

苦荞 TBW16 重组表达及靶向结合蛋白的初步分析

陈 姣, 张学宾, 王 磊, 陈 鹏*

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 苦荞 16 kD 过敏蛋白(Tartary buckwheat 16 kD allergen, TBW16)是定位于种子胚中的过敏蛋白,其生物学功能未知。该研究以苦荞种子灌浆期 cDNA 文库中获得苦荞过敏原 TBW16 基因的序列为基础,构建 TBW16 成熟蛋白的原核表达载体 pET47b-TBW16,实现了其在大肠杆菌 BL21 Star(DE3)中的高效表达。结果表明:该过敏原以包涵体的形式表达,经包涵体复性及金属离子螯合层析纯化了目标蛋白;以 1,4 丁二醇二缩水甘油醚环氧基介导的蛋白偶联技术固定化 TBW16 于 Sepharose CL 6B 上,采用亲和层析分离与 TBW16 靶向结合的蛋白, MALDI-TOF 质谱鉴定显示,苦荞 TBW16 过敏原靶向结合蛋白与细菌膜孔蛋白高度同源,该研究结果为分析苦荞 TBW16 生物学功能奠定了基础。

关键词: 苦荞; 16 kD 过敏原; 过敏蛋白; 互作蛋白

中图分类号: Q786

文献标志码: A

Recombinant Expression of TBW16 Allergen in Tartary Buckwheat and Preliminary Analysis of Its Targeting Binding Protein

CHEN Jiao, ZHANG Xuebin, WANG Lei, CHEN Peng*

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Tartary buckwheat 16 kD allergen (TBW16) is located in seed embryo and its biological function is still unknown. Based on the TBW16 sequence obtained from the seed-filling period cDNA library of tartary buckwheat, prokaryotic expression vector pET47b-TBW16 was constructed and TBW16 was successfully overexpressed in *E. coli* BL21 Star(DE3) in form of inclusion bodies. The TBW16 was renatured by dialysis against gradually decreasing urea solution and further purified by cobalt chelating chromatography. TBW16 was then coupled to Sepharose CL 6B activated by 1,4 butyl glycol two glycidyl ether, and the TBW16 interacting protein was obtained by affinity chromatography protocols. Result of MALDI-TOF mass spectrometry showed that the TBW16 interacting protein has high homology to bacteria porin. This result laid the basis for further revealing the biological functions of TBW16 in tartary buckwheat.

Key words: tartary buckwheat; TBW16; allergic protein; interacting protein

荞麦, 蓼科荞麦属双子叶植物, 有甜荞(*Fagopyrum esculentum*)与苦荞(*Fagopyrum tataricum*)

两个种。由于其富含氨基酸均衡的蛋白质及多种黄酮类物质, 因此具有较高的营养及药用价值^[1-2]。如

收稿日期: 2014-01-16; 修改稿收到日期: 2014-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(31171606)

作者简介: 陈 姣(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶方面的研究。E-mail: csy_joyce@hotmail.com

* 通信作者: 陈 鹏, 博士, 教授, 主要从事蛋白质与酶方面的研究。E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

今伴随人们生活方式的巨大改变,糖尿病、心血管疾病的发病率呈逐年上升的趋势,已成为危害人类健康的主要慢性病害,而研究表明荞麦具有明显的降血脂、降血糖和降胆固醇等作用^[3-4]。然而伴随荞麦消费人群和区域的扩大,荞麦过敏的报道日益增多,其引起过敏的比例远高于其他食品。据不完全统计日本儿童过敏的比例高达 0.2%,目前日本已将荞麦列为五大过敏源之一。荞麦过敏主要表现为荨麻疹、血管水肿、胃肠道症状和支气管痉挛哮喘等症状、甚至产生休克而危及生命^[5]。1909 年 Smith 首次报道了关于因摄取少量荞麦粉而引起的过敏反应^[6]。Noma 等首次报道了荞麦过敏致死的病例^[7]。而这些过敏原以蛋白质为主,至今已从甜荞中分离得到 9、16、22~24、34~38 及 69 kD 等不同分子量的过敏蛋白^[8-9],同时作为生物活性物质含量更高的苦荞,已有 16、22、24 和 56 kD 等过敏蛋白得到鉴定^[10-11]。

消除或降低食品原料的过敏活性是食品过敏研究的主攻方向之一^[12-13],研究主要集中在两个方面,一是通过食品加工的途径使过敏蛋白发生变性或者抗原表位发生改变,从而降低食品过敏活性,但有研究显示众多的食品过敏原对食品加工的变性过程不敏感^[14-16];另一种最直接和最经济的降低食品过敏活性的方法是选育和创制低敏种质。通过突变或者基因工程技术消除或抑制过敏蛋白的表达已成为现今选育低敏种质最主要的方法。有些过敏蛋白在生物体内以贮藏蛋白的形式存在,仅发挥储存氮素的功能,然而有些过敏蛋白在植物体内发挥着特定的生理功能,参与特定的生理过程,如有些过敏蛋白属于病程相关蛋白,其参与植物自身对于病原的抗性反应^[17];具有过敏活性的橄榄钙结合蛋白,参与橄榄花粉粒细胞的钙信号转导^[18]。因此明确过敏蛋白的生物学功能是通过突变或者基因工程手段进行低敏种质创制的前提。

苦荞 16 kD 过敏原(Tartary buckwheat 16 kD allergen, TBW16)是定位于种子胚中的主要过敏蛋白,然而 TBW16 过敏蛋白的生物学功能尚未有研究报道,因此为揭示 TBW16 过敏原的生物学功能,本研究通过构建 TBW16 过敏原成熟蛋白的原核表达载体,采用环氧基介导的蛋白偶联技术固定化 TBW16 蛋白,利用亲和层析的方式分离其靶向结合蛋白,以期为深入研究 TBW16 过敏蛋白的生物学功能及降低或消除苦荞的过敏活性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

原核表达载体 pET47b、pTriplEx2-TBW16、大肠杆菌菌株 BL21 Star(DE3)和 TOP10 均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 TBW16 过敏原原核表达载体构建 根据 TBW16 成熟蛋白的编码区(393 bp,登录号 GO496294)序列设计并合成引物,上游引物 F₁(5'-GGCTCCCCG-CGGGGAGAGATGAAGGCTTCGATTTAG-3',下划线为 Sac II 酶切位点),下游引物 R₁(5'-CGGCCGCTC-GAGTTACACATAATACCAGTTTCTCTAGAGT-3',下划线为 Xho I 酶切位点)。以本实验室先前构建的质粒 pTriplEx2-TBW16 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s;54 °C 退火 25 s;72 °C 延伸 30 s;30 个循环。纯化后的扩增产物与表达载体 pET47b 同时用 Sac II 和 Xho I 进行双酶切,回收酶切产物经 T4 DNA Ligase 连接构建表达载体 pET47b-TBW16,对重组质粒进行双酶切鉴定,测序验证后转化表达菌株 BL21 Star(DE3)。

1.2.2 TBW16 过敏原的诱导表达 将重组质粒转入 BL21 Star(DE3)中,挑单克隆接种于 5 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C 过夜培养。次日,将菌液按 1:100 的比例转接到含卡那霉素的 20 mL LB 培养基中至 OD 值为 0.6~0.8,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导 6 h。同时,取 1 mL 未加诱导剂 IPTG 的菌液作为对照。离心收集菌体,加入 1×SDS-PAGE 上样缓冲液悬浮菌体,沸水浴煮 5~10 min,离心后取上清进行 SDS-PAGE。

1.2.3 TBW16 过敏原的分离纯化 包涵体的纯化:大量诱导过敏原蛋白表达,收集菌体后加入 1/10 体积 pH 8.0 的裂解缓冲液(50 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl),超声破碎 20 min,离心后弃上清,加入适量 pH 8.0 的包涵体洗涤缓冲液(50 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,1% Triton X-100)重悬沉淀,超声 5 min,重复以上步骤 3~4 次。洗涤后加入适当体积 pH 8.0 的包涵体溶解液(50 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L 尿素),冰上溶解沉淀约 2 h。

钴离子螯合层析纯化过敏原蛋白:将溶解好的包涵体于 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,上清转入透析袋中,在含有不同浓度尿素(6、4、3、2、1、0 mol/

L)的透析液(pH 9.0, 50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)中进行缓慢梯度透析 6~8 h。将透析过的蛋白溶液 12 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 上清与等体积的 2×PBS(pH 7.8, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 含有 0.6 mol/L NaCl)混合, 缓慢上样于经 1×PBS 平衡过的 Talon resin 柱上。用 6 倍柱体积的 1×PBS 洗脱杂蛋白。随后用含有 150 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱目标蛋白。目标蛋白经 pH 为 8.0 的透析液(50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)透析后, -20℃ 保存。

1.2.4 苦荞种子萌发过程中 TBW16 过敏原蛋白的 Western blotting 分析 苦荞总蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后半干转移至 0.15 μm 的 NC 膜上, 50 mA 电流下转移 1 h, 以制备的多克隆抗体为一抗(工作浓度 1:300), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 为二抗(1:1 000, 北京博奥森生物技术有限公司)进行蛋白质印迹分析, 印迹信号的检测方法参考化学发光显色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司), 并利用化学发光成像仪(ChemiDoc XRS System, Bio-Rad)记录结果。

苦荞总蛋白样品的制备: 称取定量苦荞种子, 去皮研磨并加入 pH 6.5 的 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液, 混匀后置于 4℃ 保温过夜, 10 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 上清液即为总蛋白样液, 保存于 -20℃ 待用。

1.2.5 TBW16 的固定化及靶向结合蛋白纯化 过敏原的固定化: 用大量水清洗 Sepharose CL 6B, 加入适量 1 mol/L NaOH(含 2 mg/mL Sodium borohydride)和 1,4-Butanediol diglycidyl ether, 室温反应约 5 h, 大量水洗及 100 mmol/L NaHCO₃ 洗涤 1 次, 与经超滤管除 Tris-HCl 后的 TBW16 过敏原蛋白室温偶联反应约 10 h, 将获得的溶液用 pH 7.5 的 PBS 洗涤 1 次去除游离蛋白, 加入 1 mmol/L 甘氨酸封闭未反应基因, 水洗 3 次。

TBW16 过敏原靶向结合蛋白的纯化: 将苦荞籽粒总蛋白溶液 12 000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 上清与等体积的 2×PBS(pH 6.9, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 含有 0.6 mol/L NaCl)混合, 缓慢上样于经 1×PBS 平衡过的偶联 TBW16 过敏原的 Sepharose CL 6B 上。用 6 倍柱体积 1×PBS 洗脱杂蛋白, 0.1% SDS 洗脱目标蛋白, -20℃ 保存。

1.2.6 质谱鉴定 对洗脱蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝染色后切取目标条带送至北京华大生物科技有限公司进行 MALDI-TOF 质谱

检测。

2 结果与分析

2.1 TBW16 过敏原基因的 PCR 扩增、诱导表达及分离纯化

用合成的引物 F₁、R₁ 进行 PCR 扩增, 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示特异性扩增条带与预期大小 393 bp 一致(图 1)。

将表达载体 pET47b-TBW16 转化表达菌 BL21 Star(DE3), 诱导后经 SDS-PAGE 分析(图 2), 在 16 kD 附近有明显的诱导表达条带, 其大小与预测的苦荞 TBW16 的分子量大小相符。

TBW16 过敏蛋白在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达, 纯化的包涵体经 8 mol/L 尿素溶解及透析复性, 可形成高度可溶的蛋白质溶液。复性蛋白经钴离子螯合层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示 TBW16 有较高纯度(图 3), 表明钴柱 Talon resin 可实现该过敏蛋白的高效纯化。

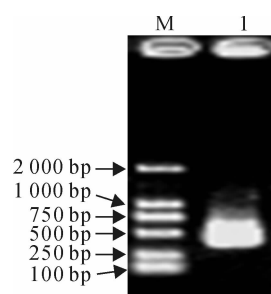


图 1 TBW16 基因序列的 PCR 扩增
M, DL2000; 1, TBW16 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of the coding sequence of TBW16
M, DL2000; 1, PCR product of TBW16 gene

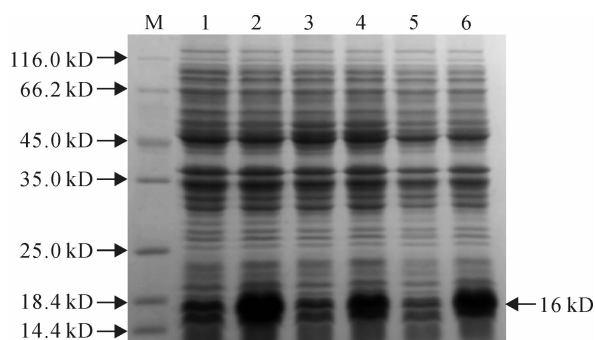


图 2 TBW16 过敏原诱导表达的 SDS-PAGE 分析
M, 蛋白 Marker; 1, 3, 5, 诱导前对照菌; 2, 4, 6, 诱导表达菌体
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of TBW16
M, Protein marker; 1, 3, 5, Uninduced cells containing pET47b-TBW16; 2, 4, 6, Induced cells containing pET47b-TBW16

2.2 苦荞种子萌发过程中 TBW16 蛋白的 Western blotting 分析

提取干种子及不同萌发状态共 9 阶段的苦荞种子(图 4,A)中的总蛋白,以 TBW16 过敏原为抗原制备的多克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blotting 分析(图 4,B)。干种子中的 TBW16 天然蛋白与抗体结合的信号最强,随着种子的萌发结合信号依次减弱,当芽长过 3 cm,几乎无抗原抗体结合信号,说明 TBW16 在干种子及萌发初期含量较高,选取此时期种子提取总蛋白,以检测与之相作用的目标蛋白。

2.3 TBW16 的固定化

除去 TBW16 过敏原蛋白溶液中 Tris-HCl,与 Sepharose CL 6B 以 1,4 丁二醇二缩水甘油醚环氧

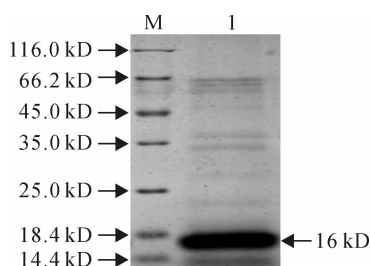


图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 marker; 1. 纯化的 TBW16 蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified TBW16 protein

M. Protein marker; 1. Purified protein

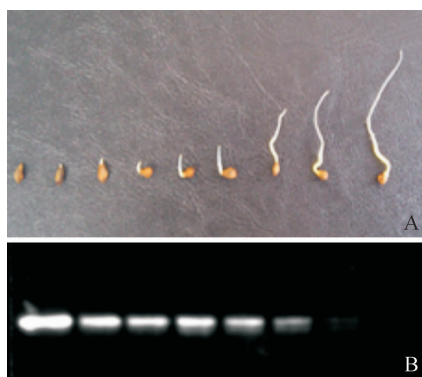


图 4 不同萌发状态种子中 TBW16 含量的 Western blotting 分析

A. 干种子及不同萌发状态的种子;

B. TBW16 含量 Western blotting 分析检测

Fig. 4 Western blotting analysis of TBW16 content in different germination stages of seeds

A. Characterization of dry seed and different germination stages of seeds; B. Detection the content of TBW16 in dry and different germination stages of seeds by Western blotting

基共价键偶联,亲和层析靶向结合苦荞总蛋白中未知蛋白,用 0.1% SDS 洗脱目标蛋白后经 SDS-PAGE 电泳检测(图 5),有 1 条分子量约为 40 kD 的条带清晰可见。

2.4 质谱鉴定靶向结合蛋白

对图 5 中清晰可见的蛋白条带进行 MALDI-TOF 质谱分析结果显示,该目标蛋白的 3 条肽段为 K. LQYALYDQK. A, R. STVSLAGGFGEVR. L 和 K. AHQISLGYVHNLSK. R(图 6)。经与 NCBI 数

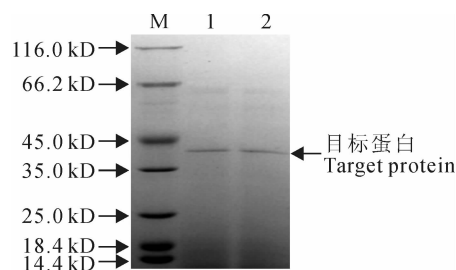


图 5 TBW16 过敏原靶向结合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 Marker; 1, 2. 目标蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of TBW16 targeting binding protein

M. Protein marker; 1 and 2. Target protein

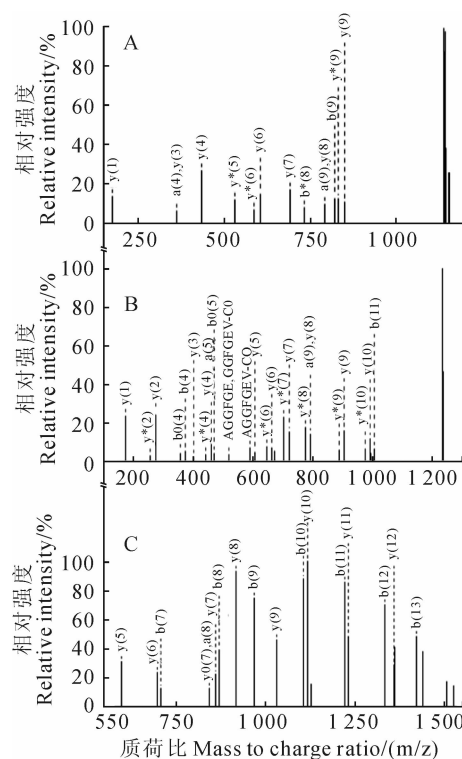


图 6 目标蛋白的质谱分析

A~C. 3 条肽段的二级质谱图

Fig. 6 Mass spectrometry analysis of the target protein

A~C. The secondary mass spectrogram of three peptides

数据库比对,该蛋白与细菌膜孔蛋白高度同源,因此该蛋白被初步预测为类膜孔蛋白。

3 讨 论

食物过敏已成为世界性的食品安全问题。据统计全世界有 8% 的儿童和 2% 的成年人对特定的食物过敏,发达国家超过 20% 的人受食物过敏性疾病困扰^[19-20]。食品过敏原主要是蛋白质类物质。植物性食物过敏蛋白根据其功能可分为种子储藏蛋白、结构蛋白和防御蛋白^[21]。有些过敏蛋白在植物体内承担着重要的生理功能,在通过分子手段降低或消除过敏蛋白(如基因沉默)前应优先分析过敏蛋白的生物学功能,否则可能造成转基因植株农艺性状的严重缺陷,因此揭示过敏蛋白在生物体内的生物学功能对于通过基因工程手段降低过敏蛋白的含量有着基础的指导价值。

对于荞麦过敏蛋白的研究,主要集中在过敏蛋白的鉴定、分子特性和过敏表位分析等领域。Park 等^[22]在荧光酶联免疫分析过敏患者血清 IgE 的基础上推测 9、16、19 和 24 kD 蛋白可能是甜荞中的主要过敏原。国内学者对苦荞 22、24、56 kD 过敏蛋白进行了克隆和重组表达的研究,并利用体外 IgE 的结合实验进行了过敏活性的分析^[23-25]。Ren 等^[26]通过点突变确定了 56 kD 苦荞过敏原 C 端片段 TBa 的核心表位。Tanaka^[27]证明甜荞 16 kD 过敏原具有抗胃蛋白酶消化的特性, Lee 验证了荞麦中 24 kD 过敏原有抗胰凝乳蛋白酶消化特性^[28]。李玉英证明 9 kD 过敏原具有胰蛋白酶抑制剂活性^[29]。迄今为止对于荞麦过敏蛋白的生物学功能分析未有文献报道。

TBW16 是定位于苦荞种胚中分子量为 16 kD 的过敏蛋白,其具有抗胃蛋白酶、耐热(沸水浴,150 min 以上)、耐酸(pH 2.0)等高稳定的特性,该苦荞

过敏原被世界卫生组织和国际免疫学会联合会(IUIS)过敏原命名小组委员会审查并命名为 Fag t 2.0101 (<http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=724>)^[30]。李学俊等^[11]利用原核表达系统实现了 16 kD 过敏蛋白前体的原核表达并制备了多克隆抗体,但包含信号肽的蛋白不能实现正确的复性。本研究建立了去除 N 端 19 个氨基酸残基的信号肽(MKLFILATATLLIAATQA)的成熟蛋白的原核表达体系,虽然目标蛋白仍以包涵体的形式表达,但可实现包涵体蛋白的完全复性,为高效纯化目标蛋白和研究该蛋白的生物学功能奠定了基础。

寻找与过敏蛋白相互作用的蛋白是揭示过敏蛋白生物学功能的有效途径之一。本研究在实现 TBW16 重组表达、复性和纯化的基础上,采用 1,4-丁二醇二缩水甘油醚作为 Sepharose 的活化剂偶联 TBW16,制备了 TBW16 互作蛋白分离的纯化介质。1,4-丁二醇二缩水甘油醚活化琼脂糖凝胶,可以引入环氧基以利于 TBW16 的共价固定化,同时在固定化配基和支持介质之间引入 10 个碳原子的亲水性间隔臂,大大降低了支持介质对靶向蛋白结合的空间位阻,可提高待分离蛋白结合的特异性 and 高效性。

本研究初步证实苦荞 TBW16 靶向结合蛋白与细菌膜孔蛋白高度同源。细菌和真核生物的线粒体膜孔蛋白有相对较多的研究,在细菌体内,膜孔蛋白参与细菌对环境胁迫的响应,研究最多的是膜孔蛋白与细菌抗生素耐药性的关系。膜孔蛋白是抗生素进入革兰阴性菌胞质间隙的非特异性蛋白通道,其减少或缺失可能导致细菌抗生素摄入的降低,是细菌抗生素耐药性形成的机制之一^[31-32]。与 TBW16 互作的类膜孔蛋白在苦荞中的细胞定位以及生物学功能的进一步分析,将有助于揭示苦荞 TBW16 过敏蛋白的生物学功能。

参考文献:

- [1] POMERANZ Y, ROBBINS G S. Amino acid composition of buckwheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1972, **20**(2): 270-274.
- [2] 郭晓娜. 苦荞麦蛋白质的分离纯化及功能特性研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2006.
- [3] ZHANG H W(张宏伟), ZHANG Y SH(张永生), LU M J(卢明俊), et al. Effects of buckwheat-eating on blood sugar and serum lipids levels and blood pressure[J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine* (环境与职业医学), 2003, **20**(2): 120-125(in Chinese).
- [4] SAMMUT D, DENNISON P, VENTER C, et al. New disease: Buckwheat allergy; a potential problem in 21st century Britain[J]. *BMJ Case Reports*, 2011, doi:10.1136/bcr.09.2011.4882.
- [5] IMAI T, IIKURA Y. The national survey of immediate type of food allergy [J]. *Arerugi*, 2003, **52**(10): 1006-1013.
- [6] SMITH H L. Buckwheat-Poisoning; With report of a case in man[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1909, **3**(4): 350-359.

- [7] NOMA T, YOSHIKAWA I, OGAWA N, *et al.* Fatal buckwheat dependent exercised-induced anaphylaxis[J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2001, **19**(4): 283—286.
- [8] URISU A. Identification of a major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods[J]. *Allergy & Clinical Immunology News*, 1994, **6**: 151—155.
- [9] XIAN J W(冼静雯), WU H Q(吴海强), JIAN X L(简晓莉), *et al.* Extraction, isolation and immunological identification of allergens from *triticum aestivum* and *fagopyrum esculentum*[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报), 2008, **28**(5): 799—803(in Chinese).
- [10] WANG L(王 岚), LI Y Y(李玉英), CAI G H(蔡桂红), *et al.* Prokaryotic expression and immunological identification of tartary buckwheat allergenic protein(TBa)[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2006, **22**(4): 308—312(in Chinese).
- [11] LI X J(李学俊), GUO Y F(郭彦飞), YAN Q(闫 倩), *et al.* Recombinant expression of tartary buckwheat allergen-like protein in *E. coli* and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2011, **31**(8): 1 524—1 530(in Chinese).
- [12] THALHAMER T, DOBISA H, STEPANOSKA T, *et al.* Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by means of *in silico* mutation and screening[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, **125**(4): 926—934.
- [13] MARTH K, FOCKE-TEJEL M, LUPINEK C, *et al.* Allergen peptides, recombinant allergens and hypoallergens for allergen-specific immunotherapy[J]. *Current Treatment Options in Allergy*, 2014, **1**(1): 91—106.
- [14] ASTWOOD J D, LEACH J N, FUCHS R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**(10): 1 269—1 273.
- [15] MALEKI S J, VIQUEZ O, JACK T, *et al.* The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, **112**(1): 190—195.
- [16] VISSERS Y M, IWAN M, ADEL-PATIENT K, *et al.* Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6; the necessity of degranulation assays[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2011, **41**(11): 1 631—1 642.
- [17] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Pathogenesis-related(PR)-proteins identified as allergens [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**(6): 930—934.
- [18] LEDESMA A, VILLALBA M, RODRIGUEZ R. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca^{2+} binding protein from olive pollen with allergenic activity[J]. *FEBS Letters*, 2000, **466**(1): 192—196.
- [19] LARCHÉ M, AKDIS C A, VALENTA R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, **6**(10): 761—771.
- [20] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, **125**(2): S116—S125.
- [21] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2000, **122**(3): 155—166.
- [22] PARK J W, KANG D B, KIM C W, *et al.* Identification and characterization of the major allergens of buckwheat[J]. *Allergy*, 2000, **55**(11): 1 035—1 041.
- [23] HOU X J(侯晓军), CHANG W J(畅文军), CHEN L ZH(陈立钊), *et al.* Cloning and sequencing of major allergenic gene cDNA from tartary buckwheat[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2003, **19**(4): 436—440(in Chinese).
- [24] 畅文军. 苦荞过敏蛋白 TB 24 kDa 的原核表达纯化及免疫活性的鉴定[D]. 太原: 山西大学, 2004.
- [25] ZHANG X, YUAN J M, CUI X D, *et al.* Molecular cloning, recombinant expression, and immunological characterization of a novel allergen from tartary buckwheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(22): 10 947—10 953.
- [26] REN X, ZHANG X, LI Y, *et al.* Epitope mapping and immunological characterization of a major allergen TBa in tartary buckwheat[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, **32**(9): 1 317—1 324.
- [27] TANAKA K, MATSUMOTO K, AKASAWA A, *et al.* Pepsin-resistant 16 kD buckwheat protein is associated with immediate hypersensitivity reaction in patients with buckwheat allergy[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, **129**(1): 49—56.
- [28] LEE S, HAN Y, DO J R, *et al.* Allergenic potential and enzymatic resistance of buckwheat[J]. *Nutrition Research and Practice*, 2013, **7**(1): 3—8.
- [29] LI Y Y(李玉英), ZHANG ZH(张 政), LI CH(李 晨), *et al.* Prokaryotic expression and purification of buckwheat trypsin inhibitor [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2007, **27**(1): 16—20(in Chinese).
- [30] CHEN P, GUO Y F, YAN Q. Molecular cloning and characterization of Fag t 2: a 16 kD major allergen from tartary buckwheat seeds[J]. *Allergy*, 2011, **66**(10): 1 393—1 395.
- [31] ZHONG L(钟 利), FAN X J(范昕建). The research progress on membrane protein of *Escherichia coli*[J]. *World Notes on Antibiotics*(国外医药: 抗生素分册), 1998, **19**(3): 208—210(in Chinese).
- [32] KOJIMA S, NIKAIIDO H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**(28): E2 629—E2 634.