

牛乳主要过敏原 α_{S1} -酪蛋白的纯化鉴定及其多克隆抗体的制备

何圣发, 龙彩云, 王 娇, 熊 梦, 赵江强, 燕 燕, 董亚萍, 李 欣, 陈红兵

Purification, Identification and Polyclonal Antibody Development for Cow's Milk Major Allergen α_{S1} -Casein

HE Shengfa, LONG Caiyun, WANG Jiao, XIONG Meng, ZHAO Jiangqiang, YAN Yan, DONG Yaping, LI Xin, and CHEN Hongbing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021110034>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

牛乳主要过敏原酪蛋白的特性和分离纯化研究进展

Research Progress on Characteristics Isolation and Purification of Casein, the Major Allergen in Milk

食品工业科技. 2021, 42(20): 391-399

奶花芸豆中凝集素的提取、纯化及鉴定

Extraction, Purification and Identification of Lectin from *Phaseolus vulgaris*

食品工业科技. 2018, 39(15): 48-54, 59

抗克百威单链抗体的可溶性表达、纯化与鉴定

Soluble expression, purification, and identification of scFv against carbofuran

食品工业科技. 2017(20): 77-82

贵州薏米致霉菌的分离鉴定

Isolation and identification of moldy fungus from coix seed in Guizhou

食品工业科技. 2017(16): 101-105

凝结芽孢杆菌XZQ-16抗菌脂肽分离鉴定及抗菌特性

Isolation, Identification and Antibacterial Properties of Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus coagulans* XZQ-16

食品工业科技. 2021, 42(3): 36-42

一株产普鲁兰酶菌株的筛选鉴定、酶学性质及海带多糖酶解产物的抗氧化活性

Screening, Identification and Enzymatic Properties of a Pullulanase Producing Strain, and Antioxidant Activity of *Laminaria japonica* Polysaccharide Enzymatic Hydrolysate

食品工业科技. 2018, 39(17): 106-111



关注微信公众号，获得更多资讯信息

何圣发, 龙彩云, 王娇, 等. 牛乳主要过敏原 α_{S1} -酪蛋白的纯化鉴定及其多克隆抗体的制备 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 106-114. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110034

HE Shengfa, LONG Caiyun, WANG Jiao, et al. Purification, Identification and Polyclonal Antibody Development for Cow's Milk Major Allergen α_{S1} -Casein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 106-114. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110034

· 研究与探讨 ·

牛乳主要过敏原 α_{S1} -酪蛋白的纯化鉴定及其多克隆抗体的制备

何圣发^{1,2}, 龙彩云³, 王娇¹, 熊梦¹, 赵江强¹, 燕燕¹, 董亚萍¹, 李欣^{2,4}, 陈红兵^{2,5,*}

(1. 赣南医学院公共卫生与健康管理学院, 江西赣州 341000;

2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

3. 赣州市疾病预防控制中心, 江西赣州 341000;

4. 南昌大学食品学院, 江西南昌 330047;

5. 南昌大学中德联合研究院, 江西南昌 330047)

摘要:目的: 从牛乳酪蛋白中纯化获得 α_{S1} -酪蛋白并对其进行综合鉴定, 以及制备特异性识别 α_{S1} -酪蛋白的兔多克隆抗体。方法: 采用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析色谱对 α_{S1} -酪蛋白进行分离纯化, 利用酪蛋白的理化性质(等电点和含量)、免疫学技术和质谱技术对纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行综合鉴定, 然后通过透析和冷冻干燥获得高纯度的 α_{S1} -酪蛋白, 最后免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 并分析其特异性。结果: 在 4 种酪蛋白中, α_{S1} -酪蛋白在阴离子交换层析色谱中的出峰时间最晚、峰面积最大, 在电泳图中的位置最高, 最终获得纯度高达 94.26% 的 α_{S1} -酪蛋白, 得率为 27.19%。免疫 5 次后, 两只兔子的抗血清效价分别为 128 万和 32 万, 抗血清除了与大豆蛋白存在轻微交叉反应 (<0.25%) 外, 与 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、蛋清蛋白、花生蛋白均无交叉反应, 表明特异性高。结论: 本研究制备了高纯度的 α_{S1} -酪蛋白及其高特异性的多克隆抗体, 为过敏原蛋白的纯化与综合鉴定提供了思路, 为 α_{S1} -酪蛋白免疫学检测方法的建立提供了物质基础。

关键词: 牛乳过敏原, α_{S1} -酪蛋白, 纯化, 鉴定, 多克隆抗体

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)15-0106-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110034



本文网刊:

Purification, Identification and Polyclonal Antibody Development for Cow's Milk Major Allergen α_{S1} -Casein

HE Shengfa^{1,2}, LONG Caiyun³, WANG Jiao¹, XIONG Meng¹, ZHAO Jiangqiang¹, YAN Yan¹,
DONG Yaping¹, LI Xin^{2,4}, CHEN Hongbing^{2,5,*}

(1. School of Public Health and Health Management, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Ganzhou Center for Disease Control and Prevention, Ganzhou 341000, China;

4. School of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

5. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Objective: To purify and comprehensive identify α_{S1} -casein from bovine caseins and prepare rabbit polyclonal antibody against α_{S1} -casein. Method: DEAE Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography was used to separate and

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 赣南医学院博士启动课题(QD201809); 赣南医学院重点科研课题(ZD201816); 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室开放课题(SKLF-KF-202003); 江西省自然科学基金项目(20202BAB215013); 国家自然科学基金项目(32160606)。

作者简介: 何圣发(1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食物过敏, E-mail: heshengfa11@hotmail.com。

* 通信作者: 陈红兵(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食物过敏, E-mail: chenhongbing@ncu.edu.cn。

purify α_{S1} -casein. The physicochemical property (isoelectric point and protein content), immunological technique and mass spectrometry were used to comprehensively identify α_{S1} -casein. Then the α_{S1} -casein was obtained by dialysis and lyophilization, polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand white rabbit with the purified α_{S1} -casein, and the specificity of polyclonal antibody was analyzed. Result: Among the four kinds of caseins, α_{S1} -casein had the latest peak time, the largest peak area in anion exchange chromatography and the highest position in the electrophoretic diagram. Finally, the purity of α_{S1} -casein was 94.26%, and the yield was 27.19%. The titers of sera from two rabbits inoculated with purified α_{S1} -casein for five times reached 1280000 and 320000, respectively. In addition to the slight cross reaction with soybean protein (<0.25%), the antiserum showed no cross reaction with α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, egg white protein and peanut protein, indicating high specificity. Conclusion: This study prepared high purity α_{S1} -casein and high specificity polyclonal antibody against α_{S1} -casein, providing a new train of thought for α_{S1} -casein purification and comprehensive identification, and also providing material basis for the development of immunologic method for detection of α_{S1} -casein.

Key words: cow's milk allergen; α_{S1} -casein; purification; identification; polyclonal antibody

牛乳具有丰富的营养物质,深受人们喜爱,但作为“八大过敏性食物”之一,由于摄入牛乳蛋白而引起的食物过敏现象也引起了国内外的广泛关注^[1-4]。牛乳中有 30 多种蛋白质可能会导致过敏,其中 α_{S1} -酪蛋白不仅含量最高,其致敏性也更强^[5-7]。因此, α_{S1} -酪蛋白被认为是牛乳中最重要的过敏原之一,可作为检测食品中是否含牛乳蛋白的一个重要标志物。而 α_{S1} -酪蛋白的纯化及其特异性多克隆抗体的制备是建立 α_{S1} -酪蛋白检测方法的物质基础。

α_{S1} -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白在牛乳中含量分别为 12~15、3~4、9~11 和 3~4 mg/mL,分子量分别为 23.6、25.2、24.0 和 19.0 kDa,等电点分别为 4.9~5.0、5.2~5.4、5.1~5.4 和 5.4~5.6^[7]。这些理化性质为各种酪蛋白的分离纯化和鉴定提供了重要依据。例如,DEAE Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose 等阴离子交换层析(pH=7.0)是分离纯化酪蛋白的常用方法^[8-12],根据 α_{S1} -酪蛋白的等电点最低及蛋白含量最高,可大致判断 α_{S1} -酪蛋白的出峰时间最晚,且峰面积较大。另外,由于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)通常能较准确地指示蛋白质的分子量,因此是鉴定蛋白质最常用的方法^[13-15]。然而,研究发现酪蛋白在 SDS-PAGE 中的迁移速度要比理论值更慢,尤其是由于 α_{S1} -酪蛋白的水合粒径较大,导致其在 SDS-PAGE 中位于 34.5 kDa,远高于其实际分子量^[16]。Treweek 等^[17]通过质谱技术证明 α_{S1} -酪蛋白在 SDS-PAGE 中的位置高于 α_{S2} -酪蛋白。但目前有些研究仅根据各酪蛋白的分子量及其在 SDS-PAGE 中的理论分布来判断纯化结果,导致各研究结果存在较大差异^[8-11]。另外,虽然有少数研究通过质谱、标准品对照等方法对纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行鉴定,但未给出纯化样品的 SDS-PAGE 图^[12, 17-18],从而无法给相关的纯化研究提供准确、直观的参考。因此,有必要在充分利用各酪蛋白理化性质的基础上,结合其他技术方法对分离纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行综合准确鉴定,以确保纯化获得的 α_{S1} -酪蛋白的可靠性,并提供分离纯化的色谱图

和 SDS-PAGE 图,为相关研究提供科学、直观的参考。

除了利用目标蛋白的理化性质对其进行鉴定外,免疫学方法、质谱方法等技术可进一步为蛋白质的鉴定提供有力保障。其中,免疫学技术是利用抗原与抗体特异性结合的特性来鉴别抗原蛋白,具有特异性强、灵敏度高、操作简单、经济、快速等优点^[19-21]。抗体是免疫学鉴定抗原蛋白的关键,在未获得目标蛋白质而无法制备相应抗体时,可以通过化学合成或原核表达等方法制备含目标蛋白质某些序列或全部序列的多肽或蛋白质,并制备相应的抗体^[22-25],再利用这些抗体对纯化的目标蛋白质进行免疫学鉴定。另外,将质谱技术与酶解和液相色谱等方法联合,得到蛋白质谱图后,通过检索数据库,可以灵敏、准确、高通量地鉴定蛋白质,是蛋白质鉴定的“金标准”,广泛用于蛋白质等物质的鉴定与检测^[26-28]。

本研究将通过 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析对牛乳酪蛋白的各蛋白质组分进行分离,基于 4 种酪蛋白的理化性质,结合 SDS-PAGE、免疫学方法和质谱技术等方法对纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行综合鉴定,并制备特异性识别 α_{S1} -酪蛋白的兔多克隆抗体(polyclonal antibody against α_{S1} -casein, pAb- α_{S1} -CN),为 α_{S1} -酪蛋白免疫学检测方法的建立提供物质基础,也为其他过敏原蛋白的纯化与鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

8 周龄的雄性新西兰大白兔 赣州蓉江新区潭东镇天子养殖场;牛乳酪蛋白、 α -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HRP 标记羊抗兔 IgG(HRP-IgG)二抗 美国 Sigma 公司;DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子柱材 美国 GE 公司;TMB 底物试剂盒、预染蛋白 Markers 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、透析袋(分子截留量 3500 Da) 北京索莱宝科技有限公司;40% 的丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液(29:1) 上海生工生物工程股份有限公司;96 孔酶标板 无锡耐思生命科技股份有限公司。

ST16R 高速冷冻离心机、Varioskan LUX 多功能酶标仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TH-

500 梯度混合仪、BT-100 恒流泵、HD-3 紫外检测仪、HD-A 层析图谱采集分析仪、BS-100 自动部分收集器、层析柱(1.6 cm×50 cm) 上海沪西分析仪器有限公司; PB-30 pH 计 德国 Sartorius 公司; Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳仪 美国 Bio-Rad 公司; Amersham Imager 600 超灵敏多功能成像仪 美国 GE 公司; FreeZone 2.5 L 立式冷冻干燥机 美国 Labconco 公司; PL9620G 全自动洗板机 北京普朗新技术有限公司; MT60-4 恒温微孔板振荡器 深圳市优米仪器设备有限公司; MS-H-Pro^T 磁力搅拌器 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。

1.2 实验方法

1.2.1 阴离子交换层析分离纯化牛乳 α_{S1} -酪蛋白 称取 1 g 牛乳酪蛋白溶于 50 mL 平衡缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 含有 3.3 mol/L 尿素、20 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、0.12% [V/V] β -巯基乙醇, pH7.0), 调 pH 至 7.0。采用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析分离纯化 α_{S1} -酪蛋白。先用平衡缓冲液平衡离子交换柱, 然后加入 10 mL 酪蛋白(20 mg/mL)。采用平衡缓冲液洗脱未被吸附的杂质, 流速为 2 mL/min; 然后用含 0.02~0.5 mol/L NaCl 的平衡缓冲液进行连续洗脱, 流速为 1.5 mL/min。收集洗脱样品, 6 mL/管。

1.2.2 SDS-PAGE 分析蛋白质纯度 SDS-PAGE 用来分析离子交换层析所得蛋白质的组分与纯度。SDS-PAGE 电泳采用 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶, 凝胶厚度为 1.0 mm, 样品上样量为 18 μ L, Markers 上样量为 3 μ L。电泳采用恒流模式, 浓缩胶电泳条件为 10 mA、30 min, 分离胶电流为 20 mA, 直至溴酚蓝跑至分离胶底端。电泳结束后, 进行剥胶、考马斯亮蓝染色、甲醇乙酸溶液脱色等程序。脱色完全后, 利用 Amersham Imager 600 进行凝胶成像, 通过 ImageJ 软件分析蛋白纯度。

1.2.3 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的鉴定 首先, 按照课题组前期报道的方法^[24], 制备了特异性识别 α_{S1} -酪蛋白 9 个 IgE 表位的多克隆抗体, 然后以该多克隆抗体为一抗, 通过间接酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)分析各峰样品的免疫学反应性。用包被液将各峰尖样品进行梯度稀释(不稀释、10 倍、100 倍、1000 倍), 以包被液作为空白对照, 每孔 100 μ L, 3 个平行, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 PBST (PBS, 含 0.05% Tween-20)洗涤 3 次后, 每孔依次加入 250 μ L 3% 的明胶、100 μ L 一抗(稀释 2 万倍)、100 μ L HRP-IgG(稀释 1 万倍), 均于 37 $^{\circ}$ C、400 r/min 振荡孵育 1 h(若无特殊说明, ELISA 的孵育条件均为 37 $^{\circ}$ C、400 r/min 振荡孵育), 每次孵育完后均用 PBST 洗涤 3 次。然后每孔加入 100 μ L TMB 工作试剂, 孵育 15 min 后, 每孔加入 50 μ L 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应。最后, 450 nm 测吸光值(optical density at 450 nm, OD_{450 nm})。

另外, 进一步通过质谱技术对 α_{S1} -酪蛋白进行鉴定。将间接 ELISA 确定为 α_{S1} -酪蛋白的样品进行 SDS-PAGE, 染色、脱色后, 将最粗的条带切下, 送上海生工生物工程股份有限公司(武汉)进行 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定。

1.2.4 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的冷冻干燥 对综合鉴定为 α_{S1} -酪蛋白的样品进行透析和冷冻干燥。首先, 按照说明书处理透析袋: 剪取合适长度的透析袋, 先用 2%(W/V)NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA(pH8.0)煮沸 10 min, 再用 1 mmol/L 的 EDTA(pH8.0)煮沸 10 min, 每次煮完后均用超纯水彻底清洗透析袋。接着将 α_{S1} -酪蛋白样品倒入透析袋中, 用流动的自来水透析过夜除盐, 然后在磁力搅拌下用超纯水透析 2 次, 每次 3 h。然后, 通过离心收集透析所析出的沉淀, 并放入 -80 $^{\circ}$ C 进行冷冻。将 α_{S1} -酪蛋白样品进行冷冻干燥。最后, 通过 SDS-PAGE 分析冻干样品的纯度, 其余样品保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.5 兔抗牛乳 α_{S1} -酪蛋白多克隆抗体的制备与特异性分析 按照课题组前期报道的方法^[24], 制备 pAb- α_{S1} -CN 并分析其特异性。选取 2 只 8 周龄的新西兰大白兔, 雄性, 分别标记为兔 A 和兔 B, 饲养于动物房。喂养不含牛乳蛋白的食物, 喂养一周无异常后, 开始免疫, 每次免疫前, 耳缘静脉取血, 用于监测抗体效价变化。用 PBS 将 α_{S1} -酪蛋白配成 2 mg/mL 的溶液, 将等体积的 α_{S1} -酪蛋白溶液和弗氏佐剂混合进行乳化, 初次免疫用弗氏完全佐剂, 加强免疫用弗氏不完全佐剂。采用背部皮下多点注射, 每只兔子每次免疫 1 mL(1 mg α_{S1} -酪蛋白)。每两周免疫一次。免疫过程中, 通过间接 ELISA 监测血清效价变化, 当效价不变或出现下降时结束免疫。免疫结束后, 通过颈动脉采血, 先将血液置于室温 1 h, 然后置于 4 $^{\circ}$ C 过夜, 最后 4500 g 离心 5 min, 收集上清液(血清), 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

通过竞争抑制 ELISA 法分析 pAb- α_{S1} -CN 的特异性。在 A 板中包被合适浓度的 α_{S1} -酪蛋白, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 洗涤 3 次后, 用 3% 的明胶封阻, 同时取一块新板 B 进行封阻, 孵育 1 h。对 A 板和 B 板进行洗涤后, B 板每孔加入 70 μ L 的 α_{S1} -酪蛋白或其他过敏原蛋白(牛乳 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、蛋清蛋白、花生蛋白、大豆蛋白), 以及 70 μ L pAb- α_{S1} -CN, 3 平行, 孵育 1 h。然后, 从 B 板每孔中取 100 μ L 加到 A 板中, A 板孵育 1 h。洗涤后, 每孔加 100 μ L HRP-IgG 二抗, 孵育 1 h。其余步骤同 1.2.3。

1.3 数据处理

采用 Origin 8 绘制图形, 通过 SPSS 17 对数据进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ (*) 和 $P < 0.01$ (**) 表示数据间差异显著。

2 结果与分析

2.1 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的分离纯化

牛乳酪蛋白的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离

子交换层析图谱如图 1 所示, 共有 4 个峰(A、B、C 和 D)。由于 α_{S1} -酪蛋白在酪蛋白中的等电点最低(4.9~5.0)、含量最高^[7], 因此 α_{S1} -酪蛋白在 pH=7 的缓冲液中所带电荷最大, 需要更高的离子浓度才能将其洗脱下来, 将是最后出峰, 且峰面积最大。因此, 结合酪蛋白的理化性质, 可以初步推断 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白(图 1)。

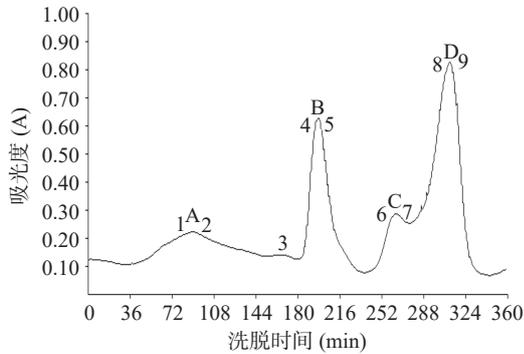


图 1 牛乳酪蛋白的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析图谱

Fig.1 Chromatogram of bovine casein using DEAE Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography

注: A~D 代表 4 个峰; 1~9 分别为第 21、23、42、48、50、65、67、76、78 管样品的位置, 用于后续 SDS-PAGE 分析。

通过 SDS-PAGE 对 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析的样品(图 1, 1~9)及牛乳蛋白进行组分分析, 结果如图 2 所示。从图 2A 可知, A 峰样品(泳道 1 和 2)和 B 峰样品(泳道 4 和 5)及泳道 3 的条带位于 25~30 kDa, C 峰(泳道 6 和 7)和 D 峰(泳道 8 和 9)样品在 35 kDa 左右, 且 C 峰样品的位置略低于 D 峰, B 峰和 D 峰样品的条带较粗。在牛乳蛋白中, α_{S1} -酪蛋白不仅含量最高, 其水合粒径也较大, 在 SDS-PAGE 中的移动速度较慢, 导致 α_{S1} -酪蛋白在 SDS-PAGE 中的实际位置(34.5 kDa)高于其实际分子量(23.6 kDa), 也高于 α_{S2} -酪蛋白和 β -酪蛋白的位置^[7, 16-17]。因此, 结合文献报道和 α_{S1} -酪蛋白的理化性质, 可以推测 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白, 与阴离子

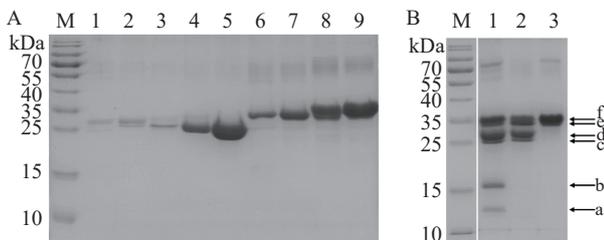


图 2 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析分离牛乳酪蛋白和牛乳蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE profile of bovine casein purified by DEAE Sepharose Fast Flow and milk proteins

注: A: 泳道 1~9 与阴离子交换层析图谱(图 1)中所标注的“1~9”相对应; B: 泳道 1~3 分别为脱脂牛乳、牛乳酪蛋白和牛乳 α -酪蛋白, a~f 分别指示牛乳中不同蛋白质的条带位置。

交换层析图谱的分析结果一致。另外, 脱脂牛乳、牛乳酪蛋白和牛乳 α -酪蛋白(Sigma 标品)的电泳结果如图 2B 所示, 根据牛乳(泳道 1)、酪蛋白(泳道 2)和 α -酪蛋白(泳道 3)中的主要蛋白成分及其含量与分子量^[7], 可以初步推断 a~f 分别为 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 κ -酪蛋白、 β -酪蛋白、 α_{S2} -酪蛋白和 α_{S1} -酪蛋白。由此可知, 图 2B 中的 α_{S1} -酪蛋白(f 条带)和 α_{S2} -酪蛋白(e 条带)的位置分别与图 2A 泳道 9 (D 峰)和泳道 7(C 峰)的条带位置一致。综上, 通过综合分析牛乳各蛋白的理化性质(等电点和含量)及其在电泳图中的位置并结合文献报道, 可以判断 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白。

2.2 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的免疫学方法鉴定

结合牛乳酪蛋白的理化性质和标准品对照, 已初步判断 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白。为了进一步从免疫学角度确定 α_{S1} -酪蛋白的出峰位置, 以 α_{S1} -酪蛋白的 IgE 表位多克隆抗体为一抗, 通过间接 ELISA 分析了第 22、49、66 和 77 管样品(图 1, A~D 的峰尖样品)与一抗的免疫反应性, 结果如图 3 所示。由于所用的一抗能特异性识别 α_{S1} -酪蛋白的多个 IgE 表位, 因此能与该抗体反应的样品则含有 α_{S1} -酪蛋白。从图 3 可知, A 峰样品基本未与一抗反应, 表明 A 峰不含 α_{S1} -酪蛋白。未稀释的 B 峰样品与一抗有明显反应, 但稀释 10 倍后没有反应, 表明 B 峰含有微量 α_{S1} -酪蛋白。C 峰样品在低稀释度时, 有较强烈的反应, 但稀释 1000 倍时只有极轻微的反应, 表明 C 峰样品中含有少量 α_{S1} -酪蛋白。而不同稀释度的 D 峰样品均与一抗有强烈反应, 表明 D 峰含有大量 α_{S1} -酪蛋白。另外, C 峰和 D 峰样品与一抗的反应强度随样品稀释度的增加呈先增强后减弱趋势, 产生该现象的原因可能是: a. 高浓度的 NaCl 和尿素会抑制抗原的包被效果^[29], NaCl 和尿素的浓度随样品稀释度的增加而降低, 因此这种抑制作用也会随样品稀释度的增加而减弱; b. 样品中 α_{S1} -酪蛋白的浓度也随样品的

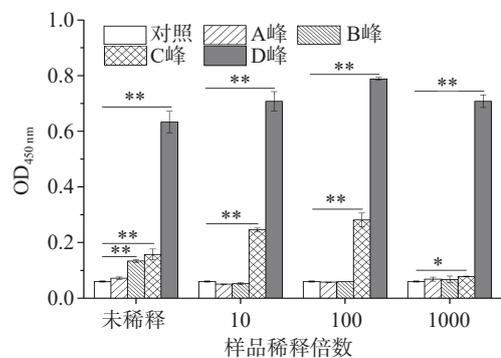


图 3 间接 ELISA 分析阴离子交换层析样品的免疫反应性(n=3)

Fig.3 Analysis of immunoreactivity of bovine casein purified by DEAE Sepharose Fast Flow by indirect ELISA(n=3)

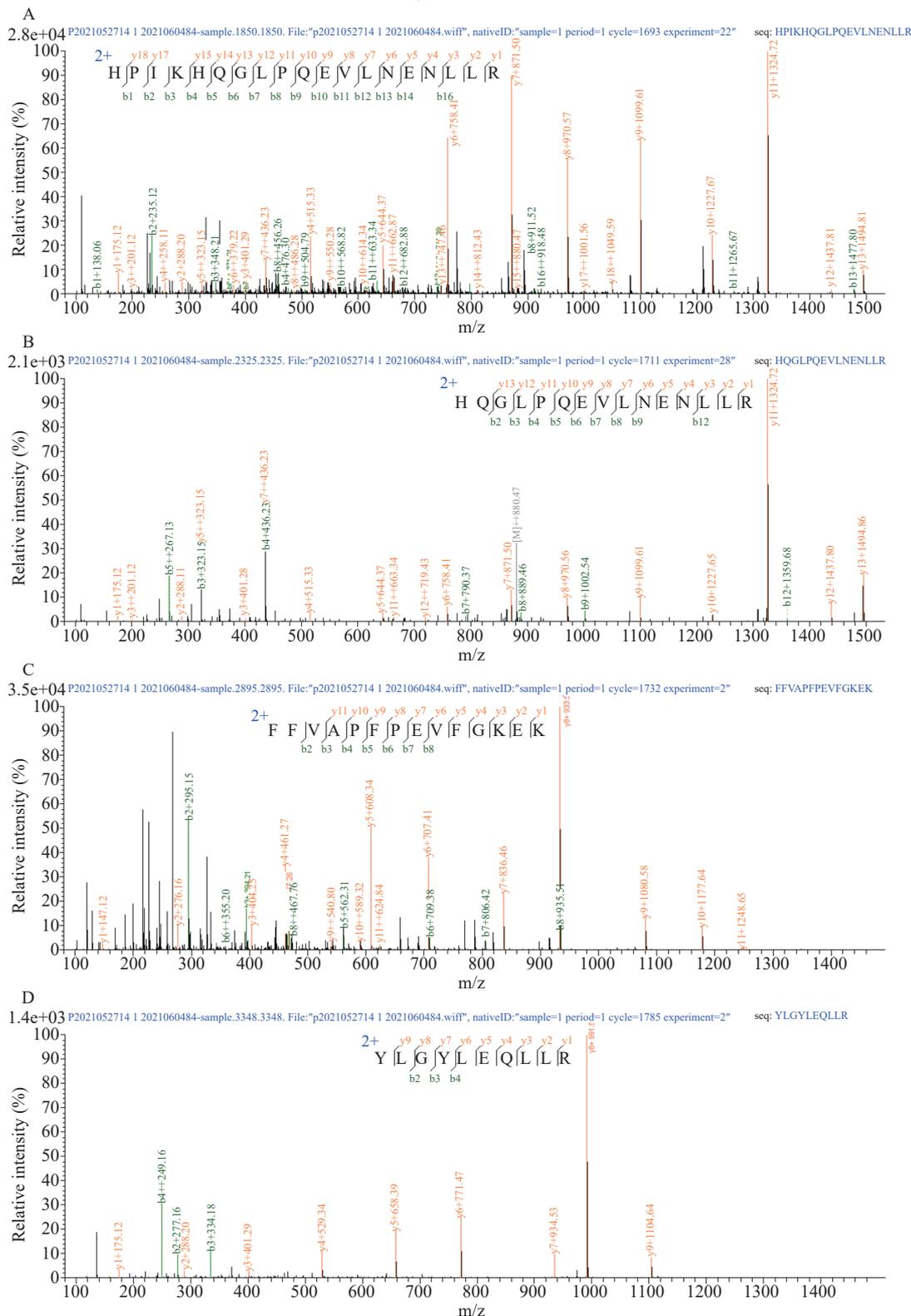
注: 样品组与对照组之间的差异显著性以 * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 表示。

稀释度的增加而降低。由于样品中 α_{S1} -酪蛋白浓度和 NaCl 与尿素浓度的降低对 α_{S1} -酪蛋白的包被效果具有相反作用,这可能产生 C 峰和 D 峰样品中 α_{S1} -酪蛋白的包被量随样品稀释度的增加呈先增加后降低的趋势,从而产生此现象。总之,从免疫学角度进一步证明 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白。

2.3 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的质谱鉴定

虽然免疫学方法鉴定 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白,但为了确证图 2A 泳道 9 中含量最高的条带是否为 α_{S1} -

酪蛋白,进一步对该条带进行质谱鉴定,结果如图 4 所示。根据质谱结果,在 uniprot 数据库中共搜索到 7 个蛋白,其中 α_{S1} -酪蛋白的分值最高(4395),而其他 6 种蛋白质只有 16~42 分,分值越高说明匹配度越高。二级质谱共鉴定出 α_{S1} -酪蛋白的 7 条多肽(图 4A~G),覆盖 α_{S1} -酪蛋白 43.22% 的氨基酸序列(图 4H)。而从文献报道^[30]和 BLAST 序列对比分析可知, α_{S1} -酪蛋白只与大豆蛋白(如 Gly m5、P34)存在少量相似的氨基酸序列。因此,质谱结果可以确



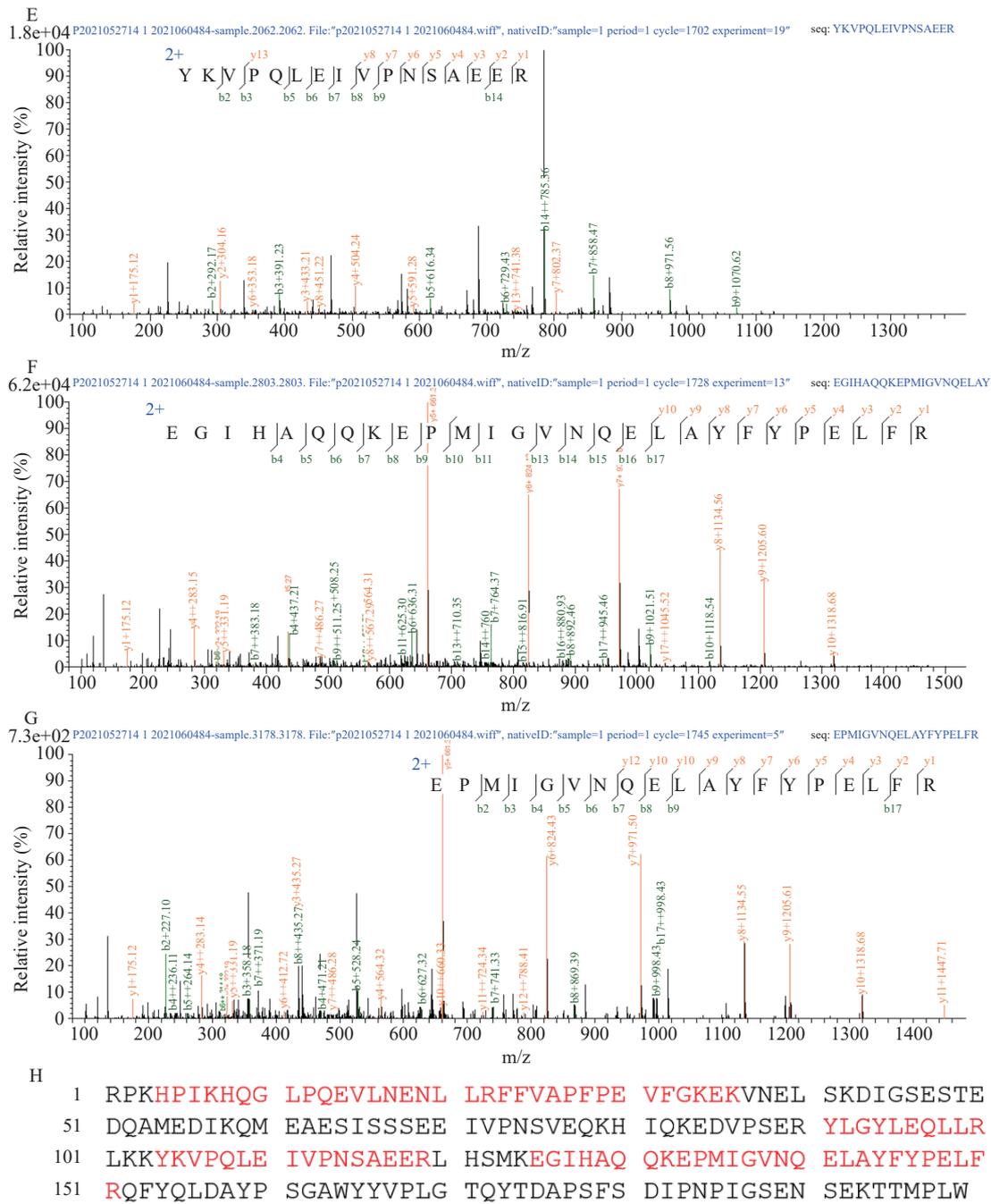


图 4 泳道 9(图 2A)的二级质谱图及其在 α_{S1} -酪蛋白氨基酸序列中的覆盖区域

Fig.4 Mass spectra and amino acid sequences in α_{S1} -casein of lane 9 (Fig.2A)

注: A~G 为蛋白二级质谱图; H 为氨基酸序列覆盖区域(红色)。

定图 2A 泳道 9 为 α_{S1} -酪蛋白。

2.4 牛乳 α_{S1} -酪蛋白的冻干样品纯度分析

虽然综合 α_{S1} -酪蛋白的理化性质、免疫学反应性、质谱技术等方法的结果确定 D 峰为 α_{S1} -酪蛋白, 但 D 峰左侧样品中仍然含有少量 α_{S2} -酪蛋白(图 2, 泳道 8)。因此, 为了提高 α_{S1} -酪蛋白的纯度, 通过 SDS-PAGE 分析第 75~83 管样品(D 峰, 297~332 min)中 α_{S1} -酪蛋白的纯度, 结果如图 5A 所示。D 峰样品中 α_{S1} -酪蛋白的纯度随出峰时间推移, 纯度先升高后下降, 泳道 1~3 中含有少量 α_{S2} -酪蛋白, 而泳道 8 和 9 的 α_{S1} -酪蛋白含量较少。因此, 收集 78~81 管样品

(泳道 4~7)进行透析。另外, 由于酪蛋白的水溶性较差^[31], 当透析除去尿素后, 大部分 α_{S1} -酪蛋白会析出形成沉淀, 只有少量 α_{S1} -酪蛋白和 α_{S2} -酪蛋白会溶解在水中。因此, 为了进一步除去 α_{S2} -酪蛋白, 提高 α_{S1} -酪蛋白的纯度, 对透析后的样品进行离心, 并收集沉淀进行冷冻干燥。最终, 200 mg 酪蛋白可分离获得 21.75 mg α_{S1} -酪蛋白, 按 α_{S1} -酪蛋白占酪蛋白的 40% 计算, α_{S1} -酪蛋白的纯化得率为 27.19%。冻干样品的纯度如图 5B 所示, 泳道 1 基本是 α_{S1} -酪蛋白, 几乎不含 α_{S2} -酪蛋白和其他牛乳蛋白, ImageJ 软件灰度分析显示 α_{S1} -酪蛋白的纯度高达 94.26%。

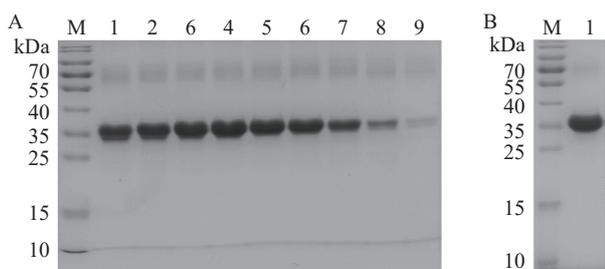


图5 α_{S1} -酪蛋白透析前后的 SDS-PAGE 图

Fig.5 SDS-PAGE profile of α_{S1} -casein before and after dialysis
注: A: 泳道 1~9 依次是第 75~83 管样品; B: 泳道 1 是第 78~81 管样品冻干后的 α_{S1} -酪蛋白。

国内外分离纯化 α_{S1} -酪蛋白的部分研究结果如表 1 所示, 本文和 Treweek 等^[17] 均采取了质谱技术等方法从多方面综合确证了所纯化的蛋白质为 α_{S1} -酪蛋白, 也有些研究以标准品或有证标准物质作为参考来鉴定所纯化的 α_{S1} -酪蛋白^[12, 18], 但它们均未提供 α_{S1} -酪蛋白的电泳图, 未能给相关研究提供更直观的参考。虽然大部分报道均认为 α_{S1} -酪蛋白在 SDS-PAGE 中的位置高于 α_{S2} -酪蛋白, 但 α_{S1} -酪蛋白的具体位置却存在一定差异, 结果如表 1 所示。然而, 也有部分研究仅根据酪蛋白分子量来判断 α_{S1} -酪蛋白

在 SDS-PAGE 中的理论位置, 并认为 α_{S1} -酪蛋白 (23.6 kDa) 的位置低于 α_{S2} -酪蛋白 (25.2 kDa)^[9] 或 β -酪蛋白 (24.0 kDa)^[10], 结果均与其他研究报道的不一致(表 1), 表明仅依据分子量是难以准确判断 α_{S1} -酪蛋白的纯化结果。此外, 本研究所纯化的 α_{S1} -酪蛋白的纯度也高于大部分报道的纯度(表 1), 并对其进行了综合鉴定(图 2~4), 也展示了 α_{S1} -酪蛋白的阴离子交换层析图谱(图 1)及其电泳图(图 2 与图 5), 可为相关研究提供直观的参考。

2.5 兔抗牛乳 α_{S1} -酪蛋白多克隆抗体的免疫学性质分析

首先, 通过方正滴定法确定最佳抗原包被浓度和二抗稀释倍数, α_{S1} -CN 的包被浓度梯度为 4、2、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$; A 兔的二免血清稀释梯度为 5000 倍、1 万倍、2 万倍、4 万倍、8 万倍和 16 万倍, 同时以 A 兔的阴性血清作为阴性对照; 二抗的稀释梯度为 5000 倍和 1 万倍, 选取 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值为 1.0 左右的抗原浓度和二抗稀释倍数为后续实验的工作浓度。根据表 2 结果可知, 当 α_{S1} -酪蛋白的被浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 一抗稀释 2 万倍, 二抗稀释 5000 倍时, $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值为 1.003。因此, α_{S1} -酪蛋白的最佳包被浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 二抗的最佳稀释度为 5000 倍。

表 1 α_{S1} -酪蛋白不同分离纯化方法的对比

Table 1 Comparison of different methods for purifying α_{S1} -casein

纯化方法	在酪蛋白 SDS-PAGE 图中的位置	鉴定依据/方法	纯度	参考文献
DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析	最高, 位于 35 kDa 左右	理化性质、免疫学技术、质谱技术	94.26% (α_{S1} -酪蛋白)	本研究
DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析	第二高(低于 α_{S2} -酪蛋白), 略低于 35 kDa	SDS-PAGE(分子量)	—	[9]
DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析	第二高(低于 β -酪蛋白), 略低于 26 kDa	SDS-PAGE(分子量)	—	[10]
等电点沉淀法+HiPrep 16/10 DEAE-FF 阴离子交换层析	α_{S1} -酪蛋白高于 α_{S2} -酪蛋白, 位于 20~31 kDa 之间	理化性质	—	[8]
Q-Sepharose 阴离子交换层析	α_{S1} -酪蛋白高于 α_{S2} -酪蛋白	质谱技术、分子排阻色谱法、远紫外光谱	—	[17]
TSK-Gel Ether-5PW 疏水作用层析	—	有证标准物质	—	[18]
Q-Sepharose FF 阴离子交换层析	—	标准品	66.84% (α_S -酪蛋白)	[12]
尿素沉淀+Q-Sepharose FF 阴离子交换层析	—	标准品	75.4% (α_S -酪蛋白)	[12]
膜分离+选择性沉淀法	—	—	61% (α_S -酪蛋白)	[32]

注: “—”表示无相关数据。

表 2 间接 ELISA 确定 α_{S1} -酪蛋白最佳抗原包被浓度和二抗稀释倍数

Table 2 Determination of the best antigen coating concentration of α_{S1} -casein and dilution multiple of HRP-IgG by indirect ELISA

一抗稀释倍数	血清类型	二抗稀释5000倍											
		5000	1万	2万	4万	8万	16万	5000	1万	2万	4万	8万	16万
4	P	2.744	2.164	1.441	0.793	0.403	0.205	1.794	1.293	0.753	0.452	0.232	0.148
	N	0.075	0.059	0.054	0.048	0.049	0.049	0.056	0.052	0.049	0.051	0.059	0.074
2	P	2.759	2.085	1.331	0.722	0.397	0.203	1.743	1.276	0.773	0.445	0.245	0.165
	N	0.072	0.060	0.053	0.050	0.047	0.048	0.057	0.056	0.065	0.062	0.067	0.078
1	P	2.609	1.885	1.194	0.682	0.312	0.180	1.627	1.168	0.729	0.416	0.243	0.136
	N	0.069	0.060	0.054	0.051	0.049	0.051	0.061	0.064	0.064	0.069	0.070	0.075
0.5	P	2.285	1.476	1.003	0.468	0.277	0.154	1.367	0.894	0.527	0.332	0.177	0.127
	N	0.072	0.068	0.058	0.053	0.052	0.061	0.070	0.073	0.063	0.071	0.064	0.079

注: P为A兔的二免阳性血清, N为A兔的阴性血清。

根据方正滴定法确定的 α_{S1} -酪蛋白包被浓度和二抗稀释度,利用间接 ELISA 监测 A 兔和 B 兔在免疫过程中抗血清效价的变化,结果如图 6 所示。经过 5 次免疫后,A 兔和 B 兔的最终效价分别为 128 万和 32 万。A 兔的效价更高,用于后续实验。

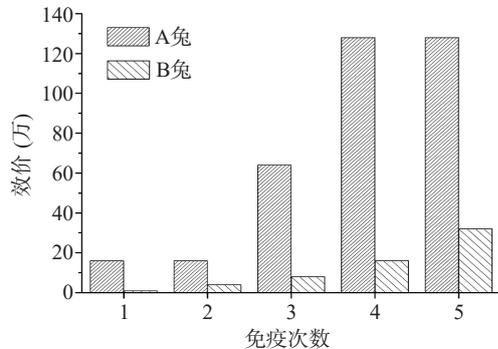


图 6 A 兔和 B 兔的血清效价

Fig.6 The serum titre of rabbit A and rabbit B

以 α_{S1} -酪蛋白为包被抗原,以 α_{S1} -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、蛋清蛋白、花生蛋白、大豆蛋白为竞争蛋白,通过竞争抑制 ELISA 分析 pAb- α_{S1} -CN 的特异性,结果如图 7 所示。 α_{S1} -酪蛋白半抑制浓度 (50% inhibition concentration, IC_{50}) 为 2.38 $\mu\text{g/mL}$,除了与大豆蛋白有轻微交叉反应外,与其他 4 种竞争蛋白均无交叉反应。国内外研究从氨基酸序列对比、动物实验、过敏患者血清实验等方面也证实 α_{S1} -酪蛋白与大豆蛋白(如 Gly m 5、P34 等)存在交叉反应^[30, 33-35]。在本研究中,当大豆蛋白浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑制率为 14.41%,低于 α_{S1} -酪蛋白浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时的 17.52%。由此可推测 pAb- α_{S1} -CN 与大豆蛋白的交叉反应率低于 0.25%。因此,所制备的 pAb- α_{S1} -CN 具有高特异性。

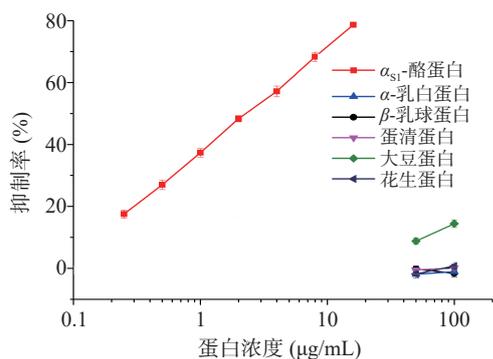


图 7 pAb- α_{S1} -CN 与食物过敏原蛋白的交叉反应 (n=3)

Fig.7 Cross-reactivity of pAb- α_{S1} -CN with food allergen proteins (n=3)

3 结论

本研究采用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析对牛乳 α_{S1} -酪蛋白进行了分离纯化,结合酪蛋白的理化性质、SDS-PAGE、免疫学技术和质谱技术对纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行了综合鉴定,结果表明在 4 种酪蛋白中, α_{S1} -酪蛋白的出峰时间最晚、峰面

积最大,在 SDS-PAGE 中的位置最高。利用酪蛋白不易溶于水的特点,进一步通过透析除去样品中的微量 α_{S2} -酪蛋白,最终获得了纯度高达 94.26% 的 α_{S1} -酪蛋白,纯化得率为 27.19%。所制备的兔抗 α_{S1} -酪蛋白多克隆抗体除了与大豆蛋白存在轻微交叉反应 (<0.25%) 外,与其他过敏原蛋白没有交叉反应,表明具有高特异性。本研究对纯化的 α_{S1} -酪蛋白进行了综合确证,并获得了高纯度的 α_{S1} -酪蛋白及其高特异性多克隆抗体,将为 α_{S1} -酪蛋白免疫学检测方法的建立提供物质基础,也为其他过敏原蛋白的分离纯化与鉴定提供参考方法。

参考文献

- [1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 41-58.
- [2] LUYT D, BALL H, MAKWANA N, et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2014, 44(5): 642-672.
- [3] ZENG G Q, LUO J Y, HUANG H M, et al. Food allergy and related risk factors in 2540 preschool children: An epidemiological survey in Guangdong Province, southern China[J]. *World Journal of Pediatrics*, 2015, 11(3): 219-225.
- [4] SUN X X, ZHAO J W, WANG Q Y, et al. Prevalence of allergen sensitization among 15534 patients with suspected allergic diseases in Henan Province, China[J]. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2019, 37(2): 57-64.
- [5] MEULENBROEK L A, OLIVEIRA S, DEN HARTOG JAGER C F, et al. The degree of whey hydrolysis does not uniformly affect *in vitro* basophil and T cell responses of cow's milk-allergic patients[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2014, 44(4): 529-539.
- [6] LISSON M, NOVAK N, ERHARDT G. Immunoglobulin E epitope mapping by microarray immunoassay reveals differences in immune response to genetic variants of caseins from different ruminant species[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(4): 1939-1954.
- [7] HOCHWALLNER H, SCHULMEISTER U, SWOBODA I, et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention[J]. *Methods*, 2014, 66(1): 22-33.
- [8] 夏薇,张帆,赖莹,等.低聚半乳糖糖基化法降低牛乳 α_{S1} -酪蛋白抗原性和免疫原性[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(1): 50-53. [XIA Wei, ZHANG Fan, LAI Ying, et al. Reduce the antigenicity and immunogenicity of bovine α_{S1} -casein by conjuncted with galactooligosaccharide[J]. *Food and Nutrition in China*, 2011, 17(1): 50-53.]
- [9] 汝成业.酶法降低牛乳 α_{S1} -酪蛋白致敏性[D].无锡:江南大学, 2015. [RU Chengye. Enzymatic hydrolysis of milk α_{S1} -casein for allergenicity reduction[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.]
- [10] 欧阳逸斌.牛奶酪蛋白各组分与大豆蛋白交叉过敏反应研究[D].长沙:中南大学, 2012. [OUYANG Yibin. Study on the cross-reaction between components of casein and soy protein[D]. Changsha: Central South University, 2012.]

- [11] 刘法辉. 牛乳中 β -酪蛋白构象性表位定位研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011. [LIU Fahui. Conformational epitopes mapping of bovine β -casein[D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.]
- [12] 刘纳. 酪蛋白组分分离、纯化研究[D]. 成都: 西华大学, 2010. [LIU Na. Studies on fractionation and purification of casein individuals[D]. Chengdu: Xihua University, 2010.]
- [13] CHO Y J, PARK J H, CHUNG G Y, et al. Facile identification and isolation of protease using SDS-PAGE and zymography[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2020, 25(2): 164–169.
- [14] YANG Y, CHEN Z W, HURLBURT B K, et al. Identification of triosephosphate isomerase as a novel allergen in *Octopus fangsiao*[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 85: 35–46.
- [15] REN J, HE W, LI C, et al. Purification and identification of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* XB-1[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(10): 150.
- [16] CREAMER L K, RICHARDSON T. Anomalous behavior of bovine α_{S1} - and β -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1984, 234(2): 476–486.
- [17] TREWEEK T M, THORN D C, PRICE W E, et al. The chaperone action of bovine milk α_{S1} - and α_{S2} -caseins and their associated form α_{S} -casein[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 510(1): 42–52.
- [18] BRAMANTIE, SORTINO C, RASPI G. New chromatographic method for separation and determination of denatured α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 958(1–2): 157–166.
- [19] EHRENBERG A E, KLINGEBIEL C, OSTLING J, et al. Characterization of a 7 kDa pollen allergen belonging to the gibberellin-regulated protein family from three Cupressaceae species[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2020, 50(8): 964–972.
- [20] OGINO R, CHINUKI Y, YOKOOJI T, et al. Identification of peroxidase-I and β -glucosidase as cross-reactive wheat allergens in grass pollen-related wheat allergy[J]. *Allergology International*, 2021, 70(2): 215–222.
- [21] MADRID R, GARCIA-GARCIA A, CABRERA P, et al. Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two ELISA methods and real time PCR[J]. *Foods*, 2021, 10(2): 440.
- [22] 刘玉敏, 梁占丽, 李兆杰, 等. 基于虾类原肌球蛋白共同表位肽抗体的过敏原检测方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3963–3968. [LIU Yumin, LIANG Zhanli, LI Zhaojie, et al. Rapid detection of shrimp allergens based against the polyclonal antibodies of shrimp tropomyosin common peptide epitopes[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(10): 3963–3968.]
- [23] LI S Y, LIN H, HUANG J L, et al. Preparation of soybean β -conglycinin epitope antibody and its preliminary application in frozen surimi detection[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247(6): 1411–1423.
- [24] HE S F, LI X, GAO J Y, et al. Preparation, immunological characterization and polyclonal antibody development for recombinant epitope tandem derived from bovine β -lactoglobulin[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2016, 27(6): 806–819.
- [25] SCHOCKER F, SCHARF A, KULL S, et al. Detection of the peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6 in human breast milk: Development of 2 sensitive and specific sandwich ELISA assays[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2017, 174(1): 17–25.
- [26] BOSE U, BROADBENT J A, JUHASZ A, et al. Protein extraction protocols for optimal proteome measurement and arginine kinase quantitation from cricket *Acheta domesticus* for food safety assessment[J]. *Food Chemistry*, 2021, 348: 129110.
- [27] BIAN Y, ZHENG R, BAYER F P, et al. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by microflow LC-MS/MS[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 157.
- [28] 胡玲萍, 张晓梅, 张鸿伟, 等. 利用高效液相色谱-飞行时间质谱和高效液相色谱-三重四级杆质谱检测南美白对虾的过敏原[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(4): 232–238. [HU Lingpin, ZHANG Xiaomei, ZHANG Hongwei, et al. Determination of allergens of *Litopenaeus vannamei* by HPLC-QToF and triple quadrupole mass spectrometer[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(4): 232–238.]
- [29] BAUNOCH D A, DAS P, BROWNING M E, et al. R-ELISA: Repeated use of antigen-coated plates for ELISA and its application for testing of antibodies to HIV and other pathogens[J]. *Biotechniques*, 1992, 12(3): 412–417.
- [30] 丛艳君, 吕晓哲, 李晔, 等. 牛乳 α_{S1} -酪蛋白与大豆蛋白交叉过敏原的识别鉴定[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 70–75. [CONG Yanjun, LÜ Xiaozhe, LI Ye, et al. Identification and characterization of cross-reactive allergens between cow milk α_{S1} -casein and soybean proteins[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 70–75.]
- [31] VILLA C, COSTA J, OLIVEIRA M B P P, et al. Bovine milk allergens: A comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(1): 137–164.
- [32] THIENEL K J F, HOLDER A, SCHUBERT T, et al. Fractionation of milk proteins on pilot scale with particular focus on β -casein[J]. *International Dairy Journal*, 2018, 79: 73–77.
- [33] CANDREVA A M, FERRER-NAVARRO M, BRONSOMS S, et al. Identification of cross-reactive B-cell epitopes between Bos d 9.0101 (*Bos Taurus*) and Gly m 5.0101 (*Glycine max*) by epitope mapping MALDI-TOF MS[J]. *Proteomics*, 2017, 17(15–16): 1700069.
- [34] CANDREVA A M, SMALDINI P L, CURCIARELLO R, et al. Cross-reactivity between the soybean protein p34 and bovine caseins[J]. *Allergy Asthma & Immunology Research*, 2015, 7(1): 60–68.
- [35] CANDREVA A M, SMALDINI P L, CURCIARELLO R, et al. The major soybean allergen Gly m Bd 28K induces hypersensitivity reactions in mice sensitized to cow's milk proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(7): 1590–1599.