAAAATGCCTTGGAT
2  M D A I K K K M Q A M K L E K E N A L D

61 AAAGCAGAACAGTTAGAACAAAACTTAGGGATGTTGAGGAAACCAAAGCAAAGGCAGAG
21  K A E Q L E Q K L R D V E E T K A K A E

121 GAAGATCTTACTCTTCTCCAAAAGAAATACACAAACCTCGAGAATGAGTTCGACCAAGTC
41  E D L T L L Q K K Y T N L E N E F D Q V

181 AACGAAAATACAATGAAGGTGTCAACAAGCTTGAGGTCTCCGAGAAACGTGTAACAGAG
61  N E K Y N E G V N K L E V S E K R V T E

241 GCAGAAGATGAAATCAAGGGCTACACTAGGCGTATCCAACCTTTAGAAGATGACCTTGAA
81  A E D E I K G Y T R R I Q L L E D D L E

301 CGTACACAAGTCAAGTTGGACGAAGCCACCTCTAAGTTGGAAGACGCAACCAAAACAGCA
101 R T Q V K L D E A T S K L E D A T K T A

361 GATGAGAGTGAAAGAGGACGCAAGGTACTCGAGAGCAGAAGCATTGCTGATGATGATAGA
121 D E S E R G R K V L E S R S I A D D D R

421 ATTGATGCATTAGAAAAACAAGTGAAAAGATGCTAAATATGTTGCTGAGGAAGCCGACCGT
141 I D A L E K Q V K D A K Y V A E E A D R

```

481 AAATACGATGAGGCTGCCCCGTAACCTTGCTATCACTGAAGTAGATCTTGAACGCTCCGAG
161 K Y D E A A R K L A I T E V D L E R S E

541 ACCCGATTGGAAGCTGCTGAAGCCAAAATTACCGAACTCAGTGAAGAGCTGGCTGTGGTT
181 T R L E A A E A K I T E L S E E L A V V

601 GGTAATAACTGTAAGGCCCTGCAGAACGCCGTAGACCAGGCATCTCAGAGAGAAGACAGT
201 G N N C K A L Q N A V D Q A S Q R E D S

661 TACGAGGAGACTATCCGTGACTTGACCCAGAGACTCAAGGACGCCGAGAATCGTGCGGCG
221 Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A A

721 GAGGCTGAACGCGTAGTCAACAAGCTGCAGAAGGAAGTTGACAGATTAGAAGATGAATTA
241 E A E R V V N K L Q K E V D R L E D E L

781 CTTGCTGAAAAGGAGAAGTACAAGCGATTAGTGACGAATTGGATCAAACATTTGCTGAG
261 L A E K E K Y K A I S D E L D Q T F A E

841 TTAGCTGGCATGTGA
281 L A G M*

利用生物信息学方法对不同软体类过敏原之间的同源性进行分析。结果表明, 菲律宾蛤仔原肌球蛋白序列的相似性在 65.1%~99.6%之间, 连续 6 个氨基酸残基完全一致的区域共有 4 个(120~125、164~178、214~228、251~261), 其中 251~261 区域包含在已报道的过敏原原肌球蛋白抗原表位中^[2], 极有可能是交叉抗原表位。

4 结 论

本实验证实了原肌球蛋白为菲律宾蛤仔的过敏原, 对其进行分离纯化、热稳定性鉴定和分子克隆, 并对获得的序列进行同源对比等研究, 较详细地分析了菲律宾蛤仔的基本特征, 为深入研究菲律宾蛤仔过敏原提供基础数据。

参考文献

- [1] Motoyama K, Ishizaki S, Nagashima Y, *et al.* Cephalopod tropomyosins: Identification as major allergens and molecular cloning [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12): 1997–2002.
- [2] 黄榕芳. 软体类海产品主要过敏原的基因克隆及生物信息学分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Huang RF. Gene cloning and bioinformatic analysis of molluscs seafood allergen [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [3] Hoffman DR, Day Jr ED, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp [J]. *Ann Allergy*, 1981, 47(1): 17–22.
- [4] Leung PS, Chu KH, Chow WK, *et al.* Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 94(5): 882–890.
- [5] 王晓斐, 李振兴, 林洪, 等. 中国对虾主要过敏原的鉴定及理化性质[J]. *水产学报*, 2008, (02): 273–278.
Wang XF, Li ZX, Lin H, *et al.* Identification and physical and chemical properties of major allergen of *Penaeus chinensis* [J]. *J Fish China*, 2008, (02): 273–278
- [6] Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, *et al.* Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*) [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 98(5 Pt 1): 948–953.
- [7] Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes [J]. *J Immunol*, 1993, 151(10): 5354–5363.
- [8] Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, *et al.* Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104(2): 329–337.
- [9] Jeong KY, Lee J, Lee IY, *et al.* Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin [J]. *Allergy*, 2003, 58(10): 1059–1063.
- [10] Aki T, Kodama T, Fujikawa A, *et al.* Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae* [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1995, 96(1): 74–83.
- [11] Zheng L, Lin H, Pawar R, *et al.* Mapping IgE binding epitopes of major shrimp (*Penaeus monodon*) allergen with immunoinformatics tools [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(11): 2954–2960.
- [12] 龚礼财, 邹玉兰, 李小龙, 等. 盘鲍原肌球蛋白基因的克隆、表达及其免疫原性鉴定[J]. *水产科技情报*, 2012, 39(4): 163–167.
Gong LC, Wu YL, Li XL, *et al.* Identification of gene cloning, expression and immunogenicity of *Halotis discus discus* tropo-

- myosin[J]. *Aquatic Sci Technol Inf*, 2012, 39(4): 163–167.
- [13] 肖军民, 张红梅, 宋协德, 等. 扇贝边致过敏性皮炎 139 例报告[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2000, (03): 152.
Xiao JM, Zhang HM, Song XD, *et al*. 139 cases of allergic dermatitis of scallop edge [J]. *China J Leprosy Skin Dis*, 2000, (03): 152.
- [14] 刘志刚, 邬玉兰, 吴淑勤, 等. 虾夷扇贝过敏原的克隆表达、纯化及免疫学鉴定[J]. *水生生物学报*, 2010, (05): 979–983.
Liu ZG, Wu YL, Wu SQ, *et al*. Identification of gene cloning, expression and immunogenicity of *Patinopecten yessoensis* allergy [J]. *J Aquatic Org*, 2010, (05): 979–983.
- [15] Lee BPH. Common whelk (*Buccinum undatum*) allergy: Identification of IgE-binding components and effects of heating and digestive enzymes [J]. *J Korean Med Sci*, 2004, 19(6): 793–799.
- [16] Wang X, Lin H, Sui J, *et al*. The effect of fish matrix on the enzyme-linked immunosorbent assay of antibiotics [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(7): 1603–1609.
- [17] Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, *et al*. Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(3): 985–991.
- [18] 刘一璇. 刀额新对虾过敏原的加工稳定性及特征肽的表征[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Liu YX. Characterization of peptides and processing stability of shrimp (*Metapenaeus*) allergen [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [19] Lv L, Lin H, Li Z, *et al*. Identification of oxidative modification of shrimp (*Metapenaeus*) tropomyosin induced by malonaldehyde [J]. *Eu Food Res Technol*, 2014, 239(5): 847–855.
- [20] Ignacio O, Benito C, Pilar CM, *et al*. Identification of commercial prawn and shrimp species of food interest by native isoelectric focusing [J]. *Food Chem*, 2010, 121: 569–574.
- [21] 陆宗超. 大菱鲆过敏原小清蛋白的制备及氧化对其 IgE 结合能力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Lu ZC. Influence of IgE binding ability on allergen oxidation and preparation of small turbot allergen [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



吕良涛, 博士, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: hdsgllt@163.com



李振兴, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn