

东亚飞蝗主要过敏原精氨酸激酶基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定*

陈义昆¹ 邬玉兰² 李 荔¹ 连国云² 刘志刚^{1,2 **}

(1. 深圳大学生命科学学院 深圳 518060; 2. 深圳大学医学院 深圳 518060)

摘 要 本研究克隆了东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 精氨酸激酶 (arginine kinase, AK) 基因全长, 表达并纯化重组 AK 蛋白, 研究重组蛋白的免疫反应性。东亚飞蝗 AK 基因开放阅读框全长为 1 068 bp, 编码 355 个氨基酸, 与 GenBank 中已登录的东亚飞蝗 AK (DQ513322) 基因同源性为 98%, 重组质粒 pET-28a-AK 在 *E. coli* 中获得高效表达, 重组蛋白相对分子质量 (Mr) 约为 40 000, 主要以可溶性形式表达, 经亲和层析获得重组蛋白。通过免疫印迹分析结果表明, 重组 AK 蛋白可被过敏性患者血清识别, 免疫原性良好。结果表明我们成功获得东亚飞蝗精氨酸激酶全长基因并表达出重组 AK 蛋白, 重组 AK 蛋白具有良好的免疫反应性。

关键词 东亚飞蝗, 精氨酸激酶, 过敏原, 克隆表达, 纯化

Cloning, expression and purification of arginine kinase from *Locusta migratoria manilensis* and its allergic activity

CHEN Yi-Kun¹ WU Yu-Lan² LI Li¹ LIAN Guo-Yun² LIU Zhi-Gang^{1,2 **}

(1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract This investigation aimed to clone the *Locusta migratoria manilensis* arginine kinase (AK) gene, produce its recombinant protein and investigate the protein's allergenicity. The cDNA of AK was cloned, using specific primers, from the total RNA of *L. m. manilensis*. The cloned gene was inserted into pMD18-T vector and digested by EcoR I and Xho I. The cDNA was sequenced and subcloned into a pET-28a expression vector. The cloned AK cDNA gene was expressed in *Escherichia coli* Rosetta by IPTG induction. The recombinant AK (rAK) was purified by metal (Ni^{2+}) chelating affinity chromatography. Its allergenicity was examined by Western blotting. The cloned cDNA ORF sequence contained 1 068 bp and encoded 355 amino acids. Its sequence homology with the published sequence (Accession no. DQ513322) was 98% at nucleotide level. The allergen rAK was highly expressed in *E. coli* as a soluble protein with a molecular weight of about Mr 40 000 under induction with IPTG and purified by a 6-His-tag purification system. Under both non-denaturalization and denaturalization conditions, the recombinant allergen was identified by its affinity to IgE antibodies from the cockroach-allergic patient sera by Western blotting. It is concluded that recombinant arginine kinase with proper allergenicity was successfully obtained.

Key words *Locusta migratoria manilensis*, arginine kinase, allergen, gene expression, purification

东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 属直翅目 (Orthoptera), 蝗科 (Acrididae) (占昌寿, 2009)。其寄主主要为麦类、玉米、水稻、高粱等禾本科植物; 也可为棉花、蔬菜及大豆等农作物。在我国分布北起河北、山西、陕西, 南至福建、广东、海南、广西、云南, 东达沿海各省, 西至四

川、甘肃南部、黄淮海地区常发 (占昌寿, 2009)。据统计, 蝗科共有 859 种, 能入药供食用的主要有两种, 即东亚飞蝗和中华稻蝗, 这两种蝗虫营养丰富, 肉质松软、鲜嫩, 味美如虾, 据《飞蝗之研究》和《飞蝗的饲料价值》等书介绍, 蝗虫富含蛋白质、碳水化合物、昆虫激素等活性物质, 并含有维生素

* 资助项目: 国家 863 计划; No. 2006AA10Z236; 深圳市科技计划项目。

** 通讯作者, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-30, 接受日期: 2012-05-28

A、B、C 和磷、钙、铁、锌、锰等微量元素,蝗虫不但是美味佳肴,而且还是治病良药,有暖胃助阳,健脾消食,祛风止咳之功效。但过敏体质的人则不宜食用蝗虫,因为蝗虫作为一种特异性的过敏原,作用于具有过敏性体质的人,除了引起休克外,还常常伴有喉头水肿、气管痉挛、肺水肿等并发症,山东省就曾报道过过敏体质人群食用蝗虫后休克的病例(郝玉珍,2001)。

蝗虫中的精氨酸激酶是导致过敏病人过敏的一种重要的过敏原,本研究通过克隆东亚飞蝗精氨酸激酶基因,构建表达载体,表达并纯化精氨酸激酶,研究其免疫原性。以期为蝗虫过敏原的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

东亚飞蝗由中国农业科学院植物保护研究所(北京)提供。克隆载体 pMD18-T SimpleVector、表达载体 pET-28a(+)均购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),大肠埃希菌(*E. coli*)菌种 Top10 和 Rosetta 由呼吸疾病国家重点实验室深圳大学变态反应分室保存。昆虫过敏病人的血清由深圳市儿童医院提供。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司,cDNA 合成试剂盒(AMV first strand cDNA synthesis kit)购于美国 Bio Basic Inc.(BBI 公司)。克隆所用的特异性引物由华大基因研究院(深圳)合成。琼脂糖凝胶回收试剂盒[Gel Extraction Kit(50) D2500-01]以及质粒提取试剂盒[Plasmid Mini Kit I(100) D6943-01]均购于美国 OMEGA 公司。*Ex-Tap* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、*T4* DNA 连接酶以及 DL2000DNA Marker 购于 TaKaRa 公司。Ni-NTA matrix 及柱子购于 Amersham Pharmacia 公司。二抗羊抗人 IgE 购于 KPL 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计及合成 从 GenBank 上下载东亚飞蝗主要过敏原精氨酸激酶基因的核苷酸序列(基因登录号为 DQ513322)。利用 GeneTool 软件设计并合成特异性引物(由华大基因研究院合成),上游引物为 5' CGGAATTCATGTTGATGCTGCAGT3',下游引物为

5' CCCTCGAGTTACAGAGTGCCTTCAATCT 3',其中分别插入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点以及保护碱基。

1.3.2 东亚飞蝗总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

取一只东亚飞蝗于液氮下充分研磨,然后称取大约 100 mg 左右研磨后的样品于 RNase Free 离心管中,按照 Qiagen 公司试剂盒说明书提取总的 RNA,采用美国 Bio Basic Inc.(BBI 公司) cDNA 合成试剂盒(AMV first strand cDNA synthesis kit),以总的 RNA 为模板反转录合成 cDNA,以合成的 cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应的条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72℃ 完全延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳来检测 PCR 产物,并切胶回收。

1.3.3 RT-PCR 产物的克隆和测序 利用 *T4* DNA 连接酶将回收纯化的 RT-PCR 产物与 pMD18-T 载体连接(连接条件:16℃ 过夜),将连接产物转入经 CaCl_2 处理的感受态细胞 *E. coli* Top 10 克隆菌中,通过含氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板进行抗氨苄筛选,挑取阳性菌落(即含重组质粒),并通过 LB 液体培养基进行扩增及质粒提取,并对质粒进行双酶切(*EcoR* I 和 *Xho* I)鉴定,对双酶切合理的质粒进行测序(由上海生工完成)。

1.3.4 表达载体的构建以及测序 测序正确的 pMD18-T 质粒与原核表达载体 pET-28a(+)分别进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,并将获得的目的基因片段和切开的 pET-28a(+)载体进行胶回收,利用 *T4* DNA 连接酶将回收产物相互连接,构建重组表达载体。将重组质粒转入 *E. coli* Top 10 中,通过含卡纳霉素(KaNa)的 LB 平板进行抗卡纳筛选,挑取阳性质粒,进行双酶切鉴定,并对阳性克隆菌通过测序来鉴定。

1.3.5 重组精氨酸激酶蛋白在 *E. coli* Rosetta 中的表达 将重组表达载体转化到 *E. coli* Rosetta 中,转化成功后挑取抗 KaNa 阳性菌落于 20 mL LB 液体培养基中,37℃、180 r/min 过夜培养。次日将上述培养液倒入 1 L 灭菌的新鲜的 LB 液体培养基中,加入 1 mL 卡纳青霉素进行二活,培养一段时间后,测菌液的 OD 值,600 nm 波长下菌液 OD 值为 0.6 时,取 1 mL 菌液作为诱导前的对照,然后加入 1 mL IPTG 进行诱导 4 h,诱导后也取 1 mL 菌液作为诱导后的对照,分别将诱导前、诱导

后菌液进行离心,弃上清,并分别用 1 mL 去离子水清洗,离心弃上清(重复 2 次),再用 80 μ L 纯净水重悬菌体。

将上述诱导后的 1 L 菌液离心,弃上清,沉淀用 PBS(pH 7.6)溶解,溶解后超声破碎,超声 20 min 左右离心,再将沉淀和上清分装。沉淀先用 1 mL 去离子水清洗,离心弃上清(重复 2 次),再用 80 μ L 去离子水重悬,然后将诱导前、诱导后、上清和沉淀各 80 μ L 中分别加入 20 μ L Loading Buffer,再用 SDS-PAGE 检测其表达情况以及表达产物的可溶性。

1.3.6 重组精氨酸激酶蛋白的纯化 取超声后的上清(或沉淀),采用 Ni^{2+} 柱亲和和层析法(FPLC)纯化目的蛋白。先将 Ni^{2+} 螯合到琼脂糖凝胶层析柱上,再用平衡液平衡柱子,然后用 40、300 mmol/L 的咪唑进行洗脱,分别收取洗脱峰液,SDS-PAGE 检测纯化结果。

1.3.7 免疫印迹检测重组精氨酸激酶蛋白的免疫原性 将纯化好的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转到硝酸纤维素膜(NC 膜)上。取下转完的膜于 2% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液中 4℃ 封闭过夜;与 1:5 倍稀释的过敏病人的阳性血清 37℃ 孵育 2 h;加入经 TBST 稀释(1:2 000)生物素标记的羊抗人 IgE,37℃ 孵育 2 h;再加入经 HRP 标记的链霉亲和素(按 1:2 000 稀释),37℃ 孵育 1.5 h;以上每个步骤进行完后都用 TBST 清洗 3 次(5 min/次)。最后用 DAB 试剂盒显色分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

东亚飞蝗总 RNA 与设计的特异性引物进行 RT-PCR 扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳来检测扩增产物,结果如图 1 所示。在 1 070 bp 左右有一条亮带,大小与理论值相符。

2.2 克隆载体 pMD18-T-AK 的构建

将上述凝胶电泳产物进行胶回收,回收产物与 pMD18-T 载体连接,并将连接产物转入克隆菌 *E. coli* Top 10 中,通过抗 Amp 的 LB 培养基筛选,挑取单菌落进行扩增,提质粒并做双酶切鉴定,目的条带与 RT-PCR 结果一致(图 2),且测序结果与 GenBank 上基因序列一致。

2.3 序列分析及其同源性分析

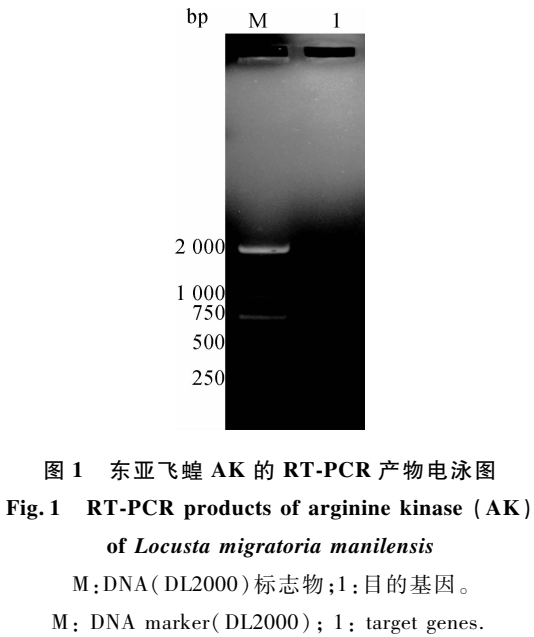


图 1 东亚飞蝗 AK 的 RT-PCR 产物电泳图
Fig. 1 RT-PCR products of arginine kinase (AK) of *Locusta migratoria manilensis*
M: DNA (DL2000) 标志物; 1: 目的基因。
M: DNA marker (DL2000); 1: target genes.

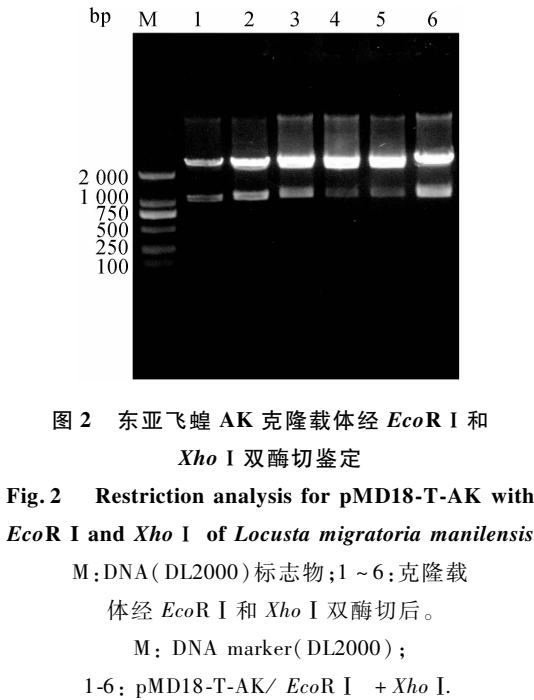


图 2 东亚飞蝗 AK 克隆载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定
Fig. 2 Restriction analysis for pMD18-T-AK with *EcoR* I and *Xho* I of *Locusta migratoria manilensis*
M: DNA (DL2000) 标志物; 1~6: 克隆载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后。
M: DNA marker (DL2000);
1-6: pMD18-T-AK/ *EcoR* I + *Xho* I.

克隆得到的东亚飞蝗精氨酸激酶基因由 1 068 个碱基组成(包含终止密码子),推导其编码 355 个氨基酸(图 3)。在 Genebank 中的登录号为 DQ513322。将测序所得基因序列通过 NCBI 数据库中的 BLAST 进行序列比对,同时推导其相对应的氨基酸序列,将所得的克隆推导出的氨基酸序列与数据库中已知的精氨酸基因的氨基酸序列进行比对,分析其同源性。结果表明:克隆的东亚飞

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AK  atggttgatgctgagtgctggagaaattggaggccggcttcaagaagcttgaagcctccgacagcaaatctctgtggaagaagtacctg 90
    M V D A A V L E K L E A G F K K L E A S D S K S L L K K Y L

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
AK  T R E V F D Q L K T K K T S F G S T L L D C I Q S G L E N H 180
    -----
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
AK  gaotctggtcttgatctatctgctgcatgctgaggaataccagcttttctgtgacctgtttgaccccatcttgaggattaccatggt 270
    D S G V G I Y A P D A E A Y T V F A D L F P D P I I E D Y H G

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
AK  ggcttcaagaagaactgataagcaacccacccaagaactcctggctgacgtttgacacgttggcgcaacctagaccccaatggtggaatcgctcatt 360
    G F K K K T D K H P P K N F G D V D T L G N L D P N G E Y V I

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AK  tccactcgtctgtctgctgctgcaatgcaagggttaccacatttaaccccttggctgacggaggacagcttcaagaagaatggacaacagaaa 450
    S T R V R C G R S M Q G Y P F N P C L T E A Q Y K E M E Q K

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
AK  -----
    V S T T L S G L E G E L K G Q F Y P L T G M S K E V Q Q K L 540
    -----
      550     560     570     580     590     600     610     620     630
AK  atttgatgccaactcctcgttccaaggaggtgacaggttccctggcaggctgccaatgctcgcagatactggcctctctgtctggtattttac 630
    I D D H F L F K E G D R F L Q A A N A C R Y W P S G R G I Y

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
AK  cacaatgacaaagaacactcctgttctggttgcgaatgaggaagacacacccctccgaatcattctsmatgcagcctggtggtgactggagacag 720
    H N D N K T F L V W C N E E D H L R I I S M Q P G G D L G G Q

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
AK  gttttacggcctctctgttgcagtgccgtgaaatggaaagcagattctctctgcagatgacagcttctgttcttccctcaaatctgtga 810
    V Y R R L V H A V N E I E K R I P F S H D D R L G F L T F C

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
AK  -----
    P T N L G T T L R A S V H I K L P K L A A D R A K L E E V A 900
    -----
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
AK  ggaaaaatttaacctccaggtccctggaaacacagaggtgacacacagagcctgagggctggtgtatatgatatttctacaagaggcgagctg 990
    G K F N L Q V R G T R G E H T E A E G G V Y D I S N K R M

      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060
AK  ggccttacagagtaacgatgctgtgaaggaaatgaatgatggcactcctggagctcctcaagatttgaaaggaactctgttaa 1068
    G L T E Y D A V K E M N D G I L E L I K I E G T L *

```

图3 东亚飞蝗过敏原精氨酸激酶核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.3 cDNA sequence of allergen AK of *Locusta migratoria manilensis* and the deduced aminoacid sequence

```

      10      20      30      40      50      60
AK  MVDAAVLEKLEAGFKKLEASDSKSLKKYLTREVFQDLTKKTSFGSTLLDCIQSGLEN 59
DQ513322 .....N.....P..... 60
U77580 .....K.....P..... 60
HQ840714 .....TI.....S.Q.....K...A.N...-L.....V.. 59

      70      80      90      100     110     120
AK  HDSGVGIYAPDAEAYTVFADLFDPPIIEDYHGGFKTKDKHPPKNFGDVTLGNDLPNGEYV 119
DQ513322 .....F.....N..... 120
U77580 .....A..... 120
HQ840714 L.....N.....W...E.....A..F. 119

      130     140     150     160     170     180
AK  ISTRVRCGRSMQGYFPNCLTEAQYKEMEQRVSTTSLGLEGELKGFYPLTGMSKEVQQK 179
DQ513322 .....L.....K..... 180
U77580 .....S..... 180
HQ840714 V.....E.....E..AS.....T.....T..Q 179

      190     200     210     220     230     240
AK  LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPSGRGIYHNDNKTFLVWCNEEDHLRIISMQPGGDLG 239
DQ513322 .....F..... 240
U77580 .....F..... 240
HQ840714 .....F.....E.....L...M...K 239

      250     260     270     280     290     300
AK  QVYRRLVHAVNEIEKRIPFSHDDRLGFLTFCPTNLGTLRASVHIKLPKLAADRAKLEEV 299
DQ513322 ..... 300
U77580 .....T..... 300
HQ840714 ..K...T...D.....V.....K...I 299

      310     320     330     340     350
AK  AGKFNQLQVRGTRGEHTEAEGGVYDISNKRRLMGLTEYDAVKEMNDGILELIKIEGTGL 355
DQ513322 ..... 356
U77580 .....ST.....S. 356
HQ840714 .S.YH.....Y...A.....KS. 355

```

图4 东亚飞蝗精氨酸激酶同源性分析

Fig.4 Homology analysis of AK of *Locusta migratoria manilensis*

蝗精氨酸激酶基因与数据库中已知的东亚飞蝗 AK 基因(DQ513322)的同源性为 98%,与美洲蝗的 AK 基因(U77580)同源性为 97%,与斜纹夜蛾的 AK 基因(HQ840714)同源性为 88%(图 4)。

2.4 表达载体 pET-28a-AK 的构建

重组质粒 pET-28a-AK 经核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切后用琼脂糖核酸电泳进行鉴定,电泳结果表明,切出的目的条带大小在 1 000 bp 左右,与理论值 1 070 bp 相符,将阳性菌及其质粒进行测序,结果表明与 GenBank 上基因序列一致。

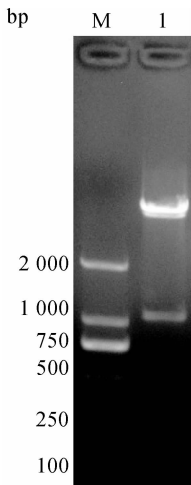


图 5 东亚飞蝗 AK 表达载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

Fig.5 Restriction analysis for pET-28a-AK with *EcoR* I and *Xho* I of *Locusta migratoria manilensis*

M: DNA(DL2000)标志物;

1:重组表达载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后。

M: DNA marker(DL2000);

1: pET-28a -AK/*EcoR* I + *Xho* I .

2.5 重组精氨酸激酶蛋白的诱导表达及分离纯化

将含有重组质粒的表达菌在终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 后,超声破碎,分别对诱导前、诱导 4 h 后、超声上清、超声沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示:目的蛋白在上清和沉淀都有表达。因此直接对超声后的上清进行亲和层析。将亲和层析后的咪唑洗脱峰以及诱导前、诱导后的溶液进行 SDS-PAGE,观察到单一条带。

2.6 重组精氨酸激酶蛋白的免疫活性鉴定

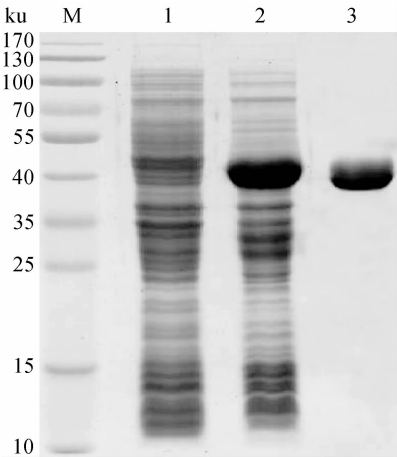


图 6 重组蛋白的诱导表达与纯化

Fig.6 Expression and purification of rAK

M:蛋白标志物; 1:诱导前; 2:IPTG 诱导后; 3:纯化后的重组蛋白。

M:protein marker; 1:*E. coli* Rosetta/pET-28a-AK before induction; 2:*E. coli* Rosetta /pET-28a-AK after induction; 3:purified recombinant AK.

Western Blotting 结果表明,在约 Mr 40 000 处有一条明显的条带(图 7),表明东亚飞蝗精氨酸激酶具有良好的免疫反应性。

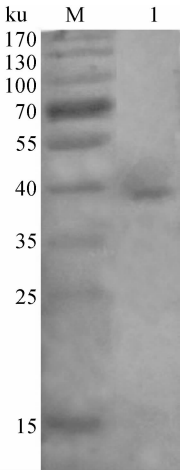


图 7 重组蛋白免疫印迹

Fig.7 Western Blotting of rAK

M:蛋白标志物;1:过敏病人混合血清。

M:protein marker; 1:sera of allergic patients.

3 讨论

过敏性疾病又被称作为变态反应性疾病,此

类病人的敏感性过高,在血液中产生一种对某种特殊过敏原过敏的特异性 IgE,而这种病人多半都有遗传倾向。过敏性疾病是临床上的常见病和多发病,被世界卫生组织(WHO)列为 21 世纪重点防治的 3 大疾病之一。世界变态反应组织对 30 个国家过敏性疾病的流行病学调查显示:这些国家的总人口中有 22% 的人患有过敏性疾病,其中包括过敏性鼻炎、哮喘、食物过敏、药物过敏以及结膜炎、湿疹等(Liu *et al.*, 2007; 易海涛等, 2010; 闫浩等, 2010), 其中的食物过敏也越来越广泛的受到人们的重视。随着人类生活水平的不断提高,人们对营养的需求也越来越高,野味昆虫日益成为人们非常喜爱的佳肴,高蛋白低脂肪的食品被广大消费者所青睐。昆虫资源成为当今人类开发利用的极其宝贵的资源,其中的东亚飞蝗是昆虫中可食用尤其是蛋白提取的主要资源之一,被列为“21 世纪安全绿色食品”。但蝗虫作为一种特异性的过敏原,过敏性体质的人食入后,除了会引起休克外,还常常伴有喉头水肿、气管痉挛等并发症。如果不及时做出明确诊断,采取有效急救措施,患者就可能有生命危险,故有必要对蝗虫过敏原进行深入研究。

精氨酸激酶是磷酸原激酶家族中的一员,于 1971 年首次发现,广泛的存在于无脊椎动物如昆虫、虾、蟹以及软体动物中,是能量代谢中最关键的酶,通过催化精氨酸和三磷酸腺苷之间的可逆性反应从而将能量存于磷酸精氨酸的高能磷酸键中分或者分解磷酸精氨酸来产生 ATP。精氨酸激酶作为过敏原的研究目前尚处于初级阶段, Binder 等(2001)对蛾类的精氨酸激酶进行了重组及一系列的免疫学研究,其中包括组胺释放、皮肤点刺以及免疫抑制等,并指出分子量为 40 ku 的蟑螂精氨酸激酶与尘螨、龙虾、对虾以及贝类有一定的交叉反应。Brown 和 Grossman (2004)纯化了蟑螂精氨酸激酶,并对其性质作了初步的研究。García-Orozco 等(2007)纯化了太平洋白虾的精氨酸激酶,并对其序列进行了扩增,指出其是首次报道的太平洋白虾过敏原。

无脊椎动物体内的精氨酸激酶是一种过敏原,国外已经验证虾、蛾等 AK 具有过敏原性(Marina *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003)。也早有报道称,由于肌肉组织内大量表达精氨酸激酶,使其成为甲壳类动物体内最重要的致敏原之一。部分

人食用虾蟹等甲壳类动物后,可能会发生过敏反应。还有少数人对美洲大蠊发生过敏反应,精氨酸激酶就是主要过敏原之一(Yu *et al.*, 2003)。通过本研究也证实蝗虫中所含的精氨酸激酶就是引起食物过敏的主要过敏原,因此对其研究显得尤为重要。通过本研究,能为制备标准化蝗虫过敏原奠定理论基础,同时也能对其他昆虫过敏原的研究有一定的借鉴意义。

参考文献 (References)

- Binder M, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Scholler M, Prozell S, Wiedermann G, Valent P, Valenta R, Duchêne M, 2001. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J. Immunol.*, 167(9):5470–5477.
- Brown AE, Grossman SH, 2004. The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 57(4):166–177.
- García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR, 2007. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 144(1):23–28.
- Liu ZG, Bai Yu, Ji Kunmei, Liu XY, Cai CY, Yu HQ, LiM, Bao Y, Lian YY, Gao B, 2007. Detection of dermatophagoides farinae in the dust of air conditioning filters. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 144(1):85–90.
- Marina B, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Scholler M, Prozell S, Wiedermann G, Valent P, Valenta R, Duchêne M, 2001. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J. Immunol.*, 167(9):5470–5477.
- Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP, 2003. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J. Immunol.*, 170(1):445–453.
- 郝玉珍, 2001. 食蝗虫致过敏性休克 1 例报告. 医学文选, 20(6):906–906.
- 闫浩, 鄒玉兰, 夏立新, 刘志刚, 2010. 牛乳中主要过敏原 α -乳白蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建. 江西师范大学学报:自然科学版, 34(3):244–248.
- 易海涛, 刘志刚, 闫浩, 刘芳, 赵郭存, 夏立新, 2010. 花生过敏原 Ara h2. 02 的克隆、表达及免疫学鉴定. 江西师范大学学报:自然科学版, 34(5):531–535.
- 占昌寿, 2009. 东亚飞蝗综合防治技术及常用防治药剂的比较. 农技服务, 26(5):93–94.