

文章编号: 1000-0615(2008)02-0273-06

中国对虾主要过敏原的鉴定及理化性质

王晓斐, 李振兴, 林 洪, 杜亚楠

(中国海洋大学食品学院水产品安全性实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以中国对虾为研究对象,旨在获得有关中国对虾过敏原的基础数据,为水产品中过敏原的控制提供依据。首先利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对中国对虾过敏原组分进行分析,经免疫印迹鉴定其主要过敏原。然后利用高效液相色谱法纯化中国对虾的主要过敏原,并用 β 消除、紫外扫描、肽质量指纹图谱和红外光谱等方法对其理化性质进行研究。表明中国对虾主要过敏原为分子量 36 ku 的糖蛋白,糖含量为 4.4%,存在 O-型糖肽键,其二级结构主要为 α -螺旋,与其他甲壳类过敏原之间存在很高的同源性。

关键词:中国对虾;过敏原;鉴定;肽质量指纹图谱

中图分类号:Q 51;S 917

文献标识码:A

随着社会的进步和全球化进程的不断发展,食物过敏疾病的发病率越来越高,食物过敏已经成为严重的食品安全问题之一,其过敏原性已经成为急需研究的新课题^[1-2]。食物中的成分多种多样,但能引起患者过敏反应的通常只有一种或几种蛋白质,其中能与 50% 以上的过敏患者血清发生明显反应的一类过敏原为主要过敏原^[3]。众所周知,人们在食用海产品后容易出现过敏症状,其中虾及其制品是其中重要的一类。目前,国内外已部分开展了虾过敏原的研究。在早期过敏原的研究中,Daul 等^[4]利用虾过敏患者血清中的 IgE 抗体能够与过敏原相结合的特性,发现分子量为 36 ku 的蛋白质是棕虾(*Penaeus aztecus*)的主要过敏原。之后,研究者们在不同种类的虾中均发现了这种相似的过敏蛋白组分,通过分析其氨基酸组成和一些物理化学性质,最后确定为肌肉中的原肌球蛋白,但不同种类之间仍存在着一定的差异^[5-8]。中国对虾(*Penaeus chinensis*)是一种原产于我国的海产品,深受我国消费者喜爱,目前对其过敏原的研究尚未见报道。本实验以中国对虾为研究对象,鉴定其主要过敏原,并对其性质进

行初步研究^[9-10],这对提高水产食品安全性水平,加强水产品中过敏原的控制,提高过敏症诊断的灵敏度具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

阳性血清取自青岛市过敏疾病防治中心,利用皮肤点刺试验(+++)确诊为虾过敏的 10 位患者。将收集的 10 位患者的血清等量混合组成标准阳性血清池,分离后分装,放在 -80℃ 的超低温冰箱中冻存。

中国对虾购于青岛市南山水产市场,为活品。生物素标记的羊抗人 IgE 抗体(A9667, Sigma),HRP 标记的亲合素(北京爱博),其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

电泳仪(DYY-7C, 北京六一),傅里叶变换红外光谱仪(NicoletNexus 470, Thermo Electron),高效液相色谱仪(1100, Agilent),MALDI-TOF 质谱仪(REFLEX III, Bruker)。

1.2 实验方法

过敏原的提取 将去头去壳去肠线的虾

收稿日期:2007-05-29

资助项目:国家自然科学基金(30471320);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA09Z427);国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD02A27)

作者简介:王晓斐(1983-),女,山东威海人,硕士研究生,从事食品安全方面的研究。Tel:0532-82031550,E-mail:wxfl@163.com

通讯作者:林 洪,Tel:0532-82032203,E-mail:linhong@ouc.edu.cn

肉匀浆,脱脂,干燥制成干粉。取 5 g 干粉,用含 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾 0.05% 的二硫苏糖醇的抽提液,按 1:5 的比例抽提过夜,离心后取上清,用 PBS ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 透析 72 h,每隔 12 h 换一次透析液。然后将此抽提物进行冷冻干燥,储藏于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。

免疫印迹 (western-blotting) 采用 Laemmli^[11] 不连续电泳体系,分离胶浓度为 12%,堆积胶浓度为 5%。将蛋白条带转印至硝酸纤维膜上,置于丽春红 S 中染色,按泳道切条。蛋白质标准用氨基黑 10B 染色。待测样品条带进行免疫印迹检测,先用 PBS-T (含 0.5% Tween 20 的 PBS) 洗涤,直至红色全部褪去,再置于封闭液 (含 0.5% BSA 和 0.5% Tween20 的 PBS) $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,加入过敏患者的单人份或混合阳性血清 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行抗原抗体反应 1.5 h,用 PBS-T 充分洗涤后加入生物素标记的羊抗人 IgE 温箱内 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,用 PBS-T 充分洗涤后加入 HRP 标记的亲合素,温箱内 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,充分孵育后用 PBS-T 充分洗涤,加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二氨基联苯胺显色,干燥后拍照、保存。

中国对虾主要过敏原的分离纯化 将冻干的过敏原蛋白的抽提物用双蒸水配制成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,高效液相色谱进行纯化。色谱柱: TSK-GEL 3000,柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相 PBS ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),进样量 $50 \mu\text{L}$,流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,在紫外检测器 (280 nm) 进行检测。对各个成分进行收集,每 2 min 收集 1 管,免疫印迹法检测活性,确定主要的过敏原蛋白峰,合并洗脱液,双蒸水透析过夜后,冻干,储存在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

总糖含量的测定 纯化的过敏原蛋白经变性电泳后,用麝香草酚溶剂混合物染色^[12],并采用苯酚-硫酸法测定其总糖含量^[12]。

糖肽键特征分析 用 β -消去反应鉴定^[12],将纯化的虾过敏原蛋白置于 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH - $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaBH₄ 溶液中,于 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 0.5 h, $200 \sim 280 \text{ nm}$ 测定其紫外吸收光谱,同时测定未用碱处理的相同浓度过敏原的紫外吸收光谱,并对二者所得曲线进行比较。

肽质量指纹图谱分析 通过 MALDI-TOF 质谱的分析,得到肽质量指纹图谱(委托北京华大中生科技公司)。质谱测定条件: N_2 激光源,波长 337 nm ,正离子线性方式检测(飞行管长 1.6 m ,

加速电压 20 kV),所用基质为 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -CHCA)。蛋白质序列数据库检索,应用 Mascot 搜索引擎在蛋白质公共数据库 NCBI 中搜索,搜索参数如下:

表 1 检索参数设置

Tab.1 Parameters of database searching

参数 parameters	参数设置 parameters selected
检索类型 type of search	肽质量指纹图谱 peptide mass fingerprint
质量容差 peptide mass tolerance	$\pm 0.3 \text{ D}$
酶 enzyme	胰蛋白酶 trypsin
肽段电荷数 peptide charge state	1+
可选修饰 variable modifications	乙酰化 carbamidomethyl(C), 氧化 oxidation(M)
最大漏切数 max missed cleavages	1
分子量范围 protein mass	36 ku
检索数 number of queries	56

红外光谱分析 将样品用 KBr 进行压片,在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 间进行扫描。

2 结果与讨论

2.1 中国对虾主要过敏原的鉴定

中国对虾抽提蛋白质采用 SDS-PAGE 进行分析(图 1),在初步分离出的蛋白质组分中分子量 36 ku 的蛋白含量较高。用 10 位虾过敏患者的血清及阳性血清池鉴定中国对虾主要过敏原(图 2),分子量为 36 ku 的过敏原与 8 号条带的过敏患者血清无明显反应,怀疑是次要过敏原导致过敏,而与另外 9 位虾过敏患者血清及阳性血清池都有反应,因此鉴定为主要的过敏原,这和国外有关虾类过敏原的研究结论是一致的^[13-15]。

2.2 中国对虾主要过敏原的分离纯化

在 280 nm 下监测吸光值,共得到 5 个峰(图 3),其中 $14 \sim 16 \text{ min}$ 收集管经 SDS-PAGE 电泳及免疫印迹结果表明与阳性血清具有强的抗体结合活性。收集 HPLC 洗脱曲线上 $11.5 \sim 16 \text{ min}$ 出现的第二个峰的洗脱液,经 SDS-PAGE 可以获得分子量 36 ku 单一的条带,确定为目的蛋白洗脱峰,并将收集时间定为 $13.5 \sim 15.5 \text{ min}$ 。

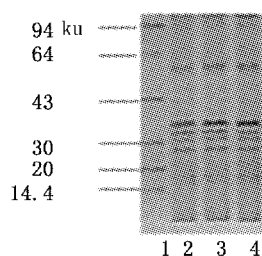


图 1 中国对虾蛋白质抽提物的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of proteins extracted

1. 蛋白质标准;

2-4. 蛋白质抽提液

1. Protein marker;

2-4. Chinese shrimp proteins extracted

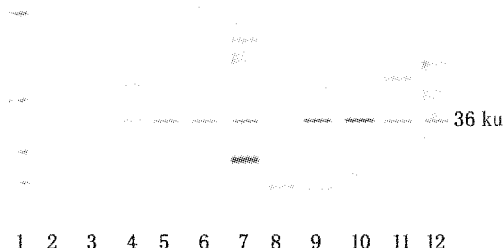


图 2 中国对虾过敏原的血清免疫印迹鉴定

Fig.2 Western-blotting analysis of proteins extracted

1. 蛋白质标准; 2. 虾过敏患者混合血清鉴定结果;

3-12. 10 位虾过敏患者血清鉴定结果

1. Protein marker; 2: mixed serum from shrimp allergic patients; 3-

12. serum from ten patients of shrimp allergy

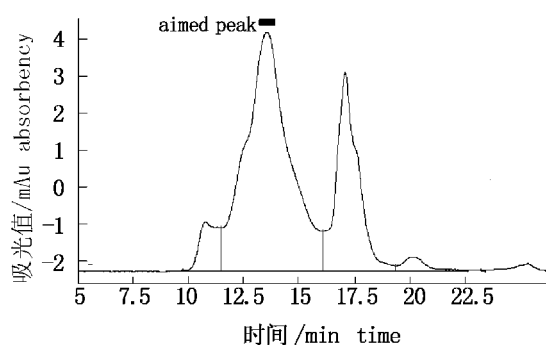


图 3 中国过敏原粗蛋白的 HPLC 洗脱曲线

Fig.3 HPLC elution curve of
Chinese shrimp proteins extracted

2.3 中国对虾主要过敏原的糖含量

如图 4 所示,蛋白条带经麝香草酚染色后,呈明显的红色,这说明在中国对虾主要过敏原蛋白中存在糖的成分,该过敏原为一种糖蛋白。为了

对其糖的含量进行研究,本实验以葡萄糖为标准,采用苯酚-硫酸法测得其糖含量为 4.4%。

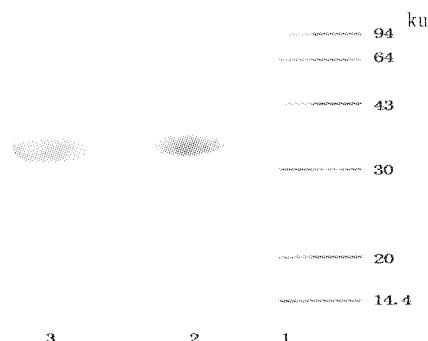


图 4 中国对虾主要过敏原的糖组分染色

Fig.4 Chinese shrimp allergen dyeing results

1. 为蛋白质标准;

2. 考马斯亮兰染色结果;

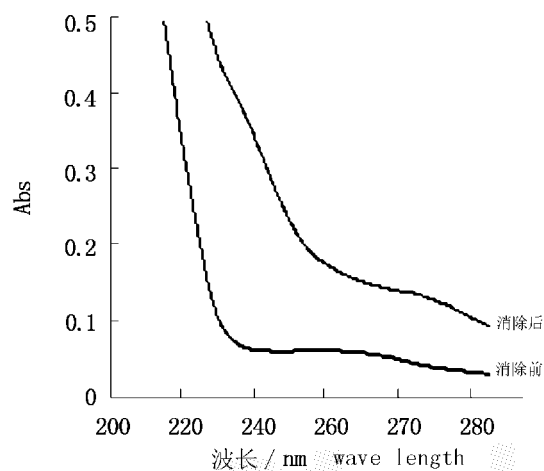
3. 麝香草酚染色结果

1. Protein marker; 2. coomassie brilliant blue-dyeing;

3. thymol-dyeing

2.4 中国对虾主要过敏原的糖肽键特征

中国对虾过敏原经碱处理后在 240 nm 处的紫外吸收与碱处理前相比有着明显的增加(图 5),这说明了在中国对虾过敏原中存在 O-型糖肽键^[16]。其原因可能是 O-型糖肽键对碱不稳定,在稀碱溶液的作用发生了 β -消除反应,在糖肽连接处,与糖链联结的丝氨酸生成 α -氨基丙烯酸,苏氨酸生成 α -氨基丁烯酸,形成的这两种不饱和氨基酸在 240 nm 处均有特征紫外吸收。

图 5 中国对虾主要过敏原 β 消除前后的紫外扫描Fig.5 UV Spectrum of Chinese shrimp allergen
after β -elimination

2.5 中国对虾主要过敏原的肽质量指纹图谱

根据 mascot 的评分标准判断 ($P < 0.05$), 评分大于 79 分为及格结果满足这一条件的为得分排在前 11 位的蛋白(图 6)。其中前四位分别为堪察加拟石蟹 (*Paralithodes camtschaticus*) 过敏原得分 107, 吻合肽段数为 17 条(表 2); 日本喷火湾甜虾 (*Pandalus eous*) 过敏原得分为 89 分, 吻合肽段数为 15 条; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和缅因龙虾 (*Homarus americanus*) 过敏原得分均为 87, 吻合肽段数为 15 条。

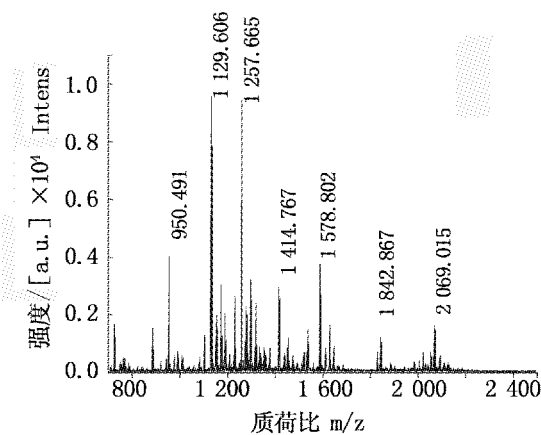


图 6 中国对虾主要过敏原的肽质量指纹谱

Fig. 6 PMF of Chinese shrimp allergen

利用 BioEdit 软件对得分最高的前四位结果进行比对, 发现这些甲壳类过敏原蛋白的氨基酸序列极为保守, 相似度可达 99%。这些过敏原蛋白均描述为原肌球蛋白, 研究发现原肌球蛋白甚至存在于其它贝类海产品^[9]以及尘螨^[17]、蟑螂^[18]中, 也是其中的主要过敏性成分之一。从 mascot 检索出的吻合肽段数及评分结果来看, 中国对虾主要过敏原与其它甲壳类过敏原之间存在很高的同源性, 是导致它们之间存在交叉反应的一个重要原因, 这与无脊椎动物主要过敏原之间存在严重交叉反应的结论相吻合^[8]。

2.6 中国对虾主要过敏原的红外光谱

从图 7 可以明显看到寡糖和蛋白的一般特征吸收: 3306 cm^{-1} 这一组峰为糖类 O-H 的伸缩振动, 2958 cm^{-1} 的一组峰是糖类 C-H 伸缩振动; $2400 \sim 2300\text{ cm}^{-1}$ 之间的一组峰是由于二氧化碳的干扰而产生鬼峰, 1648 cm^{-1} 处为肽链上酰胺键特征吸收^[12]。 1557 cm^{-1} 附近一组强吸收表示 N-H 相对于 C=O 以反式构型的形式存在; 而在 1394 cm^{-1} 附近出现了一组较弱的吸收是顺式构型这些吸收, 包含有 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动的因素。从红外光谱中可以得到蛋白质二级结构的信息^[19-20], 1299 cm^{-1} 处有特征吸收峰, 说明该蛋白质的二级结构存在 α -螺旋。

表 2 数据库检索结果

Tab.2 Database searching results

观察值 observed value	理论值 calculated value	误差 delta Da	断裂位点 position	漏切数 miss	肽序列 peptide sequence from database
835.3852	834.3719	0.0060	134-140	0	SLSDEER
880.4537	879.4450	0.0014	162-168	1	YDEVARK
918.4004	917.4454	-0.0523	67-74	0	ANTQLEDK
950.4507	949.4505	-0.0071	153-160	0	FLAEEADR
1010.4194	1009.4936	-0.0815	8-15	1	MQAMKLEK
1078.5502	1077.5454	-0.0025	153-161	1	FLAEEADRK
1129.6064	1128.6026	-0.0035	190-198	0	IVELEEELR
1146.5667	1145.5750	-0.0156	169-178	0	LAMVEADLER
1257.6648	1256.6612	-0.0037	92-101	0	IQLEEDLER
1274.6731	1273.6700	-0.0042	168-178	1	KLAMVEADLER
1295.6245	1294.6629	-0.0457	39-49	1	AEEVHGLQKR
1376.6380	1375.6215	0.0092	113-125	0	LAEASQAADER
1413.7670	1412.7623	-0.0026	91-101	1	RIQLEEDLER
1414.7437	1413.7212	0.0153	77-90	0	ALSNAEGEVAALNR
1587.8023	1586.7787	0.0163	252-264	1	EVDRLDELVNEK
1644.8303	1643.8730	-0.0500	199-213	1	VVGNNLKSLEVSEEK
1647.7518	1646.7933	-0.0488	169-182	1	LAMVEADLERAEER

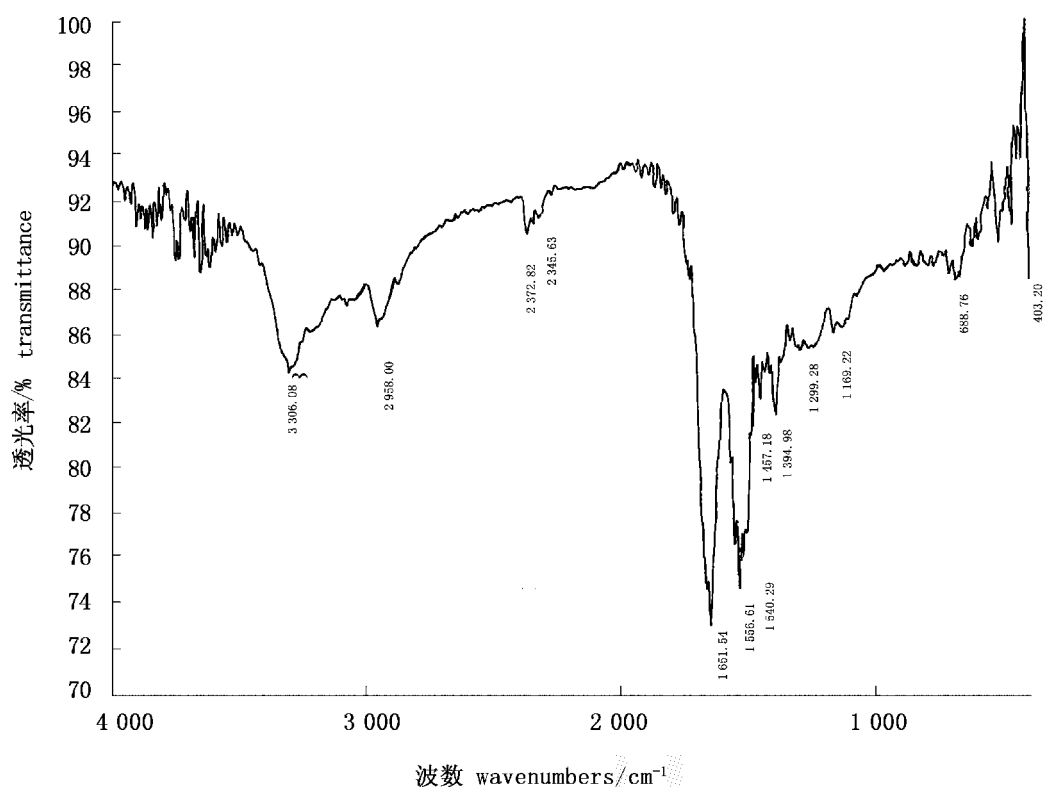


图7 中国对虾主要过敏原的红外图谱

Fig.7 The infrared spectrum of Chinese shrimp allergen

3 结论

本研究鉴定出中国对虾主要过敏原为分子量在 36 ku 的糖蛋白,利用高效液相色谱法纯化得到过敏原蛋白,测得其含糖量为 4.4%,存在 O-型糖肽键,二级结构主要是 α -螺旋,根据肽质量指纹图谱数据检索出了 17 条吻合肽段,表明中国对虾主要过敏原与其它甲壳类海产品过敏原之间存在着很高的同源性。甲壳类过敏原是一种极为保守的蛋白质,这是导致甲壳类之间交叉反应的一个重要原因。

参考文献:

- [1] Dearman R J, Kimber I. Food allergy: what are the issues[J]. Toxicology Letters, 2001, 120 (1-3): 165-170.
- [2] Malarkey T. Human health concerns with GM crops [J]. J Mutation Research, 2003, 544(2-3): 217-221.
- [3] Nordlee J A, Taylor S L, Townsend J A, et al. Identification of a Brazilnut allergen in transgenic soybeans[J]. N Engl J Med, 1996, 334(11): 688-692.
- [4] Daul C B, Morgan J E, and Lehrer S B. Hypersensitivity reactions to crustacea and mollusks[J]. Clin Rev Allergy 1993, 11(2): 201-222.
- [5] Leung P S C, Chu K H, Chow W K, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen[J]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 94: 882-890.
- [6] Daul C B, Slattery M, Reese G, et al. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) as the muscle protein tropomyosin [J]. J Int Arch Allergy Appl Immunol, 1994, 105: 49-55.
- [7] Mykles D L, Cotton J L, Taniguchi H, et al. Cloning of tropomyosins from lobster (*Homarus americanus*) striated muscles, fast and slow isoforms may be generated from the same transcript[J]. J Muscle Res Cell Motil, 1998, 19: 105-115.
- [8] 李振兴,林 洪,曹立民.不同虾类的过敏原及其过敏原性[J].水产学报, 2006, 30(2): 281-284.
- [9] Vogel L, Luttkopf D, Hatahet L, et al. Development of a functional *in vitro* assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system [J]. J Allergy, 2005, 60(8): 1021.

- [10] Wild L G, Lehrer S B. Fish and shellfish allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2005, 5(1): 74.
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680 – 685.
- [12] 张维杰. 复合多糖生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11 – 12, 38 – 40, 129 – 130, 193 – 198.
- [13] Hoffman D R, Day J R, Miller J S. The major heat-stable allergen of shrimp [J]. J Ann Allergy, 1981, 47: 17 – 22.
- [14] Shanti K N, Martin B M, Nagpal S, *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes [J]. J Immunol, 1993, 151: 5354 – 5363.
- [15] Motoyama K, Ishizaki S, Nagashima Y, *et al.* Cephalopod tropomyosin: identification as major allergens and molecular cloning [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1997 – 2002.
- [16] Howard C H, Carolyn R B. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13: 5021 – 5034.
- [17] Asturias J A. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus* [J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1397(1): 27.
- [18] Santos A B, Chapman M D, Alberse R C, *et al.* Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens [J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 104: 329.
- [19] Jan K, Joohyun K, Petr B, *et al.* Contribution of transition dipole coupling to amide coupling in IR spectra of peptide secondary structures [J]. Vibrational Spectroscopy, 2006, 42: 63 – 67.
- [20] Singh B R. Infrared analysis of peptides and proteins: principles and applications [M]. Washington D C: American Chemical Society, 2000: 54 – 95.

Identification and properties of major allergen from Chinese shrimp, *Penaeus chinensis*

WANG Xiao-fei, LI Zhen-xing, LIN Hong, DU Ya-nan

(Seafood Safety Laboratory, College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to obtain relevant data of Chinese shrimp allergen, and lay theoretical base for the allergen control, here the antigenic components and properties of Chinese shrimp were investigated. Its protein profiles were analyzed using SDS-PAGE. Then western-blotting was used to determine the major allergen of it. A new shrimp allergen was obtained with high performance liquid chromatography (HPLC), and its characterization was preliminarily studied by β -elimination, UV a scan, peptide mass fingerprint (PMF) and IR spectrum. The result revealed that the major allergen of Chinese shrimp was molecules-36 ku protein. It was a kind of glycoprotein and the total carbohydrate content was 4.4%. The bond between the polysaccharide and the protein was O-type glycopeptides linkage. The major allergen of Chinese shrimp showed high sequence identity with that of other shellfish.

Key words: *Penaeus chinensis*; allergen; identification; peptide mass fingerprint (PMF)