

阴离子交换层析法分离纯化花生主要过敏原 Ara h1 的研究

何伟逸¹, 吴序栋², 刘志刚², 黄海珍², 李瑶¹, 叶焯², 曹鹤瑶¹

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

摘要: Ara h1 蛋白是花生的主要过敏原蛋白。本研究从天然的花生提取花生蛋白质, 通过硫酸铵分级沉淀及阴离子交换层析法纯化花生主要过敏原 Ara h1。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白纯度, 结合免疫印迹实验对 Ara h1 免疫活性进行鉴定。结果表明: 采用阴离子交换层析法纯化出的 Ara h1 纯度达到 90% 以上。得率为 23.1%。免疫印迹实验表明, 此方法纯化出来的 Ara h1 仍具有免疫原性, 能跟花生过敏病人血清特异结合。

关键词: 花生; 食物过敏; 纯化; 阴离子交换层析

文章编号: 1673-9078(2013)4-768-771

Purification of Peanut Allergen Ara h1 with Anion-exchange Chromatography

HE Wei-yi¹, WU Xu-li², Liu Zhi-gang², HUANG Hai-zhen², LI Yao¹, YE Ye², CAO He-yao¹

(1. College of Life Science of Shenzhen University, Shenzhen, 518060, China)

(2. Medical College of Shenzhen University, Shenzhen, 518060, China)

Abstract: Protein Ara h1 is a major allergen in peanut. In order to obtain the natural peanut allergen Ara h1, ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography were used for purification. The analysis and identification of peanut allergens was carried out using SDS-PAGE and Western blot. The results showed that the purity of Ara h1 was more than 90 percent and the recovery accounted 23.1% of total Ara h1 with the anion-exchange chromatography. The Ara h1 purified by anion-exchange chromatography had immunocompetence. It can combine to peanut allergy patients serum with high specificity.

Key words: peanut; food allergy; purification; anion-exchange chromatography

花生是八大类食物过敏原之一, 花生过敏具有长期性与普遍性, 甚至威胁生命等特点, 引起全球广泛的关注^[1]。FAO (1995) 报告的八类过敏食物均为常见食物, 它们分别是牛奶、鱼、鸡蛋、甲壳类(虾、蟹)、花生、大豆、核果类(杏、腰果、板栗)以及小麦, 约占所有食物过敏原的 90% 以上^[2]。花生过敏引起的症状主要有咽喉水肿、急性哮喘、过敏性休克, 严重的情况甚至导致死亡^[3]。花生过敏与其他食物过敏不同, 花生过敏是终身伴随性疾病, 它不会因年龄的增长而消失^[4]。目前对花生过敏采取的治疗方法主要是脱敏治疗, 然而却具有一定的风险性, 对花生过

收稿日期: 2012-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101280); 广东省自然科学基金(S2012010008514); 深圳市重点实验室项目(SW201110010);

作者简介: 何伟逸(1987-), 男, 在读硕士, 主要从事食物过敏研究

通讯作者: 吴序栋(1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品过敏相关与食品安全管理的科研工作

敏蛋白进行低致敏性处理, 改变花生蛋白的结构和功能, 能够有效的降低风险性。有文献报道通过湿热处理, 能够明显的改变花生蛋白的结构与功能^[5]。花生作为一种重要食物, 对花生过敏引起的安全性研究显得非常重要。目前国际免疫联合会命名小组委员会认可的花生过敏原有 11 种^[6], 其中 Ara h1、Ara h2、Ara h3, Ara h4、Ara h6 属于主要过敏原, 可被 90% 花生过敏患者识别。为深入的研究花生过敏的机理, 必须对花生过敏原进行纯化, 获得足够纯度的过敏原蛋白。Ara h1 是花生中含量最丰富的蛋白之一, 也是花生主要的过敏原之一。为了获得高纯度 Ara h1 本研究以花生为原材料, 采用丙酮去脂, 硫酸铵分级沉淀和阴离子交换层析法纯化 Ara h1, 并对所纯化出来的 Ara h1 进行免疫印迹实验检测其免疫原性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与血清

500 g 花生购于深圳市南山区人人乐超市,花生过敏患者血清由深圳市儿童医院提供。

1.1.2 仪器与试剂

垂直板型电泳槽, model 1000/500 转膜电泳槽法国 Vilber Lourmat 公司; MonoQ 阴离子交换层析柱, 蛋白快速纯化仪, 美国 GE 公司; 低温高速离心机, Eppendorf 公司; pH 计 BANTE instrument 公司; 酶标仪 BioTek 公司; 磁力搅拌机, IKA-C-MAG 公司。

生物素标记的羊抗人 IgE 抗体, 链霉亲和素(HRP) Southern Biotech 公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 丙酮去脂

用飞利浦豆浆机将 200 g 干燥花生粉碎, 再将花生粉末置于 500 mL 的烧杯中, 加入适量丙酮, 于 4 °C 冰箱中磁力搅拌两小时, 反复多次去脂, 直至上清澄清为止。然后倒去丙酮, 将去脂花生粉末于通风橱中使丙酮风干。干后得脱脂花生粉末。

1.2.2 花生蛋白的粗提

称量花生粉末, 按每克样品 7 mL 加入 PBS 缓冲液进行蛋白提取, 4 °C 磁力搅拌 24 h。提完后用冷冻离心机在 15000 r/min, 4 °C 条件下离心 15 min, 上清液即为花生过敏原粗提液。

1.2.3 硫酸铵分级沉淀

将花生过敏原粗提液置于烧杯中, 在磁力搅拌的情况下缓慢加入硫酸铵直至饱和度达到 30%, 待完全溶解, 将粗提液在 4 °C 下 12000 r/min 离心 10 min。沉淀用适量的 PBS 完全溶解; 按相同的操作使离心后的上清液的硫酸铵浓度达到 70%, 第三次达到 100%。硫酸铵三次分级沉淀所得的蛋白溶液于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.4 阴离子交换层析法分离 Ara h1

平衡缓冲液、洗脱缓冲液的制备: 平衡缓冲液含 8 M 尿素, 20 mM 的 Tris-HCl (pH 8.0)。洗脱缓冲液与平衡缓冲液配制方法相同, 除多加 600 mM 的 NaCl。

过层析柱蛋白样品的制备: 先将硫酸铵沉淀的蛋白样品 1 mL 混合 3 mL 的平衡缓冲液, 于 15 mL 的 MILLIPORE 超滤离心管中超滤离心, 5000 r/min 离心 10 min。倒去滤液, 再添加平衡缓冲液 3 mL, 超滤离心, 如此反复 5 次。使蛋白样品溶液与平衡缓冲液相似, 最终样品体积为 1 mL。

在 ÄKTApurifier 全自动层析仪系统下, 采用强阴离子交换层析 MonoQ 5/50 GL 进行蛋白分离纯化, 花生蛋白上柱后, 用洗脱缓冲液以 0~600 mM/NaCl 连续

梯度洗脱, 280 nm 检测紫外吸收峰, 收集各洗脱峰。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳分析

采用不连续体系 SDS-PAGE 电泳平板凝胶, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 先用 80 V 恒压电泳 15 min, 然后 120 V 恒压跑电泳。电泳结束后经考马斯亮蓝 R 250 染色、醋酸脱色。

1.2.6 蛋白浓度的测定

采用 BCA 法, 用 BCA 蛋白含量试剂盒, 配制出不同浓度的标准蛋白溶液。用紫外分光光度计在 562 nm 处分别测定不同浓度标准蛋白溶液的吸光值, 以吸光值(A_{562})为纵坐标, 标准蛋白含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)为横坐标, 绘制标准曲线。

1.2.7 免疫印迹法鉴定过敏原

取 10 μL 的纯化蛋白液进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完后取出 SDS-PAGE 凝胶, 按凝胶的大小剪取硝酸纤维素膜 (NC 膜), 然后在 350 mA 条件下, 于 4 °C 冰箱中转膜 50 min。取下 NC 膜用 3% BSA 于 4 °C 冰箱中封闭过夜, 加入过敏病人的阳性混合血清(按 1:10 稀释)。摇床上摇 2 h 后, 将 NC 膜转入生物素标记羊抗人 IgE 抗体(按 1:1500 稀释)中摇 2 h。链霉亲和素(HRP)按 1:1000 稀释后将 NC 膜放入其中摇 2 h。最后 DAB 显色, 待条带清晰后即用水冲洗, 终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 花生粗提蛋白的 SDS-PAGE 电泳

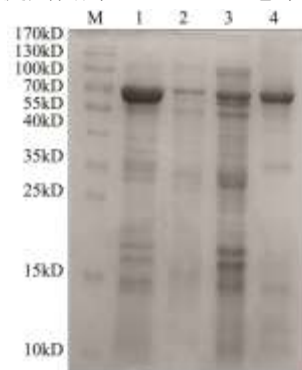


图 1 花生粗提液蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.1 SDS-PAGE of total protein in crude extract from peanut

注: M. 分子质量标准; 1. PBS 浸提花生粗蛋白; 2. 30% 硫酸铵沉淀蛋白; 3. 70% 硫酸铵沉淀蛋白; 4. 100% 硫酸铵沉淀蛋白。

如图 1 所示, 由 PBS 浸提的花生粗提蛋白条带很多, 1 条带 55~70 kD 之间有一条清晰而粗的蛋白条带, 10~55 kD 蛋白分布少且均匀。2 条带是 30% 硫酸铵沉淀蛋白, 条带稀少。3 条带是 70% 硫酸铵沉淀的蛋白, 条带很多, 分布比较均匀。第 4 条带在 60 kD 左右有一条清晰而粗的蛋白带, 除了这一条带之外, 只有大

概只有不到 10 条的蛋白带。由文献可知 Ara h1 的分子量大小为 63.5 kD。因此根据上面的结果分析选用 100% 硫酸铵沉淀的蛋白来提取 Ara h1。

2.2 MonoQ 阴离子柱分离纯化过敏原 Ara h1

花生上柱前, 用含 8 M 尿素的 20 mM/Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.0) 平衡 MonoQ 层析柱, 待花生粗提蛋白上样后, 用 0~600 mM/L NaCl 洗脱液进行连续的线性梯度洗脱 30 min, 流速为 1 mL/min。洗脱结果见图 2。一共出现 6 个峰, 前 5 个峰是 0~600 mM/L NaCl 梯度洗脱所得, 第 6 个峰是 1.5 M NaCl 洗脱所得到的。收集 6 个峰的洗脱液, 经 SDS-PAGE 鉴定。根据文献报道 Ara h1 的分子质量为 63.5 kD, 由图 3 可见, 只有 3 号峰跑的条带, 分子质量是 63.5 kD, 其余均未出现分子质量是 63.5 kD 的条带。因此判定 3 号峰即是要分离的目的蛋白。

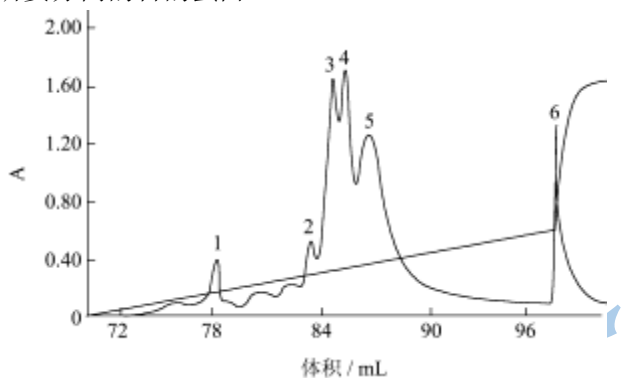


图 2 MonoQ 5/50 GL 强阴离子交换层析柱纯化峰型图

Fig.2 Purification of total protein by MonoQ 5/50 GL

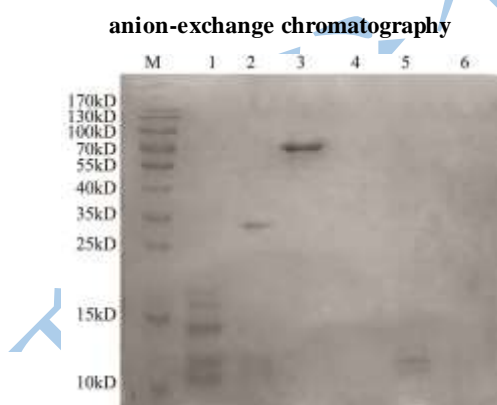


图 3 阴离子交换各峰的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

Fig.3 SDS-PAGE of purified peanut protein by MonoQ 5/50 GL anion-exchange chromatography

2.3 Ara h1 纯化回收率

采用 BCA 法测定上柱前花生粗提蛋白的浓度与过柱后纯化所得 Ara h1 浓度。根据文献报道 Ara h1 占花生总蛋白的 14% 左右。本实验花生粗提蛋白浓度测得是 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 上柱 200 μL , 收集到的目的蛋白 4 mL, 测得浓度为 0.065 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。因此可算得:

$$\text{Ara h1 蛋白得率} = (0.065 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L}) / (40 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 200 \mu\text{L} \times 14\%) = 23.1\%$$

2.4 Ara h1 的免疫学鉴定

免疫印迹又称蛋白质印迹 (Western blotting), 是根据抗原与抗体能够特异性结合的原理而设计的鉴定抗原抗体存在的一种常用方法。由于免疫印迹具有 SDS-PAGE 的高分辨率和固相免疫测定的高特异性和敏感性, 现已成为蛋白分析的一种常规技术。本实验首先将分离纯化所得的 Ara h1 进行复性浓缩, 除去尿素。然后进行 SDS-PAGE 实验, 再将聚丙烯酰胺凝胶上的 Ara h1 蛋白转移到 NC 膜上。然后进行免疫学鉴定, 结果如图所示, 在 63.5 kD 处有一印迹条带, 说明通过该方法纯化所得的 Ara h1 依然具有免疫反应性。

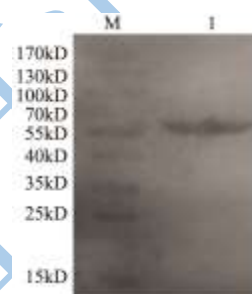


图 4 纯化后 Ara h1 免疫印迹图

Fig.4 Western-Blotting analysis of purified Ara h1

注: M. Marker; 1. 过敏患者混合血清免疫印迹条带。

3 结论

3.1 食品安全问题是全球关注的热点问题, 食物过敏则是食品安全的研究方向之一, 食物过敏也称食物变态反应, 是由于某种食物或食品添加剂等引起的 IgE 介导和非 IgE 介导的免疫反应, 而导致消化系统内或全身性的变态反应, 属于即时性过敏, 通常也叫 I 型过敏反应。是机体对过敏原物质产生的一种不正常反应。当过敏原或抗原与过敏机体首次接触后, 作用于抗原提呈细胞, 使 T 细胞和 B 细胞激活, 进而使得效应 B 细胞分泌特异性的 IgE 抗体。IgE 抗体与肥大细胞表面的 FC ϵ R1 受体结合, 这一阶段称为过敏的诱导阶段。当过敏原再次进入机体后会与肥大细胞表面的 IgE 结合使肥大细胞脱颗粒启动病理过程, 这一阶段称为效应阶段, 使细胞释放出血管活性物质如 5-羟色胺、组胺等, 引发一系列的过敏症状^[7]。近年来, 世界各国对花生过敏的研究越来越多, 花生营养丰富, 富含蛋白质、脂肪、钙、磷、铁等元素和维生素 B1、B2, 胡萝卜素、尼克酸、维生素 E, 以及脑磷脂、卵磷脂等营养成分^[8]。但是花生蛋白却是重要的食物过敏原之一, 花生引起的过敏属于速发型过敏, 其特点

具有长期性,甚至是终身的^[9]。花生过敏有时可引起过敏性休克,甚至危及生命^[4]。花生过敏的危害如此之大,因此,加大开展花生过敏研究力度显得尤为必要。要透彻地研究花生过敏,对花生过敏原的研究是关键。花生的过敏原主要有 Ara h1、Ara h2、Ara h3、Ara h4、Ara h6^[10]。其中 Ara h1、Ara h2 这两种过敏原能被 90% 的花生过敏患者的血清识别^[11]。本实验先用硫酸铵沉淀法去除相当一部分杂蛋白,选择含目的蛋白最多的 100% 硫酸铵饱和度沉淀出来的蛋白作为上柱子的层析蛋白样品,然后采用阴离子交换层析法来分离纯化花生主要过敏原 Ara h1。Ara h1 占花生蛋白总量 12~16%,其分子量大小为 63.5 kD,热稳定性强,耐酶解,不易消化^[12],等电点为 4.55^[11]。根据其等电点选择强阴离子柱。离子交换层析法的原理是:被分离物质所带的电荷可与离子交换剂所带的相反电荷结合,这种带电分子与固相之间的结合作用是可逆的,在改变 pH 值或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时,离子交换剂上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于不同的物质所带的电荷不同,它们与离子交换剂的结合能力也不同,所以被洗脱到溶液中的顺序也不同,从而可被分离开来^[13]。Ara h1 的等电点为 4.55,其在 pH 值为 8.0 时带有比较强的负电荷,可与阴离子柱中带正电荷的介质发生结合,那些等电点高于 8.0 的蛋白在蛋白上柱后不能与介质结合,在上柱子平衡的时候就被洗脱了下来。用 600 mM 的 NaCl 进行梯度洗脱,因为不同蛋白等电点有所区别,带电荷量低的蛋白由于与介质的结合能力较弱,会被先洗脱下来。因此,随着离子强度的连续增加,不同蛋白按照所带电荷量的大小被顺序洗脱下来。本实验采用 MonoQ 强阴离子柱,40 min 连续梯度洗脱的方法,分辨率较好,虽然第 3 峰与第 4 峰有部分重叠,但仍能得到较好的分离效果。

3.2 对分离所得到的目的过敏原,进行复性浓缩后,采用免疫印迹法对所分离出来的 Ara h1 进行免疫反应活性鉴定。实验结果表明,用该种阴离子交换法分离纯化得到的 Ara h1 依然具有免疫活性。因此可用该方法分离纯化天然花生过敏原 Ara h1,进行进一步科学研究。

参考文献

- [1] Hefle S L, Nordlee J A, Taylor S L. Allergenic foods [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36(6): 69-89
- [2] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Current understanding of food allergens [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 964: 69-85.
- [3] Bock S A, Munoz-Furlong A, Sampson H A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods [J]. Allergy Clin Immunol, 2001, 107(1): 191-193
- [4] Fleischer D M. The natural history of peanut and tree nut allergy [J]. Current Allergy Asthma Reports, 2007, 7(3): 175-181
- [5] 刘岩,赵冠里,赵谋明,等.花生湿热处理对其分离蛋白的结构和功能特性的影响[J].现代食品科技,2011,27(5): 506-510
- [6] Wijk F V, H S, Koppelman S J. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h1, Ara h2, Ara h3 and Ara h6 in an oral sensitization model [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(9): 1422-1428
- [7] 何韶衡,刘志刚.基础过敏反应学[M].北京:科学出版社,2009
- [8] 陈杰,徐鹤龙,方志伟,等.王春玲.花生蛋白饮料加工技术研究[J].现代食品科技,2009,12(25):1445-1447
- [9] 刘建欣,郑昌学.现代免疫学.免疫的细胞和分子基础[M].北京:清华大学出版社,2003
- [10] Viquez O M, Konan K N, Dodo H W. Structure and organization of genomic clone of a major peanut Ara h1 [J]. Molecular Immunology, 2003, 40: 565-571.
- [11] Wijk F V, Hartgring S, Koppelman S J. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h1, Ara h2, Ara h3 and Ara h6 in an oral sensitization mode [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34: 1422-1428.
- [12] Burks A W. Identification of peanut allergen Ara h1 in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges [J]. Allergy Clin Immunol, 1991, 88: 172-177
- [13] 吕宪禹,孙雷,陈小刚等.蛋白质纯化实验方案与应用[M].北京:化学工业出版社,2010