

中国花生致敏蛋白的识别

丛艳君¹, 娄飞¹, 薛文通^{1,*}, 李林峰², 王晶², 张惠¹, 范俊峰¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2. 北京大学第三医院皮肤变态反应科, 北京 100083)

摘要: 我国对花生过敏方面的研究很少。本实验利用中国常用花生品种识别鉴定了中国主要的致敏蛋白, 比较了国内外花生品种致敏蛋白相对含量的差异, 期望找到中国花生过敏发病率较低的原因, 为临床食物过敏患者的治疗和低过敏花生品种的培育提供理论依据。研究结果表明: Ara h 1 和三条 Ara h 3 多肽是中国主要的致敏蛋白, 并发现了 Ara h 1 的亚基, 分子量为 58kD 的多肽。Ara h 1 和 Ara h 3 的相对含量各品种之间差异显著, 并且低于国外花生品种。因此中国花生主要致敏蛋白相对含量低可能是导致中国花生过敏发病率较低的主要原因。

关键词: 花生过敏; Ara h

Identification of Major Peanut Allergens with IgE-binding Property in China

CONG Yan-jun¹, LOU Fei¹, XUE Wen-tong^{1,*}, LI Lin-feng², WANG Jing², ZHANG Hui¹, FAN Jun-feng¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Department of Dermatology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China)

Abstract: Peanut allergens have not yet been studied in China. The aim of this study was to investigate: (i) the major peanut allergens in China, and (ii) whether peanut varieties in China show different allergen profiles. Three peanut varieties commonly used in China were studied. Immunoblot on peanut protein extracts was performed with sera from 10 eczema patients with serum specific IgE (immunoglobulin E) of peanut proteins. Peanut specific IgE reacting bands were subjected to determination of N-terminal amino acid sequences with the automated Edman degradation method. The relative contents of major peanut allergens were quantified by SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) densitometry. In result, Ara h 1 and a series of Ara h 3 were major peanut allergens in China. The relative amount of Ara h 1 and Ara h 3 were significantly different in Chinese peanut varieties but both less than foreign varieties. Therefore, peanut varieties may induce different amount of allergens. The relative lower contents of Ara h 1 and Ara h 3 may lead to the lower prevalence of peanut allergy in China.

Key words peanut allergy; Ara h (*Arachis hypogaea* (peanut) allergen)

中图分类号: TS201.21

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0109-04

食物过敏作为重要的食品安全问题, 在国外一直是研究的热点, 而我国这方面的研究很少。花生过敏因其反应的长期性、普遍性甚至威胁生命的特点, 而成为重要的食物过敏原^[1]。

通过 IgE 定性检测的办法目前已经识别出以下几种花生致敏蛋白: Ara h 1^[2-5]、Ara h 2^[5-7]、Ara h 3^[8]、Ara h 4^[5]、Ara h 5^[5]、Ara h 6^[5]、Ara h 7^[5]等, 其中前七种蛋白过敏患者血清的识别率超过 50%, 因此是主要的花生致敏蛋白。它们的分子量分别为 63、17~20、14~45、36、14、17/19 和 14.5kDa。致敏蛋白的普遍特性是耐热、耐体内酶解。各国花生过敏血清学不同, Ara h 1 在欧洲不同人群的识别率分别为 35%^[6]、65%^[5]

和 70%^[5]。我国花生致敏蛋白的研究很少。本研究鉴定和量化中国花生主要致敏蛋白, 为今后的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生(白沙、鲁花和花育)购于北京种子公司。

0.02mol/L pH8.2 的磷酸缓冲液、pH8.3 的 25mmol/L Tris-192mmol/L 甘氨酸缓冲液、电泳试剂及 4-氯-1-萘酚 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白 Pharmacia 公司; 花生过敏患者血清北京大学第三附属医院皮肤科; 硝酸纤维素薄膜 (Amersham RPN303C)、HRP 标记的鼠抗人

收稿日期: 2006-09-22

* 通讯作者

作者简介: 丛艳君(1978-), 女, 博士研究生, 主要从事农产品加工与贮藏方向研究。

IgE(ϵ -chain specific) Zymed公司。

1.2 仪器与设备

GL-20B 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;
SK-M 10R型粉碎机(带冷却水循环) 日本协立理工株式会社;
AE-6450 垂直电泳槽、AE -8450 1000V 电源 日本 ATTO 公司;
DYY-III 7B 型转移电泳仪和 DYY-III 40B 型转移电泳槽 北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 花生蛋白的提取^[9]

2.0g 用粉碎机粉碎的大豆粉溶解于 40ml 0.02mol/L pH8.2 的 PBS 缓冲溶液中振荡提取 4h, 然后于 4℃ 离心 (14000 × g, 10min), 取上清液对 0.1mol/L NaHCO₃ 透析一夜待用。

1.3.2 SDS-PAGE 凝胶电泳^[10]

浓度 12.5% 的分离胶, 4.5% 的浓缩胶, 定流至 10mA/gel, 直到溴酚蓝跑到凝胶底。然后用凝胶成像对 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白相对含量进行分析。

1.3.3 转移电泳^[11]

将硝酸纤维素膜(NC 膜)与电泳凝胶裁成一样的大小 (60 × 80mm), NC 膜接正极, 凝胶面接负极, 定流 96mA/gel 电转移 3.0h; 电转移结束后, 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 观察转移效果, 转移完全的膜用于免疫印迹。

1.3.4 免疫印迹^[11]

将转印后的 NC 膜用 dH₂O 洗 5min, 再用 TBST (pH7.4 的 TBS+0.05% 的 TWEEN20) 在 37℃ 漂洗 4 次, 每次 15min, 在加入封闭液(即稀释液, TBST+1%BSA)的平皿中于 37℃ 水浴 1h 进行淬灭, 封闭 NC 膜, 然后用 dH₂O 洗 5min。

将 NC 膜与合适浓度(1:5 稀释)的花生过敏患者血清(第一抗体)在室温下孵育过夜, 再用 dH₂O 洗涤 5min, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10min。

将 NC 膜与合适浓度(1:500 稀释)的 HRP 标记的鼠抗人 IgE ϵ -chain specific(第二抗体)于 37℃ 孵育 2h, 再用 dH₂O 洗涤 5min, TBST 洗 3 次, 每次 10min。

显色反应: 将漂洗后的 NC 膜浸在底物溶液(4-氯-1-萘酚 30mg, 甲醇 10ml, TBS50ml, 临用前加 30% 双氧水 30 μ l)中显色(37℃, 35min), 待蛋白带显色清晰, 即可用蒸馏水漂洗, 终止反应。

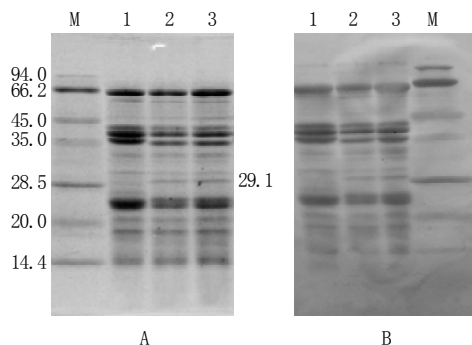
1.3.5 免疫印迹抑制实验

阳性混合血清分别加入 25、50、75 μ g 花生蛋白孵育 5h 后, 再进行免疫印迹反应, 反应步骤同上。

2 结果与分析

2.1 不同花生品种的 SDS-PAGE 电泳图谱

本实验揭示了在还原状态下, 花生蛋白典型的 SDS-PAGE 图谱^[9], 如图 1(A)。花生蛋白的分子量主要分布在 14kD 和 66kD 之间, 除了白沙品种较另外两个品种缺少 29.1kD 条带之外, 总的来说不同品种花生 SDS-PAGE 蛋白条带的分布相似。花生蛋白的等电点在 pH3~6.5 之间^[12], 我们使用 pH8.2 的缓冲溶液, 保证了花生蛋白的提取效率, 并且提取过程都是在 4℃ 条件下进行的, 避免了蛋白在提取过程中发生酶解。



M 为低分子量标准蛋白, 分子量分别为: 94.0、66.2、45.0、35.0、28.5、20.0 和 14.4kD; 1~3 分别代表白沙, 鲁花和花育。

图1 SDS-PAGE (A)和电转印(B)图谱

Fig.1 SDS-PAGE (A) and protein profile transferred to nitrocellulose membrane (B)

2.2 不同花生品种的免疫印迹图谱

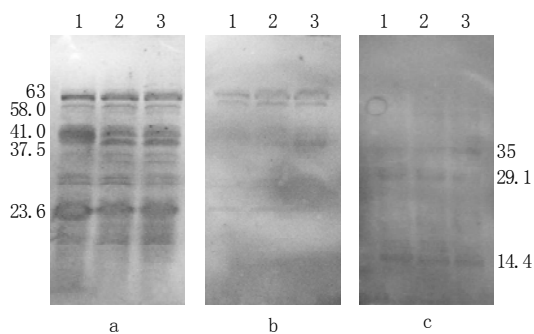
如图 1(B)所示, SDS-PAGE 胶上的蛋白全部转印到了硝酸纤维素膜上。免疫印迹的结果见图 2(a~b), 免疫抑制实验结果见图 3(c)。在阳性反应条带中, 35、29.1 和 14.4kD 条带表现出非特异吸附, 因此它们为非致敏蛋白。花生蛋白与不同花生过敏患者血清结合能力的统计结果见表 1, 63kD 和 58kD 蛋白的识别率为 100%, 41、37.5 和 23.6kD 蛋白的识别率为 80%, 所以这 5 种蛋白为中国的主要致敏蛋白。而 30.3、18.7、47、32.8 和 20.8kD 蛋白为次要的致敏蛋白。为了排除免疫印迹反应中的非特异性吸附, 进行了免疫抑制实验, 我们设计了三个抑制梯度, 如图 3(c~e)所示, 随着孵育时蛋白加入量的增加, 免疫反应变弱, 表现为抑制实验中硝酸纤维素膜上 63、58、41、37.5 和 23.6kD 的条带变浅, 进一步表明了花生过敏患者血清与花生主要致敏蛋白反应的特异性。

Burks 等^[2]克隆了 Ara h 1 的基因, 通过 cDNA 碱基序列, 测定了 Ara h 1 的全部氨基酸序列。研究表明 63 kD 蛋白 N-端氨基酸与 Burks 的第 85 至 88 位氨基酸序列一致, 为 Ara h 1 致敏蛋白, 58kD 蛋白与 Burks 测定的 Ara h 1 蛋白的第 150~159 位的氨基酸序列 90% 相对应, 因此为 Ara h 1 的亚基。41kD 和 37kD 蛋白的 N

表2 花生致敏蛋白N端氨基酸序列鉴定
Table 2 Identification of peanut allergens based on N-terminal amino acid sequence

蛋白(kD)	N 端序列	与已知致敏蛋白相对应的氨基酸序列	已知致敏蛋白名称
63	R S P P	R S P P G E R T R G R S P P G E R T R G	Ara h1 (P43238) ^[2,6]
58	E G R E G E Q E E G	E G R E G E Q E W G	Ara h1 (P43238) ^[2]
41	I S F R Q Q P E E N	I S F R Q Q P E E N	Ara h3 ^[5]
37.5	I S F R Q Q P E E N	I S F R Q Q P E E N	Ara h3 ^[5]
23.6	G I E E T I C I A S	G I E E T I C I A S	Ara h3 ^[5]

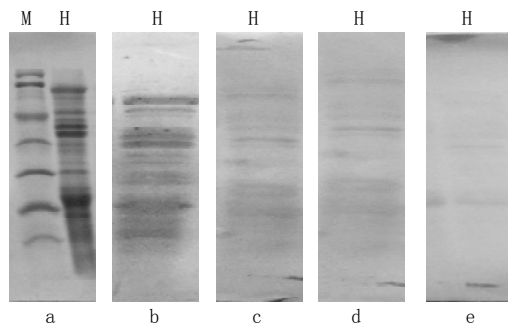
端氨基酸序列与 Rabjohn 等发现的 42kD 蛋白相同, 23.6kD 与 Rabjohn 等发现的 25kD N 端氨基酸序列一致, 因此这三种致敏蛋白均属于 Ara h 3, 只是分子大小的差异(表 2)。Ara h 1 为主要的致敏蛋白, 这一结论支持了 Burks 和 Rabjohn 等^[4,6]的研究结果。Ara h 1 和 Ara h 1 亚基断裂的位点为精氨酸和谷氨酸, 这有力的证明了 Ara h 1 在生物合成中的多样修饰作用。Ara h 3 致敏蛋白与大豆球蛋白具有同源性^[5], 均具有酸性和碱性亚基, 第 88 和 332 位的半胱氨酸残基形成二硫键将酸性亚基(res 1~325)和碱性亚基(res 326~510)连接起来^[8]。



a、b 为花生蛋白阳性血清印迹实验(限于篇幅本文只列出 2 份阳性血清反应, 其它 8 份阳性血清反应结果同 a); c 为花生蛋白阴性血清印迹实验。1~3 分别代表白沙, 鲁花和花育。

图2 花生蛋白的免疫印迹试验和阴性血清对照实验

Fig.2 Immunoblot on peanut protein with positively pooled sera and negatively pooled sera



a 为电转印图; b 为阳性血清池印迹反应; c、d、e 为孵育中加入 25、50、75 μg 蛋白的免疫抑制反应。H 为花育。

图3 免疫印迹抑制实验

Fig.3 Immunoblot inhibition experiment

23.6kD 多肽的首位是 Ara h 3 的第 326 位氨基酸, 为酸性亚基和碱性亚基的裂解位点, 说明了 Ara h 3 形成过程中的不完全加工。

表1 花生蛋白相对含量(%)和免疫印迹阳性反应比例
(发生特异性反应血清/收集的血清数)

Table 1 Relative contents of peanut proteins (% of total protein) and IgE-binding activity (number of patients with reactions/total patients number)

蛋白(kD)	白沙	鲁花	花育	阳性反应血清数/收集的过敏患者血清
63*	7.98	7.71	9.12	10/10
58	2.12	2.21	2.26	10/10
41	3.59	3.26	3.09	8/10
37.5*	5.33	3.97	4.45	8/10
23.6	11.83	5.34	8.12	8/10

注: * $p < 0.05$ 。

2.3 主要花生致敏蛋白的相对含量

如表 1 所示, Ara h 1 在白沙, 鲁花和花育中的相对含量分别为 7.98%、7.71% 和 9.12%, 差异极显著($p < 0.01$, Student's-t test); Ara h 1 亚基在三个品种的相对含量为 2.12%~2.26%, 41kD 为 3.59%~3.09%, 23.6kD 为 11.83%~6.12%, 差异均不显著。37.5kD 在白沙中含量最高为 5.33%, 其次在花育中为 4.45%, 三个品种中差异显著($p < 0.05$)。并且 Ara h 1 和 Ara h 3 的相对含量均低于国外品种^[9], 这与 Roland 等^[13]的研究结果是一致的, 即与美国花生相比较, 中国花生蛋白的提取率低大约 20%。

3 结论

中国主要的致敏蛋白是 Ara h 1、Ara h 1 亚基和三条 Ara h 3 多肽, 并且 Ara h 1 和 Ara h 1 亚基致敏性最强。不同花生品种中 Ara h 1 差异极显著($p < 0.01$), Ara h 3 中 37.5kD 的多肽差异显著($p < 0.05$)。并且 Ara h 1 和 Ara h 3 的相对含量均低于国外花生品种, 由此可以解释中国花生过敏发病率低与国外的原因。

参考文献:

- [1] HOURIHANE J O, KILBURN S A, DEAN P, et al. Clinical characteristics of peanut allergy[J]. Clin Exp Allergy, 1997, 27(6): 634-639.

壳聚糖复合生物防腐剂的抑菌效果研究

吴慧清, 吴清平*, 石立三, 张菊梅

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州

510070)

摘 要: 本实验研究了以壳聚糖及其金属锌螯合物为主复配的五种生物防腐剂配方以及配方中的主要组分在不同 pH 条件下的抑菌效果。研究选定的五种指示菌是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 8099、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC6538、枯草杆菌黑色变种 (*Bacillus subtilis*) ATCC9372、白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231 和黑曲霉 (*Aspergillus niger* ATCC16404), 采用平板培养计数法检测了从加入不同种类的菌悬液至含抑菌剂和培养基的试管中培养 0、4、24、48、72 和 96 h 的活菌残留数, 以活菌残留数的对数值随时间变化的趋势表示抑菌效果。结果表明: 配方 A、B、D、E 在 pH 6.0 以下可以抑制五种指示菌。配方 A~E 和单组份壳聚糖金属锌螯合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制效果好, 而对羟基苯甲酸乙酯主要对枯草芽孢杆菌和黑曲霉的抑制较好, 对其余三种菌的抑制效果较差, 所有配方对白色念珠菌的抑菌效果较其它四种指示菌的抑制效果差, 这是由于实验的起始菌悬液浓度较高造成的, 同一配方在起始菌悬液浓度和作用 pH 值均低的情况下抑菌效果好。

关键词: 壳聚糖; 壳聚糖衍生物; 生物防腐剂配方; 抑菌效果评价

Study on Antimicrobial Effect of Biological Preservative Based on Chitosan

WU Hui-qing, WU Qing-ping*, SHI Li-san, ZHANG Ju-mei

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The antimicrobial effect of five compositions and two components of the compositions against five kinds of indicated

收稿日期 2007-08-11

*通讯作者

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B011000006)

作者简介: 吴慧清(1967-), 女, 副研究员, 主要从事食品安全与微生物控制技术研究。

-
- [2] BURKS A W, COCKRELL G, STANLEY J S, et al. Recombinant peanut allergen Ara h 1 expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity[J]. J Clin Invest, 1995, 96: 1715-1721.
- [3] BURKS A W, SHIN D, COCKRELL G, et al. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicillin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity[J]. Eur J Biochem, 1997, 25: 334-339.
- [4] BURKS A W, WILLIAMS L W, HELM R W, et al. Identification and characterization of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge[J]. J Allergy Clin Immunol, 1991, 88: 172-179.
- [5] RABJOHN P, HELM E M, STANLEY J S, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3[J]. J Clin Invest, 1999, 103: 535-542.
- [6] DE JONG E C, VAN ZIJVERGEN M, SPANHAAS S, et al. Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins[J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28: 743-751.
- [7] 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]. J Allergy Clin Immunol, 1992, 90: 962-969.
- [8] KOPPELMAN S J, KNOL E F, VLOOSWIJK R A A, et al. Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization[J]. Allergy, 2003, 58: 1144-1151.
- [9] KOPPELMAN S J, VLOOSWIJK R A A, KNIPPELS L M J, 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: 132-137.
- [10] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 359-365.
- [11] TOWBIN H K, STAHELIN T H, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350-4354.
- [12] ST ANGELO A J, MANN G E. Peanut proteins: Peanuts culture and uses[M]. Stillwater: Education Association, WILSON CT, 1973: 559.
- [13] POMS R E, CAPELLETTI C, ANKLAM E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency[J]. Mol Nutr Food Res, 2004, 48: 459-464.