

## 冻融循环过程中虾过敏原的免疫原性变化

吴丽莎, 李振兴, 刘一璇, 陈瑜, 林洪\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 采用凡纳滨对虾为研究对象, 分别将过敏原提取物在  $-3$ 、 $-20$  和  $-80$   $^{\circ}\text{C}$  的贮存条件下反复冻融 1~5 次, 通过测定每次冻融后的蛋白浓度, 过敏原免疫原性等探讨过敏原在不同温度循环下的变化, 分析冻融循环对过敏原提取物活性的影响。结果表明, 虾过敏原提取物在  $-80$ 、 $-20$ 、 $-3$   $^{\circ}\text{C}$  冻融循环 5 次时, 蛋白浓度分别下降 33.1%、30.0% 和 24.2%; 在  $-80$  和  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  冻融循环 4 次时, 主要过敏原条带发生降解,  $-3$   $^{\circ}\text{C}$  冻融循环 5 次, 主要过敏原条带不会发生变化。在  $-80$  和  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  冻融循环 5 次以及在  $-3$   $^{\circ}\text{C}$  冻融 3 次时, 过敏活性降低; 在  $-80$  和  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  冻融 5 次, 主要过敏原的免疫印迹条带消失, 在  $-3$   $^{\circ}\text{C}$  冻融的免疫印迹条带没有变化。因此, 应尽量减少过敏原蛋白冻融次数, 保证贮存在  $-80$  和  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  的过敏原冻融循环 4 次以内以及  $-3$   $^{\circ}\text{C}$  冻融循环 2 次以内, 以保证实验结果的准确性。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 过敏原; 冻融; 免疫原性

**中图分类号:** R 392.8; S 968.22

**文献标识码:** A

近年来随着社会环境和生活方式的巨大改变, 食物过敏性疾病的发病率呈现出持续快速的上升趋势, 尤其是在发达国家。在美国, 约有 3.7% 的成年人和 6% 的儿童受到食物过敏的困扰<sup>[1-2]</sup>。在联合国粮农组织提出的八大类容易引起过敏的食物中, 虾蟹等甲壳类动物及其制品是其中重要的一类<sup>[3-5]</sup>, 已经分离纯化出的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 主要过敏原为分子量 36 ku 的原肌球蛋白<sup>[6]</sup>。皮肤点刺测试 (SPT) 为临床常用的检测过敏原特异性 IgE 的体内试验<sup>[7]</sup>。目前, 市场上点刺液的剂量一般为 3~5 mL, 治疗时的最小剂量一般为 0.05~0.1 mL<sup>[8-10]</sup>, 因此用于点刺液的过敏原难免会出现反复冻融的现象。本实验以虾蛋白提取物为研究对象, 研究了冻融过程中过敏原免疫原性的变化情况, 以期能为过敏原点刺液以及口服激发药物的贮存与使用提供理论指导。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

凡纳滨对虾购于青岛市市南区南山水产品批

发市场, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 青岛福林生物化学公司), 二硫苏糖醇 (DTT, solarbio 公司); 十二烷基硫酸钠 (SDS, 山东爱博科技贸易公司); 虾免疫的兔抗 (实验室制备); HRP-山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司)。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

#### 1.2 实验仪器

电泳仪 (DYY-7C, 北京六一); 冷冻干燥机 (FD1, 丹麦 Heto 公司); pH 计 (PHS23C, 上海伟业仪器厂); 冷冻离心机 (BR4i, 法国 Jouan 公司); 高速组织捣碎机 (DS21, 上海标本模型厂); 96 孔 Costar 酶标板 (美国 Costar 公司); 酶标仪 (MuLiskan MK3, 芬兰 Labsystems 公司); 紫外可见分光光度计 (TU1810 型, 北京普析仪器有限公司)。

#### 1.3 虾过敏原丙酮粉的制备

参照文献<sup>[11]</sup>的方法改进, 将虾去头去壳去肠线的 500 g 虾肉放在匀浆器中, 用 500 mL 的生理盐水悬浮, 匀浆。悬浮液在 0~4  $^{\circ}\text{C}$  悬浮 5 min 后加入 2 000 mL 的冷丙酮 ( $-20$   $^{\circ}\text{C}$  预冷), 充分

收稿日期: 2011-01-06 修回日期: 2011-02-22

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30800859)

通讯作者: 林洪, E-mail: linhong@ouc.edu.cn

混匀,放在0~4℃下作用30 min,期间混匀数次,抽滤。抽滤后,将布氏漏斗上的固体转移到容器中,再加入2 000 mL的冷丙酮(-20℃预冷),0~4℃下作用1 h,期间混匀数次,抽滤。抽滤后,将布氏漏斗上的固体转移到容器中,再加入1 000 mL的冷丙酮(-20℃预冷),0~4℃下作用1 h,期间混匀数次,抽滤,收集漏斗上固体并转移至干净的滤纸上,分散并让其在室温下风干,直到固体充分干燥和分散。待粉末干燥后研磨,200目筛并收集转移至密闭的容器中,即为丙酮粉。

#### 1.4 虾过敏原提取物的抽提

含1 mol/L KCl 0.05%的二硫苏糖醇(DTT)的抽提液,与丙酮粉的质体比为1:10的比例抽提12 h,10 000 r/min离心30 min后,取上清,沉淀用抽提液继续以质体比为1:10的比例抽提4 h,10 000 r/min离心30 min后,取上清液。两次的上清液合并后用双蒸水透析,直到透析液用氯化银溶液检测没有沉淀产生时,冻干。

#### 1.5 虾过敏原提取物的冻融处理

将浓度为1 mg/mL的虾过敏原提取物分别贮存于-80、-20、-3℃的冰箱中12 h,然后取出融化12 h,如此反复,每冻融1次为1个循环,分别循环1到5次。

#### 1.6 二喹啉甲酸法(BCA法)测定蛋白浓度

以二喹啉甲酸法(BCA法)测定蛋白浓度,牛血清白蛋白溶液作为标准品绘制标准曲线,在590 nm处测定不同浓度下冻融5次的蛋白浓度。每个处理重复3次,取平均值,并对数据进行标准差分析。

#### 1.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用LAEMMLI<sup>[12]</sup>建立的不连续电泳体系,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)研究蛋白在不同温度条件下贮存冻融后可溶性蛋白组成变化。电泳分离胶浓度为15%( $\rho$ ),浓缩胶浓度为5%( $\rho$ ),经样品缓冲液处理样品,上样量20  $\mu$ L。电泳完毕后用考马斯亮蓝R-250染色,用10%的乙酸、甲醇溶液进行脱色。

#### 1.8 间接酶联免疫吸附法(Indirect ELISA)

参考文献[6]的方法,采用间接酶联免疫吸附法(Indirect ELISA)测定贮存后过敏原蛋白活性的变化情况。用0.05 mol/L pH 9.6碳酸盐包被缓冲液,将贮存于不同温度的虾蛋白分别稀释

10倍、100倍、1 000倍、10 000倍。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加100  $\mu$ L(空白孔加入100  $\mu$ L双蒸水),4℃过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次,每次3 min(简称洗涤,下同);以100  $\mu$ L 0.5%牛血清蛋白封闭2 h,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次,每次3 min;加500倍稀释的兔抗虾(一抗)100  $\mu$ L于上述已包被的反应孔中,37℃孵育1 h,洗涤3次;在各反应孔中,加入新鲜稀释10 000倍的酶标抗体(二抗,HRP标记的羊抗兔)100  $\mu$ L,37℃孵育1 h,洗涤;在各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液100  $\mu$ L,37℃15 min;最后于各反应孔中加入2 mol/L硫酸50  $\mu$ L终止反应。在酶标仪上,以空白对照孔调零后测各孔OD<sub>450nm</sub>,每个稀释浓度测定3个孔,取平均值,进行标准差分析。

#### 1.9 免疫印迹(Western-blotting)

参照文献[13]的方法改进,经冻融处理后的虾总蛋白经SDS-PAGE后,采用半干式碳板转印仪,横流30 mA转印3 h,将凝胶上的蛋白条带电转移到PVDF膜上。转印完毕后,用丽春红S对PVDF膜进行染色,检测蛋白条带是否转移成功,采用PBST脱色。将膜浸泡在封闭液(5%脱钙苣/PBST)中2 h,然后用PBST洗涤3次,每次5 min,下面的洗涤方法相同。一抗采用兔抗虾多克隆抗体/50%封闭液,室温下过夜孵育后洗涤。二抗采用羊抗兔IgG/50%封闭液,37℃孵育1 h,洗涤。然后将PVDF膜浸没在ECL蛋白印迹底物中孵育1 min,取出拭去膜上残余底物溶液,将膜置于暗盒中,避免气泡。在暗室中,采用胶片覆盖于膜上,曝光1 min,显影定影后成像。

## 2 结果

### 2.1 冻融过程中凡纳滨对虾蛋白浓度的变化

经过冻融循环后,凡纳滨对虾的抽提蛋白采用BCA法测定(图1),由图1可以看出,在各个温度条件下冻融的蛋白浓度都有下降,并且随着冻融循环的次数增多,蛋白的浓度下降越大。在-80℃、-20℃、-3℃冻融循环5次时,蛋白浓度分别下降33.1%、30.0%和24.2%。

### 2.2 冻融循环过程中凡纳滨对虾蛋白组成的变化

凡纳滨对虾抽提蛋白质采用SDS-PAGE进行分析(图2),在-80℃冻融的蛋白(图2-A)与

在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白(图 2-B)电泳情况相似,经过冻融循环 3 次时,开始出现分子量为 56 ku 的蛋白条带;冻融 5 次时,36 ku 发生明显降解,出现 32 ku 左右的蛋白条带,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融条件下,32 ku 左右的蛋白条带比  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白条带明显。在  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白(图 2-C)仅在冻融 4 次时,开始出现分子量为 56 ku 的蛋白条带,其余蛋白组成没有变化。

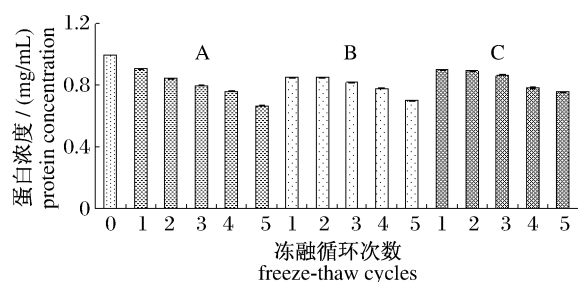


图 1 凡纳滨对虾蛋白质抽提物经过冻融循环后的蛋白浓度

A,B,C. 贮存温度为  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 0,1,2,3,4,5. 冻融循环次数。

Fig. 1 The protein concentration of white shrimp extracts through different freeze-thaw cycles

A,B,C. the shrimp extracts were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectively; 0,1,2,3,4,5. the number.

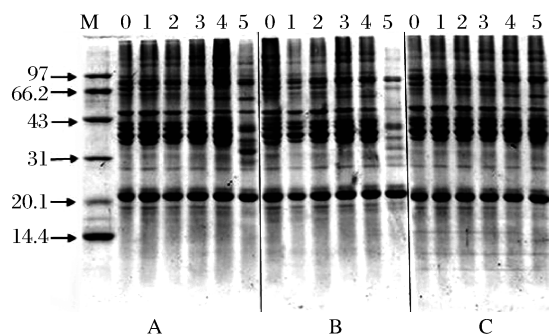


图 2 冻融循环过程中凡纳滨对虾提取物的 SDS-PAGE/考马斯亮兰染色图谱

A,B,C. 贮存温度为  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; M. 蛋白质分子量标准; 0,1,2,3,4,5. 冻融循环次数。

Fig. 2 SDS-PAGE/Coomassie blue-staining of white shrimp protein extracts through different freeze-thaw cycles

A,B,C. the shrimp extracts were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectively; M. molecular weight proteins; 0,1,2,3,4,5. the number of freeze-thaw cycles.

### 2.3 冻融循环过程中凡纳滨对虾蛋白活性的变化

用不同浓度的凡纳滨对虾抽提物对兔抗进行

预孵育后的检测结果如图 3 所示,在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白(图 3-A)与在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白(图 3-B)电泳情况相似,在冻融循环 5 次时,其蛋白的过敏活性都降低;但在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白过敏活性比在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白降低的幅度大。在  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白(图 3-C)在冻融 3 次时,过敏活性开始降低。当包被虾蛋白浓度为  $0.01\text{ mg/mL}$  时,冻融 5 次后,  $-80$ 、 $-20$  和  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  的 OD 值分别降低 23.6%、72.2% 和 56.9%。

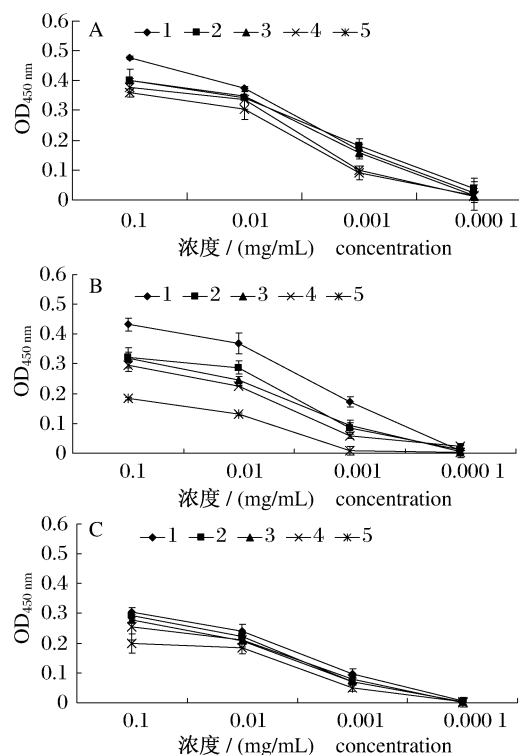


图 3 冻融循环过程中凡纳滨对虾提取物的间接 ELISA A,B,C. 贮存温度为  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 0,1,2,3,4,5. 冻融循环次数。

Fig. 3 The indirect ELISA of white shrimp protein extracts through different freeze-thaw cycles

A,B,C. the shrimp extracts were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectively; 0,1,2,3,4,5. the number of freeze-thaw cycles.

用凡纳滨对虾抽提物对兔抗进行预孵育之后,检测冻融循环过程中过敏原抽提物的致敏性,结果发现,未经冻融的蛋白出现条带的分子量是 36 和 20 ku 的蛋白。在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (图 4-A)和  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (图 4-B)冻融 5 次的蛋白,没有 36 ku 的蛋白免疫印迹条带,而在 34 ku 出现不明显的条带。在  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻融的蛋白,与未经冻融的蛋白相比,没有变化。

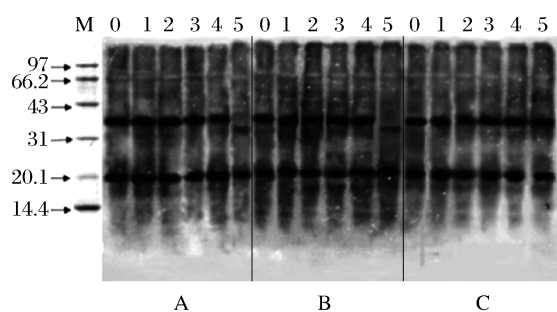


图4 冻融循环过程中凡纳滨对虾提取物的免疫印迹

A, B, C. 贮存温度为  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; M. 蛋白质分子量标准; 0, 1, 2, 3, 4, 5. 冻融循环次数。

Fig. 4 SDS-PAGE immunoblotting of white shrimp protein extracts through different freeze-thaw cycles

A, B, C. the shrimp extracts were stored in  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectively; M. molecular weight proteins; 0, 1, 2, 3, 4, 5. the number of freeze-thaw cycles.

### 3 讨论

冻融过程对蛋白的活性和功能<sup>[14]</sup>以及蛋白组成<sup>[15-16]</sup>有损害,并且随着冻融次数的增多,对蛋白组成的影响越大<sup>[17-18]</sup>。BCA测定冻融过程中虾蛋白浓度以及SDS-PAGE的结果也表明,随着冻融次数的增多,蛋白浓度下降越多,蛋白组分发生变化越明显,这可能是反复冻融过程中,冰晶结构变化造成的影响,这和STROM等<sup>[19]</sup>研究抗冻蛋白的结论相似。另外,由蛋白浓度以及SDS-PAGE的结果也可以看出,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融的蛋白比在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融的蛋白,浓度下降多且电泳条带在冻融3次就发生变化。这可能是 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的迅速冷冻形成的冰晶及复融对蛋白的破坏作用更大造成的,造成损害的机理还需进一步研究。

间接酶联免疫试验结果显示 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融的蛋白,过敏活性下降最多,说明在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的反复冻融对蛋白活性的影响最大。JIANG等<sup>[20]</sup>考察了遮目鱼在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏过程中肌原纤维蛋白盐溶性的变化,发现 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏时肌原纤维蛋白盐溶性下降速度比 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏时快,而蛋白质的变性速度在不同冻藏温度下的差异极其显著<sup>[21-22]</sup>,并且反复冻融,可能改变蛋白氢键和疏水键的强弱变化,从而引起蛋白质的空间构象的

变化,造成蛋白质分子的聚集和蛋白质多肽链的展开,这个过程可能会导致在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融的蛋白活性比 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的降低迅速。

本研究结果表明,在低温 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融的虾蛋白提取物,其过敏活性都有不同程度的降低,因此在贮存过敏原蛋白时要尽量避免反复冻融,不论作为点刺液还是口服激发液,都要小剂量分装贮存,防止过敏活性降低。

### 参考文献:

- [1] SAMPSON H A. Update on food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004, 113: 805-819.
- [2] SAMPSON H A. Food allergy Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999, 103: 717-728.
- [3] EMMETT S E, ANGUS F J, FRY J S, *et al.* Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other householdmembers [J]. Allergy, 1999, 54 (4): 380-385.
- [4] MONERET-VAUTRIN D A. Epidemiologie de I allergie alimentaire et prevalence relative des trophallergenes [J]. Cahiers Nutrition Dietetique, 2001, 36(4): 247-252.
- [5] SCHARFER T, BOHLER E, RUHDORFER S, *et al.* Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy [J]. Allergy, 2001, 56(12): 1172-1179.
- [6] 李振兴, 林洪, 李明华, 等. 不同虾类的过敏原及其过敏性[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 281-284.
- [7] 赵俊芳, 王学谦. 食物过敏原检测及其应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 948-950.
- [8] 贺娟, 张玉, 肖会. 阿罗格脱敏治疗支气管哮喘的疗效观察及护理[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(19): 2336-2337.
- [9] 匡嘉丽, 方向佳, 吴军, 等. 阿罗格长效变应原脱敏治疗变应性鼻炎的疗效观察[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(8): 883-886.
- [10] 张春林. 阿罗格®标准化变应原特异性免疫治疗对儿童过敏性哮喘的持续影响[J]. 药物与临床, 2009, 47(12): 89-90.
- [11] YU C J, LIN Y F, CHIANG B L, *et al.* Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m2 [J]. Journal of Immunology, 2003,

- 170(1):445-453.
- [12] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*,1970,227:680-685.
- [13] MOTOYAMA K, SUMA Y, ISHIZAKI S, *et al.* Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of Crustaceans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (3): 985-991.
- [14] WATSON P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen [J]. *Animal Reproduction Science*,2000,60-61:481-492.
- [15] 杨继东. 冻融对血浆总蛋白含量的影响[J]. *现代医药卫生*,2004,20(3):1271.
- [16] XIA X F, KONG B H, LIU Q, *et al.* Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as inuenced by different freeze-thaw cycles [J]. *Meat Science*, 2009, 83: 239-245.
- [17] SADETTIN TURHAN, SULE USTUN N, INCI BANK. Effect of freeze-thaw cycles on total and heme iron contents of bonit (*Sardasarda*) and bluesh (*Pomatomus saltator*) fillets [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*,2006,19:384-387.
- [18] PRATHALINGAM N S, HOIT W V, REVELL S G, *et al.* Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw [J]. *Theriogenology*,2006,66:1894-1900.
- [19] STROM C S, LIU X Y, JIA Z. Antifreeze protein-induced morphological modification mechanisms linked to ice binding surface [J]. *Biological Chemistry*,2004,279(31):32407-32417.
- [20] JIANG S T, HUANG D C, CHEN C S. Effect of storage temperature on the formation of disulfides and denaturation of milkfish actomyosin [J]. *Food Science*,1988,53(5):1333-1335.
- [21] 曾名勇,黄海,李八方. 鲮肌肉蛋白质生化特性在冻藏过程中的变化[J]. *水产学报*,2003,27(5):480-485.
- [22] 曾名勇,黄海,李八方. 不同冻藏温度对鲈鱼肌肉蛋白质生化特性的影响[J]. *青岛海洋大学学报:自然科学版*,2003,33(33):525-530.

## Effect of freeze-thaw cycles on the immunogenicity of *Litopenaeus vannamei* allergens

WU Li-sha, LI Zhen-xing, LIU Yi-xuan, CHEN Yu, LIN Hong\*

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

**Abstract:** In order to study the activity of shrimp allergens in freeze-thaw cycles, *Penaeus vannamei* were used to extract allergen, respectively stored at  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for one to five cycles. For the purpose of exploring the best activated condition of the allergen extract, protein concentration was determined by BCA; SDS-PAGE electrophoresis was used to evaluate protein composition; indirect ELISA and Western-blotting were used to survey allergens activity. The results showed that when shrimp allergen extract was in the cycle of freezing and thawing for five cycles at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the protein concentration decreased by 33.1%, 30.0% and 24.2% respectively. The major allergen bands were degraded, when the shrimp protein extract was frozen and thawed for four cycles at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , on the other hand the major allergen bands didn't change at  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  for five cycles of freezing and thawing. The allergenic activity of shrimp protein extract had reduced when frozen and thawed for five cycles at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and three cycles at  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The major allergen Western-blotting bands disappeared when five cycles of freezing and thawing were advanced at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , while the major Western-blotting bands didn't change at  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Therefore, when the allergens protein was stored, the cycles of freeze-thawing should be reduced to ensure the allergenic activity of shrimp didn't change, then at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  within four freeze-thaw cycles and at  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  less than two freeze-thaw cycles were allowed.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; allergen; freeze-thaw cycles; immunogenicity

**Corresponding author:** LIN Hong. E-mail: linhong@ouc.edu.cn