

聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测大豆过敏原蛋白 Gly m Bd 30 K 缺失方法

王绍东^{1,3}, 李远明¹, 刘伟¹, 姜妍¹, 王浩¹, 于佳¹, 李文滨², 高桥浩司³

(1. 东北农业大学 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 独立行政法人/农业食品产业技术综合研究机构/作物科学研究所, 茨城 筑波 305-8518)

摘要:通过对现有 SDS-PAGE 电泳技术的样本前处理和制胶技术的改良, 开发出了一种能够同时清晰鉴别 7S 球蛋白组分亚基(α' , α , β -Subunit)和 Gly m Bd 30 K 谱带的 SDS-PAGE 电泳快速检测新技术。利用该方法对 PI603570A \times 0329F₆ 杂交组合 F₂ 群体的 116 个样本进行了 7S 球蛋白组分亚基(α' , α , β -Subunit and Gly m Bd 30K)缺失的筛选, 并通过回交转育技术, 将 7S 球蛋白组分亚基的缺失性状成功导入到黑龙江主栽品种中去。新方法可以有效地加快筛选进程, 降低筛选成本, 对过敏原蛋白缺失大豆种质创新具有重要意义。

关键词: 过敏原蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 免疫印迹技术; 大豆种子

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)04-0638-05

A Fast Detection Method for Screening of Gly m Bd 30 K Allergen Protein Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Soybean Seeds

WANG Shao-dong^{1,3}, LI Yuan-ming¹, LIU Wei¹, JIANG Yan¹, WANG Hao¹, YU Jia¹, LI Wen-bin², TAKAHASHI Koji³

(1. National Research Center of Soybean Engineering and Technology(NRCSET), Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 2. Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 3. National Agriculture and Food Research Organization, National Institute of Crop Science, Tsukuba 305-8518, Ibaraki, Japan)

Abstract: In this research, through the improvement of the sample pretreatment and confection of the gel, a fast detection method was developed for simultaneous determination of α' , α , β -Subunit and Gly m Bd 30 K lacking individual using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in soybean seeds. We have screened F₂ (PI603570A \times 0329F₆) population (N = 116) in 7S globuline lacking by this method. Moreover, we have introduced the lacking character into the major soybean varieties in Heilongjiang province through the backcross breeding. The results indicated that the method was better in velocity and less costs of the screening. It is significant for the development of soybean germplasm in the allergen proteins lacking.

Key words: Allergen proteins; Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Western blotting; Soybean seeds

大豆是我国最重要的蛋白质和油料作物之一, 蛋白质含量约为 35%~50%, 含油量约为 16%~24%, 具有营养附加值高、加工产业链条长、食材助剂应用范围广等特点。但它也是仅次于牛奶、鸡蛋的三大过敏原食物之一。相关研究发现, 大豆种子中有 16 种过敏原蛋白^[1], 其中, Gly m Bd 60 K(分子量为 68 KDa)^[2]、Gly m Bd 30 K(分子量为 34 KDa)^[3]和 Gly m Bd 28 K(分子量为 26 KDa)^[4]是大豆主要过敏原蛋白(以下分别简称为 60 K, 30 K 和 28 K), 它们均属于大豆球蛋白的 7S 组分。60 K 被确认为 β -伴大豆球蛋白(β -conglycinin)的 α -亚基

(α -subunit), 28 K 是一种带有半多糖的微量糖蛋白, 30 K 为 34 KDa 油体辅助蛋白, 也是一个 N-连接糖蛋白, 存在于大豆种子液泡中, 与木瓜蛋白酶家族包囊蛋白酶具有高度同源性^[5-6]。Cheng 等^[7]的研究表明, 30 K 可能与丁香交酯配基特异结合, 作为调节丁香交酯信号的受体, 参与大豆植株的防御反应。

近年来, 人们生活水平逐渐提高, 人类机体免疫力却有不断下降的趋势, 在日、美等生活水平较高的发达国家表现尤为突出。根据小川等^[1]的研究发现, 在日本患阿托品性皮肤炎的乳幼儿中, 约

收稿日期: 2011-07-08

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金资助项目(2010RFLYN016); 东北农业大学留学回国基金资助项目(2010RCA03); 黑龙江省留学回国基金资助项目(LC2009C25)。

第一作者简介: 王绍东(1966-), 男, 副研究员, 博士, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wsdhlj@yahoo.com.cn。

有 20% 左右的患者对大豆蛋白呈阳性反应。在对 69 名大豆过敏的普通患者中,对 60 K、28 K 和 30 K 呈阳性反应比例分别为 23.2%、23.2% 和 65.2%,说明 30 K 是大豆种子中致敏性最强的储藏蛋白^[8]。为了增加大豆优质蛋白及其制品的受众群体,有必要去除或减低大豆及其制品中过敏原蛋白含量。目前,生产上去除或减低过敏原蛋白的方法,通常采用酶改性或化学方法^[9],但处理效果多不理想,而且增加了加工成本,降低了大豆蛋白的营养价值。通过现代遗传改良育种手段,培育过敏原蛋白缺失或低含量的大豆新品种,从源头上去除或减低过敏原蛋白的含量,成为大豆育种家共同追求的育种目标。

Takahashi 等^[10]用 r 射线照射 α -、 β -亚基含量半减的“Karikei434”获得 M_1 种子后代群体,在世界上首次育成了 α -亚基和 28 K 缺失、30 K 含量极低的高 11S 球蛋白含量且低过敏原化的大豆新品种“梦实”(Yumemimori)。邱丽娟等^[11]通过对中国栽培大豆核心种质 220 份,保留种质 201 份样本的 28 K 和 30 K 过敏原蛋白的分析研究明,核心种质中 28 K 缺失比例达到 36.3%,虽未发现 30 K 缺失种质,但证明了品种间 30 K 过敏蛋白含量存在差异。据日本 Hiemori 等^[12]的最新研究表明,28 K 过敏原蛋白序列的 2 个氨基酸发生单碱基替换变异,原先使用 C5 抗体时获得的阴性反应的材料,使用新的单克隆抗体 G9 进行 28 K 过敏原蛋白的缺失检测时,均表现为阳性反应。截止目前,世界各地尚未找到 28 K 缺失的大豆种质资源。Herman^[13]通过基因沉默技术成功抑制了 30 K 过敏原蛋白的蓄积,首次获得 30 K 完全缺失的转基因植株。Leina 等^[14]从 16 266 份大豆和一年生野生大豆种质资源中筛选出 12 份 30 K 缺失体。目前,包括美国、日本等发达国家在内,也没有 30 K 过敏原蛋白完全缺失大豆新品种的商业化种植。主要原因可能由于现在所通用的 30 K 过敏原蛋白缺失筛选鉴定技术——免疫印迹技术过于繁琐,影响了 30 K 过敏原蛋白缺失资源的筛选进程,致使短时间内无法找到可用的杂交亲本。

作为大豆发源地,我国有着丰富的大豆遗传资源,开发一套 30 K 过敏原蛋白缺失的便捷有效的筛选方法,对 30 K 过敏原蛋白缺失大豆新品种的培育具有重要意义。该研究通过对现有的免疫印迹技术中的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术进行改良,在先期筛选阶段,不通过后期的免疫印迹,利用肉眼直接就能在凝胶上清晰判断 30 K 谱带的有

无,并能够同时检测 α' 、 α 、 β -Subunit 谱带的存在与否。待初步筛选出 30 K 谱带缺失个体后,再利用免疫印迹技术进行最后确认鉴定,可以极大地节约筛选成本,缩短筛选进程。利用此方法,已从配制的 PI603570A(\varnothing) \times 0329F₆(δ)F₂群体中筛选出若干份 7S(α' 、 α 、 β -Subunit、30 K)亚基完全缺失的材料,为下一步创制出适于我国各生态类型区栽培的 7S 组分亚基过敏原蛋白完全缺失的大豆新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 参试样品 Nagomimaru(α' 、 α -Subunit null type, cv., Japan), \varnothing : PI603570A(Gly m Bd 30 K allergen null type, cv., USA), δ : 0329 F₆(α' 、 α 、 β -Subunit triple null type, high generation lines), 及其杂交后代 F₂ 个体。杂交群体的选育,在独立行政法人/农业与食品综合研究机构/作物科学研究所实验场圃内完成(日本/筑波)。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:分析纯级 Tris(Sigma), Acrylamide(Amresco), Bisacrylamide(Amresco), Bovine Serum Albumin(KH), 4-Chloro-1-Naphthol(Amresco), 一次抗体:F5(NICS, Japan), 二次抗体:IgG(H+L)(HRP-labeled Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(Bioss Inc.))等。

主要仪器:四连体垂直冷凝电泳槽(HTJY),温控离心机(HITACHI), KQ300DE 数控超声波清洗器,电泳仪电源(BIO-RAD),半干转印系统(BIO-RAD),数字显示酸度计,振荡器等。

1.2 试验方法

1.2.1 Gly m Bd 30 K 的提取 从保存的每份大豆种质资源中,分别随机取 10 粒,研钵研磨成粉末,混匀装入 1.5 mL 离心管,干燥冷藏备用。称取大豆粉末 10~12 mg,装入 1.5 mL 离心管,加入 1 mL 提取缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.2, 内含 2% 的巯基乙醇,溴酚蓝指示剂适量),用震荡器搅拌均匀,超声波萃取 15 min,室温下放置 20~30 min,再度搅拌后, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液 10 μL 用于 SDS-PAGE 电泳解析。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶的配制 成胶溶液的配制 A 液:SDS 2.00 g, Tris 90.75 g, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 将 pH 值调至 8.80,最后加蒸馏水定容至 500 mL。B 液:SDS 2.00 g, Tris 15.00 g, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 将 pH 值调至 6.80,最后加蒸馏水定容至 500 mL。C 液:Acrylamide 150.00 g, 加 Bisacrylamide 4.00 g, 加蒸馏水定容至 500 mL。P 液:过硫酸铵 1.40 g,

加蒸馏水至 100 mL。E 液:核黄素 8.00 mg,加蒸馏水定容 200 mL 混匀备用。

10 × 电泳缓冲液的配制:甘氨酸 Glycine 144.00 g, Tris 30.00 g, SDS 10.00 g, 用 1 mol · L⁻¹ HCl 将 pH 值调至 8.30, 加蒸馏水定容至 1 000 mL。

分离胶的配制:以制作玻璃板规格为 16 cm × 14 cm × 1 mm 厚的胶 2 枚为例, 10.5% 的聚丙烯酰胺凝胶液按 A 液 9.0 mL, C 液 12.6 mL, P 液 1.8 mL, 蒸馏水 12.6 mL 的先后顺序加入到 100 mL 的三角烧瓶中, 充分混合均匀后, 加入 TEMED 24 μL, 再度混匀后, 分装到两套玻璃板中, 胶面的上部轻轻滴入蒸馏水适量, 防止胶面干燥, 室温放置 20 ~ 30 min, 等待胶体凝固。与此同时, 准备配制浓缩胶, 在往浓缩胶中加入 TEMED 之前, 倒掉上部蒸馏水, 灌制浓缩胶, 放在日光灯下照射 20 min 左右, 浓缩胶凝固后, 撤下固定铗, 用蒸馏水轻轻冲洗掉凝固不完全的残胶, 用保鲜膜包好, 4℃ 倒置冷藏备用。浓缩胶的配制及 SDS-PAGE 电泳参照王绍东等^[15]的方法进行。

1.2.3 Gly m Bd 30 K 的免疫印迹分析(Western Blotting) 关联试剂的准备: Transbuffer (1 L), Tris 12.11 g, Glycine 14.41 g 加蒸馏水定容至 800 mL, 使用之前与 CH₃OH 按 4:1 比例配制转写缓冲液; Buffer A (pH 7.3, 1 L), Tris 2.42 g, NaCl 9.00 g, Tween20 0.5 mL, 加蒸馏水定容至 1 000 mL; 1% BSA (500 mL) 5.00 g, 加 Buffer A/Tween 定容至 500 mL; 10 × Buffer B (pH 7.30, 1 L) Tris 60.55 g, 加水定容至 1 000 mL; 1 × Buffer B/Tween20 10 × Buffer B 100 mL, Tween20 0.5 mL, 加蒸馏水定容至 1 000 mL; 0.75% 4-Chloro-1-Naphthol (100 mL) 4-Chloro-1-Naphthol 0.75 g, 加 CH₃OH 至 100 mL, 1 mol · L⁻¹ NaCl。PVDF (Polyvinylidene difluoride membrane) 膜 (裁剪至与胶等规格), 经 CH₃OH 浸润后, 放入 Transbuffer 保存待用; 与胶等规格的加厚滤纸放入 Transbuffer 保存待用。

免疫印迹技术 (1) 转膜: 从电泳槽卸下的胶体, 在 Transbuffer 中驯染 8 ~ 10 min, 同时, 在半干转印系统的底板 (正极) 上方, 按加厚滤纸 ⇒ PVDF 膜 ⇒ 驯染的胶体 ⇒ 加厚滤纸 ⇒ 不锈钢负极顶板的顺序叠放, 注意为了避免各层之间残存气泡, 在各层放置之前都要添加适量的 Transbuffer, 接通电源, 保持电压 15 ~ 20 V, 转写 1.5 ~ 2.0 h。 (2) PVDF 转写膜的封闭: 将转写后的 PVDF 膜, 放入 1% 的 BSA 封闭液, 室温下摇床轻摇 1 h 或 4℃ 下封闭 12 h。 (3) 抗体的孵育: 封闭后的 PVDF 膜, 放入盛有用 1%

BSA 稀释成 1 000 倍液的 F5 (2 μg · mL⁻¹) 一次抗体的密闭容器或分子杂交炉内, 室温轻摇或旋转孵育 1.5 ~ 2.0 h。 (4) 洗膜: 回收一抗后, 用 Buffer A 清洗液漂洗 3 次, 每次 5 ~ 10 min; 二次抗体的孵育, 洗涤后的 PVDF 膜放入 2 000 倍的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L) (HRP-labeled Goat Anti-Mouse IgG (H + L)) 孵育液中, 室温孵育 1.5 ~ 2.0 h, 用 Buffer A/Tween 0.05% 漂洗 2 次, 每次 5 ~ 10 min, Buffer B/Tween 0.05% 漂洗 2 ~ 3 次, 每次 5 ~ 10 min。 (5) 过氧化物酶反应 (Gly m Bd 30 K 过敏原蛋白的检测): 根据欲检测 PVDF 膜的枚数, 确定反应液的体积。以检测 4 枚 PVDF 膜为例, 需 Buffer B 25 mL, 4-Chloro-1-Naphthol 450 μL, 30% H₂O₂ 15 μL, 充分混匀后将 PVDF 膜放入, 反应 20 ~ 25 min 左右, Gly m Bd 30 K 过敏原蛋白谱带即会显色, 注意显色时间不宜过长, 否则背景谱带也会出现, 影响目标蛋白的判定。目标蛋白谱带清晰出现后, 将膜浸入 1 mol 的 NaCl 溶液, 终止显色反应, 用去离子水反复冲洗 2 ~ 3 遍, 置滤纸上干燥后照相保存, 反应液回收统一处置, 避免直接倒掉, 污染环境。

2 结果与分析

2.1 大豆种子 7S 组分 (α', α, β-Subunit and 30 K) 亚基缺失 SDS-PAGE 分析

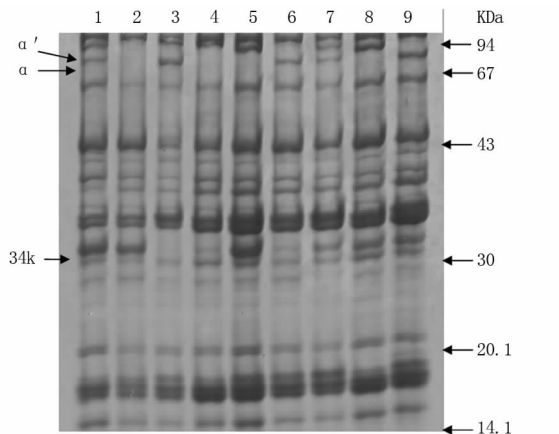
如图 1 所示, 利用新开发的 SDS-PAGE 电泳技术, 对 Nagomimaru (♀) × PI603570A (♂) 杂交后代的部分 F₂ 个体筛选的电泳图谱, 发现 7S 组分亚基之间的遗传重组频度较大, 与刘珊珊等^[16]的研究结果相同。在 3 泳道除发现 α'-Subunit 缺失外, 大约在分子量 Marker 34 K 的位置有谱带缺失, 是否为 Gly m Bd 30 K 过敏原蛋白 (其分子量为 34 K Da) 谱带, 需要 Western Blotting 确认。

2.2 Gly m Bd 30 k 过敏原蛋白缺失免疫印迹 (Western Blotting) 分析

7S 组分 (α', α, β-Subunit) 的缺失分析, 常规 SDS-PAGE 电泳技术就可以实现^[15-16], 已无需免疫印迹验证。上述 1 ~ 9 个样品在 SDS-PAGE 电泳结束后, 应用 Western blotting 技术, 进行了 30 K 过敏原蛋白的缺失验证, 如图 2 所示, 在分子量 Marker 34 K Da 所示的水平位置上, SDS-PAGE 各泳道染色谱带所对应的位置, 与 PVDF 膜显色谱带的粗细及存在与否完全吻合, 特别是 3 泳道的样品在 SDS-PAGE 胶上所表现出来的缺失, 以及 6 泳道上表现出来的极细的谱带, 在 PVDF 膜上均得到了清晰的认证。

2.3 新 SDS-PAGE 电泳技术在 7S 组分(α' , α , β -Subunit and 30 K)亚基缺失检测上的应用

应用上述新 SDS-PAGE 电泳检测技术,对 PI603570A \times 0329F₆ 杂交组合 F₂ 群体(N = 116)进行了包括 30 K 在内的 7S 组分亚基缺失筛选。如图 3 所示,1,2,3,5,8,11,14,15 和 19 泳道的 9 个样品,表现为 7S 组分(α' , α , β -Subunit and 30 K)亚基完全缺失型,7,16 和 17 泳道的 3 个样品,表现为 30 K 缺失的母本类型,4,6,9,10,12,13 和 18 泳道的 7 个样品,表现为 α' , α , β -Subunit 缺失的父本类型。



1,7:无缺失的普通型;2,4: α 和 α -Subunit 缺失型;3: α -Subunit 和 Gly m Bd 30 K 缺失型;5,8: α -Subunit 缺失型;6: α -Subunit 缺失和 30 K 过敏原蛋白低含量型;9: α -Subunit 缺失型。

1,7:wild type;2,4: α and α -Subunit null type;3: α -Subunit and Gly m Bd 30 K null type;5,8: α -Subunit null type;6: α -Subunit null and hypoallergenic content type;9: α -Subunit null type.

图 1 (Nagomimaru \times PI603570A) 部分 F₂ 个体的 7S 球蛋白组分亚基缺失 SDS-PAGE 电泳检测图谱
Fig.1 The new SDS-PAGE electrophoretogram pattern for 7S globulin subunit lacking detection from a part of (Nagomimaru (♀) \times PI603570A) F₂ individual

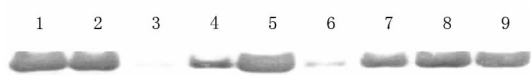
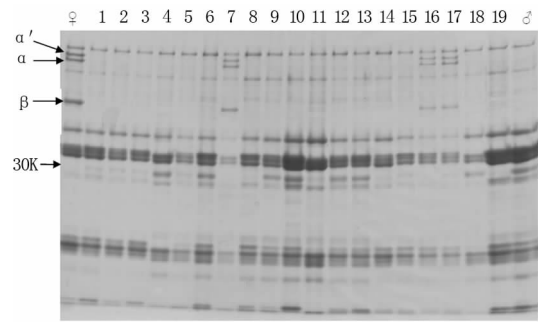


图 2 Gly m Bd 30 K 过敏原蛋白缺失免疫印迹技术验证图谱

Fig.2 The western blotting pattern corresponds to Gly m Bd 30 K allergen protein lacking

3 结论与讨论

大豆蛋白组分的研究,特别是大豆过敏原蛋白的去除,一直是大豆加工和大豆品质改良育种领域共同研究的热点之一^[5,13,14,18-20]。30 K 是最主要的大豆过敏原蛋白^[8],如果能从育种源头上通过遗传改良手段将其去除,对降低大豆加工成本,增加大豆营养食品的受众人群,增进国民健康,具有重要



♀:PI603570A (Gly m Bd 30 K null type); ♂:0329 (α' , α , β -Subunit 三缺失 F₆ 品系);1,2,3,5,8,11,14,15 和 19 为 7S 组分(α' , α , β -Subunit and 30 K)亚基完全缺失型;7,16 和 17 为 Gly m Bd 30 K 缺失型(母本类型);4,6,9,10,12,13 和 18 为 α' , α , β -Subunit 缺失型(父本类型)。

The samples No. 1,2,3,5,8,11,14,15 and 19: α' , α , β -Subunit and 30 K all null type;7,16 and 17:Gly m Bd 30 K null type(female type);4,6,9,10,12,13 and 18: α' , α , β -Subunit null type(pollen type).

图 3 (PI603570A \times 0329F₆) 部分 F₂ 个体 SDS-PAGE 检测

7S 球蛋白组分亚基缺失电泳检测图谱
Fig.3 The SDS-PAGE electrophoretogram pattern for 7S globulin subunit(including Gly m Bd 30k)lacking detection from a part of (PI603570A \times 0329F₆) F₂ individual

的意义。

有关 30 K 大豆过敏原蛋白的研究,始自 20 世纪 90 年代。然而,目前为止,世界各国尚无 30 K 过敏原蛋白缺失型非转基因的大豆品种的商业化种植。其根本原因在于尚没有筛选到 30 K 缺失的品种资源。至 2006 年美国大豆育种家 Leina 等^[13]才从 16 266 份大豆和一年生野生大豆种质资源中筛选出 12 份 30 K 缺失体。30 K 大豆过敏原蛋白检测筛选的常用方法是免疫印迹技术(Western blotting),由于此种检测方法与 7S 球蛋白组分的 α' , α , β -Subunit 的筛选相比,步骤繁琐、难度大、成本高^[11,16,17]。一般完成一次检测得需要 2 个工作日,所需试剂种类超过 20 种,而且有毒试剂较多,重演率低,极大地限制了 30 K 大豆过敏原蛋白缺失体的筛选^[11]。有关 7S 组分的 α -subunit 的遗传机制已基本清楚^[19]。30 K 大豆过敏原蛋白缺失资源虽已找到,有关 30 K 大豆过敏原蛋白缺失的遗传机制却鲜有报道。

该研究通过对现有 SDS-PAGE 电泳技术的样本前处理和制胶技术的改良,实现了 7S 球蛋白组分亚基(α' , α , β -Subunit)和 30 k 谱带缺失的同时检测,有效地缩短了筛选进程,降低了筛选成本。目

前,课题组已利用国外的过敏原蛋白缺失资源,将 α' 、 α 、 β -Subunit 和 30 K 缺失性状同时导入到黑龙江省大豆主栽品种中,并已获得 α' 、 α 、 β -Subunit 和 30 K 同时缺失的 F₂ 个体若干株。有关缺失性状的遗传稳定性研究、综合农艺性状的考察和缺失基因分子标记的开发正在进行中。

致谢:该研究曾经得到日本北海道大学/农学研究院/育种工学讲座喜多村教授的指导,日本独立行政法人/农业与食品综合研究机构/作物研究所/大豆育种研究室羽鹿牧太主任研究员的帮助,在此一并表示诚挚的感谢。

参考文献

- [1] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 37(6): 555-565.
- [2] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1995, 59(5): 831-833.
- [3] Bando N, Tsuji H, Yamanishi R, et al. Identification of the glycosylation site of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1996, 60(2): 347-348.
- [4] Tsuji H, Bando N, Hiemori M, et al. Purification of characterization of soybean allergen Gly m Bd 28K[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1997, 61(6): 942-947.
- [5] Ogawa T, Tsuji H, Bando N, et al. Identification of the soybean allergenic proteins, Gly m Bd 30K with the soybean seed 34kDa oil-body-associated protein[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1993, 57: 1030-1033.
- [6] Kalinski A, Weisemann J M, Matthews B F, et al. Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain family[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(23): 13843-13848.
- [7] Cheng J, Carol B, David S, et al. Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors[J]. Plant Biology, 1998, 95(6): 3306 - 3311.
- [8] 小川 正, 辻 英明, 坂東紀子. 大豆たんぱく質の低アレルギー化に関する研究[J]. 大豆たんぱく質栄養研究会会誌, 1992, 13: 86-91. (Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Preparation of hypoallergenic soybean products identification of allergenic proteins in soybeans[J]. Report of the Soy Protein Research Committee, 1992, 13: 86-91.)
- [9] 程伟, 陈红兵, 高金燕, 等. 酶改性对食物蛋白质过敏原性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 391-394. (Cheng W, Chen H B, Gao J Y, et al. A review of the effect of enzymatic modification on the allergenicity of food proteins[J]. Food Science, 2010, 31(23): 391-394.)
- [10] Takahashi K, Shimada S, Shimada H, et al. A new soybean cultivar "Yumeminori" with low allergenicity and high content of 11S globulin[J]. Bulletin of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region, 2004, 102: 23-39.
- [11] 张跃强, 关荣霞, 刘章雄, 等. 利用大豆核心种质部分样本鉴定 28K 和 30K 过敏原蛋白缺失材料[J]. 作物学报, 2006, 23(3): 324-329. (Zhang Y Q, Guan R X, Liu Z X, et al. Identification of Gly m Bd 28k and 30k lacking soybean by using random sampling of core collection in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 23(3): 324-329.)
- [12] Hiemori M, Kakiuchi C, Yamaguchi A, et al. Elucidation of the mutant protein of Gly m Bd 28K, a soybean allergen, in the allergen-lacking soybean varieties[J]. Proceedings. Annual Meeting, Japan. Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, 2006: 61 (in Japanese).
- [13] Herman E. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen[J]. Crop Science, 2005, 45: 462-467.
- [14] Leina M J, Hymowitz T, Schmidt M A, et al. Evaluation of Glycine germplasm for nulls of the immunodominant allergen P34/Gly m Bd 30K[J]. Crop Science, 2006, 46: 1755-1763.
- [15] 王绍东, 姜妍, 王浩, 等. 新聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测大豆脂氧酶缺失方法[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 484-487. (Wang S D, Jiang Y, Wang H, et al. A fast detection method for screening of lipoxygenase null individual using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in soybean[J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 484-487.)
- [16] 姜振峰, 赫卫, 汪洋, 等. 大豆种子 7S、11S 球蛋白及 7S 球蛋白亚基的研究[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2): 32-35. (Jiang Z F, He W, Wang Y, et al. Study on 7S, 11S globulin and subunits of 7S globulin of soybean seed[J]. Chinese Journal of Oil Crop Science, 2007, 29(2): 32-35.)
- [17] 刘珊珊, 滕卫丽, 姜自芹, 等. 大豆 7S 球蛋白 α -亚基缺失型种质创新[J]. 作物学报, 2010, 36(8): 1409-1403. (Liu S S, Teng W L, Jiang Z Q, et al. Development of soybean germplasm lacking of 7S globulin α -subunit[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(8): 1409-1403.)
- [18] Hajik M, Takahashi M, Sakai S, et al. A new genotype of 7S globulin(β -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb et. Zucc)[J]. Breeding Science, 1996, 46: 385-386.
- [19] Takahashi K, Mizuno Y, Yumoto S, et al. Inheritance of the α -subunit deficiency of β -conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] line induced by g-ray irradiation[J]. Breeding Science, 1996, 46: 251-255.
- [20] Takahashi K, Banba H, Kikuchi A, et al. An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Breeding Science, 1994, 44: 65-66.