

# 竞争性ELISA检测鱼糜制品中蛋清含量

赵勇娟<sup>1</sup>, 翁 凌<sup>1,2</sup>, 颜龙杰<sup>1</sup>, 刘孟琦<sup>1</sup>, 张凌晶<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2,\*</sup>

(1.集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2.水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

**摘 要:**通过纯化蛋清中主要成分卵清蛋白(ovalbumin, OVA), 制备抗OVA多克隆抗体, 利用制备的抗体建立鱼糜制品中蛋清定量检测的竞争性酶联免疫吸附测定方法(competitive enzyme linked-immunosorbent assay, c-ELISA)。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot结果显示, 制备的抗OVA多克隆抗体特异性良好。以热处理的OVA为竞争抗原建立的c-ELISA法检测限为1.82 mg/kg, 组内变异系数为3.1%, 组间变异系数为7.8%, 回收率为87.4%~97.2%, 表明建立的方法重复性好, 准确性较高。利用建立的方法对6种商品化的鱼糜制品进行检测, 发现其蛋清的添加量在2.7~83.5 g/kg之间。本研究为今后鱼糜制品中蛋清含量规范标识的监管提供了重要的技术支持。

**关键词:**蛋清; 卵清蛋白; 鱼糜制品; 竞争性酶联免疫吸附测定方法

## Quantification of Added Egg White in Surimi Products by Competitive Enzyme Linked-Immunosorbent Assay

ZHAO Yongjuan<sup>1</sup>, WENG Ling<sup>1,2</sup>, YAN Longjie<sup>1</sup>, LIU Mengqi<sup>1</sup>, ZHANG Lingjing<sup>1,2</sup>, CAO Minjie<sup>1,2,\*</sup>

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

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, a competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA) using the polyclonal antibody against purified ovalbumin (OVA), the major protein in egg white, was proposed to quantify added egg white in surimi products. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot results showed the high specificity of the anti-OVA polyclonal antibody. The limit of detection (LOD) of the c-ELISA method was 1.82 mg/kg, and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.1% and 7.8%, respectively. Recovery rates of egg white added to fish meatballs ranged from 87.4% to 97.2%. The c-ELISA method was successfully applied to quantify added egg white in commercial surimi products, and results demonstrated that the added egg white content was 2.7–83.5 g/kg in six samples from different manufacturers. Our results indicated that the method established can be applied to quantify added egg white in surimi products.

**Key words:** egg white; ovalbumin; surimi products; competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714044

中图分类号: TS254

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 14-0284-06

引文格式:

赵勇娟, 翁凌, 颜龙杰, 等. 竞争性ELISA检测鱼糜制品中蛋清含量[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 284-289. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714044. <http://www.spkx.net.cn>

ZHAO Yongjuan, WENG Ling, YAN Longjie, et al. Quantification of added egg white in surimi products by competitive enzyme linked-immunosorbent assay[J]. Food Science, 2017, 38(14): 284-289. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714044. <http://www.spkx.net.cn>

我国是水产品生产和加工大国, 2014年水产品总产量达到6 462万 t, 水产品加工产量为2 053万 t, 其中, 鱼糜制品产量达到152万 t<sup>[1]</sup>。随着鱼糜制品产量的增加及鱼

浆原料价格的上涨, 更多的低值鱼类被用于鱼浆制备。为了提高鱼糜制品的口感, 在实际生产过程中, 部分企业通过过量添加包括蛋清在内的非鱼肉蛋白成分, 以达

收稿日期: 2016-08-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31271838); 福建省重大科研专项(2011NZ0002-1)

作者简介: 赵勇娟(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工。E-mail: 1217248231@qq.com

\*通信作者: 曹敏杰(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品深加工、蛋白质化学。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

以降低生产成本并提高制品弹性的效果。食品法典委员会已经宣布,要求在“一般标准预包装食品标签的”8类食物过敏,包括鸡蛋<sup>[2]</sup>。但该类非鱼肉蛋白的添加却没有明确标识,损害了消费者的利益。作为八大类致敏食物之一,鸡蛋过敏原主要存在于蛋清中,包括卵铁传递蛋白、卵类黏蛋白、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)以及溶菌酶等,其中卵类黏蛋白是最主要的过敏原,而OVA含量最高,约占蛋清总蛋白的54%<sup>[3-4]</sup>,这些过敏原经热处理后仍具有致敏性<sup>[5-6]</sup>。据报道,7岁以下儿童对鸡蛋过敏率较高<sup>[7]</sup>,尤其是婴幼儿,约有0.5%~2%对鸡蛋过敏,临床表现为皮炎、哮喘、过敏性休克,甚至死亡<sup>[8]</sup>。痕量过敏原即可引发过敏症状的发生,因此,对食物中含有的蛋清成分进行检测对于食品安全控制也十分必要。目前,有报道一些应用于红酒中蛋清成分检测的方法,如Tolin等<sup>[9]</sup>采用液相色谱-质谱联用技术对红酒中蛋清成分进行检测,检测限为5 g/L蛋清添加量;Pilolli等<sup>[10]</sup>采用表面等离子共振技术以OVA为靶蛋白对红酒中的蛋清组分进行检测,灵敏度显著提高至0.03~0.2 µg/mL。Mattarozzi等<sup>[11]</sup>采用液相色谱-电喷雾电离串联质谱检测红酒中的OVA,其线性范围为10~800 ng/mL。另外,由于多数流感疫苗采用鸡胚进行生产,因此,对于流感疫苗中OVA的监测也受到广泛关注,主要采用酶联免疫吸附测定方法(enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA)<sup>[12-13]</sup>进行定量检测。大多数食物都经过各种条件加工,如烘烤和蒸煮,这些处理条件可以改变溶解度,蛋白的结构与生物活性<sup>[14]</sup>。特别是鱼糜制品制备过程的特殊加工工艺,使最终产品中的蛋白组分因交联等发生了变化,更加大了检测难度。目前为止,仍未有相关方法应用于鱼糜制品中蛋清定量检测的报道。

在蛋清蛋白组分中,OVA含量丰富<sup>[15]</sup>,且具有良好的热稳定性<sup>[16]</sup>。因此,本研究以OVA为标志蛋白,制备相应的多克隆抗体,建立可靠的鱼糜制品中蛋清的定量检测方法,以期今后规范鱼糜制品中蛋清的正确标识提供技术支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

爆汁小鱼丸、闽南脆丸、鱼豆腐及鸡蛋 厦门市集美区新华都超市。

DEAE-Sepharose树脂、Protein A Sepharose树脂 美国GE Healthcare公司;蛋白质分子质量标准 立陶宛Fermentas公司;其他试剂为国产分析纯产品。

### 1.2 仪器与设备

Avanti JA-25高速冷冻离心机 美国Beckman公司;

Biologic LP蛋白质柱层析系统 美国Bio-Rad公司;荧光化学发光凝胶成像仪 法国Alpha Innotech公司;PT-2100组织捣碎机 瑞士Kinematica公司;G:BOX凝胶成像仪 英国Syngene公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 OVA的纯化

OVA的纯化主要参考Tankrathok等<sup>[17]</sup>的方法并加以修改。将35 g蛋清于4倍体积20 mmol/L的Tris-HCl溶液(pH 7.5)中搅拌3 h,离心取上清液上样于用20 mmol/L的Tris-HCl(pH 7.5)预平衡的DEAE-Sepharose离子层析柱。用平衡缓冲液流洗后,用含有0~0.1 mol/L NaCl的20 mmol/L的Tris-HCl溶液(pH 7.5)进行洗脱,收集第1个洗脱峰即为纯化的目的蛋白。

#### 1.3.2 OVA的鉴定

将纯化的目的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后,经考染切胶回收蛋白条带,送至上海中科新生命生物科技有限公司进行肽质量指纹图谱分析。

#### 1.3.3 抗OVA多克隆抗体的制备

将纯化的OVA经95℃处理15 min,取150 µg与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,进行皮下肌肉注射新西兰雄兔,每隔2周以相同剂量的抗原加强免疫。免疫4次后,采血,静置,待血清析出后,2 000×g离心10 min,将上清液与1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液混合,上样于用0.1 mol/L Tris-HCl溶液(pH 8.0)预平衡的Protein G Sepharose亲和层析柱进行抗OVA多克隆抗体的纯化。

#### 1.3.4 SDS-PAGE分析

参照Laemmli<sup>[18]</sup>的方法,采用质量分数12%的胶进行分析,即先将制备的样品与上样缓冲液混合,95℃加热10 min后,进行电泳。电泳结束后,用考马斯亮蓝染色,经脱色液(甲醇-乙酸-水(3:1:6, V/V))脱色至条带清晰后,用凝胶成像仪记录结果。

#### 1.3.5 Western blot分析

参照Towbin等<sup>[19]</sup>的方法进行,蛋白经SDS-PAGE分离后,转移至硝酸纤维素膜上,以5%脱脂奶封闭1.5 h,以抗OVA多克隆抗体为一抗,室温孵育1.5 h后用含150 mmol/L和0.5%吐温20的10 mmol/L Tris-HCl(TBST),pH 7.4洗5次,再用抗兔IgG为二抗孵育1 h后用TBST洗5次,采用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显色,在化学发光凝胶成像系统上记录结果。

#### 1.3.6 热处理OVA的制备

将纯化的OVA蛋白分别置于70、80、90、95℃水浴锅孵育15 min后,立即置于冰上冷却。采用SDS-PAGE和竞争性ELISA(competitive-ELISA, c-ELISA)分析加热对OVA稳定性和免疫活性的影响。

1.3.7 c-ELISA法的建立及有效性验证

c-ELISA的建立参考Crowther<sup>[20]</sup>的方法进行。采用棋盘法对包被抗原、一抗及二抗的工作浓度进行优化。以优化的抗原浓度进行包被,以5%脱脂奶封闭后,加入适当稀释的样品和等体积的一抗,于37℃孵育1.5 h,洗涤后用二抗37℃孵育1 h,洗涤后加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺在37℃显色20 min,加入H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,测定在450 nm波长处的光密度(optical density, OD)值。

标准曲线的建立是以4倍稀释法制备不同质量浓度95℃热处理后的OVA做为竞争性抗原,进行c-ELISA测定。将各质量浓度竞争性OVA的OD值换算成B/B<sub>0</sub>(B为各质量浓度竞争性OVA在450 nm波长处的OD值, B<sub>0</sub>为空白对照的平均值)。利用OriginPro 9.1.0软件进行标准曲线的拟合及数据分析。

方法的重复性以组内误差和组间误差进行评价。组内误差以同一组内14个重复样品的平均变异系数进行计算;组间误差以连续3 d、每天3个重复样品的平均变异系数进行计算<sup>[21]</sup>。检测灵敏度根据公式灵敏度=B<sub>0</sub>-3s<sup>[22]</sup>计算,其中B<sub>0</sub>为24个空白对照的平均值, s为这24个空白对照的标准偏差。

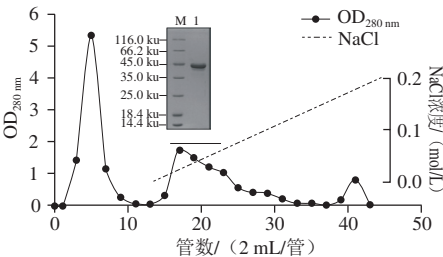
1.3.8 鱼丸及鱼糜制品检测样品的制备

鱼丸的制备参考Jiang Taoling等<sup>[23]</sup>的方法进行。取鲢鱼肉,用冰水洗净,用冰水漂洗鱼肉2次,将鱼肉3 000×g离心5 min脱水,绞肉后空播10~15 min后,加入3%食盐进行盐渍20~30 min。充分播渍后,分别制成含1、10、100 g/kg蛋清的鱼丸,手工成型后,在90~95℃水煮定型,待鱼丸浮起后立即捞出冷却。

检测样品的制备方法为取100 g鱼丸或商品化鱼糜制品,充分剁碎后,从中取出20 g样品,加入5倍体积含0.1 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)的8 mol/L尿素缓冲液,组织捣碎后,4 000×g离心15 min,所得上清液经95℃热处理15 min后离心取上清液即为待检样品。

2 结果与分析

2.1 抗OVA多克隆抗体的制备



内嵌图是纯化OVA的SDS-PAGE分析, M:蛋白分子质量标准; 1:纯化的OVA。

图1 OVA的DEAE-Sepharose离子交换柱层析图

Fig. 1 DEAE-Sepharose chromatography of OVA from egg white

通过搅拌、离心结合DEAE-Sepharose离子柱层析技术从蛋清中纯化得到OVA。图1显示搅拌、离心后的样品上样于DEAE-Sepharose,经流洗、洗脱后各收集部分的情况。可以看出, OVA处于吸附部分,在约0.02 mol/L NaCl浓度开始洗脱下来。经SDS-PAGE分析(图1内嵌图),其分子质量约为45 ku,与Huntington等<sup>[24]</sup>报道的结果一致。电泳结果显示为单一条带,表明获得高纯度OVA。为进一步确定纯化的蛋白为OVA,将纯化的样品送至上海中科新生命生物科技有限公司,利用肽质量指纹图谱技术对其进行鉴定分析。图2为获得的目的蛋白的其中一个二级质谱图。如表1所示,共获得11个肽段包含150个氨基酸残基,与已报道的鸡(*Gallus gallus*) OVA(gi|28566340)的氨基酸序列相似性达到100%,证实纯化的蛋白为OVA。

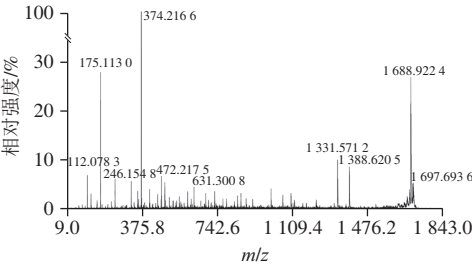


图2 OVA的肽质量指纹图谱

Fig. 2 Peptide mass fingerprinting of OVA from egg white

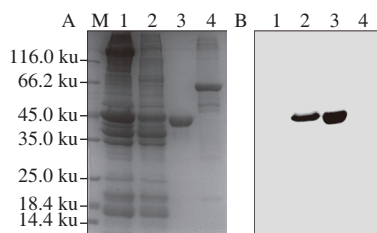
表1 与*Gallus gallus* OVA比对的肽段  
Table 1 Peptide sequences matched to the tryptic peptide mass fingerprint of ovalbumin (*Gallus gallus*)

肽段位置	理论分子质量/u	实际分子质量/u	改变分子质量/u	肽序列
86~105	2 281.182 4	2 281.189 9	0.007 5	DILNQITKPNVDVYSFLASR
112~123	1 522.797 5	1 522.792 8	-0.004 7	YPIPEYLQCVK
128~143	1 687.839 8	1 687.848 9	0.009 1	GGLEPINFQTAADQAR
144~159	1 858.965 8	1 858.974 1	0.008 3	ELINSWVESQXNGHIR
188~200	1 555.720 9	1 555.730 8	0.009 9	AFKDEDTQAMPFR
265~277	1 581.721 3	1 581.727 5	0.006 2	LTEWTSSNVMEER
265~278	1 709.816 3	1 709.840 3	0.024 0	LTEWTSSNVMEERK
324~340	1 773.899 0	1 773.897 9	-0.001 1	ISQAVHAAHAEINEAGR
341~360	2 008.945 8	2 008.958 7	0.012 9	EVVGSAAEAGVDAASVSEEFR
361~370	1 247.624 1	1 247.622 6	-0.001 5	ADHPFLFCIK
371~382	1 345.737 5	1 345.743 7	0.006 2	HIATNAVLFFGR

2.2 抗OVA多克隆抗体的特异性分析

将纯化的OVA加热处理后,免疫新西兰雄兔,获得抗OVA多克隆抗体。抗体经Protein A Sepharose亲和层析柱纯化后,采用Western blot进行特异性分析,结果如图3所示。图3A泳道2含蛋清的鱼丸粗提液中除了45 ku的OVA,还含有许多其他蛋白组分,但只有分子质量为45 ku的OVA与制备的抗OVA多克隆抗体发生反应(图3B,泳道2),未出现非特异性条带。不含蛋清的鱼丸粗提液样品(图3,泳道1)以及牛血清白蛋白阴性对照样

(图3, 泳道4)均不与抗体发生反应, 表明制备的抗OVA多克隆抗体特异性良好, 可用于后续检测方法的建立。



A. SDS-PAGE; B. Western blot. M. 蛋白分子质量标准; 1. 不含蛋白的鱼丸粗提物; 2. 含蛋白的鱼丸粗提物; 3. 纯化的OVA; 4. 牛血清白蛋白(阴性对照)。

图3 抗OVA多克隆抗体的特异性分析

Fig. 3 Specificity analysis of the anti-OVA polyclonal antibody

### 2.3 热处理对OVA稳定性的影响

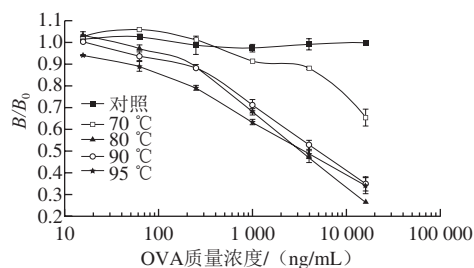
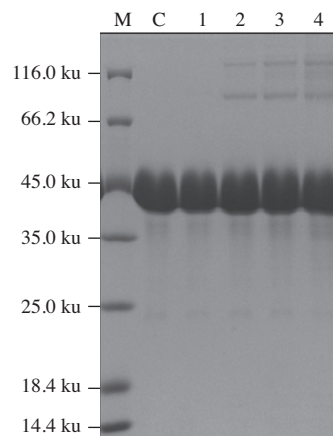


图4 热处理对竞争性抗原IgG结合能力的影响

Fig. 4 Effect of heat treatment on the IgG-binding ability of OVA

在预实验过程中, 采用未经热处理的OVA作为竞争性抗原进行c-ELISA, 发现游离OVA的IgG结合能力相对于固相OVA几乎没有竞争力。因此, 本研究对纯化的OVA进行了70~95 °C不同温度处理后, 通过c-ELISA法分析热处理对OVA IgG结合能力的影响。研究结果显示, 加热不影响OVA的溶解性, 且固相抗原的IgG结合能力几乎不受热处理的影响。以250 ng/孔包被未热处理或热处理的OVA进行间接ELISA分析, 最终OD<sub>450 nm</sub>值均为1.5左右, 没有显著差异。但在进行c-ELISA方法建立时, 热处理对OVA的IgG竞争性结合能力有显著影响。如图4所示, 在抗原包被量一致的情况下, 随着加热温度的提高, OVA的IgG竞争性结合能力显著上升, 这与张银等<sup>[25]</sup>的报道存在差异, 这可能与所用的检测抗体性质不同有关。本研究制备的抗OVA多克隆抗体目的是应用于鱼糜制品的检测, 在鱼糜制品制备过程中有加热处理工艺, 是为了更准确实现对OVA的检测。本研究以高温处理的OVA进行动物免疫, 制备的抗体均能实现对未热处理或热处理OVA的特异检测。进一步采用SDS-PAGE对OVA的热稳定性进行验证。由图5可知, OVA的热稳定性良好, 95 °C处理15 min也不发生降解, 但当加热温度高于80 °C时, 有少量多聚体产生, 这可能与热处理导

致OVA的二级结构发生改变有关<sup>[26]</sup>。Azarnia等<sup>[27]</sup>采用高效液相色谱-电喷雾串联质谱法及ELISA对意大利面中的OVA进行检测, 结果表明, 食物基质及热处理对检测灵敏度及回收率影响较大。结合图4的结果表明, 本研究在建立c-ELISA法时, 以95 °C处理的OVA作为竞争性抗原有利于提高检测的灵敏度。



M. 蛋白分子质量标准; C. 未加热的对照组; 1~4. 处理温度分别为70、80、90、95 °C。

图5 热处理对OVA稳定性的影响

Fig. 5 Effect of heat treatment on the stability of OVA

### 2.4 c-ELISA法的建立

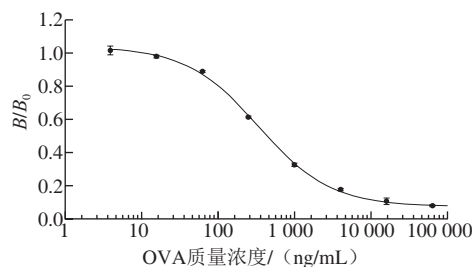


图6 c-ELISA检测OVA的标准曲线

Fig. 6 The standard curve of quantification of OVA by c-ELISA method

采用纯化的OVA抗原及制备的抗OVA多克隆抗体建立了定量检测鱼糜制品中蛋白的c-ELISA方法。经过棋盘法优化, 以95 °C、15 min处理的OVA为抗原, 以100 ng/孔进行包被。以95 °C、15 min处理的OVA为标准蛋白, 0.032 mg/mL为起始质量浓度, 以4倍法稀释, 最终建立的标准曲线如图6所示, 相关系数 $R^2=0.998$ , 检测灵敏度即检测限为36.4 ng/mL。若考虑到样品的最低稀释倍数为10, 则检测限对应为1.82 mg/kg食物, 高于Monaci等<sup>[28]</sup>采用高分辨质谱法建立的白酒中OVA等多种过敏原的检测方法。

已有研究<sup>[15]</sup>表明, 蛋白中蛋白约占总质量的11%, OVA占蛋白总蛋白的54%左右, 因此, 在本方法以OVA为检测目标对鱼糜制品中蛋白含量进行定量检测时, 应乘以系数16.8。

2.5 c-ELISA法的验证

通过计算同一96孔板上的14个重复样的变异系数,以及连续3d、每天3个重复样的变异系数分析得到,建立的c-ELISA法的组内变异系数( $n=14$ )为3.1%,组间变异系数( $n=9$ )为7.8%。以自制的蛋清含量分别为1、10、100 g/kg的鱼丸进行c-ELISA法回收率分析。由于热处理及食物基质可能影响到检测准确性<sup>[29]</sup>,本研究采用含0.1 mmol/L DTT的8 mol/L尿素缓冲液<sup>[30]</sup>进行样品制备,结果如表2所示,回收率为87.4%~97.2%,说明本研究建立的方法重复性好、准确度较高、样品制备方法适宜,可用于鱼糜制品中蛋清含量的检测。

表2 c-ELISA检测鱼丸中蛋清的回收率分析  
Table 3 Recovery of egg white added to fish meatballs by c-ELISA

添加量/(g/kg)	1	10	100
回收率/%	87.4±6.8	89.4±1.3	97.2±9.2

2.6 c-ELISA法的应用

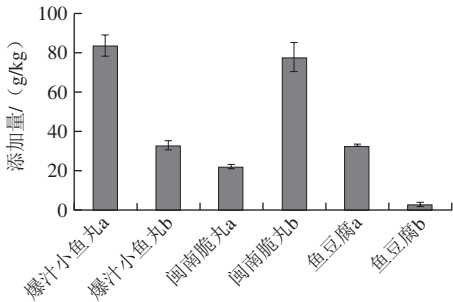


图7 商品化鱼糜制品中蛋清的含量

Fig. 7 Added egg white content in commercial surimi products

利用建立的方法对市售6组鱼糜制品进行检测,6组鱼糜制品分别为来自A公司的爆汁小鱼丸、闽南脆丸、鱼豆腐和B公司的爆汁小鱼丸、闽南脆丸、鱼豆腐。从图7可以看出,不同鱼糜制品中,蛋清的添加量差异很大,在2.7~83.5 g/kg之间。即使是同一鱼糜制品,不同公司产品的含量差异明显,表明各公司类似产品的配方存在较大差异,这也提示了在鱼糜制品包装上对蛋清含量进行明确标示及监管的必要性。

3 结论

本研究以蛋清蛋白组分中热稳定性好、含量丰富的OVA为目标蛋白,制备抗OVA多克隆抗体,成功建立了鱼糜制品中蛋清含量检测的c-ELISA法。该方法检测限为1.82 mg/kg食物,组内变异系数为3.1%,组间变异系数为7.8%,回收率为87.4%~97.2%,具有良好的重复性和准确性,并成功应用于对市售鱼糜制品中蛋清含量的检测。本研究可为今后鱼糜制品中蛋清的快速检测及规范标识的监管提供重要的技术参考。

参考文献:

[1] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 212-259.

[2] COWBURN G, STOCKLEY L. Consumer understanding and use of nutrition labelling: a systematic review[J]. Public Health Nutrition, 2005, 8(1): 21-28.

[3] POULSEN L K, HANSEN T K, NORGAARD A, et al. Allergens from fish and egg[J]. Allergy, 2001, 56(S67): 39-42. DOI:10.1034/j.1398-9995.2001.00912.x.

[4] DHANAPALA P, SILVA C D, DORAN T, et al. Cracking the egg: an insight into egg hypersensitivity[J]. Molecular Immunology, 2015, 66(2): 375-383. DOI:10.1016/j.molimm.2015.04.016.

[5] TONG P, GAO J Y, CHEN H B, et al. Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovotransferrin[J]. Food Chemistry, 2013, 131(2): 603-610. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.08.084.

[6] MA X J, CHEN H B, GAO J Y, et al. Conformation affects the potential allergenicity of ovalbumin after heating and glycation[J]. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2013, 30(10): 1684-1692. DOI:10.1080/19440049.2013.822105.

[7] CHANG M L, SHAO B, LIU Y H, et al. Analysis of allergens in 5473 patients with allergic diseases in Harbin, China[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(11): 886-893.

[8] DHANAPALA P, SILVA C D, DORAN T, et al. The prevalence of food allergy[J]. Molecular Immunology, 2015, 66(2): 375-383. DOI:10.1016/j.molimm.2015.04.016.

[9] TOLIN S, PASINI G, CURIONI A, et al. Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white[J]. Food Control, 2012, 23(1): 87-94. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.06.016.

[10] PILOLLI R, VISCONTI A, MONACI L. Rapid and label-free detection of egg allergen traces in wines by surface Plasmon resonance biosensor[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(13): 3787-3797. DOI:10.1007/s00216-015-8607-4.

[11] MATTAROZZI M, MILIOLI M, BIGNARDI C, et al. Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in fortified red wine[J]. Food Control, 2014, 38(1): 82-87.

[12] 田博, 施彤, 王晋, 等. 酶联法检测流感疫苗中卵清蛋白含量试剂盒的质量验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 647-652. DOI:10.13200/j.cjb.2006.06.100.tianb.032.

[13] LI J T, RANK M A, SQUILLACE D L, et al. Ovalbumin content of influenza vaccines[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(6): 1412-1413. DOI:10.1016/j.jaci.2010.03.009.

[14] FU T J, MAK S N, BANASZEWSKI K. Effect of heat treatment on the quantitative detection of egg protein residues by commercial enzyme-linked immunosorbent assay test kits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8): 4831-4838.

[15] ABEYRATHNE E D, LEE H Y, AHN D U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents: a review[J]. Poultry Science, 2013, 92(12): 3292-3299. DOI:10.3382/ps.2013-03391.

[16] BLOOM K A, HUANG F R, BENCHARITIWONG R, et al. Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity[J]. Pediatric Allergy and Immunology Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology, 2014, 25(8): 740-746.

- [17] TANKRATHOK A, DADUANG S, PATRAMANON R, et al. Purification process for the preparation and characterizations of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, and ovomucoid[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2009, 39(4): 380-399. DOI:10.1080/10826060903209646.
- [18] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0.
- [19] TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(9): 4350-4354. DOI:10.1073/pnas.76.9.4350.
- [20] CROWTHER J R. The ELISA Guidebook[M]. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2001: 83-112.
- [21] CAI Q F, WANG X C, LIU G M, et al. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA) for quantification of silver carp parvalbumin[J]. Food Control, 2013, 29(1): 241-247. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.06.016.
- [22] HUSAIN F T, BRETACHER I E, NEMES A, et al. Development and validation of an indirect competitive enzyme linked-immunosorbent assay for the determination of potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3): 1434-1441. DOI:10.1021/jf903350h.
- [23] JIANG T L, CAI Q F, SHEN J D, et al. Establishment of immunological methods for the detection of soybean proteins in surimi products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(1): 344-349. DOI:10.1016/j.lwt.2015.06.005.
- [24] HUNTINGTON J A, STEIN P E. Structure and properties of ovalbumin[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1/2): 189-198. DOI:10.1016/S0378-4347(01)00108-6.
- [25] 张银, 佟平, 麻小娟, 等. 热加工及超高压处理对卵白蛋白抗原性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 250-253.
- [26] GOLIAS J, SCHWARZER M, WALLNER M, et al. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37156. DOI:10.1371/journal.pone.0037156.
- [27] AZARNIA S, BOYE J I, MONGEON V, et al. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA[J]. Food Research International, 2013, 52(2): 526-534. DOI:10.1016/j.foodres.2013.02.039.
- [28] MONACI L, LOSITO I, de ANGELIS E, et al. Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white by high-resolution mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013, 27(17): 2009-2018. DOI:10.1002/rcm.6662.
- [29] AZAMIA S, BOYE J I, MONGEON V, et al. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 526-534. DOI:10.1016/j.foodres.2013.02.039.
- [30] 江韬玲, 沈建东, 蔡秋凤, 等. 荧光法检测鱼糜制品中大豆蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 54-62. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.14.043.