

花生过敏原 Ara h 2.02 原核表达方法条件的研究

Studies on prokaryotic expression conditions of peanut allergen Ara h 2.02

蔡 琴 张 文 举 陈 沁

CAI Qin ZHANG Wen-ju CHEN Qin

(上海大学生命科学学院, 上海 200444)

(School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

摘要:将重组质粒 pET-32a(+)-Ara h 2.02 转化表达宿主菌 Rosetta(DE3) 中,经 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳分析,结果显示表达的蛋白大小约为 38 kDa。进一步用通用 His 标签抗体进行 Western Blotting 检测,结果表明成功克隆表达了花生过敏原 Ara h 2.02。为获得较多的重组蛋白 Ara h 2.02,分别对 IPTG 浓度、摇床转速、诱导温度和时间等条件进行选择,确定最佳条件为:IPTG 浓度 0.3 mmol/L,摇床转速 220 r/min,诱导温度 37 °C,诱导时间 2 h。

关键词:花生;过敏原;重组蛋白;Ara h 2.02;原核表达

Abstract:The recombinant protein was induced by transforming recombinant plasmid pET-32a(+)-Ara h 2.02 into Rosetta (DE3), and identified by SDS-PAGE and Western Blotting. The results showed that the molecule weight of His-Ara h 2.02 fusion protein was about 38 kDa. At the same time, effect of IPTG concentration, shaking speed, induced temperature and time on the production of soluble recombinant protein were determined. The best conditions were as followed, the IPTG concentration was 0.3 mmol/L, the shaking speed was 220 r/min, the induction temperature was 37 °C and the induction time was two hours, respectively.

Keywords:peanut; allergen; recombinant protein; Ara h 2.02; prokaryotic expression

花生是一种重要的常见食物过敏原,是世界粮农组织(FAO)报告的八大过敏食物之一,过敏反应具有长期性、普遍性,甚至威胁生命,故引起了全球的广泛关注^[1-4]。目前国际免疫联合会命名小组委员会认可的花生过敏原有 Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、Ara h 4、Ara h 5、Ara h 6、Ara h 7、Ara h 8、Ara h 9、Ara h 10、Ara h 11^[5],其中 Ara h 2 是主要的花生过敏原之一,超过 90% 的花生过敏患者的血清 IgE 能识别 Ara h 2^[6,7]。Ara h 2 属于 2S 白蛋白家族,是分子量为 17~

20 kDa 的同种异型蛋白,约占花生蛋白总量的 10%^[8-10]。目前已经证明 Ara h 2 包含 Ara h 2.01 和 Ara h 2.02 两个亚型,与过敏原 Ara h 2.01 相比,Ara h 2.02 多 1 个 IgE 结合表位,其致敏性可能更严重^[6,11]。

Ara h 2 蛋白在结构上有由 8 个半胱氨酸残基构成的 4 个二硫键,同时还有胰蛋白酶抑制性,耐酸性环境和胃肠道消化以及耐一定程度的热处理等性质^[12-15]。研究^[16,17]表明,花生过敏原主要由蛋白质组成,热处理可能会引起蛋白质结构的改变,这种改变可能会影响花生的过敏性。但对于花生过敏原 Ara h 2,热处理对其免疫结合特性以及致敏性的研究结果却并不一致。胡纯秋等^[18]研究发现 Ara h 2 经过 115 °C 的热处理后,其抗原性下降了 85.56%;Vissers 等^[19]的研究也发现,在含水的条件下热处理 Ara h 2,其 IgE 结合能力和致敏性都是降低的。但重组 Ara h 2 蛋白在 100 °C 加热 90 min 后,其 IgE 结合能力有小幅提高,而这种提高在有糖类存在的情况下更加明显^[20];从焙烤(140 °C)的花生中提取的内源 Ara h 2,其 IgE 结合能力也有增强^[21]。但是目前关于热处理后,Ara h 2 蛋白的结构是否会变化,结构的改变是否会影响相关抗原表位,还有对致敏性变化分子机理的研究尚未见报道。要解决上述问题,大量的 Ara h 2 重组蛋白是必需的。鉴于此,本研究拟通过改变原核表达的条件以获得大量的 Ara h 2 重组蛋白,为研究其致敏机理提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

花生:上海市的大型超市;

宽范围彩色预染蛋白质 Marker、Anti-His Antibody 及羊抗鼠 IgG-HRP;天根生化科技(北京)有限公司;

氨基青霉素及 IPTG;生工生物工程(上海)股份有限公司;

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31201306)

作者简介:蔡琴(1990—),女,上海大学在读硕士研究生。

E-mail:caiqin08123310@163.com

通讯作者:陈沁

收稿日期:2014-07-24

Rosetta(DE3);上海迈其生物科技有限公司;

PVDF膜(0.45 μ M);美国 Millipore 公司;

BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒);上海碧云天生物技术有限公司;

pET-32a(+)-表达载体:上海市能源作物育种及应用重点实验室提供。

1.1.2 主要仪器

基础型电源:Powerpac Basic 型,美国 Bio-rad 公司;

垂直电泳槽:VE-180 型,上海天能科技有限公司;

小型转印槽:Mini Trans-Blot® Cell 型,美国 Bio-rad 公司;

化学发光成像系统:ChemiDoc XRS 型,美国 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 Ara h 2.02 基因的诱导表达及检测 将鉴定为阳性的重组质粒和空载 pET-32a(+) 分别转化到表达宿主菌 Rosetta(DE3)中,通过含氨基青霉素的 LB 平板筛选,挑取阳性克隆,将验证为阳性克隆的菌落于 2 mL 含氨基的培养基中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 过夜培养。次日将上述培养液倒入 100 mL 灭菌的新鲜的培养基中进行二活培养,后测菌液的 OD 值,待 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.5 时,取 1 mL 菌液作为诱导前的对照,重组质粒加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)在 37 $^{\circ}$ C,200 r/min 诱导 2 h,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体,用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次,再用 PBS 缓冲液溶解;上样量 150 ng (5 \times 上样缓冲液、0.1 M DTT),100 $^{\circ}$ C 水浴煮 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.2 Western Blotting 检测 将经 SDS-PAGE 电泳的产物,电转至 PVDF 膜上,条件为:恒流 300 mA,2 h;将膜取出,用 TBST 缓冲液洗涤 1 次(洗涤 10 min);用 5% 的脱脂乳封闭液室温封闭 1 h;加入 1:2 000 稀释的 His 标签抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜;用封闭液洗涤 3 次,每次洗涤 10 min;加入 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 二抗,室温孵育 1 h;用 TBST 洗涤 3 次,每次洗涤 10 min;最后加入 BeyoECL Plus 显色液,用 Bio-rad ChemiDoc XRS 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 IPTG 浓度对重组蛋白表达的影响 加入终浓度分别为 0.3,0.6,0.9,1.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,诱导表达条件为 37 $^{\circ}$ C,200 r/min 和 2 h,具体诱导表达过程同 1.2.1。SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 检测选择最佳 IPTG 使用浓度。

1.2.4 转速对重组蛋白表达的影响 使用 1.2.3 选择的最佳浓度 IPTG 浓度,分别在 220,190,160 r/min 的转速下诱导表达蛋白,其余同 1.2.3。

1.2.5 温度对重组蛋白表达的影响 使用 1.2.3 选择的最佳 IPTG 浓度和 1.2.4 选择的最佳转速,分别采用 37,30,25,20,16 $^{\circ}$ C 5 个诱导表达温度,诱导表达蛋白,具体过程和检测同上。

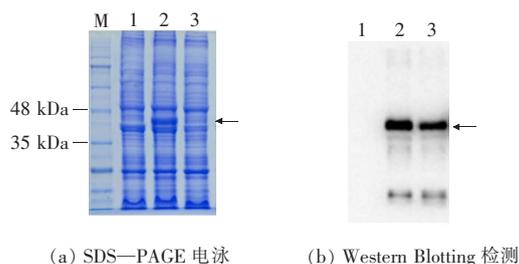
1.2.6 时间对重组蛋白表达的影响 选择最佳 IPTG 浓度、最佳转速和最佳温度分别诱导表达 2,4,6,8,12 h 后用 SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 检测选择最佳诱导时间。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的表达

含有重组质粒 pET-32a(+)-Ara h 2.02 的 Rosetta (DE3)表达菌在 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 2 h 后,超声破碎,分别对诱导前、诱导后全菌、超声后上清液进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 1(a)。在约 38 kDa 处有明显的蛋白条带,而未经诱导的阳性菌在此位置未见目的蛋白。

将 SDS-PAGE 电泳后的胶进行转膜,用通用 His 标签抗体进行 Western Blotting 检测,结果见图 1(b)。由图 1(b)可以看出,在目的蛋白处有明显的特异性印迹,进一步证明成功诱导出目的蛋白。



(a) SDS-PAGE 电泳 (b) Western Blotting 检测
M. 标准蛋白 1. 对照 2. 诱导后全菌 3. 超声破菌上清

图 1 Ara h 2.02 基因的诱导表达及 Western Blotting 检测

Figure 1 Expression of Ara h 2.02 and Western Blotting analysis

2.2 IPTG 浓度对重组蛋白表达的影响

采用终浓度分别为 0.3,0.6,0.9,1.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,取表达后的全菌和上清进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 2(a)和(b)。由图 2(a)和(b)可知,当 IPTG 浓度在 0.3~1.2 mmol/L 时,全菌中都能看到明显的 38 kDa 的目的蛋白条带,且不同 IPTG 浓度下蛋白的表达量差别不大,上清中的蛋白表达情况与此类似;进一步通过 Western Blotting 检测上清中的蛋白的表达情况,结果见图 2(c)。由图 2(c)可知,IPTG 浓度对蛋白的表达影响不大,与 SDS-PAGE 结果吻合,故选用 0.3 mmol/L 的 IPTG 浓度。

2.3 转速对重组蛋白表达的影响

将含有 0.3 mmol/L 的 IPTG 菌液置于 37 $^{\circ}$ C 摇床,分别设置 3 个不同的摇床转速(220,190,160 r/min)诱导表达蛋白 2 h,检测结果见图 3。由图 3(a)可知,随着转速的降低,全菌中目的蛋白的量基本不变,而上清中目的蛋白条带不明显,肉眼无法观察。进一步通过 Western Blotting 检测比较不同转速上清中的蛋白的表达量,结果见图 3(b)。由图 3(b)可知,转速为 220 r/min 时,上清中的表达量较高,转速为 190,160 r/min 时蛋白量基本相同,因此,选择 220 r/min 的摇床转速用于后续试验。

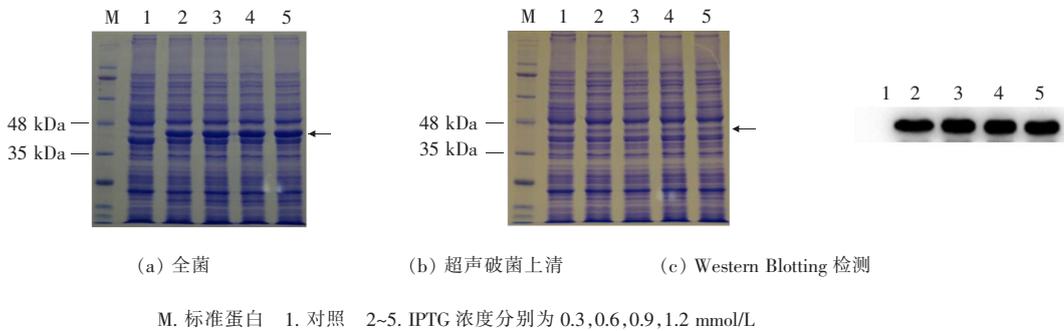
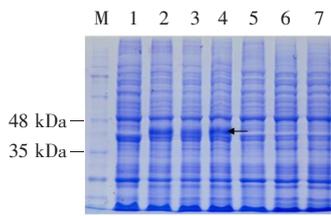


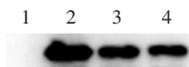
图 2 IPTG 浓度对重组蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of different concentration of IPTG on the expression of Ara h 2.02



M. 标准蛋白 1. 对照 2~4. 为全菌, 转速分别为 220, 190, 160 r/min
5~7. 为超声破菌上清, 转速分别为 220, 190, 160 r/min

(a) SDS—PAGE 电泳

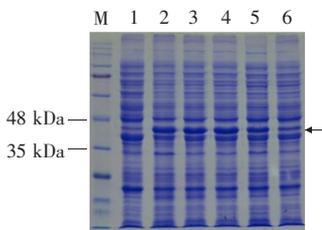


1. 对照 2~4. 为超声破菌上清, 转速分别为 220, 190, 160 r/min

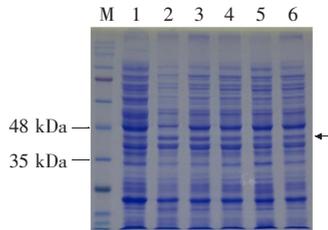
(b) Western Blotting 检测

图 3 转速对重组蛋白表达的影响

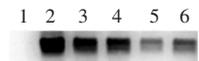
Figure 3 Effect of different shaking speed on the expression of Ara h 2.02



(a) 全菌



(b) 超声破菌上清



(c) Western Blotting 检测

M. 标准蛋白 1. 对照 2~6. 诱导温度分别为 37, 30, 25, 20, 16 °C

图 4 温度对重组蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of different temperature on the expression of Ara h 2.02

3 讨论

诱导条件对于重组蛋白的可溶性表达具有重要的作用。一般情况下, 高浓度的 IPTG、高的摇床转速和诱导温度有利于蛋白表达量的提高, 但同时也会由于表达过快导致形成包涵体, 反之, 若 IPTG 浓度较低、摇床转速和诱导温度均较低

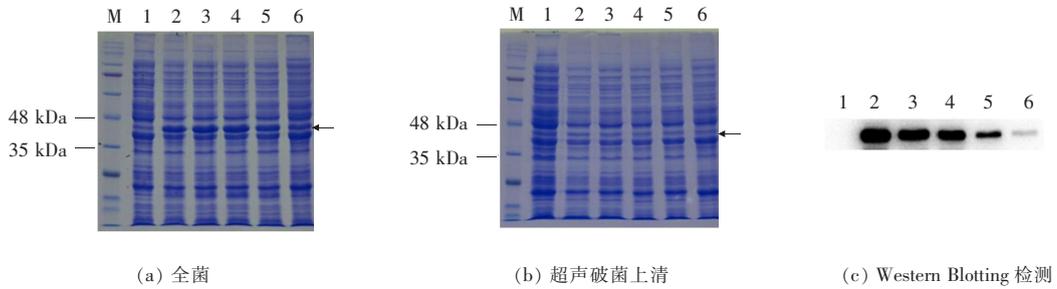
2.4 温度对重组蛋白表达的影响

选取 0.3 mmol/L 的 IPTG, 将菌液置于 37, 30, 25, 20, 16 °C 下, 设置摇床转速为 220 r/min 诱导表达蛋白 2 h, 结果见图 4。由图 4(a) 可知, 当诱导温度分别为 37, 30, 25 °C 时, 全菌中的目的蛋白量较高且量基本相同, 低温 (20, 16 °C) 时, 蛋白量逐渐降低; 上清中目的蛋白条带几乎不可见, 无法进行比较; 进一步的 Western Blotting 检测分析结果见图 4(c)。由图 4(c) 可以看出, 随着诱导温度的降低, 上清中的蛋白表达量逐渐下降, 因此, 选择 37 °C 作为后续表达的温度。

2.5 诱导时间对重组蛋白表达的影响

菌液中添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 摇床转速为 200 r/min, 在 37 °C 分别诱导 2, 4, 6, 8, 12 h, 结果见图 5。由图 5(a) 可知, 当诱导时间分别为 2, 4, 6 h 时, 全菌中目的蛋白量较高且蛋白含量基本相同, 随着时间的延长, 目的蛋白的表达量逐渐降低; 而上清中目的蛋白条带的变化不明显, 进一步用 Western Blotting 检测, 结果见图 5(c)。由图 5(c) 可以看出, 随着诱导时间的延长, 上清中目的蛋白的表达量依次递减, 故选择 2 h 作为最佳的表达时间。

时, 可能更利于可溶性的蛋白表达, 但可能会导致蛋白的表达效率降低, 因此找到一个合适的平衡点是关键^[22]。在影响蛋白表达的诸多条件中, 首先应该考虑 IPTG 的使用量, 分子克隆手册提供的常规用量 1 mmol/L IPTG 通常是过量的, 而过量的 IPTG 会加重蛋白表达系统的负载, 不利于菌



M. 标准蛋白 1. 对照 2-6. 诱导时间分别为 2,4,6,8,12 h

图 5 诱导时间对重组蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of different time on the expression of Ara h 2.02

的生长,可能还有一定的毒性^[23]。另外,IPTG 价格相对昂贵,从经济方面考虑在表达效果相似的情况下,IPTG 使用量应尽量低^[24]。由于 IPTG 的作用机制是竞争性地与阻遏蛋白结合,从而开放目标蛋白基因,使其得以转录,如果浓度过低,达不到与阻遏蛋白结合的饱和浓度,从而影响到目标蛋白的表达^[25]。故本研究选择了 0.3 mmol/L 的 IPTG,这与高慎阳等^[26]的研究(0.3~0.5 mmol/L 为最佳 IPTG 诱导浓度)结果是一致的。

摇床转速和诱导温度是蛋白可溶性表达的两个关键因素。转速低一些有利于重组蛋白的可溶性表达但会影响菌体的生长速度,而温度不仅影响菌体的生长,还影响重组质粒的稳定性,融合蛋白表达量、可溶性和稳定性,因此有必要选择一个适当的转速和适宜的温度进行诱导表达^[22,27]。金晶等^[28]在研究 HCMV pp65 截短蛋白原核表达时得到转速和温度越高,目的蛋白表达量越高的结果。本研究的结果与其类似。

确定摇床转速和诱导温度后,诱导时间也是影响蛋白表达量的一个重要因素。研究^[24]表明,在大肠杆菌中重组蛋白诱导表达超过一定程度时,容易出现过多的副产物,影响菌生长。诱导时间的长短是基于摇床转速和诱导温度进行选择的,一般来说,转速和温度较高,则较短的诱导时间即可;低温低转速则需要较长的诱导时间,如吕彤等^[29]采用 18℃,100 r/min 诱导表达烯酮还原酶 12 h。综合考虑蛋白的总表达量和可溶性蛋白的含量,本研究建立了基于 Ara h 2.02 基因,以 pET-32a(+) 为表达载体,Rosetta(DE3) 为表达菌株的原核表达体系。

参考文献

- 1 蔡琴,张文举,陈沁. 含扩增内标的花生过敏原 PCR 检测方法[J]. 食品与机械,2013,29(4):63~66.
- 2 Ratnaparkhe M B, Lee T H, Tan X, et al. Comparative and evolutionary analysis of major peanut allergen gene families[J]. Genome biology and evolution, 2014,6(9): 2 468~2 488.
- 3 Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. J. Allergy Clin Immunol, 2014,133(2):291~307.

- 4 Burks A W. Peanut allergy[J]. Lancet, 2008(371): 1 538~1 546.
- 5 Jin Teng-chuan, Guo Feng, Chen Yu-wei, et al. Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut[J]. Mol Immunol, 2009,46(8/9): 1 796~1 804.
- 6 易海涛,刘志刚,闫浩,等. 花生过敏原 Ara h2. 02 的克隆,表达及免疫学鉴定[J]. 江西师范大学学报(自然科学版),2010,34(5):531~535.
- 7 Mueller G A, Gosavi R A, Pomés A, et al. Ara h 2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity[J]. Allergy, 2011,66(7):878~885.
- 8 胡纯秋,高金燕,罗春萍,等. 重组花生过敏原 Ara h 2 的生物合成[J]. 食品科学,2010,31(15):203~207.
- 9 Palmer G W, Dibbern D A Jr, Burks A W, et al. Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity[J]. Clin Immunol, 2005,115(3): 302~312.
- 10 Bublin M, Kostadinova M, Radauer C, et al. IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and the nonhomologous allergens Ara h 1 and Ara h 3[J]. J. Allergy Clin Immunol, 2013, 132(1):118~124.
- 11 Li J, Shefcheck K, Callahan J, et al. Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2[J]. Protein Science, 2010,19(1): 174~182.
- 12 邓鹏,王守经,王兆华,等. 花生致敏研究进展[J]. 中国食物与营养, 2009(10):13~14.
- 13 蒋姝娟,周正义. 花生致敏蛋白 Ara h1,2,3 的研究进展[J]. 生物医学工程学杂志,2011,27(6): 1 401~1 405.
- 14 Klemans R J B, Broekman H C H P, Knol E F, et al. Ara h 2 is the best predictor for peanut allergy in adults[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2013,1(6): 632~638.
- 15 韩远龙,吴志华,李璞,等. 花生过敏原结构及加工研究进展[J]. 食品科学,2013,34(9): 310~315.
- 16 周雪松,赵谋明. 低过敏性花生制品开发[J]. 粮油食品科技, 2005,13(3): 32~33.

(下转第 156 页)

$$a_2 = -12.370\ 200\ 34$$

$$a_3 = 0.882\ 147\ 307\ 2$$

$$a_4 = 3.920\ 543\ 206 \times 10^4$$

$$a_5 = -79.634\ 319\ 74$$

$$a_6 = -1.265\ 677\ 307 \times 10^{-4}$$

$$a_7 = 9.759\ 785\ 533 \times 10^{-5}$$

所得的三维曲面见图 11。

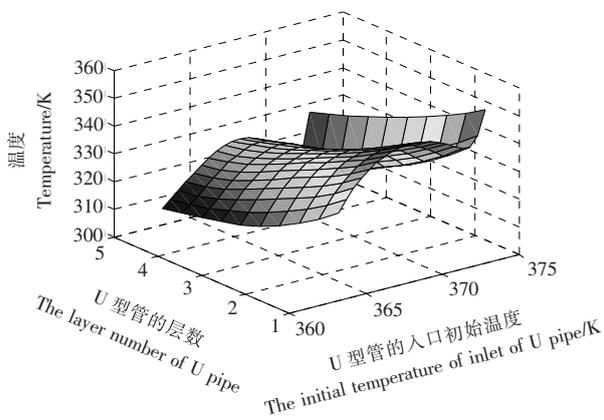


图 11 数值拟合的三维曲面

Figure 11 The 3D surface by Numerical fitting

图 11 反映了 U 型管入口的初始温度、层数以及 U 型管每一层的出口温度三者之间的一个函数关系。在同一初始入口温度的情况下,随着 U 型管层数的增多,每一层的出口温度呈现不断下降的趋势;相同层数的条件下,不同初始入口温度也会导致各个出口的温度各不相同。

3 结论

本试验针对烟熏炉中的 U 型管换热器部分,采用了 fluent 对其中的内流场进行了模拟分析。通过对所获得的仿真

数据进行数值分析,分析建立了烟熏炉内的 U 型管换热器的温度降模型。该模型以 U 型管入口的初始温度以及层数为自变量,方便得到相应层数出口位置处的温度,有利于了解 U 型管换热器的加热规律,大大简化了此类 U 型管换热器的设计过程,可直接被推广到相关企业的设计中。

参考文献

- 王晨,桑芝富. 1/4 椭圆螺旋折流板换热器性能的数值模拟[J]. 过程工程学报,2007,7(3): 425~431.
- 付磊,曾毅林,唐克伦,等. 管壳式换热器壳程流体流动与传热数值模拟[J]. 设计计算,2012,29(5): 36~41.
- 杨明,孟晓风,张卫军. 管壳式换热器的一种优化设计[J]. 北京航空航天大学学报,2009,35(5): 615~617.
- 焦凤,邓先和,孙大力,等. 管束排列及管间距对换热器传热性能的影响[J]. 石油学报,2013,29(5): 836~843.
- 刘延斌,王学生,简林均,等. 新型热交换器壳程流体流动与传热特性[J]. 石油化工设备,2013,42(3): 6~11.
- 张勇,胡京明,李航,等. 基于 CFD 技术的某管式换热器结构改进[J]. 湖南工业大学学报,2012,26(4): 97~100.
- 董金善,潘兵兵,周鹏飞,等. 螺旋板换热器密封端盖结构研究[J]. 食品与机械,2012,28(6): 180~182.
- 陈楠,贺小华,邵虎跃,等. 换热器管板有限元分析模型研究[J]. 食品与机械,2012,28(2): 90~93.
- Wen Jian, Yang Hui-zhu, Wang Si-min, et al. Experimental investigation on performance comparison for shell-and-tube heat exchangers with different baffles[J]. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2015(84): 990~997.
- 张志鹏,宋新南. 单 U 型与双 U 型竖直土壤换热器换热性能的对比[J]. 太阳能学报,2012, 33(7): 1 193~1 198.
- 宋小飞,温治,司俊龙. 地源热泵 U 型管地下换热器的 CFD 数值模拟[J]. 北京科技大学学报,2007,29(3): 329~333.
- Xu Ya-chao, Xue Fu-shan, Luo Mao-ping, et al. Median effective dose oremifentanil for awake laryngoscopy and intubation [J]. Chin Med J. (Engl), 2009,122(13): 1 507~1 512.
- 杨文理,陈守春,陈毅荣. 人自剪切 TRA IL 胞外段融合蛋白表达条件的优化[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(6): 1 237~1 239,1 248.
- Fernández-Castané A, Vine C E, Caminal G, et al. Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by Escherichia coli in fed-batch high cell density cultures[J]. Journal of Biotechnology, 2012,157(3): 391~398.
- 高慎阳,李一经. 猪流行性腹泻病毒重组 M 蛋白膜外区原核表达 IPTG 最佳诱导条件的确定[J]. 中国畜禽种业,2008(7): 75~76.
- Corbanese U, Possamai C. Awake intubation with the Bonfils fibrescope in patients with difficult airway[J]. Eur J. Anaesthesiol, 2009,26(10): 837~841.
- 金晶,蔡亦红,类延花,等. HCMV pp65 截短蛋白原核表达条件优化[J]. 微生物学杂志,2005,25(3): 28~32.
- 吕彤,刘扬,赵青,等. 烯酮还原酶基因的克隆与优化表达[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(1): 87~90.

(上接第 46 页)

- 胡纯秋,高金艳,陈红兵. 花生过敏原在加工中的变化[J]. 食品科学,2006,27(12): 784~788.
- 胡纯秋,高金燕,陈红兵,等. 热加工对花生过敏原 Ara h 2 抗原性及其构象的影响[J]. 光谱学与光谱学分析,2010,30(9): 2 550~2 554.
- Vissers Y M, Blanc F, Skov P S, et al. Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut[J]. PloS one, 2011,6(8): e23 998.
- Gruber P, Becker W M, Hofmann T. Influence of the maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (Arachis hypogaea), its major epitopes, and peanut agglutinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(6): 2 289~2 296.
- Mondoulet L, Paty E, Drumare M F, et al. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53, (11): 4 547~4 553.
- 闫飞. 花生过敏原蛋白 Ara h 1 的纯化表达研究[D]. 南昌:南昌大学,2012.