

模拟肠液对 Pen a1 及其抗原表位免疫原性的影响

赵鑫¹, 高美须¹, 王志东¹, 支玉香², 牟慧¹, 沈月¹

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193) (2. 北京协和医院变态反应科, 北京 100052)

摘要: 体外模拟人体肠液 (SIF) 消化分析 Pen a1 消化后免疫原性的变化规律。虾致敏蛋白 Pen a1 及其表位多肽经 SIF 消化后, 用全抗体和表位特异性抗体检测 Pen a1 及其各抗原表位的免疫原性的变化, 并测定表位多肽的 SIF 消化稳定性。结果表明, Pen a1 的免疫原性在消化 60 min 内下降显著, 在 90 min 后下降缓慢, 生成的新片段仍具有免疫原性, 但会逐步完全分解至 SDS-PAGE 无法检测出; Pen a1 中 5 个抗原表位的免疫原性变化也类似。Western-blot 表明五个表位抗体与生成的新蛋白结合程度不同, No.3、4、5 抗体与 20~30 ku 处的新蛋白片段结合多于 No.1、2。ELISA 检测表明即使经过 4 h 的消化, 免疫原性也只是降低了 80%。Pen a1 各表位消化稳定性为 No.2>No.1>No.3>No.4>No.5; 5 个表位多肽的消化稳定性为 No.3>No.1>No.4>No.2>No.5, 与各表位上的酶切位点的个数呈负相关。可以得出 Pen a1 中 No.2 表位具有最高的消化稳定性, No.5 表位表消化稳定性最差。

关键词: 虾致敏蛋白 Pen a1; 体外模拟人体肠液; 免疫原性; 消化稳定性

文章编号: 1673-9078(2015)10-29-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.006

Effect of Simulated Intestinal Fluid on Immunogenicity of Pen a1 and Its Epitopes

ZHAO Xin¹, GAO Mei-xu¹, WANG Zhi-dong¹, ZHI Yu-xiang², MOU Hui¹, SHEN Yue¹

(1. Institute of Agro-products Processing Science & Technology, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100193, China) (2. Department of Allergy, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100052, China)

Abstract: Simulated intestinal fluid (SIF) was used to digest Pen a1, and changes in the immunogenicity of Pen a1 after digestion were analyzed. After digestion of shrimp antigen Pen a1 and the epitope peptides of Pen a1, a Pen a1 antibody and epitope-specific antibody were used to measure changes in the immunogenicities of Pen a1 and its epitopes, and the digestive stabilities of the epitope peptides of Pen a1 were determined. The results showed that the immunogenicity of Pen a1 decreased significantly within 60 min of digestion and continued to decrease slowly after 90 min. The generated protein fragments remained immunogenic, but were gradually degraded until they could no longer be detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Similar changes were observed for the immunogenicities of five epitopes of Pen a1. Western blot results indicated that the binding degrees of the five epitope antibodies with the proteolytic fragments of Pen a1 after the SIF digestion were different. The numbers of 20~30 ku fragments bound to antibody No. 3, 4, and 5 were greater than those bound to antibody No. 1 and 2. Enzyme-linked immunosorbent assay results indicated that after 4-h digestion, the immunogenicity had only decreased by 80%. The digestive stabilities of the five epitopes of Pen a1 were as follows: No. 2 > No. 1 > No. 3 > No. 4 > No. 5. In contrast, the digestive stabilities of the five epitope peptides of Pen a1 were in the following order: No. 3 > No. 1 > No. 4 > No. 2 > No. 5, which was negatively correlated with the number of cleavage sites on the epitope peptide. In conclusion, epitope No. 2 showed the highest digestive stability, while epitope No. 5 showed the lowest digestive stability.

Key words: Pen a1; simulated intestinal fluid; immunogenicity; digestive stability

目前食物过敏已成为严重的食品安全问题之一。食物中能与 50% 以上的过敏患者血清发生明显反应的一类过敏原为主要过敏原^[1]。虾的主要过敏原为 Pen a1, 是分子量为 36 ku, 284 个氨基酸组成, 等电点

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 农业部公益性行业科研专项 (201103007)

作者简介: 赵鑫 (1990), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 高美须 (1965), 女, 副研究员, 研究方向: 食品科学

4.74 的原肌球蛋白。过敏原中的抗原表位在过敏反应中起着决定性的作用, Ayuso 等^[2]通过交叠肽合成法, 并通过虾过敏患者血清推测出 Pen a1 中有 5 个 IgE 结合区, 共包含 8 个线性抗原表位, SDAP 过敏原数据库中有明确的 Pen a1 的表位信息。

食品过敏最有效的防治是严格控制和避免特定食品的摄入。因此, 低致敏性食物和人体消化过程中过敏原的免疫原性变化是近期研究的重点之一。在脱

敏方法研究方面,发现加热辐照综合作用^[3]、酶解和关键氨基酸替换^[4]等可降低某些过敏原的致敏性。在人体消化系统对过敏原的降解作用方面,早期 Astwood^[5]等对花生、大豆、芥末、蛋、牛奶等中常见过敏蛋白和非过敏蛋白进行模拟胃液消化试验发现过敏蛋白具有很强的耐消化性,而非过敏蛋白在 15 秒内就被完全降解,认为消化稳定性可作为过敏原的一般特征,但后来大量的研究^[6]表明,消化稳定性和过敏原性没有必然的联系。在肠胃消化过敏原的研究方面,黄圆圆^[7]用过敏原患者血清检测经肠胃液消化的锯缘青蟹肌肉中过敏原在 120 min 后被完全分解,但会产生一些较稳定的仍具有免疫原性的蛋白降解片段。郭永超^[8]等对 Pen a1 进行模拟肠液消化,发现经消化 60 min 后既被降解成小蛋白片段,用患者血清检测仍具有免疫原性。这些研究结果均表明过敏原消化降解后仍具有免疫原性,但所用的患者血清检测不能确定这些片段的属性。食物过敏反应并不是由蛋白质本身引起的,而是抗原表位在起作用,上述研究所用的血清或抗体均不能检测出某一段抗原表位是否存在,不能准确描述蛋白酶解过程中的分解规律和免疫原性变化情况。

本实验室通过提取纯化虾过敏原 Pen a1,采用 Fmoc 化学合成方法,合成了 Pen a1 的 5 个多表位肽,偶联载体制备免疫原,免疫兔子获得全蛋白抗体和对应的五个特异性表位抗体,已验证所得表位抗体灵敏度高,特异性强^[9]。本试验参照美国药典模拟肠液消化条件,对 Pen a1 及表位多肽进行酶解,用上述抗体研究肠液消化对 Pen a1 及其各抗原表位的影响,为脱敏食物的制备和治疗食物过敏提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售新鲜刀额新对虾;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG、96 孔酶标板、MD34 透析袋、预染蛋白 Marker, Fermentas 公司;硝酸纤维素膜(NC 膜),北京 Solarbio 生物技术公司;Pancreatin(catalog no. P0636), Sigma 公司;Pen a1 表位多肽由上海紫域生物科技有限公司合成;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

AE-8130 型电泳仪,日本 ATTO 公司;AlpHaEase@FC 凝胶成像系统,美国 AlpHa 公司;HH-4 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器制造

有限公司;WD-9405B 型水平摇床购于北京六一仪器厂;Eppendorf 8 孔道手动可调移液器,德国 THOMAS CSIENTIFIC 公司;I-mark 型酶标仪、1575 型洗板机,美国伯乐 BIO-RAD 公司;精密电子天平,德国赛多利斯仪器有限公司;PHS-3E 型 PH 计;WD-9405B 型摇床。

1.3 表位抗体的制备

根据学者 Ayuso 得出的 Pen a1 五个 IgE 结合区,利用 Fmoc 化学合成法分别合成这 5 段肽段:Epitope1: Pen a1⁴³⁻⁵⁷, Epitope2: Pen a1⁸⁵⁻¹⁰⁵, Epitope3: Pen a1¹³³⁻¹⁴⁸, Epitope4: Pen a1¹⁸⁷⁻²⁰², Epitope5: Pen a1²⁴⁷⁻²⁸⁴。将合成的多肽部分用 KLH 偶联,制备成免疫原免疫纯种新西兰白兔,获得五种抗血清^[10],部分用 BSA 偶联作为包被原,部分保持裸肽状态用于消化试验。

1.4 方法

1.4.1 Pen a1 提取、纯化及鉴定

参照李振兴^[11]的方法。将去头去壳去肠线的虾肉匀浆机中匀浆,用生理盐水按照 1:1 比例悬浮。加入 4 倍体积的冷丙酮充分混匀,0 °C 搅拌离心,回收沉淀物,重新用冷丙酮悬浮并混匀。将沉淀物风干得丙酮粉。按 1:10 比例加入抽提液(1 mol/L KCl, 5 mmol/L DTT, pH 7.4),低温搅拌过夜提取,离心分离得上清液即为虾蛋白粗提液。调 pH 至 7.4,缓慢加入硫酸铵至饱和度 30%,4 °C 低温下缓慢搅拌 1.5 h,后静置 4 h,4 °C, 9000 r/min 离心 30 min,收集沉淀。将沉淀用 1×PBS 充分溶解,逐滴加入 50% (V/V) 盐酸溶液,直到 pH 至 4.74。低温下缓慢搅拌 1 h,4 °C 静置 4 h, 9000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,低温蒸馏水透析 48 h,期间换透析液数次。冷冻干燥得蛋白冻干粉,-20 °C 低温保存。同时 SDS-PAGE 鉴定分离纯化效果。

1.4.2 模拟肠液消化试验

人工肠液 SIF 配置参照美国药典^[12]: 0.05 mg/ml 的胰液素溶于 0.05 mol/L 的 KH₂PO₄, pH7.5。根据测定的酶活,对酶解蛋白的酶与底物蛋白比例进行了筛选,最后选择了 1:50 (m/m)。配好的 SIF 提前于 37 °C 水浴震荡,将蛋白样品加入,间隔时间为 0、1、5、15、30、60、90、105、120、240 min 依次取出,每次取出 1 mL 100 °C 加热灭酶 5 min。其中 0 min 时是将含有胰液素的 SIF 先 100 °C 加热 5 min 终止反应,再加入底物蛋白,蛋白最终浓度与其他时间间隔的相同。

1.5 SIF 消化对 Pen a1 分子量的影响测定

采用 5% 浓缩胶, 12% 和 18% 分离胶对辐照前后

的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 初步判断 Pen a 1 经辐照后其分子量变化情况。

1.6 SIF 消化对 Pen a1 免疫原性的影响测定

1.6.1 免疫印迹定性检测消化后 Pen a1 结合抗体的能力^[13]

将处理后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳试验, 得到的凝胶在 96 mA 条件下转膜至 NC 膜 1.5 h, TBST 震荡洗涤 3 次, 每次 10 min; 用封闭液 4 °C 封闭过夜。用封闭液将对应抗体稀释到各自的最适浓度, 加一抗, 37 °C 震荡温育 1.5 h, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 稀释至适当浓度, 加二抗, 37 °C 震荡温育 1 h, TBST 洗涤 4 次, 每次 5 min, 再用 TBS 洗涤 2 次, 每次 5 min。DAB 显色液 37 °C 避光显色至条带清晰, 立即用蒸馏水漂洗终止反应。漂洗后的膜在滤纸上吸干, 出现棕色条带为阳性, 及时封膜摄像。

1.6.2 ic-ELISA 定量测定 Pen a1 及其各表位免疫原性变化

用纯化的虾蛋白(测多肽时用 BSA 偶联的多肽包被原)包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL, 4 °C 温育过夜, 封闭液 37 °C 封闭 1.5 h, 洗涤(磷酸盐缓冲液(PBST, pH 7.4)洗涤 5 次, 甩干, 以下同)。PBS 梯度稀释的样品, 与等体积的一抗混合, 37 °C 温育 2 h, 每孔 100 μL 加入酶标板, 37 °C 温育 1.5 h, 洗涤, 每孔加 100 μL HRP 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 温育 1 h, 洗涤, 加入 50 μL TMB 显色液显色, 37 °C 温育 15 min 后每孔加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 测定 OD₄₅₀ 值。

1.6.3 数据分析

以样品浓度对数值为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制样品对抗体的抑制率标准曲线, 从而求抑制率和抑制率下降百分比, 经 SAS9.2 的进行差异显著性分析。其中

$$\text{抑制率} = \frac{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{样品}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率下降百分比} = \frac{\text{降解后抑制率}}{\text{未降解抑制率}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

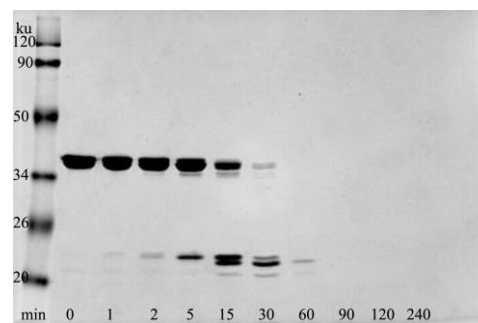
2.1 模拟肠液消化对 Pen a1 分子量的影响

从图 1 中可以看出, 随着消化时间的延长, 36 ku 的 Pen a1 逐渐被消化, 60 min 后被完全分解, 在 23 ku

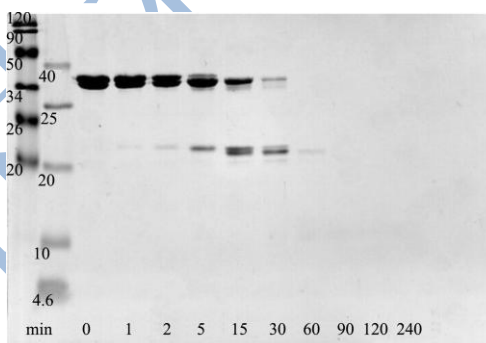
处生成一条较稳定的条带, 15 min 该条带量最多, 90 min 后被完全分解。图 2 采用分离范围更大的 18% 浓度的分离胶进行电泳, 从图中可知在 20 ku 以下无明显条带生成。

2.2 模拟肠液消化对 Pen a1 免疫原性影响

2.2.1 免疫印迹检测 Pen a1 经 SIF 消化后结合抗体能力



(a) SDS-PAGE (12%分离胶)

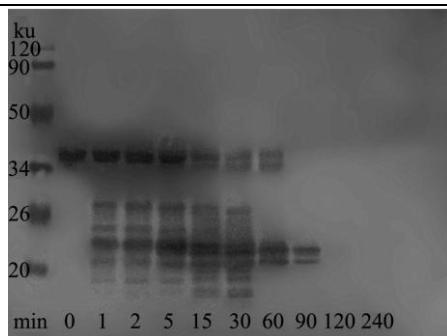


(b) SDS-PAGE (18%分离胶)

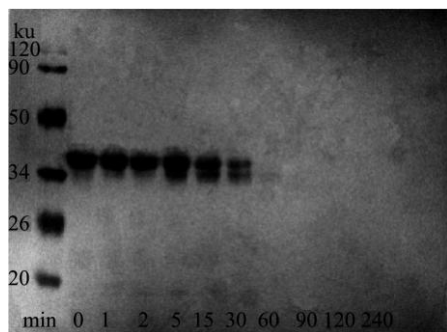
图 1 SIF 对 pen a1 分子量的影响

Fig.1 Effect of SIF on the molecular weight of Pen a1

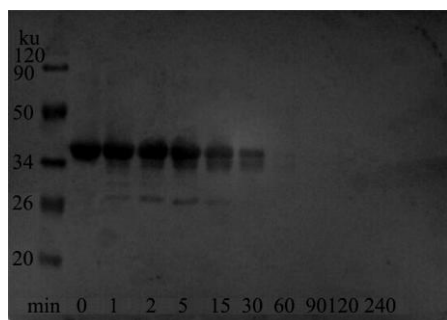
免疫印迹结果见图 3。结果显示, 36 ku 的 Pen a1 逐渐被降解, 30 min 内与全抗体和表位抗体均结合, 60 min 时只与全抗体和 No.3 抗体结合, 90 min 后 Pen a1 被完全分解, 与各抗体均无结合。消化 1 min 后在 26 ku 逐渐处生成一些片段仍具有致敏性, 该片段与全抗体和 No.3 抗体在 30 min 内都有结合, 60 min 后无结合, 与 No.2、4、5 抗体仅在 5 min 内有较明显的结合, 而与 No.1 抗体无任何结合。在 20 ku 左右处生成一系列的蛋白片段, 其中 22 ku 处的条带最明显, 这些条带与各抗体发生不同程度的结合, 其中与全抗体结合的最多, No.3 抗体次之, 二者均在 120 min 后无结合, No.4、5 抗体与这些片段也有部分结合, 在 90 min 后无结合, 而 No.1、2 抗体与这些片段几乎无任何结合作用, 说明片段 20、22、26 ku 主要携带 No.3、4、5 抗原表位。



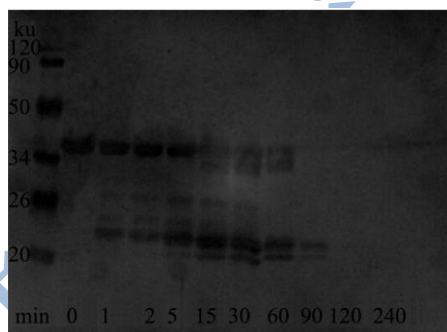
(a)全抗体



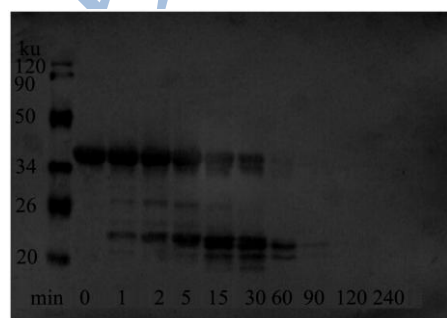
(b)No.1 抗体



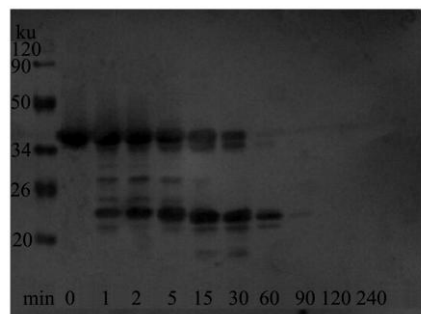
(c)No.2 抗体



(d)No.3 抗体



(e)No.4 抗体



(f) No.5 抗体

图2 免疫印迹检测结果

Fig.2 Result of western-blot

免疫印迹的结果可知, 经过 SIF 消化后, 36 ku 的 Pen a1 逐渐消失, 而生成的新的蛋白片段仍具有致敏性, 与表位抗体发生不同程度的结合作用, 其中与 No.3、4、5 抗体结合的较多, No.1、2 较少。此外, 免疫印迹法具有分析容量大、敏感度高、特异性强等优点, 同时抗体的效价高, 抗原抗体结合紧密, 特异性高等, 使得电泳中观察不到的片段, 免疫印迹仍可以检测出。

2.2.2 ic-ELISA 定量检测 Pen a1 经 SIF 消化后免疫原性变化

2.2.2.1 全抗体检测 Pen a1 经 SIF 消化后免疫原性变化

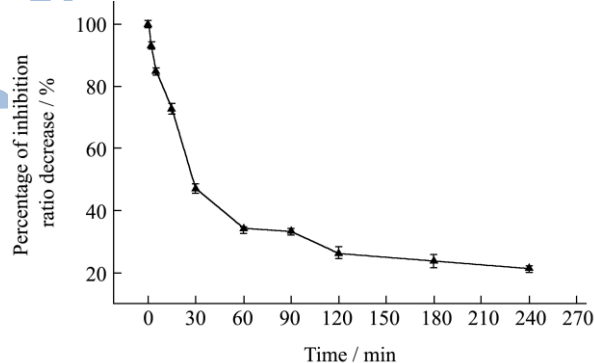


图3 全抗体检测 Pen a1 经 SIF 消化后抑制率变化结果

Fig.3 Changes of inhibition rate after SIF digestion of Pen a1 using Pen a1 antibody

Pen a1 经消化后, 对全抗体的抑制率影响结果见图。经 LSD 差异显著性分析, 抑制率随时间极显著的降低, 说明经过消化后, Pen a1 免疫原性显著降低, 其中在 60 min 内快速下降, 120 min 后下降缓慢。结合免疫印迹全抗体检测结果 (图 3), 在 120 min 后无条带与全抗体结合, ic-ELISA 结果表明, 在 120 min 后免疫原性趋于稳定, 但是即使经过消化 4 h, 仍具有 20% 的免疫原性, 说明在现有的实验条件下有部分具有免疫原性的片段免疫印迹检测不到, 可经 ic-ELISA 检测出。

2.2.2.2 表位抗体检测 Pen a1 经 SIF 消化后免疫原性变化

Pen a1 经消化后, 对 5 个表位抗体的抑制率结果可知经 LSD 差异显著性分析, 抑制率均随时间极显著的降低, 说明经过消化后, Pen a1 及其抗原表位的免疫原性均显著下降。由于对各个抗体的初始抑制率不同, 以抑制率下降百分比分析五个抗原表位的消化稳定性, 见图, 在 60 min 内 Pen a1 各表位免疫原性均迅速下降, 其中 No.5 下降最快, No.2 最慢, 在 90 min 后都趋于平稳。经 LSD 差异显著性分析, 抑制率下降结果为 No.5>No.4>No.3>No.1>No.2, 即消化稳定性为 No.2>No.1>No.3>No.4>No.5, 其中 No.1、3、4 之间无显著性差异。结合免疫印迹结果, No.3、4、5 抗体结合的片段较多, No.1、2 较少, 但是 ic-ELISA 检测 No.2、1 消化稳定性反而较高。

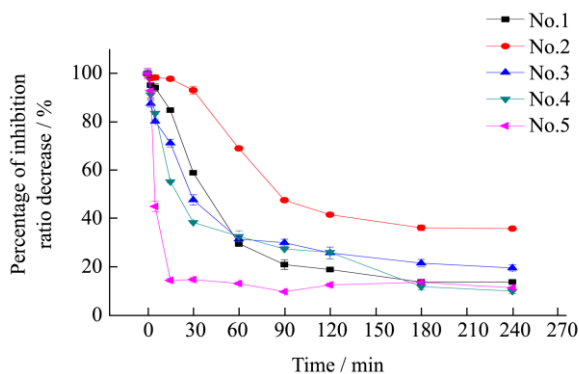


图 4 表位抗体检测 Pen a1 经 SIF 消化后免疫原性变化

Fig.4 Changes in immunogenicity after SIF digestion of Pen a1 using epitope-specific antibody

2.2.3 ic-ELISA 定量检测表位多肽经 SIF 消化

表 1 胰蛋白酶在 Pen a 1 中 5 个抗原表位上的酶切位点

Table1 Cleavage sites of five epitopes of Pen a1 with trypsin

编号	位置	长度	氨基酸序列	胰蛋白酶酶切位点
1	43~57	15	VHNLQ KRMQQ LENDL	48, 49
2	85~105	21	VAALN RRIQL LEEDL ERSEE R	90, 91, 101, 105
3	133~148	16	RSLSD EERMD ALENQ L	133, 140
4	187~202	16	ESKIV ELEEE LRVV GN	189, 198
5	247~284	38	QKLQK EVDRL EDELV NEKEK YKSIT DELDQ TFSSEL SGY	248, 251, 255, 264, 266, 268

2.3 讨论

在检测方法上, 免疫印迹可观察到电泳中无法显示的条带与抗体的结合作用, 免疫印迹检测结果显示, No.3、4、5 抗体结合的蛋白片段明显高于 No.1、2, 推测 No.1、2 消化稳定性较差, 但是在 ELISA 定量检测结果显示 No.1、2 的消化稳定性反而较高, 分析原因可能是 Pen a1 被酶解后生成一些小肽段落在表位区, 电泳、免疫印迹无法检测到这些小片段, 但是

后免疫原性变

消化后表位多肽对表位抗体的抑制率结果如图 6。经 LSD 差异显著性分析, 对应抗体对消化后表位多肽的抑制率均极显著下降, 说明经消化后, 表位多肽的免疫活性显著下降。抑制率下降百分比经双方面分类的方差分析可知, 在 30 min 内五个表位多肽的免疫原性在 30 min 内均迅速下降, 60 min 后平稳, 只有 No.3 表位多肽在 180 min 后显著下降; 各表位多肽抑制率下降程度为 No.3>No.1>No.4>No.2>No.5, 结合 SDAP 数据库搜索胰蛋白酶在 Pen a1 抗原表位上的酶切位点, 见图, 可以看出各表位多肽的消化稳定性与其酶切位点的个数呈负相关, No.1、3、4 的酶切位点均是两个, 使得 No.1、3、4 的消化稳定性高于其它, 其中 No.3、1 多肽消化稳定性最高, No.5 多肽表位上的酶切位点最多, 消化稳定性最差。在消化 Pen a1 中, No.3、1 稳定性也相对较高。

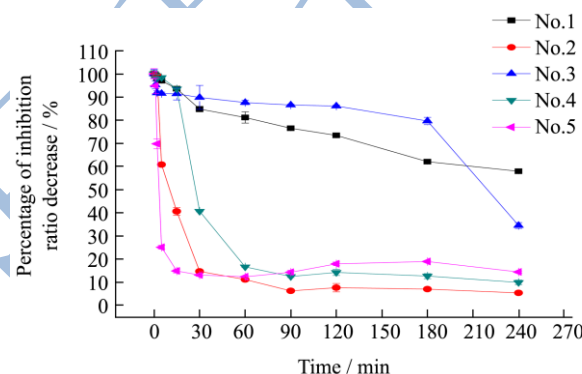


图 5 表位多肽经 SIF 消化后免疫原性变化

Fig.5 Changes in immunogenicity after SIF digestion of epitope peptides

ELISA 可检测到, 即条带消失并不能代表无免疫原性, 说明免疫印迹不能精确判断过敏原 Pen a1 消化稳定性的高低, 需经 ELISA 定量测定。

此外, 在消化多肽的试验中, No.3 表位多肽的稳定性最高, 一方面因为该表位上的酶切位点少, 另一方面可能是由于其中一个酶切位点位于多肽首端; 5 个表位多肽中 No.3、1 多肽消化稳定性最高, 而在消化 Pen a1 试验中, No.3、1 表位的消化稳定性并不是最高, 分析原因, 表位抗体在检测整个蛋白和对应多

肽的灵敏度不同,表位抗体在检测表位多肽的试验中,抗体和多肽结合的较充分,而在检测整个蛋白 Pen a1 的试中,由于蛋白的分子量大,表位抗体与蛋白上对应的表位结合可能需要更长的时间,或是由于蛋白空间结构的影响使其结合的不充分;No.5 多肽的消化稳定性最差,在消化 Pen a1 中 No.5 表位的免疫原性稳定性也最差,说明在消化 Pen a1 时其空间结构对 No.5 表位未起到有效的保护作用;而 No.2 表位上的酶切位点也较多,其多肽消化稳定性较差,但在消化 Pen a1 中 No.2 表位的消化稳定性却最高,说明 SIF 在消化 Pen a1 时其空间结构对 No.2 表位有一定的保护作用,使其抗 SIF 消化。

3 结论

经 SIF 消化后, Pen a1 及其抗原表位的免疫原性在 60 min 内显著下降,90 min 后下降缓慢,即使经过 4 h 的消化,仍具有约 20% 的免疫原性。No.2 表位具有最高的消化稳定性,其次为 No.1、3、4 表位, No.5 表位消化稳定性最差。

参考文献

- [1] Nordlee J A, Taylor S L, Townsend J A, et al. Identification of a brazilnut allergen in transgenic soybeans [J]. *N. Engl. J. Med.*, 1996,334(11): 688-692
- [2] Ayuso R, Lehrer S B, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen pen a1 (tropomyosin) [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 127: 27-37
- [3] MOU Hui, GAO Mei-xu, ZHAO Jie, et al. Influence of gamma irradiation and heat treatment on the immunogenicity of five epitopes of Pen a1 [J]. *Food Science and Technology Research*, 2014, 20(5): 955-960
- [4] 牟慧,高美须,李淑荣等.虾过敏原 Pen a1 抗原表位的关键氨基酸分析[J].*分析化学*,2014,42(11):1604-1610
MOU Hui, GAO Mei-Xu, LI Shu-rong, et al. Critical amino acids analysis of epitopes in Pen a1 [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(11): 1604-1610
- [5] Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro* [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(10): 1269-1273
- [6] Bannon G, Fu T J, Kimber I, et al. Protein digestibility and relevance to allergenicity [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2003, 111(8): 1122-1124
- [7] 黄园园,刘光明,周利亘等.蟹类主要过敏原的模拟肠胃液消化及其对过敏原活性的影响[J].*中国食品学报*,2009, 9(4):15-22
HUANG Yuan-yuan, LIU Guang-ming, ZHOU Li-gen, et al. The simulated gastrointestinal digestion of major allergic source from mud crab and its effect on allergic source activity [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2009, 9(4): 15-22
- [8] Guo Yong-chao, Li Zhen-xing, Lin Hong. The effect of simulated gastrointestinal digestion on shrimp penaeus vannamei allergenicity [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27: 703-707
- [9] 赵杰,高美须,潘家荣,等.Pen a 1 表位抗原多克隆抗体的制备及鉴定[J].*中国农业科学*,2013,46(15):3191-3198
ZHAO Jie, GAO Mei-Xu, PAN Jia-rong, et al. Preparation and identification of polyclonal antibody of one Pen a1 epitope peptide [J]. *Scientia Agriculturae Sinica*, 2013, 46(15): 3191-3198
- [10] 牟慧,高美须,潘家荣,等.Pen a1 抗原表位 187-202 关键氨基酸的筛选和鉴定[J].*中国农业科学*,2014,47(9):1793-1801
MOU Hui, GAO Mei-xu, PAN Jia-rong, et al. Selection and identification of critical amino acids in epitope187-202 of Pen a1 [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(9): 1793-1801
- [11] 李振兴.虾(*Penaeus Vannamei*)过敏原免疫活性的研究[D].青岛,中国海洋大学,2006
LI Zhen-xing. Study on the immunoreactivity of shrimp allergen [D]. Qingdao, Ocean University of China, 2006
- [12] Anonymous. *The United States Pharmacopeia* [M]. The United States: The National Formulary, 1995
- [13] 许舒婷.低敏花生品种筛选及电子束辐照对其免疫原性影响研究[D].北京,中国农业科学院研究生院,2012
XU Shu-ting. Screening of hypoallergenic peanut and effect of electron beam irradiation on immunoreactivity of peanut allergens [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012