

坚果类过敏原的分离及免疫印迹分析

张爱琳^{1,2}, 王昌禄², 胡云峰², 周志江³

(1. 天津市食品加工工程中心, 天津 300457) (2. 天津农学院食品科学系, 天津 300384)

(3. 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 本文采用传统的丙酮、乙醚溶剂去脂方法, 选用不同品种和不同种类的坚果食品对其进行过敏蛋白的初步分离, 应用 BCA 蛋白试剂盒测定各蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 电泳分离坚果过敏蛋白各组份, 采用免疫印迹(Western-blotting)方法鉴定坚果蛋白的过敏性。结果表明, 各坚果蛋白提取浓度为白芝麻: 14 mg/mL, 黑芝麻: 4 mg/mL, 核桃: 8 mg/mL, 腰果: 28 mg/mL, 开心果: 21 mg/mL。SDS-PAGE 电泳显示 15 ku 是白芝麻的主要蛋白, 34 ku 是黑芝麻的主要蛋白, 19 和 37 ku 是腰果的主要蛋白, 13 ku 是核桃的主要蛋白, 13 和 21 ku 是开心果的主要蛋白。Western-Blotting 显示对过敏患者的阳性混合血清均有过敏反应, 坚果过敏具有同源性, 白芝麻与黑芝麻的主要过敏原分子量均在 22 ku, 腰果的主要过敏原分子量在 20 ku, 核桃的主要过敏原分子量在 54 ku, 开心果的主要过敏原分子量在 23 ku。

关键词: 坚果; 过敏原; SDS-聚丙烯酰胺凝胶; 免疫印迹

文章编号: 1673-9078(2014)3-99-102

Isolation of Allergens in Nuts and Analysis on Western Blotting

ZHANG Ai-lin^{1,2}, WANG Chang-lu², HU Yun-feng², ZHOU Zhi-jiang³

(1. Tianjin Engineering Center of Food Process, Tianjin 300457, China)

(2. Department of Food Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

(3. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Acetone and ethyl ether solvent were used to degrease of different kinds of nuts, then the allergen were isolated from the defatted nuts. The concentration and molecular weight of allergenic proteins were tested by the BCA protein kit and SDS-PAGE. Western-blotting was adopted for the identification of nut allergens. Results showed that the extracted concentration of the protein of white sesame, black sesame seed, walnut, cashew and pistachios were 14 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 28 mg/mL and 21 mg/mL, respectively. In addition, the molecular weight of each allergenic protein from the above-mentioned five nuts were 15 ku, 34 ku, 19 and 37 ku, 13 ku, 13 and 21 ku, respectively. The Western-blotting method showed allergenic reaction to patients with positive mixed serum. Nut allergy had homology, and the main allergens of sesame, cashew nuts, walnut and pistachios were at 22, 20, 54 and 23 ku.

Key words: nuts; allergens; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); Western-blotting

随着食品行业的加速发展, 环境污染加剧, 过敏食物越来越多, 食品过敏的发病率和流行情况日益加剧, 食品过敏性疾病已成为一个新兴的、公众性、全球性的健康问题^[1], 给临床变态反应学和食品工业造成了巨大的压力^[2, 3]。加之, 食物过敏原的种类和来源急剧增加, 与食物过敏直接相关的过敏性疾病亦趋于多样化、复杂化和严重化^[4], 过敏症成为了人类健康和生命危害的又一大文明病。国外流行病学调查表明, 约 1~2%的成人和 5~7%的儿童对一种或者几种食品过敏^[5], 因此食物过敏已被视为一种严重的世界公

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2013M541181)

作者简介: 张爱琳 (1977-), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 食品安全与检测

共卫生问题^[6]。其中坚果类制品的过敏更是占有很大的比重, 因坚果类食品具有极高的营养价值及其独特的风味, 作为疗效食品和休闲食品备受消费者的喜爱, 但是坚果类食品过敏问题涉及食物过敏症的 90%^[7], 在食品标签上标明过敏原的存在是避免过敏患者食入潜在过敏原的最有效的途径。目前, 体外免疫印迹分析检测技术是将免疫反应与现代检测手段相结合而建立的超微量测定技术, 是以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的分析技术, 在过敏原的检测中也有较广泛的应用^[8]。本研究旨在通过醚类和丙酮等有机试剂对坚果类蛋白进行粗提取分离, 再应用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹分析研究坚果食品中的过敏原, 找到引起人体致敏的主要过敏原蛋白, 以期得到纯度比较高的坚果类过敏原-抗原, 为后续的

研究坚果致敏机理奠定基础,并对临床过敏症诊断及过敏原检测提供借鉴,对生产企业在坚果过敏原的标注上起到推进作用,为普通消费者选购该类食品也具有一定的指导意义^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 原料

黑芝麻、白芝麻、核桃、开心果、腰果均购自天津市物美超市,产地河北省。

1.2 仪器与试剂

DYY-7C型转膜电泳仪,北京市六一仪器厂;电泳仪、凝胶成像仪,伯乐生命医学产品有限公司;酶标仪,赛默飞科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒,博士德生物;ECL化学发光显色液,上海西唐生物科技有限公司;HRP标记山羊抗人IgE抗体(进口),艾美捷科技有限公司;过敏病人阳性血清(7人混合),天津市长征医院变态反应病理室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质的粗提取

1.3.1.1 粉碎

将白芝麻、黑芝麻、核桃、腰果和开心果分别在冰浴中研磨破碎,并分别称取坚果样品的质量。

1.3.1.2 去脂

用丙酮浸泡放入4℃冰箱中去脂1d,期间冰浴中用丙酮、乙醚多次交替去脂,直至脱脂的丙酮澄清后倒掉丙酮,并在通风橱中风干,直至样品呈粉末状。分别称取去脂后的样品质量,测定脂肪的去除效果,即蛋白质的得率。

1.3.1.3 提取

分别称取10g风干后的样品,按1:10比例加入PBS 100 mL进行蛋白质提取,用磁力器搅拌24h。提取完后用冷冻离心机在10000 r/min、4℃条件下离心10 min,并将上清液在冰浴上过滤。

1.3.1.4 透析

将透析袋置于NaHCO₃溶液中煮30 min,将坚果类的过敏原粗提液分别装入透析袋中,用密封夹夹紧袋口,于磷酸盐缓冲溶液中透析48 h,期间每隔6~8

小时更换一次透析液,得到粗提的蛋白质样品。将各样品分装后放入-18℃冰箱中保存备用。

1.3.2 蛋白质含量的测定

解冻蛋白质样品之后用BCA蛋白定量试剂盒进

行测定,参照操作说明进行,蛋白质样品分别稀释2、4、8、16、32、64倍。

1.3.3 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳配置方案

表1 凝胶配制比例(mL)

凝胶	H ₂ O	30% Arc/Bis	1.0 M Tris-Hcl	1.5 M Tris-Hcl	10% SDS	10% AP	TEMED
分离胶	6.68	8.00	0	5.00	0.20	0.10	0.01
浓缩胶	6.80	1.70	1.25	0	0.10	0.10	0.01

1.3.4 免疫印迹方法鉴定过敏原

1.3.4.1 转膜(半干电转移)

取出SDS-PAGE凝胶,按凝胶的大小剪取NC膜和滤纸。NC膜在无水甲醇中浸泡15 s,将胶和膜放入电转缓冲液中平衡20 min后,在150 V恒压下,于4℃冰箱中电转80 min。用2% BSA-TBS封闭2 h后将膜放入血清池中,在血清池中加入过敏较严重病人(共6人)的混合阳性血清。十分钟后取出滤纸、凝胶和NC膜,按照三张滤纸+凝胶+NC膜+一张滤纸+两张滤纸的顺序叠放,放入转膜电泳仪中,在100 mA条件下转膜20 min。然后进行封闭,抗体制备。

1.3.4.2 免疫反应

将NC膜放入制备好的混合血清中,在4℃条件下孵育过夜。之后用TBST清洗NC膜30 min,期间换液3次。清洗后将NC膜放入二抗溶液中,在37℃恒温培养箱中培养2 h。过后取出NC膜。用ECL显色:将ECL试剂的A液(鲁米诺)与B液(过氧化氢)按照1:1的比例混合,滴加在NC膜表面,显色1 min。

1.3.5 数据统计及图形分析

用Excel 2007统计分析所有数据,计算标准误差并制图;用SPSS 11.0软件进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 五种样品的粗蛋白得率

五种样品在冰浴研碎后均称取100 g进行去脂处理,去脂彻底后,分别称取风干后的样品质量,所得蛋白得率如图1所示。

由图1可知,白芝麻的蛋白得率高于黑芝麻,即黑芝麻中有更多的脂肪含量,五种坚果中核桃的脂肪含量最多,占总质量的一半以上。白芝麻和开心果的脂肪含量是最少的,粗蛋白质约占各坚果总质量的60%左右。

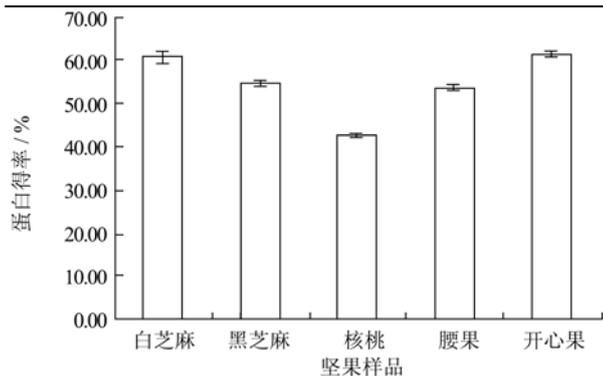


图1 坚果蛋白得率 (n=3)

Fig.1 protein yield of the nuts

注: $\sigma < 0.5$ (由三维图变为二维图)。

2.2 蛋白质标准曲线的绘制

采用 BCA 蛋白定量试剂盒分析方法配制标准蛋白后测得的标准蛋白曲线如图 2 所示。

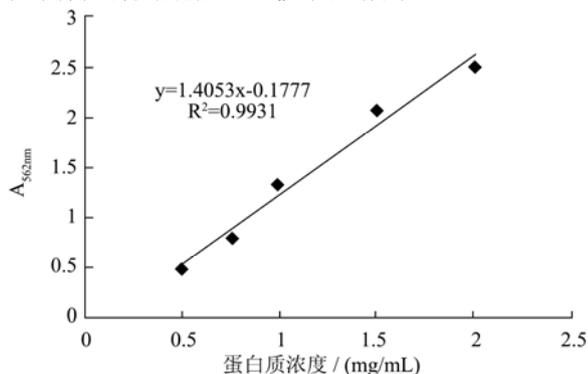


图2 蛋白质标准曲线

Fig.2 The standard curves of BCA

由图 2 可知, 蛋白质含量的标准曲线方程为 $y=1.4053x-0.1777$, $R^2=0.9931$, 方程呈线性相关。

2.3 BCA 蛋白定量试剂盒测定

待测坚果样品分别进行 2、4、8、16、32、64 倍稀释, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒的方法测定 A_{562} , 结果如表 2 所示。

表2 坚果 BCA 蛋白定量结果

Table 2 The protein quantitative results of BCA

稀释倍数	1	2	3	4	5
2	2.87	1.69	2.65	2.92	2.99
4	2.75	0.94	2.68	2.07	3.23
吸光度	1.98	0.53	2.68	1.27	2.54
值 A_{562}	1.21	0.34	2.07	0.73	1.67
32	0.75	0.24	1.17	0.47	0.99
64	0.46	0.21	0.75	0.33	0.62

注: 1 为白芝麻; 2 为黑芝麻; 3 为腰果; 4 为核桃; 5 为开心果。

根据标准曲线, 将蛋白样品的 A_{562} 值代入上述方程, 即可获得蛋白样品的浓度。由于实验的误差, 最终的蛋白浓度由所测得的相近的两个浓度值取平均值。各样品的浓度如图 3 所示。

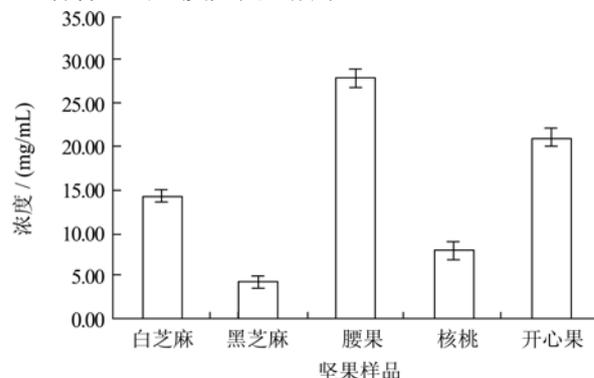


图3 坚果蛋白浓度 (n=3)

Fig.3 protein concentration of the nuts

注: $\sigma < 0.5$ (由三维图变为二维图)。

图 3 可知, 10 g 样品在 PBS 缓冲液 pH 7.8 下提取蛋白质效果最好的是腰果样品, 提取效果最差的是黑芝麻样品, 蛋白浓度低于 5%, 综合各坚果的物性, 采用上述方法五种样品均有较好的提取效果。

2.4 蛋白粗提液 SDS-PAGE 结果

提取出的各坚果蛋白分别用上样缓冲液稀释到 2 mg/mL 后上样, 进行电泳, 电泳结果如图 4 所示。

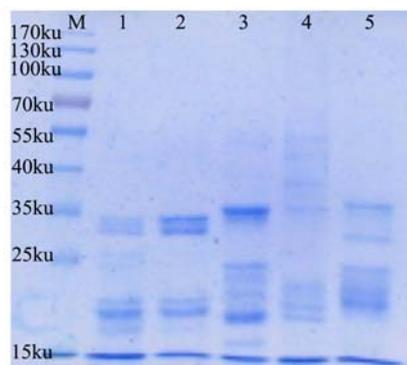


图4 白芝麻、黑芝麻、腰果、核桃、腰果粗提液蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.4 Result of SDS-PAGE test on the protein of nuts

注: M 为分子质量标准; 1 为白芝麻蛋白条带; 2 为黑芝麻蛋白条带; 3 为腰果蛋白条带; 4 为核桃蛋白条带; 5 为开心果蛋白条带。

从图 4 和表 3 可以看出, 白芝麻和黑芝麻蛋白种类很相似, 它们的电泳条带基本都是一致的, 核桃中蛋白种类多余其它四种样品, 导致其每一种蛋白含量较少, 条带不清晰。最富集的各样品条带分别为白芝麻 15 ku、黑芝麻 34 ku、腰果 37 和 19 ku、核桃 13 ku、腰果 21 和 13 ku。

表 3 坚果样品 SDS-PAGE 分析

样品/ku	1	2	3	4	5
	34	34	37	62	37
	26	31	25	54	32
	22	22	23	42	25
	19	19	20	38	23
	17	16	19	36	21
蛋白分子量	15	(5 条)	17	24	13
	(6 条)		14	22	(6 条)
			(7 条)	19	
				13	
				(9 条)	
最富集的条带	15	34	37 和 19	13	21 和 13

2.5 蛋白粗提液免疫印迹结果

选用临床上对坚果类食品过敏患者阳性混合血清为一抗，HRP 标记山羊抗人 IgE 抗体为二抗，ECL 显色法进行显色对五种坚果类食品的蛋白的过敏原进行了免疫印迹分析，在暗室中根据结果调整曝光时间和曝光区域，得到最佳结果，如图 5 所示。

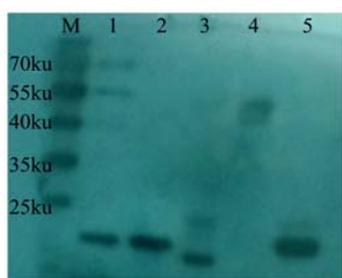


图 5 坚果提取过敏原蛋白免疫印迹结果

Fig. 5 Result of western-blotting test on the allergen of nuts

注：1 为白芝麻蛋白条带；2 为黑芝麻蛋白条带；3 为腰果蛋白条带；4 为核桃蛋白条带；5 为开心果蛋白条带。

根据图 5 免疫印迹反应可以看出，每类坚果都使阳性血清产生致敏性，白芝麻有 3 条免疫条带，分子量分别为 70 ku、55 ku 和 22 ku，主要的过敏原是 22 ku 附近的蛋白条带；黑芝麻有一个过敏条带，在 22 ku 附近；腰果有两个过敏条带，在 23 ku 和 20 ku 附近，20 ku 附近的条带为主要的过敏原；核桃只有一个过敏条带，在 54 ku 附近；开心果有两个过敏条带，在 25 ku 和 23 ku 附近，分子量为 23 ku 的蛋白是主要过敏原。

3 结论

3.1 本试验对五种坚果用丙酮和乙醚进行交替脱脂处理，得到一个较好的蛋白得率，分别为白芝麻：61.20%、黑芝麻：54.80%，核桃：42.00%，腰果：53.50%，

开心果：61.50%。

3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示，15 ku 是白芝麻的主要蛋白，34 ku 是黑芝麻的主要蛋白，19 和 37 ku 是腰果的主要蛋白，13 ku 是核桃的主要蛋白，13 和 21 ku 是开心果的主要蛋白。

3.3 Western-blotting 结果显示，五类坚果同时对过敏人群有致敏性，坚果类蛋白拥有共同的过敏原成分，具有同源性和交叉性，用同一种试剂方法检测多种坚果蛋白提供了创新手段；其中引起过敏反应的主要过敏物质为白芝麻的主要过敏原分子量在 22 ku，黑芝麻的主要过敏原分子量在 22 ku，腰果的主要过敏原分子量在 20 ku，核桃的主要过敏原分子量在 54 ku，开心果的主要过敏原分子量在 23 ku。

参考文献

- [1] Chiara Bignardi, Monica Mattarozzi, Andrea Penna, et al. Rapid Size-Exclusion Solid-Phase Extraction Step for Enhanced Sensitivity in Multi-Allergen Determination in Dark Chocolate and Biscuits by Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry [J]. Food Anal. Methods, 2013, 6: 1144-1152
- [2] J Ponsaille1, T Bourrier. Two pediatric cases of pine nut allergy proved by oral food challenge. From Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (FAAM 2013) Nice, France. 7-9 February 2013
- [3] Yubao Cui, Ying Zhou, Wei-hong Shi. Molecular cloning, expression, sequence analyses of dust mite allergen Der f 6 and its IgE-binding reactivity with mite allergic asthma patients in southeast China [J]. Mol. Biol. Rep. ,2012, 39: 961-968
- [4] Julie Barnett, Neil Botting, M Hazel Gowland, et al. The strategies that peanut and nut-allergic consumers employ to remain safe when travelling abroad. Barnett et al. Clinical and Translational Allergy 2012, 2:12, <http://www.ctajournal.com/content/2/1/12>
- [5] Reihaneh Noorbakhsh, Seyed Ali Mortazavi Ortazawi, Mojtaba Sankian. Influence of Processing on the Allergenic Properties of Pistachio Nut Assessed in Vitro [J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58: 10231-10235
- [6] 孙秀兰,管露,单晓红,等.食品过敏原体外检测方法研究进展[J].东北农业大学学报,2012,43(2):126-132
- [6] SUN X L, GUAN L, SHAN X H, et al. Research on food allergen detection methods in vitro [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(2): 126-132
- [6] Hamid Reza Nouri, Danial Afsharzadeh, Abdolreza Varas teh. Diagnosis of Chenopodium album allergy with a cocktail lof

- recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis [J]. Mol. Biol. Rep., 2012, 39: 3169-3178
- [7] 马涛,刘文颖,林峰,等.食物中过敏原的体外检测[J].食品工业,2012,33(7):137-141
Ma T, Liu W Y, Lin F, et al. Development of Detection Methods for Food Allergens [J]. Food Science, 2012, 33(7): 137-141
- [8] 吴序栋,陈莉娜,刘志刚,等.芝麻过敏原的分离、鉴定与纯化[J].中国粮油学报,2009,24(5):85-86
Wu X L, Cheng L N, Liu Z G. Isolation, Identification and Purification of Allergens in Sesame Seeds [J]. Journal of grain and oil chinese, 2009, 24(5): 85-86
- [9] 郑义成,华萍,杨安树,等.食物中过敏原检测技术研究进展[J].食品科学,2010,31(21):417-420
ZHENG Y C, HUA P, YANG A S, et al. Research Advance in Detection Technologies for Allergen in Food [J]. Food Science, 2010, 31(21): 417-420

现代食品科技