

# 拟穴青蟹新型过敏原磷酸丙糖异构酶的鉴定分析

陈仲玮<sup>1,2</sup>, 费丹霞<sup>1,2</sup>, 杨 阳<sup>1,2</sup>, 刘鹏源<sup>1,2</sup>, 蔡秋凤<sup>1,2</sup>,  
张凌晶<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2</sup>, 刘光明<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 利用硫酸铵盐析和柱层析对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)进行处理, 纯化得到28 ku的新型过敏原蛋白, 经质谱鉴定为磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, TIM), 与中华绒螯(*Eriocheir sinensis*)TIM序列相似度达到93%。该过敏原蛋白能够与甲壳类过敏患者血清和兔抗克氏原螯虾多克隆抗体发生特异性反应, 等电点为5.8。对热处理稳定, 加热温度高于50℃时发生聚合, 且多聚体仍具有免疫结合活性, pH>9.0时, 对TIM免疫结合活性略有影响。在模拟胃肠液消化过程中, TIM耐受胰蛋白酶消化但不耐受胃蛋白酶消化, 模拟胃液消化后的小分子片段仍保留有IgG结合活性。综合血清学及性质分析, 该磷酸丙糖异构酶是拟穴青蟹的一种新型过敏原。

**[关键词]** 拟穴青蟹; 磷酸丙糖异构酶; 新型过敏原; 纯化; 性质分析

**[中图分类号]** Q 785

## Identification and Characterization of Triosephosphate Isomerase as a Novel Allergen in *Scylla paramamosain*

CHEN Zhong-wei<sup>1,2</sup>, FEI Dan-xia<sup>1,2</sup>, YANG Yang<sup>1,2</sup>, LIU Peng-yuan<sup>1,2</sup>,  
CAI Qiu-feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Ling-jing<sup>1,2</sup>, CAO Min-jie<sup>1,2</sup>, LIU Guang-ming<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** A 28 ku protein was purified from crab (*Scylla paramamosain*) and identified to be triosephosphate isomerase (TIM) by mass spectrometry, which had a 93% similarity with the TIM sequence of *Eriocheir sinensis* and its isoelectric point was 5.8. It also showed IgE-binding activity with shellfish allergic patients' sera and IgG-binding activity with rabbit anti-*Procambarus clarkii* polyclonal antibody. TIM aggregated after being heated above 50℃ and the polymer remained allergenic reactivity. The binding activity of TIM reduced under strong alkaline condition (pH>9.0). The allergen protein could be digested into small fragments by pepsin while it remained the IgG reactivity.

**Keywords:** *Scylla paramamosain*; triosephosphate isomerase; novel allergen; purification; physico-chemical characterization

[收稿日期] 2016-03-10

[修回日期] 2016-04-07

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(U1405214, 31171660)

[作者简介] 陈仲玮(1990—), 男, 硕士生, 主要从事食品生物技术研究。通信作者: 刘光明(1972—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: gmlu@jmu.edu.cn。

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

## 0 引言

食物过敏是机体免疫系统对某一特定食物产生的一种异常免疫反应。食物过敏反应症状主要可以分为消化系统症状、呼吸系统症状、皮肤系统症状3大类<sup>[1]</sup>。联合国粮食及农业组织公布的8大类主要致敏食物包括花生、坚果、大豆、小麦、鱼类、甲壳类、牛奶和蛋类。在8大类致敏食物中,甲壳类是其中重要一类,蟹类又作为甲壳类水产品中常见的物种,其种类繁多。拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)属于梭子蟹科青蟹属,为暖水广盐性海洋蟹类,具有个体大、生长快、适应性强的特点,因其肉质鲜美、营养丰富,已经成为我国重要的海水养殖蟹类,2013年其养殖产量已达到13.807 1万t<sup>[2]</sup>。已经报道的蟹类主要过敏原包括原肌球蛋白(tropomyosin, TM)和精氨酸激酶(arginine kinase, AK)。TM是甲壳类肌原纤维中的主要过敏原,其空间结构有两个 $\alpha$ 螺旋结构相互缠绕成超螺旋结构,不同物种间存在免疫交叉反应<sup>[3-5]</sup>。AK是调节细胞磷酸精氨酸与ATP间能量平衡的重要酶类,是锯缘青蟹和拟穴青蟹中的重要过敏原<sup>[6-7]</sup>。近年来,毛海燕等<sup>[8]</sup>发现,存在于无脊椎动物肌肉和神经组织中21 ku的EF-手型钙离子结合蛋白——肌质钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)为拟穴青蟹中新型过敏原,同时在克氏原螯虾中也有报道<sup>[9]</sup>。Zhang等<sup>[10]</sup>发现具有两种亚型的肌球蛋白轻链为克氏原螯虾中新型过敏原。此外,已有研究报道磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, TIM)家族是褐虾(*Crangon crangon*)<sup>[11]</sup>、黑虎虾(*Penaeus monodon*)<sup>[12]</sup>、德国小蠊(*Blattella germanica*)<sup>[13]</sup>、尘螨(*Dermatophagoides farinae*)<sup>[14]</sup>等的过敏原,但国内外尚未见蟹类TIM及其致敏性的研究报道。本研究以拟穴青蟹为对象,采用过敏患者阳性血清筛选肌浆蛋白中的新型过敏原,并对其进行纯化鉴定和性质分析,为进一步研究水产品新型过敏原及免疫交叉反应奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活的拟穴青蟹购自厦门市集美菜市场,去壳取肉用于实验。甲壳类过敏患者血清(1—6号)采自厦门市第二医院,编号分别为099809、152077、567055、645376、722719、787956;健康人血清(N)3份采自集美大学医疗中心,编号分别为833684、839758、856386。所有血清分装后于-30℃冰箱保存备用。

Q-Sepharose、Phenyl-Sepharose购自美国GE Healthcare公司;硝酸纤维素膜购自美国Pall公司;羊抗兔IgG-HRP、猪胰蛋白酶购自美国Pierce公司;IPG胶条、两性电解质购自美国Bio-Rad公司;猪胃蛋白酶和兔抗克氏原螯虾TIM多克隆抗体由本实验室制备。

### 1.2 仪器与设备

组织捣碎机(PT-3100, Kinematica, 瑞士);高速冷冻离心机(Avanti JA-26.5, Beckman, 美国);蛋白层析系统AKTA(UPC 900, GE Healthcare, 美国);质谱仪(Triple TOF 5600 LC-MS, AB SCIEX, 美国);等电聚焦电泳仪(Ettan IPGphor 3, GE Healthcare, 美国);化学发光荧光和可见光凝胶成像仪(Fluor Chem Q, Alpha Innotech, 美国);圆二色谱仪(Chirascan, Applied Photophysics, 英国)。

### 1.3 拟穴青蟹肌浆蛋白的制备及免疫印迹分析

拟穴青蟹肌浆蛋白的提取参照Yu等<sup>[7]</sup>的方法并略作调整。取新鲜蟹肉100 g,去筋膜切碎,置于4倍体积的冰冷缓冲液A中(20 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸钠、20 mmol/L 苯甲基磺酰氨, pH=8.0)。用组织捣碎机匀浆后,进行高速离心(15 000 r/min, 4℃, 20 min)。离心后所得上清液即为肌浆蛋白。将肌浆蛋白进行SDS-PAGE电泳分析,并使用甲壳类过敏患者血清采用免疫印迹方法检测其IgE结合活性<sup>[15]</sup>。

### 1.4 目的蛋白纯化及免疫印迹分析

将初步制备的拟穴青蟹肌浆蛋白进行进一步处理。采用70%~90%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,

于 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀复溶于缓冲液 B (10 mmol/L Tris - HCl、0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸钠, pH = 8.0) 中并用缓冲液 B 充分透析过夜, 于 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 10 min 取上清液。将离心后的样品上样于用缓冲液 B 平衡好的 Q - Sepharose 阴离子交换柱, 流洗未吸附部分后, 采用含有 0 ~ 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液 B 进行线性洗脱, 收集洗脱部分进行蛋白质含量测定。用 SDS - PAGE 分析蛋白质组成, 收集含有目的蛋白的组分再次使用缓冲液 B 充分透析过夜, 浓缩后再次上样于用缓冲液 B 平衡好的 Q - Sepharose 阴离子柱, 并用含有 0 ~ 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液 B 进行线性洗脱。收集含有目的蛋白的组分, 加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至终浓度为 1.5 mol/L 的饱和, 使用 AKTA 蛋白层析系统上样于 Phenyl - Sepharose (5 mL) 预装柱, 流洗至蛋白质含量至基线, 然后采用含有 1.5 ~ 0 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的缓冲液 B 进行线性洗脱, 收集蛋白质峰, 进行 SDS - PAGE 分析。

## 1.5 目的蛋白的质谱分析

### 1.5.1 样品制备

将纯化的 28 ku 蛋白质样品进行 SDS - PAGE 分析, 经考马斯亮蓝 G - 250 染色, 用脱色液充分脱色至出现清晰蛋白质条带后, 将目的条带切下。经过再次脱色、DTT 还原和 IAA 烷基化后, 每管各加 0.02 g/L 的蛋白质组学级胰蛋白酶 20  $\mu\text{L}$ , 37 ℃ 水浴消化过夜; 酶解后上清液转移至另一新的 EP 管中离心浓缩干燥, 待作质谱分析<sup>[16]</sup>。

### 1.5.2 LC - MS/MS 质谱分析

将离心浓缩干燥后的胰酶切多肽样品重新溶解于 Nano - RPLC 流动相 A (质量分数 0.1% 甲酸, 质量分数 2% 乙腈溶液) 中, 装瓶上样, 进行在线 LCMS 分析。质谱采集到的原始 wiff 图谱文件, 采用 Paragon algorithm 算法的 Protein Pilot Software v. 4.5 (AB SCIEX, USA) 软件进行数据加工处理和检索分析, 数据库为 NCBI 下的 Crustaceans 物种蛋白质数据库 (包含 26 799 条蛋白质序列), 检索参数设置如下: 半胱氨酸烷基化为碘乙酰胺修饰、胰蛋白酶酶解, 检索方式为 Thorough 检索分析, 一级质谱质量容差为  $2 \times 10^{-4}$ , 二级质谱为 0.1 u, 假阳性率控制为 1% FDR, 蛋白质检索 unused score 大于 1.3 视为可信结果, 肽段置信度大于 95% 为可靠序列。

## 1.6 拟穴青蟹 TIM 的理化性质分析

### 1.6.1 等电点分析

将纯化后的样品进行脱盐浓缩后, 参照 Jiang 等<sup>[17]</sup>的方法, 选用长度为 7 cm、pH = 3 ~ 10 的 IPG 胶条, 使用等电聚焦电泳仪 (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare) 进行等点聚焦, 第二向选用质量分数 12% 的 SDS - PAGE, 经考马斯亮蓝染色后, 以样品点的位置计算纯化蛋白的等电点。

### 1.6.2 圆二色谱分析

将纯化的拟穴青蟹 TIM 样品调整至蛋白质质量浓度为 0.4 g/L, 在室温条件下使用 Chirascan 圆二色谱仪进行蛋白质二级结构测定, 所使用的比色皿厚度为 0.1 cm, 测定参数为: 扫描波长范围 190 ~ 260 nm, 扫描速度 1 nm/s, 光谱间隔 1 nm, 反应时间 2 s。利用 CDNN 软件对样品的二级结构含量进行分析<sup>[18]</sup>。

### 1.6.3 热稳定性分析

将纯化的拟穴青蟹 TIM 样品分别置于 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ℃ 条件下水浴 30 min, 然后进行 SDS - PAGE 分析, 并使用兔抗克氏原螯虾 TIM 作为一抗对热处理后的样品进行 Western blotting 和 Dot blotting 检测。

### 1.6.4 pH 值稳定性分析

在室温下, 将纯化的拟穴青蟹 TIM 样品分别与不同 pH 值缓冲液 (pH = 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0) 孵育 1.5 h, 然后进行 SDS - PAGE 分析, 并使用兔抗克氏原螯虾 TIM 作为一抗进行 Western blotting 和 Dot blotting 检测。



AEB54655.1)、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (gb | AFT92034.1)、褐虾 *Crangon crangon* (gb | ACR43476.1) 的 TIM 序列相似度为 93%、83%、83%、83% (见图 3b)。质谱分析结果再次验证了所纯化的蛋白质为磷酸丙糖异构酶 TIM。分别采用甲壳类过敏患者阳性血清池, 以及兔抗克氏原螯虾 TIM 多克隆抗体作为一抗, 进行 Western blot 免疫印迹分析, 结果显示均有阳性反应 (见图 3c)。

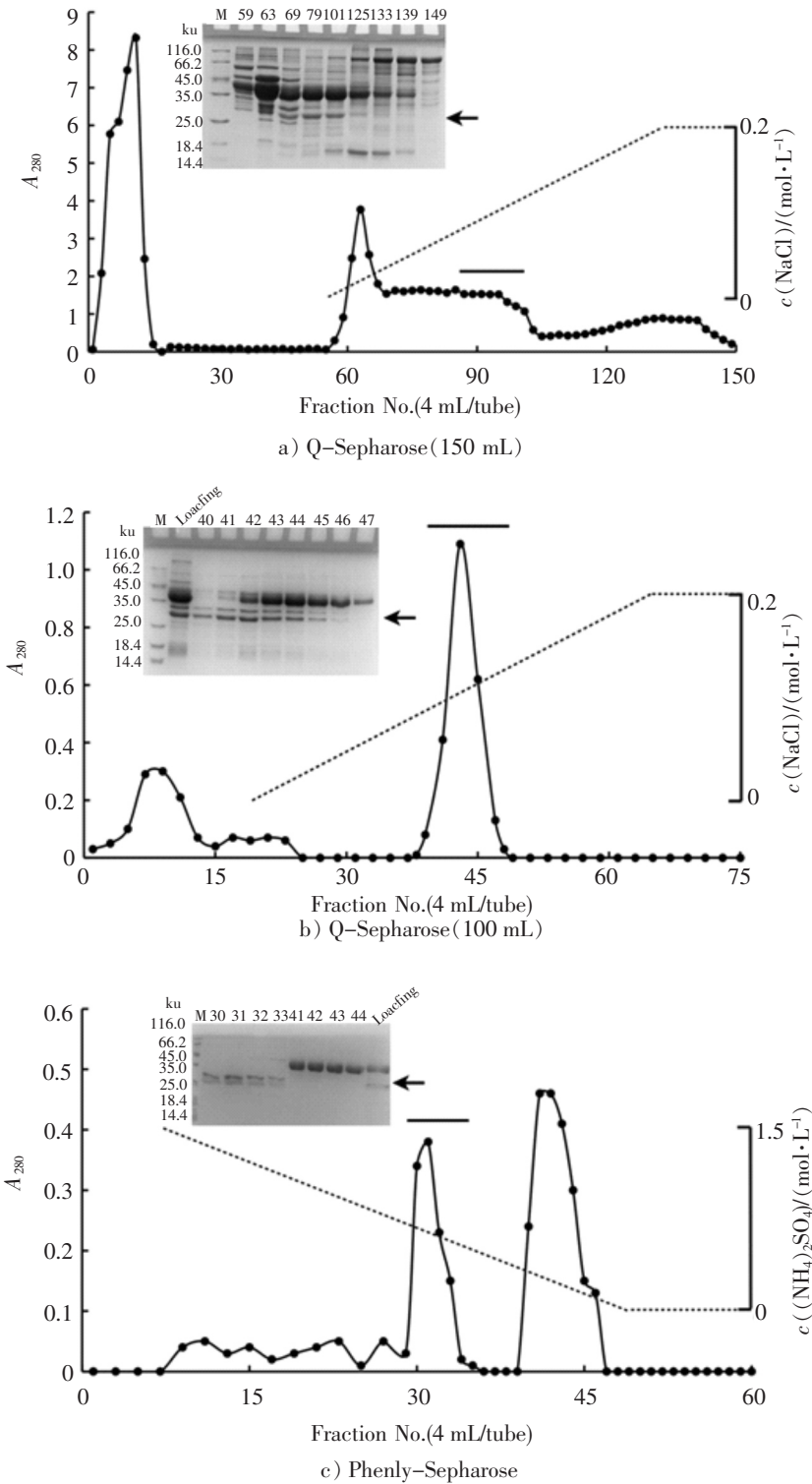


图 2 拟穴青蟹 28 ku 蛋白质纯化柱层析图及 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Purification and SDS-PAGE analysis of 28 ku protein from *Scylla paramamosain*

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

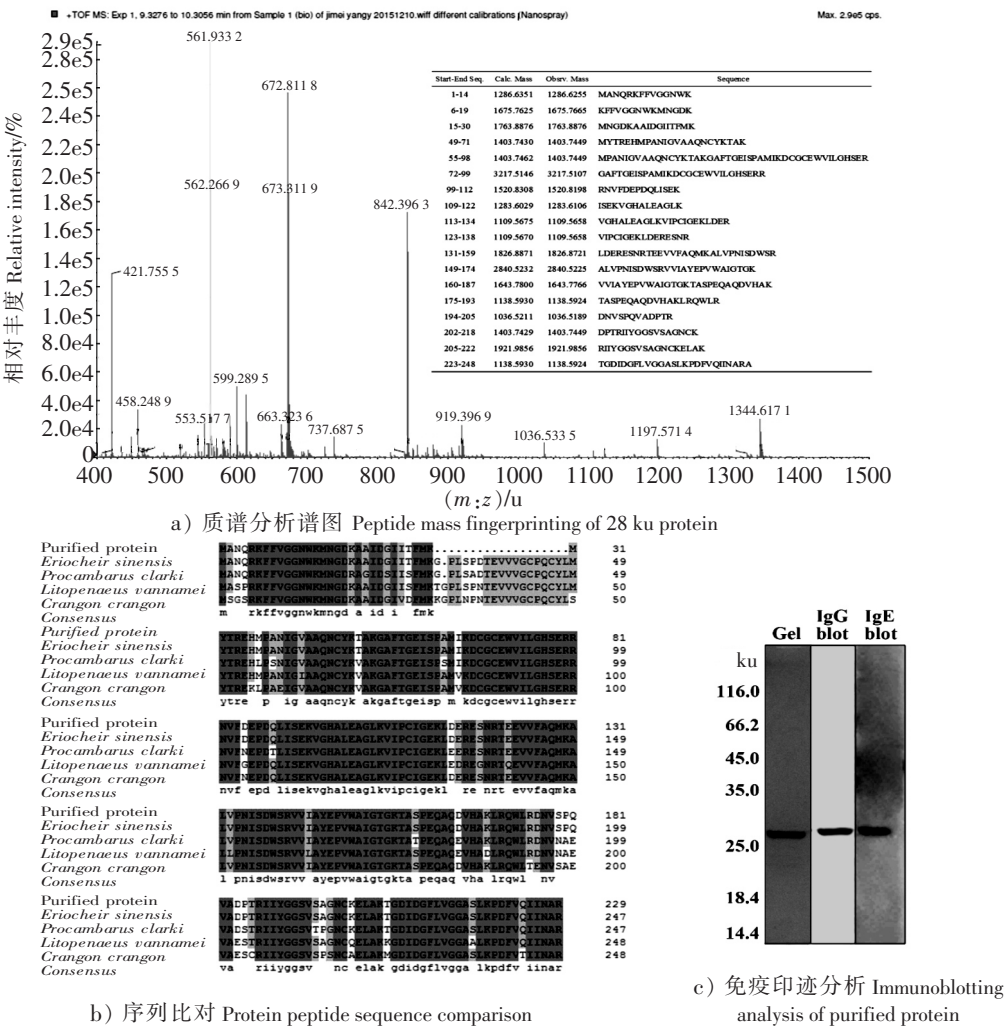


图 3 拟穴青蟹 28 ku 蛋白质鉴定

Fig.3 Identification of 28 ku protein from *Scylla paramamosain*

2.4 拟穴青蟹 TIM 的等电点测定和圆二色谱分析

将纯化的 TIM 进行双向电泳分析其等电点, 结果(见图 4a)显示, 纯化的拟穴青蟹 TIM 为单一蛋白质, 其等电点为 5.8, 与质谱比对结果相似性最高的中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* TIM (gb | ADN52396.1) 的等电点 6.03 较为接近, 同样为酸性蛋白质。

将纯化的 TIM 采用圆二色谱进行扫描, 分析其二级结构, 结果如图 4b 所示, 在扫描波长 222 nm 与 208 nm 处出现双负峰, 在 190 nm 附近出现正峰, 表明该蛋白质为典型的  $\alpha$ -螺旋结构。通过 CDNN 分析计算得到 TIM 二级结构,  $\alpha$ -螺旋结构占 31.6%, 反平行  $\beta$ -折叠结构与平行  $\beta$ -折叠结构分别占 8.9% 和 9.2%,  $\beta$ -转角结构占 16.9%, 说明拟穴青蟹的 TIM 符合典型的  $\alpha$ ,  $\beta$ -结构。

2.5 拟穴青蟹 TIM 的热稳定性及 pH 值稳定性分析

对温度和酸碱度的耐受是食物过敏原蛋白质在食品加工过程之后仍具有致敏性的一个重要因素, 因此本研究对拟穴青蟹 TIM 的热稳定性和 pH 值稳定性进行了分析。

从图 5a 中分析可知, TIM 受热不分解, 在加热情况下会出现热聚合现象。在加热 50 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$  之间时, 拟穴青蟹 TIM 开始出现多聚体, 随着温度的不断升高, 多聚体含量增加, 且多聚体在高温下较稳定。采用 Western blotting 分析加热处理后 TIM 的 IgG 结合活性变化(见图 5b)发现, 加热过程中出现多聚体之后, 其 IgG 结合活性并没有出现明显变化, 表明高温并没有破坏 TIM 的 IgG 结合位点。聚



合所形成的多聚体同样具有 IgG 结合活性，说明在聚合过程中 IgG 结合位点仍有所保留。采用过敏患者血清进行 Dot blot 分析，加热处理对 TIM 的 IgE 结合活性几乎无影响(见图 5c)。

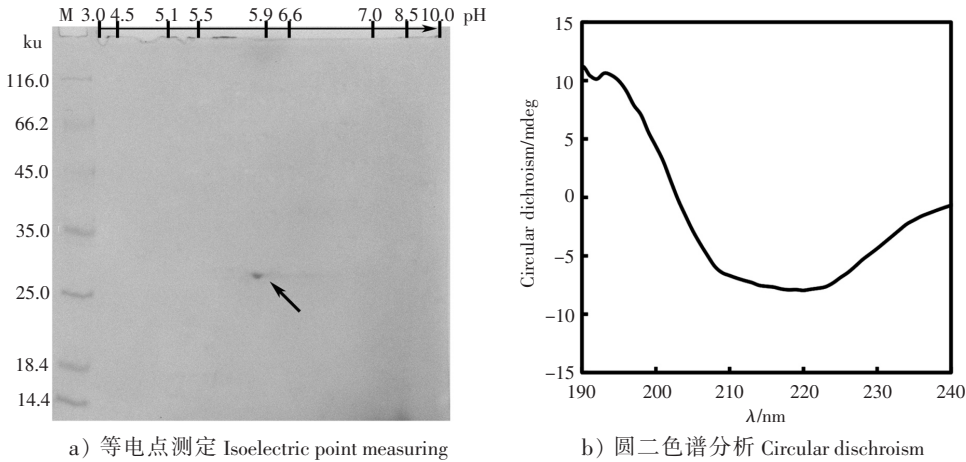


图 4 拟穴青蟹 TIM 等电点测定和圆二色谱分析

Fig.4 The isoelectric point and circular dichroism analysis of TIM from *Scylla paramamosain*

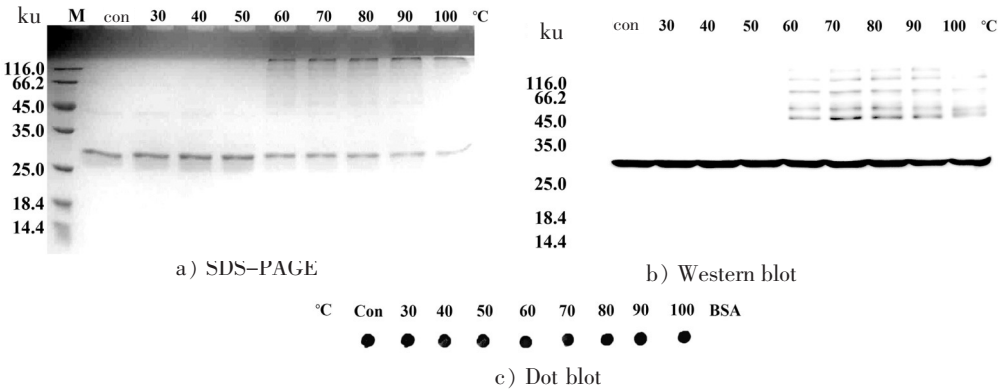


图 5 拟穴青蟹 TIM 的热稳定性

Fig.5 The stability analysis of TIM treated at different temperatures

缓冲液 pH 值对拟穴青蟹 TIM 的影响如图 6a 所示，pH 值在 1.0 ~ 11.0 的范围内，TIM 在 SDS - PAGE 中的蛋白质条带并未出现明显变化，说明 TIM 在强酸强碱环境下都较为稳定，没有发生分解或聚合。经 Western blot 分析显示（见图 6b），当缓冲液 pH 值大于 9.0 时，TIM 与兔抗克氏原螯虾多克隆抗体的结合有所减弱，说明其 IgG 结合能力受到了影响。同样，经过过敏患者血清 Dot blot 分析（见图 6c），在缓冲液 pH 值大于 9.0 时，TIM 的 IgE 结合能力也受到了影响，且随着缓冲液 pH 值的升高而下降明显。推测是由于强碱环境对于 TIM 蛋白质的空间结构产生了影响，造成其 IgG/IgE 结合位点被掩盖，导致结合活性降低。

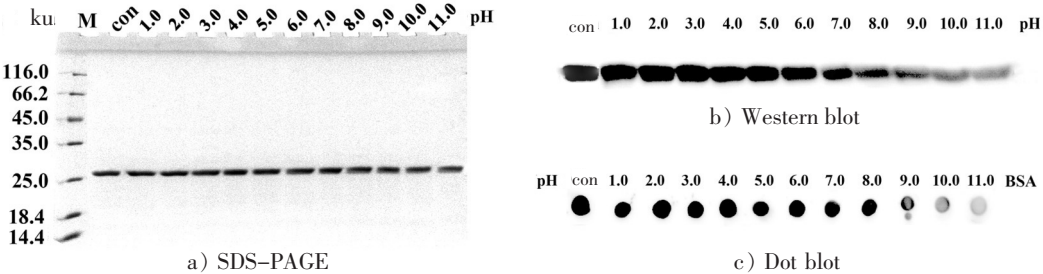


图 6 拟穴青蟹 TIM 的 pH 值稳定性

Fig.6 The stability of TIM treated at different pH value

2.6 拟穴青蟹 TIM 的消化稳定性分析

食物过敏原被摄入人体之后, 经过消化系统消化吸收而引起免疫系统反应导致过敏, 是食物过敏原致敏的一个重要方面, 所以研究过敏原在消化过程中的变化显得尤为重要。本研究中采用模拟体外胃肠液消化的方法研究拟穴青蟹 TIM 的消化稳定性。从图 7a 中的结果可以看出, 在模拟胃液中胃蛋白酶的消化作用下, 蛋白质条带在 15 min 开始弥散, 且 SDS - PAGE 中有分子质量约为 16 ku 的条带出现。当反应进行至 30 min 时有更小分子质量的片段出现, 60 min 时主条带明显减弱, 到 90 min 时大部分被消化为小片段。用 Western blot 对经过模拟胃液消化的 TIM 的 IgG 结合活性进行检测, 从图 7b 中可以看出, 经消化产生的分子质量约为 16 ku 的小分子仍然具有 IgG 结合活性, 且消化至 90 min 的小片段也具有 IgG 结合活性。而从图 7c 中可以看出, TIM 对于模拟胰液消化较为稳定, 即使采用长时间消化也未能被降解。图 7d 免疫印迹显示, 经过 4 h 模拟胰液消化, 拟穴青蟹 TIM 的 IgG 结合活性未发生明显变化, 说明 TIM 耐受胰蛋白酶消化。

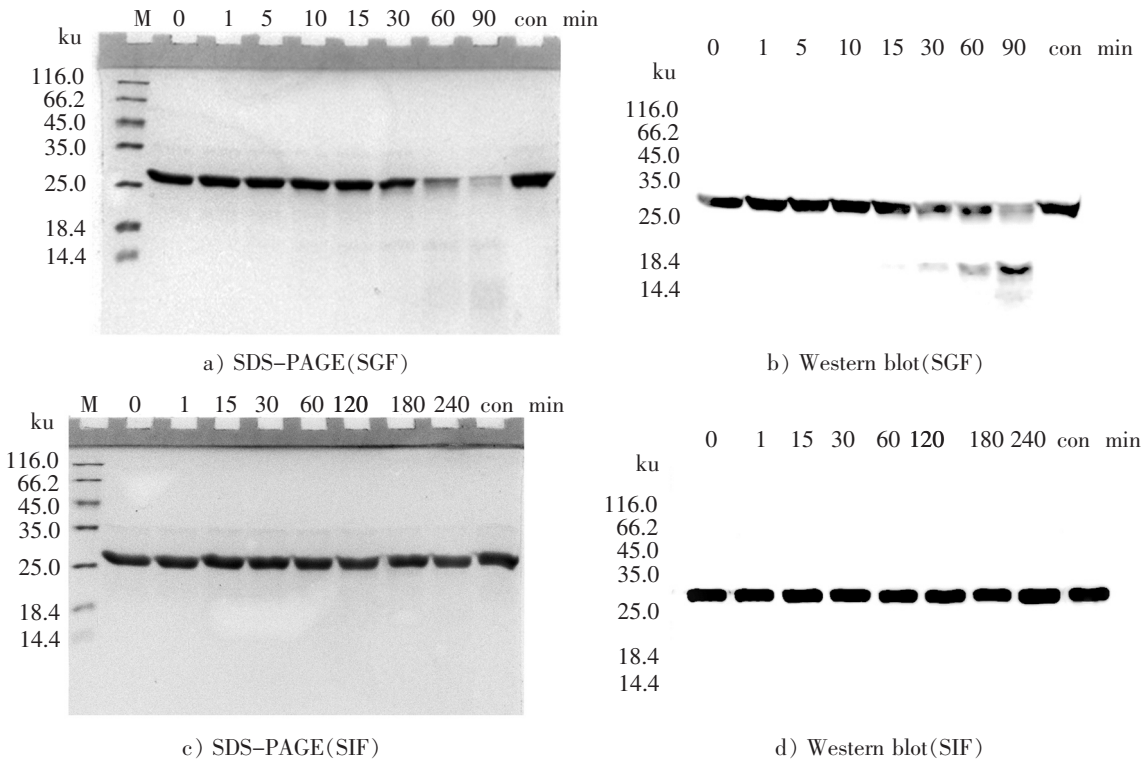


图 7 拟穴青蟹 TIM 的消化稳定性分析  
Fig.7 The stability analysis of TIM digested at different time periods

3 讨论

本研究采用甲壳类过敏患者血清学分析方法, 发现拟穴青蟹肌浆蛋白中一种新型过敏原, 经硫酸铵盐析、阴离子柱层析及疏水柱层析等方法纯化得到分子质量 28 ku 的目的蛋白, 质谱鉴定为磷酸丙糖异构酶。磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, TIM, EC 5. 3. 1. 1) 是一种能够催化丙糖磷酸异构体在二羟丙酮磷酸和 D 型甘油醛 - 3 - 磷酸之间转换的酶类。TIM 广泛分布在生物体的各个组织中, 包括哺乳动物、昆虫、真菌、细菌、植物, 在生物体糖酵解途径中具有重要作用<sup>[21]</sup>。Bauermeister 等<sup>[11]</sup>首次鉴定出 TIM 是褐虾中新型过敏原, 并命名为 Cra c 8。Kamath 等<sup>[12]</sup>研究显示, 黑虎虾 TIM 会随着温度升高形成二聚体。本文通过圆二色谱分析拟穴青蟹 TIM 的二级结构, 发现其符合典型的  $\alpha$ 、 $\beta$  - 结构, 为单平行  $\beta$  桶亚型, 其结构中的  $\beta$  股与螺旋之间的回环区域通常为参与结合和催化的残基, 所以推测其抗原表位的分布多为此区域。序列分析比较发现甲壳类 TIM 一级结构相似度较高,



其高级结构也有共同点。拟穴青蟹 TIM 能够与兔抗克氏原螯虾 TIM 多克隆抗体发生特异性反应,证明了甲壳类 TIM 之间能够发生免疫交叉反应。

食物过敏原对于热处理和酸碱处理的稳定性是其在食品加工后仍能保持致敏性的重要因素。本研究发现拟穴青蟹 TIM 的热稳定性好,且加热后形成的多聚体仍具有免疫活性。Kamath 等<sup>[12]</sup>研究发现黑虎虾 TIM 是一种热不稳定蛋白质,在加热条件下形成二聚体,这与本研究结果相同。多聚体的形成会改变蛋白质三维结构,增加空间结构的复杂性,但 IgG/IgE 表位仍可能会有保留,所以多聚体的形成对于过敏原免疫反应具有一定的影响<sup>[22]</sup>。蛋白质二级结构的改变及伸展会导致三维构象的展开,从而导致抗原表位的掩盖或者亲和性或可及性的改变,从而降低抗原表位与抗体之间的结合<sup>[23-25]</sup>。在体外模拟胃肠液消化试验中,拟穴青蟹 TIM 耐胰蛋白酶消化,但能被胃蛋白酶消化,其消化后的小分子片段产物能够与抗体发生反应,说明其仍具有免疫活性。有研究报道,牛奶中主要过敏原  $\beta$ -酪蛋白在消化之后仍保留有完整蛋白质的 IgE 结合活性<sup>[26]</sup>。

本研究结果表明磷酸丙糖异构酶是拟穴青蟹新型过敏原,具有热聚合特性且能够与克氏原螯虾 TIM 多克隆抗体发生免疫交叉反应。今后的研究可重点分析 TIM 抗原表位、聚合特性与致敏性之间的关系,以及食品加工处理(如超高压、酶法交联、美拉德反应等)对过敏原致敏性的影响。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] WU T C, TSAI T C, HUANG C F, et al. Prevalence of food allergy in Taiwan: a questionnaire-based survey. *Internal Medicine Journal*, 2012, 42(12): 1310-1315. DOI:10.1111/j.1445-5994.2012.02820.x.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2014: 214.
- [3] LIANG Y L, CAO M J, SU W J, et al. Identification and characterisation of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Chemistry*, 2008, 111(4): 998-1003. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.023.
- [4] ABRAMOVITCH J B, KAMATH S, VARESE N, et al. IgE reactivity of blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) tropomyosin, Por p 1, and other allergens; cross-reactivity with black tiger prawn and effects of heating. *Plos One*, 2013, 8(6): 400. DOI:10.1371/journal.pone.0067487.
- [5] 林江伟, 游洪燕, 沈海旺, 等. 克氏原螯虾原肌球蛋白的纯化及过敏原性分析. 集美大学学报 (自然科学版), 2012, 17(3): 167-174.
- [6] SHEN Y, CAO M J, CAI Q F, et al. Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(7): 1326-1335. DOI:10.1002/jsfa.4322.
- [7] YU H L, RUAN W W, CAO M J, et al. Identification of physicochemical properties of *Scylla paramamosain* allergen, arginin kinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(2): 245-253. DOI:10.1002/jsfa.5748.
- [8] 毛海燕, 蔡娜, 陈亨莉, 等. 拟穴青蟹新型过敏原肌钙蛋白的纯化、鉴定及分子克隆. 食品科学, 2014, 35(3): 122-127. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201403025.
- [9] CHEN H L, CAO M J, CAI Q F, et al. Purification and characterisation of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chemistry*, 2013, 139(1/4): 213-223. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.01.119.
- [10] ZHANG Y X, CHEN H L, MALEKI S J, et al. Purification, characterization, and analysis of the allergenic properties of myosin light chain in *Procambarus clarkii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(27): 6271-6282. DOI:10.1021/acs.jafc.5b01318.
- [11] BAUERMEISTER K, WANGORSCH A, GAROFFO L P, et al. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea shrimp *Crangon crangon*. *Molecular Immunology*, 2011, 48(15/16): 1983-1992. DOI:10.1016/j.molimm.2011.06.216.
- [12] KAMATH S D, RAHMAN A M A, VOSKAMP A, et al. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: a comprehensive allergenomic approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(5): 1144-1155. DOI:10.1002/mnfr.201300584.

- [13] CHUANG J G, SU S N, CHIANG B L, et al. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics*, 2010, 10(21): 3854-3867. DOI:10.1002/pmic.201000348.
- [14] AN S, CHEN L L, LONG C B, et al. *Dermatophagoides farinae* allergens diversity identification by proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(7): 1818-1828. DOI:10.1074/mcp.M112.027136.
- [15] MAO H Y, CAO M J, MALEKI S J, et al. Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Molecular Immunology*, 2013, 56(4): 463-470. DOI:10.1016/j.molimm.2013.04.016.
- [16] YAN L J, ZHAN C L, CAI Q F, et al. Purification, characterization, cDNA cloning and in vitro expression of a serine proteinase from the intestinal tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) with collagen degradation activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(20): 4769-4777. DOI:10.1021/jf500923y.
- [17] JIANG Y K, SUN L C, CAI Q F, et al. Biochemical characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 8069-8076. DOI: 10.1021/jf101970h.
- [18] BOHM G, MUHR R, JAENICKE R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, 1992, 5(3): 191-195. DOI:10.1093/protein/5.3.191.
- [19] HUANG Y Y, LIU G M, CAI Q F, et al. Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(5): 1196-1201. DOI:10.1016/j.fct.2010.02.010.
- [20] US Food and Drug Administration. The national formulary: simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, TS. Washington: Rockville, 1995: 2053.
- [21] WIERENGA R K, KAPETANIOU E G, VENKATESAN R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(23): 3961-3982. DOI:10.1007/s00018-010-0473-9.
- [22] ROSENBERG A S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *The AAPS Journal*, 2006, 8(3): 501-507. DOI:10.1208/aapsj080359.
- [23] BUBLIN M, RADAUER C, KNULST A, et al. Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52(10): 1130-1139. DOI:10.1002/mnfr.200700167.
- [24] LIN H X, LI Z X, LIN H, et al. Effect of pH shifts on IgE-binding capacity and conformational structure of tropomyosin from short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*). *Food Chemistry*, 2015, 188: 248-255. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.05.007.
- [25] VISSERS Y M, IWAN M, ADEL-PATIENT K, et al. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays. *Clinical and Experimental Allergy*, 2011, 41(11): 1631-1642. DOI:10.1111/j.1365-2222.2011.03830.x.
- [26] BENEDE S, LOPEZ-EXPOSITO I, GIMENEZ G, et al. *In vitro* digestibility of bovine beta-casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids: identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food Chemistry*, 2014, 143: 514-521. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.07.110.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)