

超高压结合酶法消减南美白对虾 蛋白过敏原研究

谢丹丹, 胡志和*, 薛璐, 张博洋, 宿文晶, 方缘

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要:以南美白对虾为研究对象, 提取水溶性虾蛋白, 采用超高压法、超高压处理后再用木瓜蛋白酶水解、超高压下直接酶解等方法消减其过敏原蛋白, 用间接酶联免疫吸附法检测过敏原消减效果, 确定消减过敏原的条件。结果表明: 采用超高压法处理, 其最佳条件为压力 150MPa、温度 45℃、保压时间 35min, 产物抗原抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.1997; 高压结合木瓜蛋白酶水解法最佳条件为: 350MPa、温度 45℃、保压时间 20min, 产物抗原抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.0492; 超高压下直接用木瓜蛋白酶处理, 其最佳条件为: 压力 300MPa、温度 45℃、保压时间 35min, 产物抗原抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.05。由此可见, 高压对过敏原蛋白有消减作用, 先高压再水解和超高压下直接酶处理对过敏原的消减效果更好。

关键词: 南美白对虾; 高压法结合酶法; 过敏原消减; 酶联免疫

Elimination of Allergens from *Litopenaeus vannamei* by Ultra High Pressure Treatment Combined with Enzymolysis

XIE Dan-dan, HU Zhi-he*, XUE Lu, ZHANG Bo-yang, SU Wen-jing, FANG Yuan

(Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,

Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Three methods, ultra high pressure (UHP) treatment, UHP treatment followed by papain hydrolysis and concurrent UHP treatment and papain hydrolysis, were developed for eliminating allergens in water soluble protein extracted from *Litopenaeus vannamei*. One-factor-at-a-time and orthogonal array design methods were used to optimize the operating conditions. The effectiveness of the methods was examined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The optimal UHP treatment was performed under 150 MPa and for 35 min at 45 °C when used alone, and the OD_{492 nm} of antigen-antibody reaction was 0.1997. When used before papain hydrolysis, the optimal UHP treatment was performed under 350 MPa for 20 min at 45 °C, and the OD_{492 nm} of antigen-antibody reaction was 0.0492. When used concurrently with papain hydrolysis, the optimal UHP treatment was performed under 300 MPa for 35 min at 45 °C, and the OD_{492 nm} of antigen-antibody reaction was 0.05. These results demonstrate that UHP treatment followed by papain hydrolysis and their concurrent action were more effective in eliminating allergens in *Litopenaeus vannamei*. Therefore UHP has eliminating effect on allergens in *Litopenaeus vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; UHP treatment combined with enzymolysis; allergen elimination; ELISA

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0109-06

随着社会的进步和全球化进程的发展, 食物过敏性疾病的发病率越来越高。据统计, 美国大约有 6% 的幼儿和 3.7% 的成年人对某些食品过敏^[1-2], 其中海产品就是引起过敏的食品中的一种^[3-4]。有研究表明, 学龄儿童中的食物过敏现象呈上升趋势, 相关调查报告显示, 在 2007 年美国大约有 300 万的学龄儿童有食物过敏现象, 相比 1997 年过敏人数增加了 18%, 另外还有很

多与此相关的报道^[5-6]。我国虽然在这方面还没有进行过比较系统的调查, 但近几年也出现了很多关于食用海产品致敏的报道^[7-10]。食物过敏已经严重的威胁到人类的健康, 甚至会对人类的生命安全造成很大的伤害^[11]。本研究以南美白对虾为原料, 抽提水溶性蛋白, 在消除虾肉其他成分影响的条件下, 研究超高压法、超高压处理后再用木瓜蛋白酶水解、超高压条件下直接用木瓜

收稿日期: 2011-10-26

作者简介: 谢丹丹(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: xddhjj03090512@163.com

* 通信作者: 胡志和(1962—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为专用功能食品。E-mail: hzhihe@tjcu.edu.cn

蛋白酶水解的方法处理海虾过敏原蛋白, 比较其消减效果, 为生产低过敏海虾制品提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜活的南美白对虾 市售; 海虾过敏人血清(3名过敏者混合血清)及非过敏人血清(30名非过敏者血清的混合) 天津商业大学校医院, 血清置于 -25°C 冰箱冻存。

木瓜蛋白酶(papain, $0.5\sim 2\text{U}/\text{mg}$)、HRP 标记的羊抗人 IgE 抗体 A9667 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HPP.L3 型超高压设备 天津市华泰森淼生物工程有限公司; UV-2100 紫外分光光度计 尤尼克仪器有限公司; DK-42 型电热恒温水浴槽 上海精宏实验设备有限公司; PB-10 pH 计 德国赛多利斯北京有限公司; 3-18K 型离心机 美国 Sigma 公司; Scientz-50N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; FA1104N 型电子天平 上海精密科技仪器有限公司; RT-6000 型酶标分析仪 深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 木瓜蛋白酶活力测定

在试管中各加入 5mL 1% 的酪蛋白溶液。测定温度下预热 10min, 加入酶液 1mL, 摇匀, 水浴反应 10min, 各加入 4mL 20% 的三氯乙酸溶液终止反应, 摇匀, 水浴放置 30min, 然后过滤, 滤液用紫外法测定。空白对照是在酪蛋白溶液中先加三氯乙酸, 再加酶液, 其他过程相同^[12]。

1.3.2 过敏原的提取

将南美白对虾去头去尾去壳去肠线后放在匀浆机中匀浆, 每克组织用 1mL 的生理盐水来悬浮, 悬浮液置于冰上 5min 后加入 4 倍体积冷丙酮(-20°C 预冷过夜), 充分混匀, 放在 0°C 作用 30min, 期间混匀数次。 4°C 、10000r/min 离心 15min, 将沉淀物移至干净滤纸上, 分散并自然风干, 即为丙酮粉。丙酮粉与 1mol/L KCl 抽提液(含 0.5mmol/L DTT)按 1:10(m/V)的比例抽提过夜, 4°C 、10000r/min 离心 15min, 取上清液, 沉淀物与抽提液按 1:10(m/V)抽提 4h, 离心取上清液, 将两次的上清合并后透析过夜, 再冷冻干燥, 置于 -20°C 冰箱保存备用^[13-14]。将该蛋白与包被液(100mL 含 0.16g Na_2CO_3 , 0.29g NaHCO_3)配成质量分数 1% 的溶液, 即为待测物。

1.3.3 间接酶联免疫检测方法

包被抗原时每个样品做 6 个平行孔, 在酶标板上每孔加 100 μL 待测物, 置于 4°C 包被过夜。用洗液洗 5 次, 每次 3min, 拍干。每孔加封闭液 200 μL (100mL PBST 含

1g BSA), 37°C 水浴 3h, 洗涤后拍干, 每孔加入 100 μL 一抗(用封闭液稀释 20 倍的过敏人血清), 37°C 水浴 2h, 洗涤后拍干, 加入用 HRP 标记的羊抗人 IgE(用封闭液稀释 200 倍的二抗), 37°C 水浴 2h。洗涤拍干, 每孔加邻苯二胺 100 μL , 37°C 显色 15min, 每孔加 50 μL 终止液(2mol/L H_2SO_4), 最后在 492nm 波长下测定 OD 值^[15]。

1.3.4 高压条件对木瓜蛋白酶活力的影响

压力对木瓜蛋白酶活性的影响: 采用温度 40°C , 保压时间 20min, 改变压力(0、100、200、300、500MPa); 温度对木瓜蛋白酶活性的影响: 采用压力 200MPa, 保压时间 20min, 改变温度(20、30、40、 60°C); 保压时间对木瓜蛋白酶活性的影响: 采用温度 40°C 、压力 200MPa, 改变保压时间(10、20、30、50min)。

1.3.5 高压法对南美白对虾过敏原蛋白消减效果的影响

1.3.5.1 单因素试验

采用保压时间 20min、温度 40°C , 改变压力(100、200、300、500MPa); 采用保压时间 20min、压力 200MPa, 改变温度(20、30、40、 60°C); 采用压力 200MPa、温度 40°C , 改变保压时间(10、20、30、50min)对过敏蛋白进行处理。将处理的产物进行冷冻干燥, 再通过 ELISA 进行检测。

1.3.5.2 高压法对南美白对虾过敏原蛋白消减条件优化

根据单因素试验结果, 以压力大小、温度以及保压时间为影响因素, 以 492nm 波长处的 OD 值为考察目标(每组做 6 个平行, 取均值), 进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。因素水平见表 1。

表 1 高压法消减过敏原正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal array design for UHP treatment when used alone

水平	A 压力 /MPa	B 温度 / $^{\circ}\text{C}$	C 保压时间 /min
1	150	35	25
2	200	40	30
3	250	45	35

1.3.6 高压处理后再用酶法消减虾过敏原蛋白

1.3.6.1 单因素试验

以压力大小、温度以及保压时间为影响因素。分别采用保压时间 20min、温度 40°C , 改变压力(100、200、300、500MPa); 保压时间 20min、压力 300MPa, 改变温度(20、30、40、 60°C); 压力 300MPa、温度 40°C , 改变保压时间(10、20、30、50min)对过敏蛋白进行处理。将处理完的产物进行冷冻干燥, 然后对每个条件的产物按照温度 60°C 、pH6.5、底物质量浓度

3g/100mL、酶与底物比 1:100 的条件用木瓜蛋白酶水解 3h, 再将水解产物离心后冷冻干燥, 然后用 ELISA 检测。

1.3.6.2 高压处理后再用酶法消减虾过敏原蛋白条件优化

根据单因素试验结果, 以压力大小、温度以及保压时间为影响因素, 以 492nm 波长处的 OD 值为考察目标(每组做 6 个平行, 然后取均值), 进行 $L_9(3^3)$ 正交试验, 因素水平见表 2。

表 2 高压条件下酶解过敏原正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal array design for UHP treatment when used before papain hydrolysis

水平	A 压力 /MPa	B 温度 /℃	C 保压时间 /min
1	250	35	15
2	300	40	20
3	350	45	25

1.3.7 高压条件下用木瓜蛋白酶水解消减虾过敏原蛋白

将酶与虾蛋白同时进行高压处理, 在 1.3.4 节和 1.3.6 节试验结果基础上, 以压力大小、温度以及保压时间为影响因素, 以 492nm 波长处的 OD 值为评价指标(每组做 6 个平行, 然后取均值), 进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。因素水平见表 3。

表 3 高压条件下酶解过敏原正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal array design for UHP treatment when used concurrently with papain hydrolysis

水平	A 压力 /MPa	B 温度 /℃	C 保压时间 /min
1	200	40	20
2	300	45	35
3	400	50	50

1.3.8 数据处理

应用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 所有数据用均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$, 差异显著; $P > 0.05$, 差异不显著。

2 结果与分析

2.1 高压条件对木瓜蛋白酶活性的影响

2.1.1 压力对木瓜蛋白酶活性的影响

将木瓜蛋白酶在不同压力下于 40℃ 处理 20min, 其活性变化见图 1。

由图 1 可知, 压力对木瓜蛋白酶的活力有影响, 当木瓜蛋白酶在 0~500MPa、40℃ 下处理 20min, 随着压力的增加, 木瓜蛋白酶的活性呈先上升后下降的趋势, 在 200MPa 的压力作用下活性最高。

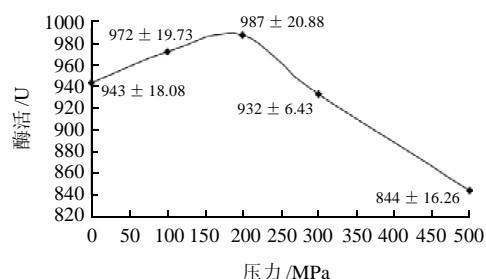


图 1 40℃、20min 条件不同压力对木瓜蛋白酶活力影响

Fig.1 Effect of different pressure levels on papain activity at 40 °C for 20 min

2.1.2 温度对木瓜蛋白酶活性的影响

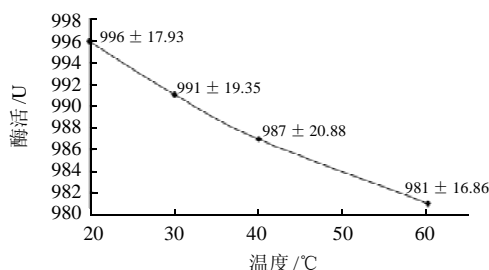


图 2 200MPa、20min 条件不同温度对木瓜蛋白酶活性的影响

Fig.2 Effect of different temperature levels on papain activity under 200 MPa for 20 min

由图 2 可知, 当木瓜蛋白酶在 20~60℃、200MPa 下处理 20min, 随着温度的增加, 木瓜蛋白酶的活性逐渐降低。根据方差分析, 在 95% 的置信区间, 温度为 20、30、40、60℃ 对木瓜蛋白酶活性的影响没有显著性差异。

2.1.3 保压时间对木瓜蛋白酶活性的影响

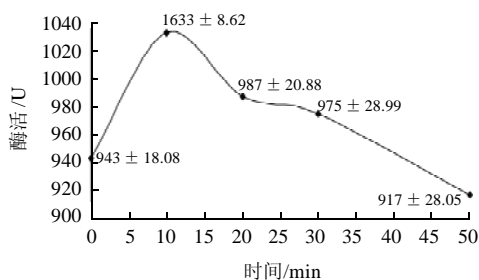


图 3 200MPa、40℃ 条件不同保压时间对木瓜蛋白酶活性的影响

Fig.3 Effect of different pressure dwell time on papain activity under 200 MPa at 40 °C

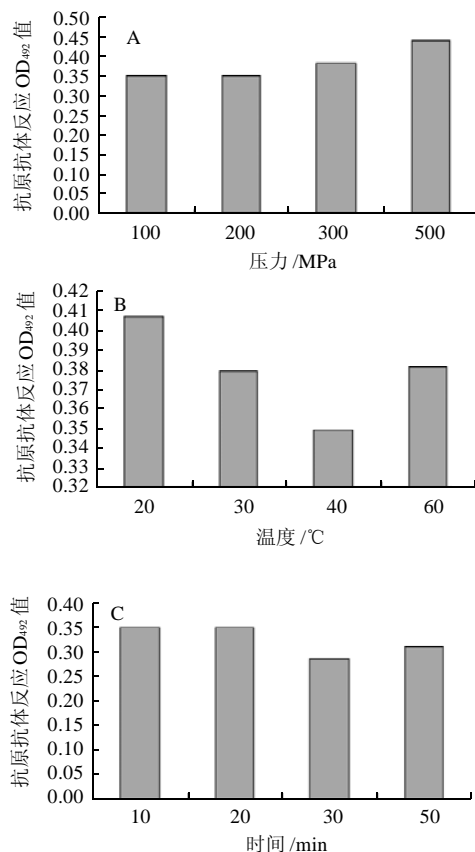
由图 3 可知, 当木瓜蛋白酶在 40℃、200MPa 处理 0~50min, 随着保压时间的增加, 木瓜蛋白酶的活性先增加后下降。当保压时间为 10min 时, 木瓜蛋白酶的活性最高。根据方差分析, 在 95% 的置信区间, 10、20min 与不加压时的酶活存在显著性差异; 20、30、50min 与

10min 存在显著性差异; 10、20、30min 与 50min 均存在显著性差异。

2.2 高压法对南美白对虾过敏原蛋白消减效果的影响

2.2.1 高压条件单因素试验

在对虾蛋白进行高压处理时, 控制压力、温度和保压时间, 其过敏原消减结果见图 4。



变化其中一种因素时, 其他因素水平为温度 40℃、压力 200MPa、保压时间 20min。

图 4 压力(A)、温度(B)和保压时间(C)对过敏原消减作用的影响

Fig.4 Effects of pressure level, temperature and pressure dwell time on allergen elimination

由图 4 可知, 在上述条件下, 处理产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值较阳性对照的 OD_{492nm} 值都有所降低。当压力不同时, 压力 200MPa 时, 处理产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.3490)较低; 当温度不同时, 温度 40℃时, 处理产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.3490)较低; 当保压时间不同时, 时间 30min 时, 处理产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.2863)较低。

2.2.2 高压法消减虾过敏原蛋白条件优化

由表 4 可知, 通过高压处理虾蛋白所得的产物, 经酶联免疫检测, 得出 3 种因素对 OD 值的影响大小依次为 A > B > C, 即压力 > 温度 > 保压时间, 较好的试

验方案为 A₁B₃C₃, 即压力 150MPa、温度 45℃、保压时间 35min, 此条件下处理产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.1977。该值虽不在正常人血清与抗体反应的 OD_{492nm} 值范围内, 但是较阳性对照已经有很大幅度的降低, 说明超高压技术对虾蛋白中过敏原的消减起到了一定的作用。

表 4 正交试验条件下高压处理过敏原的消减结果($\bar{x} \pm s$)

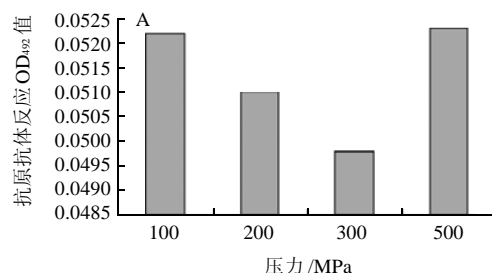
Table 4 Experimental scheme and results of orthogonal array design for UHP treatment when used alone ($\bar{x} \pm s$)

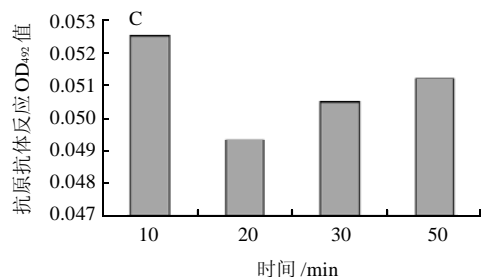
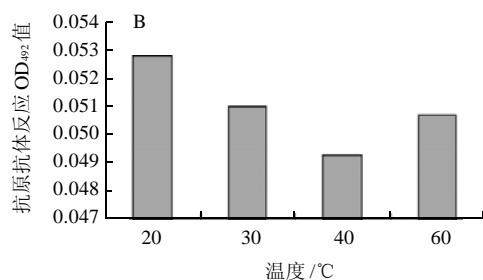
实验号	A 压力 /MPa	B 温度 /℃	C 保压时间 /min	平均 OD _{492nm}
1	1(150)	1(35)	1(25)	0.2608 ± 0.0266
2	1	2(40)	2(30)	0.2654 ± 0.0232
3	1	3(45)	3(35)	0.1977 ± 0.0147
4	2(200)	1	2	0.2610 ± 0.0155
5	2	2	3	0.2568 ± 0.0161
6	2	3	1	0.2850 ± 0.0163
7	3(250)	1	3	0.3342 ± 0.0189
8	3	2	1	0.3238 ± 0.0260
9	3	3	2	0.2858 ± 0.0221
K ₁	0.7239	0.8560	0.8696	
K ₂	0.8028	0.8460	0.8122	
K ₃	0.9438	0.7685	0.7887	
k ₁	0.2413	0.2853	0.2899	
k ₂	0.2676	0.2820	0.2707	
k ₃	0.3146	0.2560	0.2629	
R	0.0733	0.0293	0.0270	
最优水平	A ₁	B ₃	C ₃	

2.3 高压处理后再用酶法消减虾过敏原蛋白的效果

2.3.1 高压处理后再用酶法消减虾过敏原蛋白单因素试验

由图 5 可知, 用高压处理虾蛋白, 然后对每个条件的产物按照温度 60℃、pH6.5、底物质量浓度 3g/100mL、酶与底物比 1:100(质量比)的条件进行水解 3h, 水解产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值较阳性对照的 OD_{492nm} 值都有所降低。当压力 300MPa 时, 产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.0493)较低; 温度 40℃时, 产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.0493)较低; 保压时间 20min 时, 产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值(0.0493)较低。





变化其中一种因素时, 其他因素水平为温度 40℃、压力 300MPa、保压时间 20min。

图5 压力(A)、温度(B)和保压时间(C)对过敏原消减作用的影响

Fig.5 Eliminating effects of different time on allergen under 300 MPa at 40 °C

2.3.2 高压处理后采用酶法消减虾过敏原蛋白条件优化

表5 高压处理后采用酶法消减虾过敏原蛋白正交试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Experimental scheme and results of orthogonal array design for UHP treatment when used before papain hydrolysis ($\bar{x} \pm s$)

试验号	A 压力/MPa	B 温度/°C	C 保压时间/min	平均 OD _{492nm}
1	1(250)	1(35)	1(15)	0.0525 ± 0.0041
2	1	2(40)	2(20)	0.0497 ± 0.0055
3	1	3(45)	3(25)	0.0500 ± 0.0043
4	2(300)	1	2	0.0495 ± 0.0063
5	2	2	3	0.0527 ± 0.0034
6	2	3	1	0.0507 ± 0.0063
7	3(350)	1	3	0.0508 ± 0.0035
8	3	2	1	0.0510 ± 0.0028
9	3	3	2	0.0492 ± 0.0097
K ₁	0.1522	0.1983	0.1542	
K ₂	0.1529	0.1535	0.1484	
K ₃	0.1510	0.1499	0.1535	
k ₁	0.0507	0.0661	0.0514	
k ₂	0.0510	0.0511	0.0495	
k ₃	0.0503	0.0500	0.0512	
R	0.0007	0.0161	0.0019	
最优水平	A ₃	B ₃	C ₂	

由表5可知, 通过高压处理虾蛋白所得的产物, 再经过木瓜蛋白酶水解(按照温度 60℃、pH6.5、底物质量浓度 3g/100mL、酶与底物比 1:100 的条件), 其水解产

物经酶联免疫检测, 得出3种因素对 OD_{492nm} 值的影响大小依次为 $B > C > A$, 即温度 > 保压时间 > 压力, 较好的试验方案为 $A_3B_3C_2$, 即压力 350MPa、温度 45℃、保压时间 20min, 此条件下产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.0492。该值在正常人血清与抗体反应的 OD 值范围内。

2.4 高压条件下用木瓜蛋白酶水解消减虾过敏原蛋白条件优化

表6 高压下用木瓜蛋白酶消减虾过敏原蛋白正交试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Experimental scheme and results of orthogonal array design for UHP treatment when used concurrently with papain hydrolysis ($\bar{x} \pm s$)

试验号	A 压力/MPa	B 温度/°C	C 保压时间/min	平均 OD _{492nm}
1	1(200)	1(40)	1(20)	0.1017 ± 0.0133
2	1	2(45)	2(35)	0.0633 ± 0.0127
3	1	3(50)	3(50)	0.0752 ± 0.0231
4	2(300)	1	2	0.0527 ± 0.0083
5	2	2	3	0.0692 ± 0.0329
6	2	3	1	0.0597 ± 0.0163
7	3(400)	1	3	0.0553 ± 0.0161
8	3	2	1	0.0625 ± 0.0252
9	3	3	2	0.0687 ± 0.0168
K ₁	0.2402	0.2097	0.2239	
K ₂	0.1816	0.195	0.1847	
K ₃	0.1865	0.2036	0.1997	
k ₁	0.0801	0.0699	0.0746	
k ₂	0.0605	0.065	0.0616	
k ₃	0.0622	0.0679	0.0666	
R	0.0196	0.0049	0.013	
最优水平	A ₂	B ₂	C ₂	

由表6可知, 通过高压结合酶法处理虾蛋白所得的产物, 经酶联免疫检测, 得出3种因素对 OD_{492nm} 值的影响大小依次为 $A > C > B$, 即压力 > 保压时间 > 温度, 最优试验方案为 $A_2B_2C_2$, 即压力 300MPa、温度 45℃、保压时间 35min, 根据此条件进行验证实验, 产物与抗体反应的 OD_{492nm} 值为 0.05, 该值在正常人血清与抗体反应的 OD 值的范围内。

3 讨论

我国已经有很多学者从南美白对虾中提取海虾的主要过敏原, 王晓雯^[13]、刘光明^[16]等用海虾过敏者血清及阳性血清池鉴定 36ku 的蛋白为虾的主要过敏原, 吴海明等^[17]也对南美白对虾的主要过敏原进行了研究, 认为主要过敏原为 99、33、19、14ku 的蛋白。

国内外也有很多关于消减虾过敏原的报道。顾可飞等^[18]利用辐照对虾过敏原进行消减, 发现虾过敏原经辐照处理后, 免疫活性有所降低。李振兴^[14]的研究发现当辐照剂量低于 10kGy 时, 虾抽提物和虾肉的免疫活性

有稍微增加;当辐照剂量大于 10kGy 时,虾过敏蛋白的免疫活性下降。辐照和加热联合作用可以显著降低虾过敏蛋白的免疫活性,同时他还对超声波消减虾过敏原进行了研究,发现在 50℃ 条件下的超声波能够对虾的免疫活性产生明显的影响。经过 1.5h 的处理后,其免疫活性只有未处理虾肉的 20%。李庆丽等^[19]发现麦芽糖、葡萄糖均使虾过敏蛋白免疫活性有所降低,其中,麦芽糖使虾过敏蛋白活性下降了 60%;葡萄糖可使虾过敏蛋白活性下降约 10%。吴海明等^[20]对木瓜蛋白酶水解南美白对虾蛋白进行了研究,发现过敏原消减的最佳条件为酶底比 1:100,底物浓度 3g/100mL, pH6.5, 温度 60℃,与过敏人血清反应的 OD₄₉₂ 为 0.054。到目前为止,已有关于高压法消减大米中过敏原的报道^[21],但是国内外还没有利用高压结合酶消减虾过敏原的研究,本研究将南美白对虾中水溶性蛋白,利用超高压法、超高压处理后再用木瓜蛋白酶水解、超高压下直接酶解对虾过敏原进行消减,并且处理后的蛋白没有以往酶解所产生的苦味,为海虾脱敏的深入研究提供了一定依据。

4 结 论

对提取的南美白对虾蛋白过敏原,采用超高压法、超高压处理后再用木瓜蛋白酶水解、超高压下直接酶解等方法均有消减作用。采用超高压处理后再用木瓜蛋白酶水解,以及超高压下直接酶解,对消减效果更好。

参考文献:

- [1] SAMPSON H A. Update on food allergy[J]. Allergy Clin Immunol, 2004, 113(5): 805-819.
- [2] SICHERER S H, MUNOZ-FURLONG A, SAMPSON H A. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey[J]. Allergy Clin Immunol, 2004, 114(1): 159-165.
- [3] WOOD R A. The natural history of food allergy[J]. Pediatrics, 2003, 111(3): 1631-1637.
- [4] DERBY C J, GOWLAND M H, HOURIHANE J O. Sesame allergy in Britain: a questionnaire survey of members of the anaphylaxis campaign [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2005, 16(2): 171-175.
- [5] DECKER W W, CAMPBELL R L, MANIVANNAN V, et al. The etiology and incidence of anaphylaxis in rochester, minnesota: a report from the Rochester epidemiology project[J]. Allergy Clin Immunol, 2008, 122(6): 1161-1165.
- [6] SIMONS F E R. Anaphylaxis epidemic: fact or fiction[J]. Allergy Clin Immunol, 2008, 122(6): 1166-1168.
- [7] LEMIERE C, DESJARDINS A, LEHRER S, et al. Occupational asthma to lobster and shrimp[J]. Allergy, 1996, 51(4): 272-273.
- [8] GOETZ D W, WHISMAN B A. Occupational asthma in a seafood restaurantworker: cross-reactivity of shrimp and scallops[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000, 85(6 Pt 1): 461-466.
- [9] 安爱芝, 孙月芹. 食坑虾引起过敏性休克 1 例[J]. 医学理论与实践, 2003, 16(8): 877.
- [10] 许岩, 许红. 食用虾爬子引起过敏性休克 1 例[J]. 沈阳医学院学报, 2000, 2(2): 108.
- [11] BOCK S A. Prospective appraisal of complaint of adverse reaction to foods in children during the first 3 years of life[J]. Pediatrics, 1987, 79(5): 683-688.
- [12] 方焕, 生吉平, 吴显荣. 工业生产中木瓜蛋白酶的活性检测方法比较[J]. 食品与机械, 2000(6): 27-29.
- [13] 王晓雯. 中国对虾主要过敏原的鉴定及性质的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [14] 李振兴. 虾过敏原免疫活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [15] 白振宇. 牛奶中主要过敏原的消除及检测技术的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2007.
- [16] 刘光明, 沈苑, 曹敏杰, 等. 虾类过敏原的识别、纯化和检测技术研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(6): 142-148.
- [17] 吴海明, 胡志和, 王超. 免疫印迹法对 4 种海虾主要过敏原的鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 274-277.
- [18] 顾可飞, 高美须, 李春红, 等. 虾过敏及虾过敏原[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 239-243.
- [19] 李庆丽, 李振兴, 林洪, 等. 虾过敏原活性影响的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 79-84.
- [20] 吴海明, 胡志和, 王丽娟. 凡纳滨对虾主要过敏原鉴定及酶法消减技术的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 272-276.
- [21] TAKEO K, EMIKO K, SUENO M, et al. Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure[J]. Agric Food Chem, 2000, 48(8): 3124-3129.