

经基因工程改造的花生主要过敏原 *Ara h 2* 制备及其低致敏原性鉴定

易海涛^{1,2}, 刘芳³, 贾梦阳⁴, 汤慕瑾⁵, 曹小勇⁶, 夏立新^{2,4*}, 刘志刚^{2,4*}

(1. 深圳大学 生命科学学院, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学 医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060; 3. 新疆华世丹药业股份有限公司 新疆 乌鲁木齐 830000; 4. 深圳大学 医学院 广东 深圳 518060; 5. 深圳市出入境检验检疫局 广东 深圳 518045; 6. 福田区妇幼保健院 广东 深圳 518000)

摘要: 构建经基因工程改造的 *Ara h 2* 表达载体, 表达并纯化该蛋白, 鉴定其过敏原性。将花生主要过敏原 *Ara h 2* 基因序列进行颠换, 并将颠换后的序列进行合成, 再将合成后的基因克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 上, 然后转入 *Origami* 宿主表达菌中; 利用 Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) 诱导表达; 通过 Ni²⁺ 亲和层析纯化目的蛋白; Western blotting 和 ELISA 鉴定该重组蛋白的过敏原性。测序结果表明合成后的序列成功整合到原核表达载体 pET-32a(+) 上。重组的目的蛋白纯化后经 SDS-PAGE 鉴定, 蛋白大小与理论值相符。Western blotting 和 ELISA 结果均表明经基因工程改造的 *Ara h 2* (F-Ara h 2) 蛋白与重组的 *Ara h 2* (R-Ara h 2) 蛋白相比, 结合花生过敏患者混合血清中 IgE 显著降低。成功构建经基因工程改造的 *Ara h 2* 表达载体, 初步的体外实验表明该基因表达的重组蛋白具有低致敏原性。

关键词: 基因工程; 花生; 过敏原; *Ara h 2*; 低致敏

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0993-06

Preparation and Characterization of the Genetically Engineered Hypoallergenic Derivative of the Major Peanut Allergen *Ara h 2*

YI Hai-tao^{1,2}, LIU Fang³, JIA Meng-yang⁴,
TANG Mu-jing⁵, CAO Xiao-yong⁶, XIA Li-xin^{2,4*}, LIU Zhi-gang^{2,4*}

(1. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 3. Xinjiang Huashidan Pharmaceutical Co., Ltd, Wulumuqi 830000, China; 4. Medical College, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 5. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China; 6. Maternal and Child Health Hospital of Futian, Shenzhen 518000, China)

Abstract: The genetically engineered major allergen *Ara h 2* was expressed and purified and the hypoallergenic of purified recombinant F-Ara h 2 protein was characterized. The *Ara h 2* was reassembled and inserted into the expression vector pET-32a(+). The vector was transformed into *Origami* and the protein expression was induced by IPTG. Ni²⁺ Chelating affinity chromatography was used to purify the recombinant F-

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-06-14

基金项目: 国家自然科学基金(30871752)、深圳出入境检验检疫局科技计划项目(SZ2008105)和深圳大学创新团队基金资助项目(200904)

作者简介: 易海涛(1984—)男, 硕士生, 主要从事花生生物化学与分子生物学研究, E-mail: yihaitao1022@163.com;

* 通讯作者: 刘志刚 教授 博士生导师 E-mail: lzg@szu.edu.cn; 夏立新 副教授 E-mail: xialixin@126.com.

Ara h 2 protein. The hypoallergenic of F - Ara h 2 was examined by Western blotting and ELISA. The ORF which contained 471 bp and encoded 157 amino acids was authenticated to be F - Ara h 2. The recombinant F - Ara h 2 protein induced by IPTG was consistent with the actual value. The affinity between recombinant F - Ara h 2 protein and IgE antibodies from pooled peanut - allergic patients serum was significantly decreased compared with R - Ara h 2 was identified by Western blotting and ELISA. Recombinant F - Ara h 2 protein was hypoallergenic.

Key words: genetic engineering; peanut; allergen; *Ara h 2*; hypoallergenic

在当今工业十分发达的国家里,食物过敏仍然是一个十分严重的大众健康问题^[1-3]。国际健康中心的统计数据显示:在2007年,大约3.9%美国儿童对食物过敏,而且从1997—2007年,食物过敏患者以18%的速度增长^[4]。在所有的食物过敏原中,花生过敏原是一种比较常见的重要食物过敏原,而且花生做为食品添加剂广泛地加入到食品中,因而花生过敏患者很难避免接触花生过敏原^[5]。

1998年WHO的意见书指出:变应原特异性免疫治疗(SIT,俗称脱敏治疗)是除避免接触变应原外唯一能够影响变态反应性疾病自然进程的治疗手段^[6]。传统上的特异性免疫治疗主要是对过敏患者逐渐增加过敏原的注射剂量,但这种方法存在很高的风险性,有可能引发强烈的过敏反应,甚至可能导致死亡^[7]。为了避免脱敏治疗的风险性,将变应原制备成低致敏原从而降低治疗过程中发生的超敏反应的可能性^[8]。

文章首次通过基因工程的手段将花生主要过敏原 *Ara h 2* 进行改造,将其主要的 IgE 位点分割,然后重新排列。将重新排列后的新型蛋白(F - *Ara h 2*)进行重组表达,并进行低致敏原性鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料 所用花生过敏患者的8份阳性血清取自于深圳市南山防疫站,大肠埃希菌(*E. coli*) *Top10* 和 *Origami* 由深圳大学过敏反应与免疫学研究所取得。

1.1.2 试剂 琼脂糖凝胶回收试剂盒[Gel Extraction Kit (50) D2500-01]以及质粒小量提取试剂盒[Plasmid Mini Kit I (100) D6943-01]均购于美国 OMEGA 公司。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶、表达载体 pET-32a(+) 以及 DL2,000 DNA Marker 均购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。预染蛋白 Marker SM0671 购于 Fermentas (MBI)。生物素标记的二抗 IgE 以及 HRP 标记的羊抗人二抗 IgE 均购于 KPL 公司。DAB 试剂盒购于 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 序列的合成 根据已鉴定出 *Ara h 2* 的3个主要 IgE 抗原表位(27-36, 59-64, 65-72)^[9],将这3个抗原表位断开,并重新组合,按 69-157, 62-68, 32-61, 1-31 的氨基酸顺序重新排列(图1)。然后将对应的核酸序列首尾分别插入 *EcoR* I (gaattc)、*Hind* III (aagctt) 酶切位点以及保护碱基(g)和(ggg),再进行优化后交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行基因合成。

1.2.2 pUC57 simple vector - F - *Ara h 2* 的双酶切 南京金斯瑞生物科技有限公司将 F - *Ara h 2* 转入 pUC57 simple vector,将该重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切可得到目的基因 F - *Ara h 2*。

1.2.3 pET-32a(+) - F - *Ara h 2* 表达载体的构建以及测序 将 pUC57 simple vector - F - *Ara h 2* 进行双酶切得到 F - *Ara h 2*,同时将 pET-32a(+) 用同样的酶(*EcoR* I 和 *Hind* III)进行双酶切,最后用 T4DNA 连接酶将它们进行连接。连接产物转化到 *E. coli Top10* 中,提质粒并进行双酶切以及测序鉴定。

1.2.4 重组表达载体 pET-32a(+) - F - *Ara h 2* 在 *Origami* 中表达 pET-32a(+) - F - *Ara h 2* 成功转化到 *Origami* 中后,利用 IPTG 诱导表达,再将诱导表达后的菌体用 20 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0) 溶解,并超声,然后离心,最后将诱导前、诱导后、超声上清以及超声后沉淀进行 SDS - PAGE 检测最终表达情况。

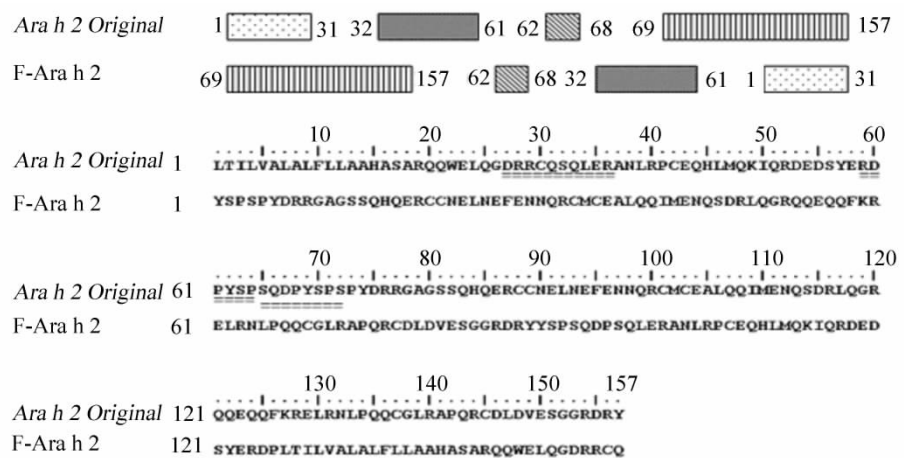
1.2.5 重组 F - *Ara h 2* 蛋白的纯化 SDS - PAGE 结果表明目的蛋白存在于超声后上清,直接对上清进行 Ni²⁺ 亲和层析,利用 40 mmol/L, 100 mmol/L 以及 300 mmol/L 的咪唑进行洗脱,收取其洗脱峰液。

SDS - PAGE 检测纯化结果。

1.2.6 免疫印迹 (Western blotting) 检测重组 F - *Ara h 2* 蛋白的过敏原性 将蛋白 Marker、R - *Ara h 2* 蛋白以及重组 F - *Ara h 2* 蛋白进行 SDS - PAGE ,F - *Ara h 2* 蛋白和 R - *Ara h 2* 蛋白上样量一致 ,均为 2 μg。然后再在 300 mA 条件下进行 SDS - PAGE 转膜。8 份花生过敏病人的混合血清作为一抗 ,HRP 标记的羊抗人 IgE 作为二抗 ,DAB 试剂盒显色分析。

1.2.7 ELISA 检测重组 F - *Ara h 2* 蛋白的过敏原性 酶标板 A1 - D3 共 12 孔 ,每孔包被 100 ng 重组 F - *Ara h 2* 蛋白(用碳酸盐缓冲液稀释纯化后的重组蛋白 ,每孔包被 100 μL); A4 - D6 每孔包被 200 ng F - *Ara h 2*; A7 - D9 每孔包被 400 ng F - *Ara h 2*; A9 - D12 每孔包被 800 ng F - *Ara h 2*。96 孔板 E1 - H3 每孔包被 100 ng R - *Ara h 2*(每孔体积 100 μL); E4 - H6 每孔包被 200 ng R - *Ara h 2*; E7 - H9 每孔包被 400 ng R - *Ara h 2*; E9 - H12 每孔包被 800 ng R - *Ara h 2*。冰箱 4 °C 封闭过夜。第 2 天弃去孔内

溶液 ,用 PBST 洗涤 3 次 (5 min/次)。然后各孔加入 100 μL 2% PBST - BSA 37 °C 进行封闭 2 h。再用花生过敏患者血清中的特异性抗体 IgE 作为一抗 (稀释比为 1:20) 在 37 °C 条件下孵育 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次 (5 min/次); 然后加入生物素标记的羊抗人 IgE (稀释比为 1:2000) 在 37 °C 条件下孵育 1 h; 之后加入链霉亲和素在 37 °C 条件下孵育



Ara h 2 Original 代表 Ara h 2 原始氨基酸序列; F - Ara h 2 代表经基因工程改造后的氨基酸序列; = = 代表主要的 IgE 表位。

Ara h 2 Original represents the original amino acid sequence of Ara h 2; F - Ara h 2 represents the amino acid sequence of Ara h 2 which is reformed by genetic engineering; = = represents the major IgE epitope of Ara h 2.

图 1 F - Ara h 2 与 R - Ara h 2 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment between F - Ara h 2 and R - Ara h 2

1 h; 之后用 TMB 在 37 °C 条件下显色 30 min; 再用 2 mol/L 浓硫酸终止反应; 最后用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。利用统计学软件 SPSS 对所测的数值进行统计学分析 ,分别计算出包被的 4 种浓度梯度下所得到的吸光度得平均值以及标准偏差。然后再对相同质量条件下 ,F - *Ara h 2* 和 R - *Ara h 2* 蛋白所得到的 12 组吸光度进行差异性分析 ,最后通过平均值作图。

2 结 果

2.1 经基因工程改造的 *Ara h 2* (F - *Ara h 2*) 与 *Ara h 2* 氨基酸序列比对

利用 BioEdit 软件对 F - *Ara h 2* 与 R - *Ara h 2* 氨基酸序列进行比对 ,结果如图 1。

2.2 pUC57 simple vector - F - *Ara h 2* 的双酶切

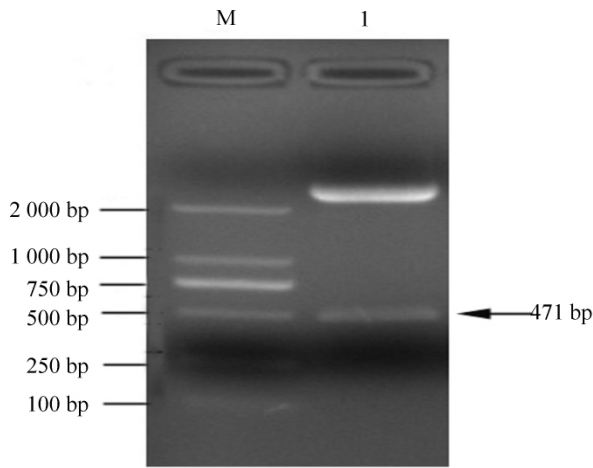
将 pUC57 simple vector - F - *Ara h 2* 质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切后得到 F - *Ara h 2* 基因 (图 2)。

2.3 pET - 32a(+) - F - *Ara h 2* 表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *THind* III 双酶切 pET - 32a(+) - F - *Ara h 2* 表达载体 ,琼脂糖凝胶电泳结果表明 ,切出的目的条带大小为 471 bp 左右 ,与理论值相符 (图 3)。将阳性菌及其质粒进行测序 ,结果表明与合成的目的基因序列一致。

2.4 pET - 32a(+) - F - *Ara h 2* 载体诱导表达及分离纯化

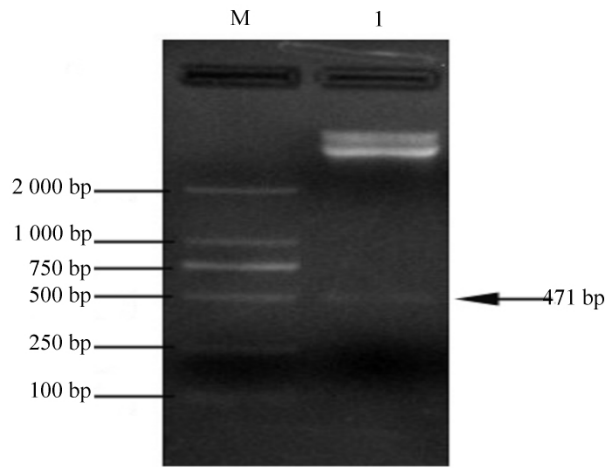
利用 SDS - PAGE 检测含有 pET - 32a(+) - F - *Ara h 2* 的 *Origami* 表达菌的表达情况 ,结果表明:



M: DNA Marker DL 2 000; 1: 重组质粒 pUC57 simple vector - F - Ara h 2 双酶切。

M: DNA Marker DL 2 000;
1: Recombinant plasmid pUC57 simple vector - F - Ara h 2 digested by restriction enzymes.
图 2 pUC57 simple vector - F - Ara h 2 质粒双酶切(*EcoR* I 和 *Hind* III)

Fig. 2 pUC57 simple vector - F - Ara h 2 digested by restriction enzymes *EcoR* I and *Hind* III



M: DNA Marker DL 2 000; 1: 重组质粒 pET - 32a(+) - F - Ara h 2 双酶切。

M: DNA Marker DL 2 000;
1: Recombinant plasmid pET - 32a(+) - F - Ara h 2 digested by restriction enzymes.
图 3 表达载体 pET - 32a(+) - F - Ara h 2 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzymes digestion analysis of recombinant plasmid pET - 32a(+) - F - Ara h 2

目的蛋白主要存在于上清。故直接对上清进行纯化; SDS - PAGE 检测 40 mmol/L ,100 mmol/L 以及 300 mmol/L 咪唑洗脱峰蛋白 结果表明: F - Ara h 2 存在于 300 mmol/L 咪唑所洗脱的溶液中。然后按照蛋白 Marker 诱导前、诱导后、超声上清、超声沉淀以及 300 mmol/L 咪唑洗脱峰溶液的顺序进行 SDS

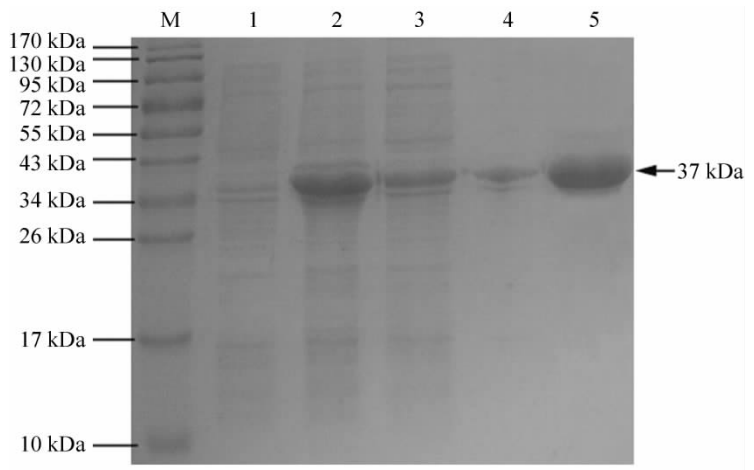
- PAGE 鉴定(图 4) 。由图 4 知表达的目的大小约为 37 kDa , 减掉 pET - 32a(+) 载体的 N 端含有的硫氧环蛋白和 6 个 His - Tag(大约为 20 kDa) , 刚好是 F - Ara h 2 蛋白大小 17 kDa。

2.5 免疫印迹(Western blotting) 鉴定重组 F - Ara h 2 蛋白的过敏原性

Western blotting 结果表明: R - Ara h 2 蛋白在约 37kDa 处有一明显条带 , 而重组 F - Ara h 2 蛋白在约 37 kDa 处条带与 R - Ara h 2 相比明显浅 , 说明重组 F - Ara h 2 蛋白与 R - Ara h 2 蛋白相比 结合花生过敏患者血清中 IgE 的能力明显降低(图 5) 。

2.6 ELISA 鉴定重组 F - Ara h 2 蛋白的过敏原性

ELISA 结果显示: 包被的 R - Ara h 2 蛋白和 F - Ara h 2 蛋白在



M: 蛋白 Marker; 1: 重组质粒 pET - 32a(+) - F - Ara h 2 导入 *Origami* 表达菌诱导前; 2: 诱导后; 3: 诱导表达的菌体超声后上清; 4: 超声后沉淀; 5: 亲和层析纯化得到的重组目的蛋白 F - Ara h 2。

M: Protein marker; 1: *E. coli Origami* /pET - 32a - F - Ara h 2 before induction; 2: *E. coli Origami* /pET - 32a(+) - F - Ara h 2 after induction by IPTG for 4 h; 3: The supernatant of ultrasound; 4: The precipitation of ultrasound; 5: The recombinant F - Ara h 2 purified by affinity chromatography.

图 4 重组 F - Ara h 2 蛋白的诱导表达与纯化

Fig. 4 Expression and purification of recombinant F - Ara h 2 protein

4 种质量梯度下 最终得到的吸光度均存在极显著性差异 (SPSS $P < 0.001$) , R - *Ara h 2* 蛋白得到的吸光度比 F - *Ara h 2* 蛋白高 , 具有统计学意义。说明 F - *Ara h 2* 蛋白结合花生过敏患者血清 IgE 的能力比 R - *Ara h 2* 蛋白显著性降低 (图 6) 。

3 讨 论

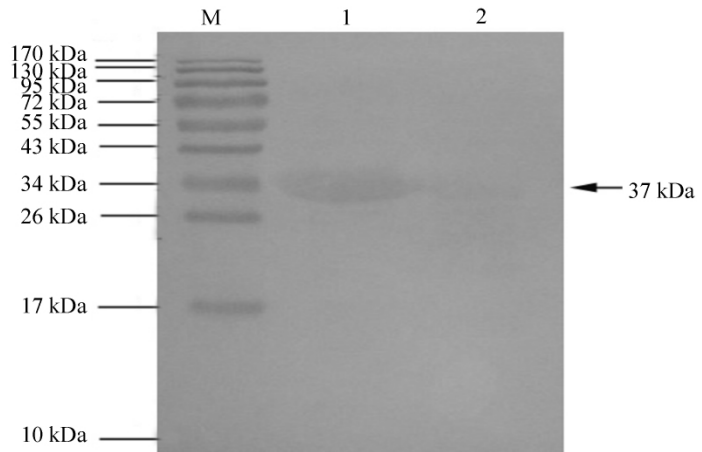
叶世泰等人^[10] 在对我国常用食品致喘 40 例分析中指出 , 花生等油料作物居食物过敏原的前列^[10] 。花生过敏反应是人体对花生过敏原产生的由 IgE 介导的 I 型超敏反应^[11] 。花生能引起十分严重的过敏反应 , 甚至有可能致死^[12-13] 。目前 , 对花生过敏患者的治疗主要是预防 , 即避免接触花生过敏原 , 但现在国内外的很多食品中都添加有花生 , 而且我国暂时还未出台食品标签的标准化 , 因而花生过敏患者很有可能接触到花生过敏原^[14] 。

到目前为止 , 特异性免疫治疗是唯一一种被广泛认可的根治过敏的治疗方法 , 但是传统的特异性免疫治疗由于采取的是抗原粗提物进行脱敏 , 因而包含很多缺点 , 例如副作用大^[15-17] 、提取物量小、纯度低等。

但是随着基因工程的发展 , 重组蛋白为特异性免疫治疗带来了新的希望^[18-19] 。重组蛋白通过原核表达可工业化生产得到大量的蛋白 , 而且纯化的蛋白可以达到很高的纯度。经过近十几年的努力 , 花生主要过敏原 *Ara h 2* 的抗原表位已经鉴定 , 通过改变过敏原的 IgE 表位 , 可降低脱敏过程中出现超敏反应 , 同时保留其 T 细胞表位 , 即可达到安全治疗过敏的目的。

文章通过已鉴定出的 *Ara h 2* 主要的 3 个 IgE 表位 (27 - 36 , 59 - 64 , 65 - 72) 进行设计新型低致敏原衍生物 , 同时保留其主要的 T 细胞表位。将以上这 3 个主要的 IgE 抗原表位断开 , 并重新组合 , 按 69 - 157 , 62 - 68 , 32 - 61 , 1 - 31 的氨基酸顺序重新排列 , 并表达出这种新型的低致敏原衍生物。

Western - blotting 和 ELISA 分析结果均表明经基因工程改造的 F - *Ara h 2* 蛋白同样能够与花生过敏患者血清中的 IgE 抗体进行特异性识别 , 但与未突变的 R - *Ara h 2* (本实验室之前已表达纯化出 R - *Ara h 2*) 相比 , 其免疫原性有明显降低 , 说明其具有低致敏原性。利用该蛋白再辅助以合适的佐剂再对花生过敏患者进行脱敏治疗将会使风险性明显降低。

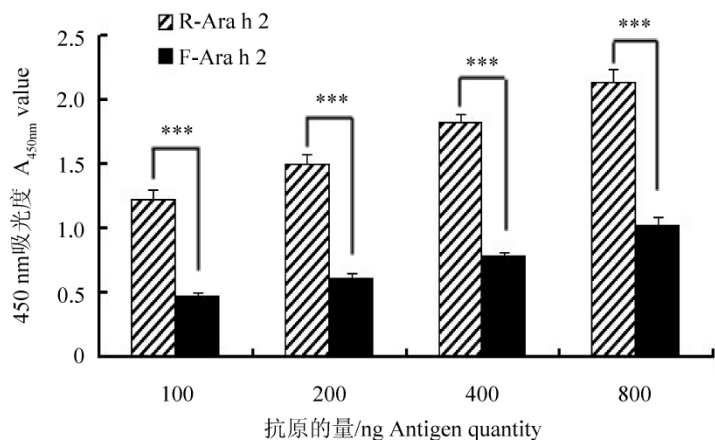


M: 蛋白 Marker; 1: 重组的 *Ara h 2* (R - *Ara h 2*) 蛋白印迹; 2: 基因工程改造的 *Ara h 2* (F - *Ara h 2*) 蛋白印迹。

M: Protein marker; 1: R - *Ara h 2*; 2: F - *Ara h 2* .

图 5 重组 F - *Ara h 2* 蛋白的免疫印迹分析

Fig. 5 Western blotting analysis of recombinant F - *Ara h 2* protein



R - *Ara h 2* 代表重组的 *Ara h 2* 蛋白; F - *Ara h 2* 代表经基因工程改造的 *Ara h 2* 蛋白; *** ($P < 0.001$) 代表 R - *Ara h 2* 和 F - *Ara h 2* 之间具有显著性差异。

R - *Ara h 2* represents recombinant *Ara h 2* protein; F - *Ara h 2* represents genetically engineered *Ara h 2* protein; *** ($P < 0.001$) represents the difference between R - *Ara h 2* and F - *Ara h 2* is Extremely significant.

图 6 重组 F - *Ara h 2* 蛋白的 ELISA 分析

Fig. 6 ELISA analysis of recombinant F - *Ara h 2* protein

参考文献:

- [1] Kim E H , Bird J A , Kulis M , et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Clinical and immunologic evidence of desensitization [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ,127(3) : 640-646.
- [2] 魏波, 夏立新, 陈红兵, 等. 小龙虾钙结合蛋白基因表达及纯化 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版* 2010 ,34(6) : 567-571.
- [3] 闫浩, 鄢玉兰, 夏立新, 等. 牛乳主要过敏原 α -乳白蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版* 2010 ,34(3) : 244-248.
- [4] Branum A M , Lukacs S L. Food allergy among U S. children: trends in prevalence and hospitalization [J]. *NCHS Data Brief* 2008 ,10(10) : 1-8.
- [5] Sicherer S H , Munoz - Furlong A , Godbold J H , et al. US prevalence of selfreported peanut , tree nut , and sesame allergy: 11 - year follow - up [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ,125(6) : 1322-1326.
- [6] Larche M , Akdis C A , Valenta R. Immunological mechanisms of allergen - specific immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol* , 2006 ,6(1) : 761-771.
- [7] Oppenheimer J J , Nelson H S , Bock S A , et al. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy [J]. *J Allergy Clin Immunol* ,1992 ,90(2) : 256-262.
- [8] Bannon G A , Shin D , Maleki S , et al. Tertiary structure and biophysical properties of a major peanut allergen , implications for the production of a hypoallergenic protein [J]. *Int Arch Allergy Immunol* ,1999 ,118(2 - 4) : 315-316.
- [9] 夏立新, 闫浩, 汤慕瑾, 等. 花生过敏原 Ara h 2 与 Ara h 6 的生物信息学比较研究 [J]. *深圳大学学报: 理工版* 2010 , 27(2) : 241-245.
- [10] 叶世泰, 傅阳心. 我国常用食品致喘 40 例分析 [J]. *中华医学杂志* ,1986 ,12(6) : 12-13.
- [11] 胡洁, 朱有名, 韩金祥, 等. 过敏原特异性 IgE 检测芯片的制备及初步应用 [J]. *中华检验医学杂志* ,2006 ,29(3) : 236-238.
- [12] Fecek R J , Marcondes Rezende M , Busch R , et al. Enteric reovirus infection stimulates peanut - specific IgG2a responses in a mouse food allergy model [J]. *Immunobiology* , 2010 ,215(12) : 941-948.
- [13] 易海涛, 刘志刚, 闫浩, 等. 花生过敏原 Ara h 2.02 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.
- [14] Hefle S L , Furlong T J , Niemann L , et al. Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2007 ,120(1) : 171-176.
- [15] Thalhamer T , Dobias H , Stepanoska T , et al. Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by means of in silico mutation and screening [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ,125(4) : 926-934.
- [16] Bousquet J , Lockey R , Malling H J , et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy , Asthma and Immunology [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol* ,1998 ,81(5) : 401-405.
- [17] Valenta R. The future of antigen - specific immunotherapy of allergy [J]. *Nat Rev Immunol* 2002 ,2(6) : 446-453.
- [18] Ferreira F , Wallner M , Thalhamer J. Customized antigens for desensitizing allergic patients [J]. *Adv Immunol* 2004 ,84: 79-129.
- [19] Jutel M , Jaeger L , Suck R , et al. Allergen - specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ,116(3) : 608-613.