

花生过敏原蛋白分离纯化方法研究进展

隗啸南^{1,2}, 高金燕³, 李欣^{1,3}, 闫飞^{1,2}, 朱江⁴, 陈红兵^{1,2,*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047;
3. 南昌大学生命科学与食品工程学院食品系, 江西 南昌 330047; 4. 江西省食品工业研究所, 江西 南昌 330047)

摘 要: 花生中已确定的过敏原蛋白包括 Ara h 1~Ara h 11 11 种。本文详细介绍花生中主要过敏原蛋白(Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3/4、Ara h 6)以及非主要过敏原蛋白(Ara h 7~Ara h 11)的分离纯化方法研究进展。花生过敏原蛋白的分离纯化方法包括硫酸铵沉淀法、柱层析法、电泳法。其中硫酸铵沉淀法主要用于粗提纯化过程, 而柱层析法则主要用于花生过敏原蛋白的精制, 它包括离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析、疏水相互作用层析、高效液相色谱。目前离子交换层析和凝胶过滤层析在花生过敏原蛋白分离纯化中应用最为广泛, 而电泳法则仅见应用于 Ara h 7 及油质蛋白(Ara h 10、Ara h 11)的分离纯化。

关键词: 花生过敏原; 硫酸铵沉淀; 柱层析; 分离纯化

Purification Methods of Peanut Allergens: A Review

WEI Xiao-nan^{1,2}, GAO Jin-yan³, LI Xin^{1,3}, YAN Fei^{1,2}, ZHU Jiang⁴, CHEN Hong-bing^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
3. Department of Food Science, School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
4. Jiangxi Food Industrial Research Institute, Nanchang 330047, China)

Abstract: Currently, 11 proteins, including 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 and Ara h 11, have been identified to be peanut allergens. Recent advances in the research on separation and purification methods for major (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 and Ara h 6) and non-major (Ara h 7-11) peanut allergens, such as ammonium sulfate precipitation, column chromatography and electrophoresis, are introduced in detail in this article. Ammonium sulfate precipitation has been generally used in the rough purification step and column chromatographic methods in the refinement step including ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography and high performance liquid chromatography. At present, the most extensively used method for separating and purifying peanut allergens are ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. However, electrophoresis is only used to purify Ara h 7 and peanut oleosins (Ara h 10 and Ara h 11).

Key words: peanut allergen; ammonium sulfate precipitation; chromatography; purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0371-05

食物过敏严重威胁人类健康, 据世界粮农组织报告, 90% 以上的食物过敏反应是由牛奶、蛋类、鱼类、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果类和小麦引起^[1]。其中花生过敏反应属于 IgE 介导的 I 型超敏反应, 严重时可以引起过敏性休克甚至死亡, 并且 90% 花生过敏患者对其终生过敏^[2-3], 花生过敏已成为一个全球性的重要健康问题, 引起了人们的广泛关注^[4]。

具有免疫活性的高纯度花生过敏原蛋白是花生过敏研究的物质基础, 对于花生过敏原蛋白氨基酸序列的确定, 晶体结构的建立, IgE 结合表位的定位以及蛋白加工过程对过敏原性、抗原性影响的评估等有重要意义。目前根据花生过敏原蛋白的理化性质, 通过硫酸铵分级沉淀、柱色谱层析及蛋白电泳等方法成功地建立了一些适宜于实验室小量制备的分离方法, 为花生过敏原蛋白

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0704); 国家自然科学基金项目(30860220);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-MB-201002)

作者简介: 隗啸南(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: huhaibingxin@163.com

* 通信作者: 陈红兵(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: chbgjy@hotmail.com

的相关研究提供了高质量的实验材料。

1 花生过敏原蛋白的基本性质

花生中的过敏原蛋白主要为糖蛋白, 热稳定性强, 耐酸和酶解。截至2010年国际免疫联合会过敏原命名小组委员会(IUIS)已经确认了花生中的11种过敏原蛋白(分别命名为Ara h 1、Ara h 2……Ara h 11)^[5-6]。其中Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3/4、Ara h 6属于主要过敏原, 可被90%花生过敏患者识别, 其理化性质和功能特点报道较多, 而其他非主要过敏原(如Ara h 5等)报道较少, 还需进一步研究。表1列出了目前已确定的11种过敏原蛋白的基本性质。

2 花生过敏原蛋白的分离纯化

花生过敏原蛋白的分离纯化一般分为蛋白粗提和柱色谱层析精制两个阶段。蛋白粗提主要是通过缓冲液对脱脂后的花生粉末进行蛋白浸提, 有时还会进行硫酸铵分级沉淀和透析操作。而柱色谱层析是指将预处理得到的蛋白粗提液通过色谱柱层析, 达到分离纯化目标过敏原蛋白的目的。分离纯化花生过敏原蛋白的核心技术体现在各种柱层析介质的选择、组合以及层析条件的优化上。本文从花生过敏原蛋白的性质出发重点归纳已报道的花生过敏原蛋白精制中的层析介质选择、组合以及优化的层析条件。

2.1 花生中主要过敏原蛋白的分离纯化

目前有关Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3/4、Ara h 6等主要花生过敏原蛋白的研究比较集中, 其分离纯化方法报道较多, 也取得了不少研究进展。

2.1.1 Ara h 1

Ara h 1是含量最高的花生过敏原蛋白, 占花生总蛋白含量的12%~16%, 它是高稳定的同源三聚体糖蛋白, 3个单体通过疏水相互作用连接起来, 末端各含有

一个 α 螺旋, 其中一个末端还含有两个反向平行的 β 折叠^[11-12], N端含有甘露糖多聚糖链^[6,13], 不易消化、耐酶解、热稳定性强^[14]。

Maleki等^[11]用含5mmol/L二硫苏糖醇(DTT), 1mmol/L EDTA, 1mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF), 200mmol/L NaCl的Tris-HCl缓冲液(50mmol/L, pH8.3)浸提脱脂后的花生粉末, 然后将离心得到的蛋白粗提液依次进行70%、100%饱和度的硫酸铵分级沉淀, 所得沉淀用浸提缓冲液复溶, 经PD-10凝胶过滤层析柱脱盐后加载到High Prep S离子交换层析柱进行线性梯度洗脱(200~800mmol/L NaCl), 最终得到所需纯度的Ara h 1, 并成功应用于Ara h 1结构的分析以及IgE结合表位的研究。

Burks等^[13]用己烷对经163~177℃烘烤13~16min的花生进行脱脂, 然后用含有1mol/L NaCl、8mol/L尿素的PBS缓冲液(20mmol/L, pH7.0)浸提得到花生粗提液。粗提液用含8mol/L尿素的Tris-HCl缓冲液(20mmol/L, pH7.2)透析并通过Mono Q 10/10阴离子交换柱进行层析分离, 以0~1.5mol/L NaCl进行梯度洗脱, 分别收集洗脱峰并做SDS-PAGE电泳分析和免疫印迹鉴定, 最终得到所需纯度Ara h 1。

另外, 在第26届CIA(Collegium Internationale Allergologicum)研讨会上^[15], 三步法精制Ara h 1被提出, 即顺序使用阴离子交换层析、伴刀豆球蛋白(ConA)亲和层析与凝胶过滤层析, 最终得到高纯度Ara h 1。此后, Becker等^[15]则将此方法优化为两步, 他们认为在自然情况下, Ara h 1和Ara h 3/4构建成一个分子质量约为200kD的复合体, 其中Ara h 3/4是主要的污染物, 他们通过实验得出在pH5.0时, Ara h 3/4几乎不能被浸提出来, 而Ara h 1在此pH值条件下是可浸提的, 故以pH5.0的浸提缓冲液对脱脂花生粉末进行浸提, 成功将三步法中的离子交换层析步骤省去, 并同样得到高纯度的Ara h 1。

以上是目前纯化Ara h 1具有代表性的方法, 主要采用离子交换层析、凝胶过滤层析以及亲和层析。由

表1 11种花生过敏原蛋白基本性质
Table 1 Some properties of peanut allergens

过敏原类型	蛋白种类	生物功能	分子质量(SDS-PAGE)	pI	参考文献
Ara h 5	肌动蛋白	肌动蛋白结合蛋白	15kD	4.6	[7-8,10]
Ara h 9	非特异性脂转运蛋白1	脂转运蛋白	9.8kD	9~10	[9-10]
Ara h 1	Cupin (豌豆球蛋白类, 7S 球蛋白)	种子贮藏蛋白	63.5kD	4.55	[7,10]
Ara h 2	蓝豆蛋白 (2S 白蛋白)	种子贮藏蛋白	17kD	5.2	[7,10]
Ara h 3	Cupin (豆球蛋白类, 11S 球蛋白, 大豆球蛋白)	种子贮藏蛋白	60kD	5.5	[7,10]
Ara h 4	Cupin (豆球蛋白类, 11S, 大豆球蛋白)	种子贮藏蛋白	37kD	5.5	[7,10]
Ara h 6	蓝豆蛋白 (2S 白蛋白)	种子贮藏蛋白	15kD	5.2	[7,10]
Ara h 7	蓝豆蛋白 (2S 白蛋白)	种子贮藏蛋白	15kD	5.6	[7,10]
Ara h 8	病程相关蛋白, PR-10	NA	17kD	5.03	[7,10]
Ara h 10	16kD 油质蛋白	NA	16kD	NA	[10]
Ara h 11	14kD 油质蛋白	NA	14kD	NA	[10]

注: NA. 未见报道。

于 Ara h 1 等电点为 4.55, 为酸性蛋白, 所以离子交换层析多用强阴离子交换介质。又由于 Ara h 1 在天然状态下为三聚体蛋白, 分子质量在 200kD 以上。因此, 在凝胶过滤层析中多用大孔径凝胶过滤介质(Superdex 200)。另外, Becker 等^[15]用 ConA 亲和层析纯化 Ara h 1, 这是因为 Ara h 1 含有甘露糖寡糖链, 它与 ConA 亲和介质可逆结合, 可以通过 α -甲基-甘露糖苷梯度洗脱得到 Ara h 1。尽管目前可以得到高纯度的 Ara h 1, 但产品中常存在分子质量为 35kD 左右的杂带, 如何去除它将是纯化 Ara h 1 工作中的难点和未来纯化工作的重点。

2.1.2 Ara h 2

Ara h 2 是一种糖蛋白, 含量约为花生总蛋白量的 5.9%~9.3%, 结构上有由 8 个半胱氨酸残基构成的 4 个二硫键, 同时它还具有胰蛋白酶抑制性, 耐酸性环境和胃肠道消化, 热处理增强致敏性^[12,16-19]等性质。

Lehmann 等^[20]将花生粉末直接用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.2)进行蛋白浸提, 然后通过两步离心(即 5min, $5000 \times g$, 4°C ; 30min, $24966 \times g$, 4°C)得到粗提液。浸提前没有进行有机溶剂脱脂, 可以防止蛋白变性。蛋白粗提液通过 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析一步得到 Ara h 2, 层析所用平衡液为 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.0), 并依次使用两种梯度洗脱液, 分别为 60mL 0~0.1mol/L NaCl 浓度的 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.0)和 450mL 0.1~1mol/L NaCl 浓度的 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.0)。最后通过 SDS-PAGE 分析所得洗脱峰, Ara h 2 大约在 150mmol/L NaCl 浓度时被洗脱下来, 从而最终得到高纯度 Ara h 2。

Sen 等^[18]将经液氮研磨的花生粉末通过索氏抽提器(二乙醚作为脱脂液)脱脂 3 次, 然后将脱脂后的花生粉末用含 1mmol/L EDTA、1mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟)、200mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(65mmol/L, pH 8.3)进行蛋白浸提, 得到的蛋白粗提液依次进行 40%、70% 饱和度的硫酸铵分级沉淀, 最后将所得沉淀用声波破碎的方法复溶, 并首先经过 MacroPrep High Q 阴离子交换柱得到富含 Ara h 2 的收集液, 然后再经过 phenyl-Sepharose 疏水相互作用层析柱得到高纯度的 Ara h 2。

张英坤等^[21]通过对层析条件的优化, 一步法分离出 Ara h 2。即用含 10% 三氯乙酸和 0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液对花生进行脱脂处理, 并用含 8mol/L 尿素、1mol/L NaCl、0.07% β -巯基乙醇、0.5mg/mL EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L, pH 8.0)浸提脱脂后的花生粉末得蛋白粗提液, 然后经过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱进行层析分离, 层析中洗脱缓冲液的浓度梯度为 0~1mol/L NaCl, 收集洗脱峰后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 最终得到高纯度 Ara h 2。

目前纯化 Ara h 2 的层析方法主要有阴离子交换层

析和疏水相互作用层析, 实验室小试产品纯度较高, 未来 Ara h 2 的规模化制备将成为纯化研究的重点。

2.1.3 Ara h 3/4

Ara h 3 由一系列分子质量约为 14~45kD 的多肽链组成, 其中包含有酸性和碱性亚基, 这些亚基是由翻译后加工形成的; 天然状态下, 它是分子质量约为 400kD 的杂多聚蛋白^[22]。由于 Ara h 4 与 Ara h 3 的氨基酸序列同源性为 91.3%, 属于同源过敏原, 一般将两者归为一种蛋白, 统称为 Ara h 3/4^[7]。

Koppelman 等^[22]首先用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 7.2)浸提花生粉末, 然后经两步离心($3000 \times g$, 30min; $10000 \times g$, 30min)得到蛋白粗提液。将粗提液通过 Source Q 层析柱(FPLC/AKTA protein purification system)进行层析分离, 平衡缓冲液为 3-(*N*-吗啉基)丙磺酸(MOPS)(20mmol/L, pH 7.2), 进行 0~1mol/L NaCl 浓度的梯度洗脱, 收集 NaCl 浓度在 400~500mmol/L 时的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 将电泳所得每个条带产物进行 N 端测序, 结果所有条带中的蛋白均源自 Ara h 3, 由此得到只含 Ara h 3 的蛋白收集液。接着他们又对纯化出的 Ara h 3 进行亚基的分离纯化, 即将上步纯化出的 Ara h 3 溶于含 6mol/L 尿素和 20mmol/L DTT 的磷酸钾缓冲液(10mmol/L, pH 6.5)中, 充分反应后经过 mini Q anion-exchange 层析柱层析分离, 收集穿过峰和梯度洗脱峰(0~1mol/L NaCl), 通过 SDS-PAGE 电泳分析, 得到分子质量为 25kD 的碱性亚基以及分子质量为 42kD 和 45kD 的酸性亚基。

Jin 等^[23]用含 1mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 7.9)浸提花生粉末得蛋白粗提液, 然后对粗提液进行透析处理后, 先后经过 Source Q15 离子交换柱、Phenyl Sepharose 疏水相互作用柱、Superdex 200 柱进行层析分离, 最终得到高纯度 Ara h 3, 并成功应用于其晶体结构的分析实验中。

Marsh 等^[24]将花生蛋白粗提液分别经过 Poros HQ20 阴离子交换柱(0~600mmol/L NaCl 浓度梯度洗脱)、Superdex Preparative Grade S200 凝胶过滤层析柱(连有 BioCad Sprint HPLC System)、ConA Sepharose 亲和层析柱(除去糖蛋白 Ara h 1)进行层析分离, 最终得到高纯度 Ara h 3/4。

纯化 Ara h 3/4 的层析技术包括阴离子交换层析、凝胶过滤层析以及疏水相互作用层析。由于 Ara h 3/4 在天然状态下为分子质量 400kD 多聚蛋白, 一般要用大孔径凝胶过滤介质; 又由于它含有 42kD 和 45kD 的酸性亚基以及 25kD 的碱性亚基, 而多聚蛋白为酸性蛋白, 故一般用阴离子交换介质。另外, 由于 Ara h 3/4 的亚基含量高, 纯化中不容易鉴定, 并且常伴有 Ara h 1 的污染。因此, 进一步优化 Ara h 3/4 的纯化方法并提高

其纯化纯度,同时建立 Native-PAGE 电泳分析方法以简化纯化中的鉴定步骤将成为 Ara h 3/4 纯化研究的任务。

2.1.4 Ara h 6

Ara h 6 与 Ara h 2 有 59% 的氨基酸序列同源性,它的结构上有由 10 个半胱氨酸残基构成的 5 个二硫键^[25]。

Koppelman 等^[26]对花生粉末进行脱脂(己烷脱脂)和浸提(Tris-HCl)处理后得到花生蛋白粗提液。然后进行 40%、80% 饱和度的硫酸铵分级沉淀,最后收集 80% 饱和度的沉淀复溶液。复溶液过滤后经过 Sephadex G75 柱(4℃)进行层析分离,并以 Tris-HCl(20mmol/L, pH8.0)作为平衡和洗脱缓冲液。富含目的蛋白的收集液升温至 25℃ 后立即通过 Source 15Q 阴离子交换柱层析分离,并用同样的缓冲液进行平衡、梯度洗脱(NaCl 梯度为 0~250mmol/L),由此得到所需纯度的 Ara h 6。

与 Koppelman 等类似, Suhr 等^[25]对经 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0.1mol/L, pH8.0)浸提得到的花生蛋白粗提液分别通过凝胶过滤层析柱和阴离子交换层析柱进行层析分离,凝胶柱介质为 Superdex 200(K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(50mmol/L, pH7.5), 0.1mol/L NaCl 作为平衡和上样缓冲液),然后将含 Ara h 6 的收集液进行除盐(HiTrap 柱)和真空超速离心干燥,最后用 Tris-HCl 缓冲液(20mmol/L, pH 8.0)复溶后通过 MiniQ 柱进行层析分离,经梯度洗脱(0~0.5mol/L NaCl)和 SDS-PAGE 电泳分析,最终得到高纯度 Ara h 6。

Marsh 等^[24]首先将粗提液分别通过 Superdex 75 凝胶过滤层析柱和 HQ-Poros 阴离子交换层析柱层析分离,最后经 Vydac preparative C_{18} RP-HPLC 柱分离得到 Ara h 6。

罗春平等^[27]通过对柱介质、缓冲液 pH 值、梯度洗脱液的梯度区间以及溶液浓度等的优化,一步法分离出高纯度的 Ara h 6。分离纯化中用 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L, pH7.2)浸提花生粉末得粗蛋白液,然后经过 DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析分离,层析中洗脱缓冲液的离子梯度为 0~0.2mol/L NaCl 浓度,收集洗脱峰后进行 SDS-PAGE 电泳分析、血清学鉴定以及质谱分析,最后确证得到了高纯度的 Ara h 6。

由于 Ara h 6 与 Ara h 2 有较高的同源性,并且分子质量相差不大,因此纯化出的 Ara h 6 常含有 Ara h 2 的污染,如何去除 Ara h 2 污染是其纯化中的难点。目前 Ara h 6 的纯化方法已相对比较成熟,步骤也大大简化,分离出的 Ara h 6 纯度也很高,但由于 Ara h 6 在花生蛋白中的含量较少,所以提高 Ara h 6 的得率并进行规模化提纯将是未来纯化工作的新课题。

2.2 花生中非主要过敏原蛋白的分离纯化

与主要花生过敏原相比,非主要花生过敏原的研究较少,对其分离纯化的报道也相应较少,但也有一些研究进展。

2.2.1 Ara h 7

Ara h 7 与 Ara h 2 有 35% 的氨基酸序列同源性^[25],

Schmidt 等^[28]对经 NH_4HCO_3 (0.1mol/L, pH8.0)浸提得到的花生蛋白粗提液用双蒸水透析并冻干,然后首先通过连有 HPLC 系统的 Superdex 200 凝胶过滤层析柱层析分离,再通过预装 10/300 GL 柱分离得到分子质量 20kD 以下的蛋白,最后将 20kD 以下分子质量的纯化蛋白进行双向电泳,并对各个电泳点做质谱分析,最终得到高纯度天然 Ara h 7.0201 和 Ara h 7.0202。

2.2.2 Ara h 8

Ara h 8 与桦树花粉过敏原 Bev v 1 具有 45.9% 的氨基酸序列同源性^[29], Riecken 等^[30]首先优化了花生过敏原蛋白的浸提条件,即选用醋酸铵溶液(0.1mol/L, pH5.0)作为花生蛋白浸提液,并用兔抗 Gly m 4 血清(可与 Bet v 1 同源的蛋白发生交叉反应)检测粗提液中的 Ara h 8。由于 Ara h 8 含量极少,故用 Superdex 200 凝胶过滤层析柱除去分子质量 25kD 以上的蛋白,使 Ara h 8 富集。又由于 Ara h 8 与 Ara h 6 有相近的等电点,很难通过离子交换层析将两者完全分开,故用 DTT 和碘乙酸处理凝胶过滤层析得到的蛋白液,使 Ara h 6 中的 4 个二硫键 S-羧甲基化($-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)以改变 Ara h 6 的 pI 值,这样 Ara h 8 与 Ara h 6 的 pI 值就不同了。继而将蛋白液通过 Source 15Q 阴离子交换柱进行层析分离,缓冲液为 Tris-HCl(20mmol/L, pH 8.0), 0~0.5mol/L NaCl 浓度梯度洗脱。将分离得到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析、N 端测序、质谱分析以及胰蛋白酶指纹分析,最终确证得到了天然 Ara h 8.0201。

2.2.3 Ara h 9

Ara h 9 是一种非特异性的脂转运蛋白(nsLTP, non-specific lipid transfer protein),耐酶解、耐高温^[9]。Lauer 等^[31]用 NaAc-Ac 缓冲液(50mmol/L, pH 5.0)浸提和透析花生蛋白,将蛋白粗提液通过 Mono S 离子交换快速蛋白液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)系统进行分离,分离过程中用 0~1mol/L NaCl 浓度梯度洗脱, LTP 在 100~225mmol/L NaCl 浓度时被洗脱下来,然后用反相色谱柱($\mu\text{RPL C}_{18}/\text{C}_{18}$ column)进行进一步纯化,并用含 2%~40% 乙腈的三氟醋酸(0.1%)梯度溶液洗脱,最后经 SDS-PAGE 电泳、N 端测序以及免疫印迹分析,最终得到天然 Ara h 9。

2.2.4 其他

Ara h 10 和 Ara h 11 属于脂质蛋白,分子质量分别为 16kD、14kD,主要来自花生油脂中^[6]。Pons 等^[32]通过 4 步浮式离心得到花生油体,然后用二乙醚和氯仿-甲醇彻底脱脂,最后经两步制备 SDS-PAGE 分离得到 17kD 的花生油质蛋白。

另外, Ara h 5 与植物肌动蛋白有很高的同源性,它是作为一种肌动蛋白结合蛋白,起支持细胞框架结构的作用^[6],目前对于它的纯化方法未见报道。

非主要花生过敏原蛋白含量极少,分子质量都在

20kD 以下, 纯化难度很大, 甚至有些蛋白尚未发现其天然存在形式(Ara h 5、Ara h 10、Ara h 11)。目前对于 Ara h 7、Ara h 8 和 Ara h 9 的分离纯化仅仅是为了证明它们的天然存在, 纯化出的纯度和含量不足以进行结构功能的研究。另外, Ara h 10 和 Ara h 11 属于油质蛋白, 虽然 Pons 等^[32]通过制备电泳得到了花生油质蛋白, 但并没有关于这两种蛋白分离纯化方法的报道。所以, 建立分离纯化非主要花生过敏原蛋白的方法将是未来整个花生过敏原蛋白纯化研究的工作中心。

3 结 语

目前, 花生过敏原蛋白的分离纯化还存在许多问题有待解决, 如分离纯化出的过敏原蛋白普遍成本较高、步骤繁琐; 某些报道中得到的过敏原蛋白纯度不高; 非主要过敏原蛋白的纯化方法研究不足等。因此, 花生过敏原蛋白的分离纯化技术还需进一步研究, 其中主要过敏原蛋白的规模化制备、标准化以及非主要过敏原蛋白分离纯化方法的建立将成为未来花生过敏原蛋白分离纯化研究的发展趋势, 这将有助于进一步开展花生过敏原结构与功能的研究。

参考文献:

- [1] MUHSEN S A, CLARKE A E, KAGAN R S. Peanut allergy: an overview[J]. CMAJ, 2003, 168(10): 1279-1285.
- [2] LEHMANN K, SCHWEIMER K, REESE G, et al. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions[J]. Biochem, 2006, 395(3): 463-472.
- [3] LEUNG Y M D, SAMPSON H A, YUNGINGE J W, et al. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy[J]. N Engl J Med, 2003, 348(11): 986-993.
- [4] BURKS A W. Peanut allergy[J]. Lancet, 2008, 371: 1538-1546.
- [5] JIN Tengchuan, GUO Feng, CHEN Yuwei, et al. Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut[J]. Molecular Immunology, 2009, 46(8/9): 1796-1804.
- [6] PELE M. Peanut allergens[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2010, 15(2): 5204-5212.
- [7] WEN H W, WYSOCKI W B, DECORY T R, et al. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007, 6(2): 47-58.
- [8] KLEBER-JANKE T, CRAMER R, APPENZELLER U, et al. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 119(4): 265-274.
- [9] KRAUSE S, REESE G, RANDOW S, et al. Lipid transfer protein(Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a mediterranean allergic population[J]. Allergy Clin Immunol, 2009, 124(4): 771-778.
- [10] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Allergen nomenclature [DB/OL]. (2010-04-29) [2011-06-02]. <http://www.allergen.org/>.
- [11] MALEKI S J, KOPPER R A, SHIN D S, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation [J]. The Journal of Immunology, 2000, 164(11): 5844-5849.
- [12] KOPPELMAN S J, VLOOSWIJK R A A, KNIPPELS L M, et al. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world[J]. Allergy, 2001, 56(2): 132-137.
- [13] BURKS A W, WILLIAMS L W, HELM R M, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges[J]. Allergy Clin Immunol, 1991, 88(2): 172-179.
- [14] CHUNG S Y, BUTTS C L, MALEKI S J, et al. Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting[J]. Agric Food Chem, 2003, 51(15): 4273-4277.
- [15] BECKER W M. Purification of the natural allergen Ara h 1[C]// Collegium Internationale Allergologicum 26th Symposium, Malta, May - 10, 2006. USA: Collegium Internationale Allergologicum, 2006.
- [16] BURKS A W, WILLIAMS L W, CONNAUGHTON C, et al. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge[J]. Allergy Clin Immunol, 1992, 90(6): 962-969.
- [17] RAMOS M L, HUNTLEY J J, MALEKI S J, et al. Identification and characterization of a hypoallergenic ortholog of Ara h 2.01[J]. Plant Mol Biol, 2009, 69(3): 325-335.
- [18] SEN M, KOPPER R, PONS L, et al. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-Binding epitopes[J]. Journal of Immunology, 2002, 169(2): 882-887.
- [19] MALEKI S J, VIQUEZ O, JACKS T, et al. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function[J]. Allergy Clin Immunol, 2003, 112(1): 190-195.
- [20] LEHMANN K, HOFFMANN S, NEUDECKER P, et al. High-yield expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2[J]. Protein Expr Purif, 2003, 31(2): 250-259.
- [21] 张英坤, 陈红兵. 离子交换层析法分离花生过敏原 Ara h 2 的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(12): 259-262.
- [22] KOPPELMAN S J, KNOL E F, VLOOSWIJK R A, et al. Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization [J]. Allergy, 2003, 58(11): 1144-1151.
- [23] JIN Tengchuan, HOWARD A, ZHANG Yuzhu. Purification, crystallization and initial crystallographic characterization of peanut major allergen Ara h 3[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2007, 63(10): 848-851.
- [24] MARSH J, RIGBY N, WELLNER K, et al. Purification and characterization of a panel of peanut allergens suitable for use in allergy diagnosis [J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(2): S272-S285.
- [25] SUHR M, WICKLEIN D, LEPP U, et al. Isolation and characterization of natural Ara h 6: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat[J]. Mol Nutr Food Res, 2004, 48(3): 390-399.
- [26] KOPPELMAN S J, de JONG G A, LAAPER-ERTMANN M, et al. Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2[J]. Clin Exp Allergy, 2005(4): 490-497.
- [27] 罗春萍, 高金燕, 胡纯秋, 等. 花生过敏原 Ara h 6 的分离纯化及鉴定 [J]. 食品科学, 2010, 31(15): 76-80.
- [28] SCHMIDT H, KRAUSE S, GELHAUS C, et al. Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of 2S albumin family[J]. Proteome Res, 2010, 9(7): 3701-3709.
- [29] MITTAG D, AKKERDASS J, BALLMER-WEBER B K, et al. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy[J]. Allergy Clin Immunol, 2004, 114(6): 1410-1417.
- [30] RIECKEN S, LINDNER B, PETERSEN A, et al. Purification and characterization of natural Ara h 8, the Bet v 1 homologous allergen from peanut, provides a novel isoform[J]. Biol Chem, 2008, 389(4): 415-423.
- [31] LAUER I, DUERINGER N, POKOJ S, et al. The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut[J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(9): 1427-1437.
- [32] PONS L, CHERY C, MRABET N, et al. Purification and cloning of two high molecular mass isoforms of peanut seed oleosin encoded by cDNAs of equal sizes[J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43(7): 659-668.