

大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 的抗原表位区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定

林苏霞^{1,2}, 王晓梅³, 刘志刚^{1,3}, 曾梦雅¹, 吴 研¹, 陈家杰¹

(1. 呼吸疾病国家重点实验室, 深圳大学 变态反应分室, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学 生命科学学院, 广东 深圳 518060; 3. 深圳大学 医学院, 广东 深圳 518060)

摘 要:根据文献并结合生物信息学方法选取大豆主要过敏原 Gly m Bd 30k 的抗原表位区, 采用 PCR 方法扩增出该抗原表位区基因片段, 并通过酶切连接分别构建单体的 pET 表达载体 (pET-sGly) 和二聚体的 pET 表达载体 (pET-dGly), 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS, 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析; 同时用 Ni²⁺ 离子亲和层析柱纯化表达的 sGly 和 dGly 抗原表位蛋白, 用 western-blotting 和 ELISA 检测重组蛋白的免疫原性。结果表明: 表达的单体 sGly 蛋白以可溶性表达为主, 而其二聚体 dGly 蛋白以包涵体形式存在, 纯化的 sGly 和 dGly 蛋白都具有较好的免疫原性, 重组蛋白 sGly 的抗原性更佳。成功构建的大豆主要过敏原 Gly m Bd 30k 蛋白的抗原表位区单体 sGly 蛋白及其二聚体 dGly 蛋白的工程菌, 为研制大豆主要过敏原的单克隆抗体以制备用于大豆主要过敏原检测的试剂奠定了基础。

关键词:大豆主要过敏原; Gly m Bd 30k; 抗原表位区; 基因克隆

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0186-05

Cloning and Expression of the Antigenic Epitope of Gly m Bd 30K Protein from Soybean and Purification and Identification of Expressed Product

LIN Su-xia^{1,2}, WANG Xiao-mei³, LIU Zhi-gang^{1,3}, ZENG Meng-ya¹, WU Yan¹, CHEN Jia-jie¹

(1. State Key Laboratory of Respiratory Disease for Allergy, Shenzhen University, Shenzhen 518060; 2. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060; 3. Medical College, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China)

Abstract: Through reviewing the literatures combined with bioinformatics predication, the antigenic epitope of Gly m Bd 30k allergen was selected. And the gene was amplified by PCR. The pET expression vector for the monomer protein (pET-sGly) and the dimer (pET-dGly) were constructed. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) plysS by IPTG, analyzed by SDS-PAGE, and then purified by metal (Ni²⁺) chelating affinity chromatography. The immunogenicity was tested by western-blotting and ELISA. Results shows that the monomer protein sGly was mainly expressed as soluble protein, while the dimer protein dGly as inclusion bodies. Purified protein sGly and dGly both have good immunogenicity, and sGly is better. The prokaryotic expression vectors for the monomer protein and dimer of the antigenic epitope of Gly m Bd 30k protein of soybean will make great foundations for developing the monoclonal antibodies and the detection kit of the major allergens of soybean.

Key words: The major allergens of soybean; Gly m Bd 30k; Epitope; Cloning

大豆是人类主要的植物蛋白来源之一, 据报道, 人体所需的蛋白质 80% 来源于植物蛋白, 而其中有 16% 来源于大豆^[1]。然而早在 1934 年 Duke 等就提出大豆蛋白会引起人类的过敏反应^[2], 仅 1983~1986 年期间, 我国就有 184 例由于食物过敏而引起的变态反应性疾病, 其中大豆过敏者占 25.5%^[3]。大豆过敏原引起的过敏反应能造成肠道损伤, 胃部不适或过敏性皮炎等, 甚至会引起过敏性休克, 进而威胁生命安全^[4]。Ogawa T 等用免

疫印迹技术, 发现了存在于 7S 球蛋白组分中的 3 种主要过敏原: Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 60K^[5]。

Gly m Bd 30K 也称为 P34, 属于半胱氨酸蛋白酶木瓜蛋白酶超家族的一个边缘成员。日本的科学家对于大豆过敏原蛋白的研究比较深入, Bando 研究发现大豆 Gly m Bd 30K 蛋白是一种能够引起过敏反应的糖蛋白, 是大豆蛋白中主要的抗原成分^[6]。Hosoyama 等已于 1996 年分析出大豆 P34 的

收稿日期: 2009-11-04

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2003A3080502); 深港创新圈计划资助项目 (200701)。

第一作者简介: 林苏霞 (1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为食物过敏原的分子生物学。E-mail: 525yunyi@163.com。

通讯作者: 刘志刚, 教授, 博士生导师。E-mail: lzg@szu.edu.cn。

2 个重要抗原表位区 F5 (DKVTIDGYETLIMSDEST) 和 H6 (QGCGRGWAFSATGAIEA), 并制备了相应的单克隆抗体^[7]。2000 年, Babiker 等用 pET-22b 构建出大豆 P34 全长基因的原核表达载体, 并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中得到大量表达, 获得了具有与天然大豆 P34 蛋白相似的免疫原性^[8]。而目前, 国内对大豆过敏原的研究非常少, 因此, 在国内筛选出大豆主要过敏原单克隆抗体具有十分重要的应用价值。郭玉兰等的研究表明 Gly m Bd 30K 的全蛋白不表达, 天然纯化技术难^[9], 从而难以得到 Gly m Bd 30K。因此, 借鉴已有资料克隆出其中一段抗原表位区, 以用于其单克隆抗体的制备。

该研究通过查阅文献结合生物信息学方法选取得到大豆过敏原 Gly m Bd 30K 的主要抗原表位区, 构建该区段及其二聚体的原核表达载体, 得到了具有免疫学活性的高表达大豆抗原表位蛋白, 为研制大豆主要过敏原单克隆抗体和用于大豆主要过敏原检测的试剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株及质粒 含 Gly m Bd 30k 的全长基因的载体 (GenBank LOCUS: EU883600)^[7], 原核表达质粒 pET 载体, 表达菌株 BL21 (DE3) plysS, 这些均由该实验室构建和保存, pMD18-T 载体购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 工具酶和试剂 DNA 限制内切酶 *Xba* I、*Bam* H I、*Hind* III、T4 DNA ligase、DL2000 DNA Marker 和 rTaq DNA Polymerase 均购自 TaKaRa 公司, Pfu DNA Polymerase、蛋白 Marker 是 Fermentas 公司的产品, 质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒为美国 OMEGA 公司产品。硝酸纤维素膜购于美国 PALL 公司。吐温-20、anti-IgG-HRP、链酶亲和素-HRP、TMB 是 Sigma 公司产品。鼠抗大豆蛋白多克隆抗体由该实验室制备^[13]。其它试剂为分析纯产品。

1.2 试验方法

1.2.1 抗原表位分析 参照文献^[7], 并根据现有关于大豆主要过敏原 Gly m Bd 30k 蛋白抗原表位的研究, 选取此蛋白中的一段作为目标基因, 此段应具有确切的抗原表位。然后利用 DNASTar Lasergene® V 7.0 生物学软件 (<http://www.dnastar.com/products/lasergene.php>) 分析该段蛋白的抗原性指数, 用以评估此段蛋白的抗原表位的活性。

1.2.2 抗原表位区基因的 PCR 扩增与其 T 克隆 根据目标基因设计 1 对引物 Glym F1: 5' AGGTG-TAGATCTGGCGGCGGTGTCATCACCCAAGTA3'; Glym R1: 5' TCACACAAGCTTAGCCTGCGGATCCGC-

CGCCGCTTAAGAACGCTTGCTC3', 以 Gly m Bd 30k 全长基因载体为模板通过 PCR 方法扩增得到其抗原表位区基因, 单体基因命名为 *sGly* 基因, 二聚体基因命名为 *dGly* 基因。用 Pfu DNA Polymerase 进行 PCR, 程序设定为: 94℃ 变性 4 min 后, 94℃ 30 s, 55℃ 15 s, 72℃ 60 s 条件下进行 25 个循环后再 72℃ 10 min。进行 1% 琼脂糖电泳分析。用 PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物。然后用 rTaq DNA Polymerase, 加入 dATP, 于 72℃ 20 min, 使 PCR 产物两端加 A, 可用于 T 克隆。首先得出 pMD18-T-sGly 载体, 送上海生工测序验证序列。

1.2.3 pET-sGly 和 pET-dGly 原核表达载体的构建

对于单体表达载体的构建, 将 pET 质粒载体 (如图 1) 用 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切, pMD18-T-sGly 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切, *Bam* H I 和 *Bgl* II 为同尾酶, 把回收酶切的质粒及 *sGly* 基因于 16℃ 过夜连接, 重组载体用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 正确的重组质粒为 pET-sGly。对于二聚体表达载体的构建, 先将 pET-sGly 用 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切, pMD18-T-sGly 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切, 同上将回收酶切的质粒与 *sGly* 基因连接, 用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定重组载体, 正确的重组质粒为 pET-dGly。最后送往上海生工测序验证。

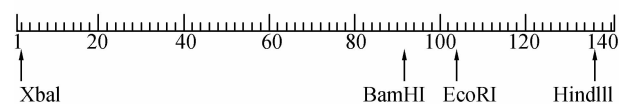


图 1 原核表达质粒 pET 载体的多克隆位点

Fig. 1 Multiple clone site of prokaryotic expression pET vector

1.2.4 pET-sGly 和 pET-dGly 的表达与纯化 将构建成功的原核表达载体 pET-sGly 和 pET-dGly 转化到 BL21 (DE3) plysS 宿主菌中, 经 37℃ IPTG 诱导 4 h 后, 离心收集表达菌菌体, 用 PBS 洗涤后, 冰浴超声破碎菌体, 分别取诱导前和诱导后菌体、用超声破碎后的上清和沉淀各加入上样缓冲液, 经 15% SDS-PAGE 分析。

sGly 蛋白上清液可直接用亲和层析柱纯化, 分别用 20、60、100、150、200、300 mmol · L⁻¹ 梯度咪唑洗脱, 收集各个梯度洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。*dGly* 包涵体蛋白经 1% Triton x-100、2 mol · L⁻¹ 尿素洗涤后用 8 mol · L⁻¹ 尿素溶解, 然后用亲和层析柱纯化, 采用梯度透析法复性^[10]。最后用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.5 Western Blotting 将纯化得到的蛋白 *sGly* 和 *dGly* 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转到硝酸纤维

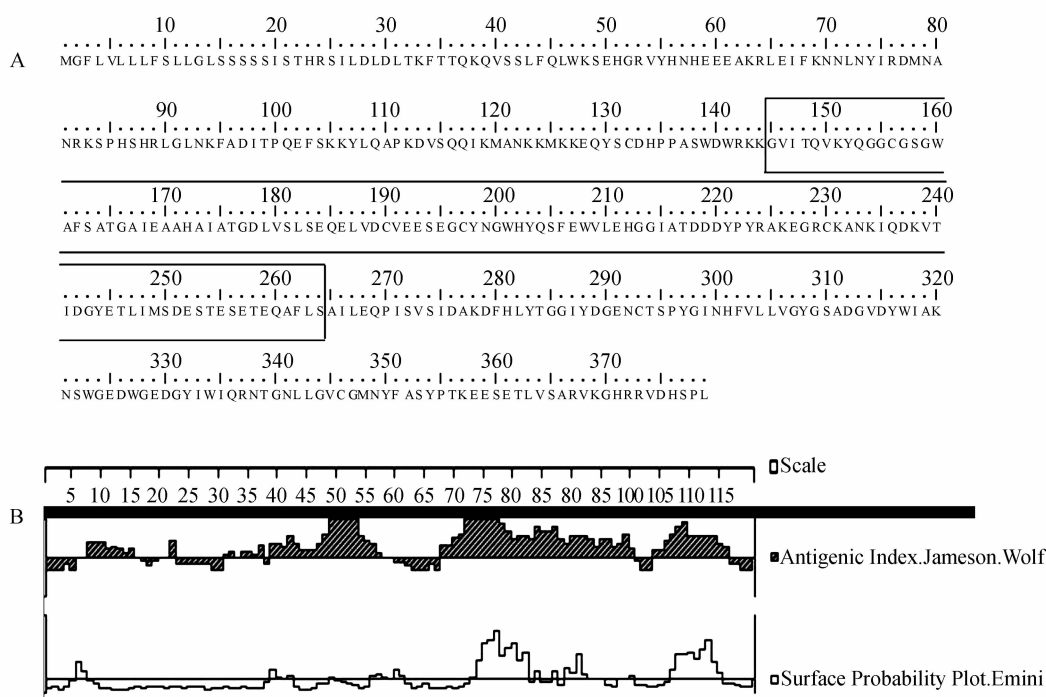
素膜上,用 2% BSA 封闭过夜,用纯化后的鼠抗大豆蛋白多克隆抗体 IgG 为一抗,以免疫前小鼠血清为阴性对照,用标记生物素的羊抗鼠 IgG 为二抗,最后用 DAB 显色。

1.2.6 用 ELISA 检测抗原的免疫学原性 用碳酸盐缓冲液(pH 9.0)分别稀释纯化后的 sGly 蛋白和 dGly 蛋白,酶联板包被 1 μ g 重组蛋白,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS-T 洗板 3 次,每孔加封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 2 h,以鼠抗大豆蛋白多克隆抗体 IgG 为一抗,稀释 1:500,以免疫前小鼠血清为阴性对照,稀释 1:500,每孔加样 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBS-T 洗板 3 次,每孔加 100 μ L HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:2000 稀释),37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBS-T 洗板后,用 TMB 显色。测定 A450 值。

2 结果与分析

2.1 序列比较以及抗原表位区的筛选及基因的 PCR 扩增

根据文献[7]得知 Hosoyama 等通过单抗与合成肽相互作用方法筛选得到的大豆主要过敏原 Gly m Bd 30k 蛋白中的 QGCGRGWAFSATGAIEA 和 DKVTIDGYETLIMSDEST 这 2 段多肽为此蛋白的 IgG 抗原表位。选取含有这 2 段多肽的抗原表位区基因(氨基酸序列范围:144-264)(图 2 A),结合生物信息学软件预测分析,结果表明,通过预测抗原指数和表位可能性表明此抗原表位区有良好的抗原表位活性(图 2 B)。



A. 大豆主要过敏原 Glym Bd 30K 蛋白抗原表位区的选取;B. 抗原表位免疫原性的预测分析

A. Selecting the antigenic epitope of Gly m Bd 30k protein of soybean; B. predicting analysis of its immunogenicity

图 2 大豆主要过敏原 Glym Bd 30K 蛋白抗原表位区的选取及其抗原表位活性的预测分析

Fig.2 Selecting the antigenic epitope of Gly m Bd 30k protein of soybean and predicting analysis of its immunogenicity

根据设计的特异性引物进行 PCR 扩增目的片段。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,结果如图 3 所示,在 450bp 左右位置有一明亮条带,大小与预期结果一致。

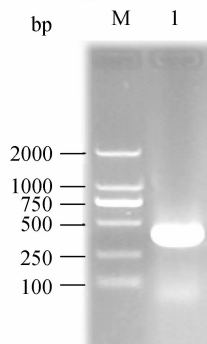
2.2 pET-sGly 和 pET-dGly 原核表达载体的构建

对阳性克隆进行 Xba I 和 Hind III 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析(图 4)。插入的单体的 sGly 基因片段大小约为 450bp,插入的二聚体的 dGly 基因片段大小约为 800bp,结果均同预期大小相一致。阳性克隆的 DNA 序列测定结果显示,pET-sGly 和

pET-dGly 插入的片段均是正确的。表明这 2 个表达载体均构建成功。所构建的重组表达载体包括大豆 Gly m Bd 30K 抗原表位区单体的 sGly (pET-sGly) 和其二聚体的 dGly (pET-dGly)。

2.3 pET-sGly 和 pET-dGly 蛋白表达及纯化

分别将含有 pET-sGly 和 pET-dGly 的表达菌株 BL21 (DE3)plys 经浓度为 1 mmol \cdot L $^{-1}$ 的 IPTG 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h,再将诱导前菌体、诱导后菌体、以及超声破菌后的上清和沉淀分别进行 15% SDS-PAGE 电泳,结果显示,sGly 为可溶性表达(图 5),而 dGly

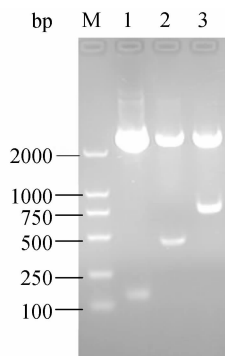


M: DNA Marker; 1: 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 抗原表位区基因

M: DNA Marker; 1: PCR Product of the antigenic epitope of Gly m Bd 30k protein of soybean

图3 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白抗原表位区基因的 PCR 产物电泳图

Fig.3 PCR Product of the antigenic epitope of Gly m Bd 30k protein of soybean



M:DNA Markers; 1:pET;2: pET-sGly; 3: pET-dGly

图4 原核表达载体 pET-sGly 和 pET-dGly 的 Xba I 和 Hind III 双酶切鉴定

Fig.4 Identification of recombinant pET-sGly and pET-dGly by double digests with Xba I 和 Hind III

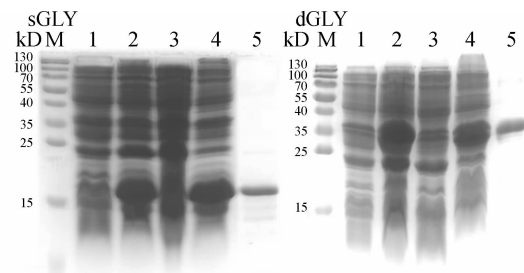
以包涵体形式表达(图5),亲和层析柱纯化的蛋白在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 洗脱效果最好。

2.4 纯化后 sGly 和 dGly 的免疫原性鉴定

Western-blotting 结果(图6)表明纯化后的 sGly 和 dGly 蛋白均能与鼠抗大豆蛋白多克隆抗体 IgG 相互作用,都具有良好的免疫原性。ELISA 活性检测结果(图7)表明以可溶性表达的 sGly 蛋白比以包涵体表达的 dGly 蛋白在天然条件下具有更高的抗原表位活性。

3 讨论

过敏性疾病是目前世界上最常见的慢性疾病之一,这类疾病与遗传和环境密切相关,近年来其发病率持续增长。而其中大豆是目前公认的八类食物过敏原之一。大豆过敏原引起的过敏反应能造成肠道损伤,胃部不适或过敏性皮炎等,甚至会引起过敏性休克,进而威胁生命安全^[11]。目前,控

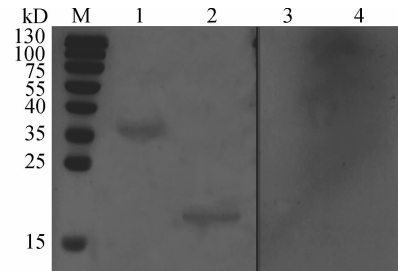


M:蛋白分子量标记;1:诱导前菌体;2:诱导后菌体;sGLY3、dGLY4:诱导后破碎菌体的沉淀;sGLY4、dGLY3:诱导后破碎菌体的上清;5:纯化产物

M:Protein Marker;1: *E. coli* Bl21 (DE3) pLysS /pET-sGly before induction; 2:*E. coli* Bl21 (DE3) pLysS /pET-sGly after induction; sGLY3,dGLY4: Precipitation after ultrasonic treatment; sGLY4,dGLY3: Supernatant after ultrasonic treatment; 5: purified recombinant protein with affinity chromatography

图5 大豆 Gly m Bd 30K 抗原表位区 sGly 和 dGly 蛋白的诱导表达与纯化

Fig.5 Expression and purification of protein sGly and dGly of the antigenic epitope of Gly m Bd 30K

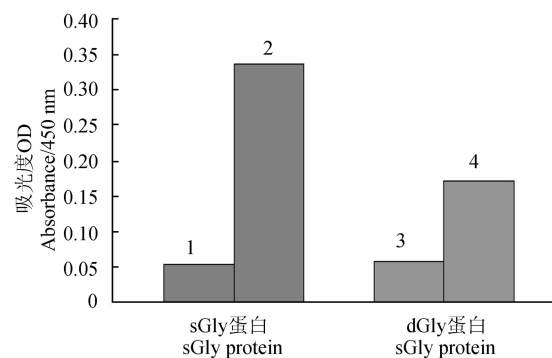


M:蛋白质标志物;1,3: 重组 sGly 蛋白;2,4: 重组 dGly 蛋白;1,2: 用鼠抗大豆蛋白多克隆抗体 IgG 反应;3,4:用正常鼠的免疫前血清反应

M: Protein marker; 1,3:Recombinant protein of sGly;2,4: Recombinant protein of dGly;1,2: IgG reaction by rat-anti-soybean protein polyclonal antibody; 3,4: Reaction by preimmune sera of normal rat

图6 纯化后的重组 sGly 蛋白和 dGly 蛋白的 Western blotting 分析

Fig.6 Immunogenic analysis of purified recombinant protein sGly and dGly by Western blotting analyse



1,3: 正常鼠的免疫前血清;2,4: 鼠抗大豆蛋白多克隆抗体 IgG
1,3: preimmune sera of normal rat; 2,4: rat-anti-soybean protein polyclonal antibody IgG

图7 纯化的重组 sGly 蛋白和 dGly 蛋白的 ELISA 活性检测分析

Fig.7 Immunogenic analysis of purified recombinant protein sGly and dGly by ELISA

制食物源性的过敏性疾病的研究主要是预防和治,而对于大豆过敏性疾病的治疗方面,国内外尚没有有效的根治手段,因此预防该过敏性疾病的发生显得尤其重要。预先检测食物中是否含有大豆过敏原,这对于避免致敏性消费者误食食品中大豆过敏原而导致过敏反应具有重要的意义。另一方面,国外近年来都重视规范食品中过敏原标识,2006年,美国FDA就开始实施新的食品过敏原标识和消费者保护法规^[12],食品中过敏原成分的检测在各个国家的食品进出口贸易中越来越受到重视,而有关食品中大豆的过敏原成分的检测在国际上才刚刚起步。因此,研制具有自主知识产权的特异性强、灵敏度高的大豆过敏原检测试剂盒具有重要的现实意义。

检测大豆过敏原的方法主要有2种:基于蛋白质的检测方法和基于基因的检测方法。基于蛋白质的检测方法就是要利用相应的抗体来检测食品中大豆过敏原情况,目标蛋白质可以是总蛋白也可以是特定的过敏原组分。近来,陈家杰等报道了利用抗大豆总蛋白的多克隆抗体检测食物中大豆过敏原情况,但因多克隆抗体特异性不高,其检测方法容易导致假阳性,从而亟需研制基于抗大豆主要过敏原单克隆抗体的检测试剂^[13],而该试剂则需要制备相应的单克隆抗体。

目前,国内对大豆主要过敏原单克隆抗体的相关研究报道比较少,2008年,游金明等^[14]选取了对应于 β -conglycinin分子 α' 亚基上的一段抗原表位肽(RPQHPER, 78-84 α')作为半抗原,人工合成后与载体蛋白(OVA)交联,以此作为免疫原制备了致仔猪过敏性大豆抗原蛋白 β -conglycinin的单克隆抗体(Mab 6G4),但是对人类大豆过敏原单克隆抗体的制备国内还没有报道。制备单克隆抗体的前提需要得到具有天然活性的大豆主要过敏原蛋白。虽然Babiker等已经成功利用原核表达系统表达出大豆主要过敏原Gly m Bd 30K蛋白^[8],但郭玉兰等发现原核表达系统难以表达Gly m Bd 30K蛋白,表明获得具有天然活性的大豆主要过敏原Gly m Bd 30K蛋白具有一定的技术难度。该研究通过查阅相关文献和生物信息学综合分析选取的大豆抗原Gly m Bd 30K的抗原表位区作为研究对象,成功构建了其单体和二聚体的原核表达载体pET-sGly和pET-dGly,并在BL21(DE3)plysS中得到了成功的表达和纯化。免疫印迹结果显示,重组的sGly和dGly蛋白均能与抗大豆蛋白的血清抗体有阳性反应,具有良好的免疫原性。ELISA活性检测结果显示,该表位区的单体sGly蛋白与二聚体dGly蛋白相比具有更好的免疫学活性。导致这一结果的主要原因是可溶性表达的单体sGly蛋白具有正确的折叠和构象,包涵体表达的二聚体dGly蛋

白复性效果不好,其活性受到了一定的影响。单体sGly蛋白具有大豆主要过敏原的抗原表位,有良好的活性。

参考文献

- [1] 郑云兰,李霞辉.大豆营养分析技术[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1991:190. (Zheng Y L, Li X H. Soybean nutritional analysis[M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1991: 190.)
- [2] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy[J]. Journal of Allergy, 1934, 5:300-302.
- [3] 李钢,丁淑霞,左容,等.食物过敏引起变态反应疾病184例临床分析[J].佳木斯医学院学报,1989,12(3):269. (Li G, Ding S X, Zuo R, et al. Food allergies cause allergic disease clinical analysis of 184 cases[J]. Jiamusi Medical College, 1989, 12(3): 269.)
- [4] 徐上浩.进食豆浆引起过敏性休克1例报告[J].海军医学,1992,10(2):185. (Xu S H. A report of Anaphylactic shock caused by the consumption of soy milk[J]. Naval Medical, 1992, 10(2):185.)
- [5] 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.
- [6] 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 and Biochemistry, 1996, 60(2):347-348.
- [7] Hosoyama H, Obata A, Bando N, et al. Epitope analysis of soybean major allergen Gly m Bd 30K recognized by the mouse monoclonal antibody using overlapping peptides[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(7):1181-1182.
- [8] Babiker E E, Azakami H, Ogawa T, et al. Immunological characterization of recombinant soy protein allergen produced by Escherichia coli expression system[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2):571-575.
- [9] 郭玉兰,刘志刚.大豆主要过敏原Gly m Bd 30K基因的克隆及其原核表达载体的构建[J].大豆科学,2009,28(1):11-15. (Wu Y L, Liu Z G. Cloning and prokaryotic expression vector construction of Gly m Bd 30K gene from soybean (*Glycine max*) [J]. Soybean Science, 2009, 28(1):11-15.)
- [10] 王莉,刘道杰,李连之.亲和层析在蛋白质研究中的应用进展[J].理化检验(化学分册),2007,43(6):515-517. (Wang L, Liu D J, Li L Z. Advances of application of affinity chromatography to research on protein[J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part B: Chemical Analysis), 2007, 43(6):515-517.)
- [11] Dean D M, Hugh A S, Ronald A S. Food Allergy: Adverse reactions to foods and food additives[M]. (Second Edition) USA Blackwell Scienceinc, 1997:53-67.
- [12] 周淑红.国外关于食品过敏标签的现状启示[J].世界农业,2007(6):67-68. (Zhou S H. The apocalypse and status on food allergy labels in abroad[J]. World Agriculture, 2007(6): 67-68.)
- [13] 陈家杰,朱海,叶卫翔,等.双抗体夹心ELISA法测定食物中大豆过敏原蛋白成分[J].食品研究与开发,2009,30(5):105-109. (Chen J J, Zhu H, Ye W X, et al. Detection of soybean allergen protein trace in food products by sandwich-antibody enzyme linked immunosorbent assay[J]. Food Research and Development, 2009,30(5):105-109.)
- [14] 游金明,王自蕊,谯仕彦,等.致仔猪过敏性大豆抗原蛋白 β -conglycinin单克隆抗体的制备与鉴定[J].中国畜牧杂志,2008,44(17):46-49. (You J M, Wang Z R, Qiao S Y, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against soybean β -conglycinin, a hypersensitive allergen to piglets[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(17):46-49.)