

## 日本鳗鲡胶原蛋白和小清蛋白的过敏原性

刘光明, 史千玉, 蔡秋凤, 潘冰青, 翁武银, 苏文金, 曹敏杰\*

(集美大学生物工程学院,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021)

**摘要:**以日本鳗鲡皮与肌肉组织为研究对象,采用碱溶、酸溶、盐析、冻干等方法纯化得到胶原蛋白,采用加热、饱和硫酸铵分级盐析、DEAE-Sepharose 阴离子交换层析等方法纯化得到两种亚型的小清蛋白(PV-I 和 PV-II),纯化的目标蛋白经动物特异性抗体的免疫印迹实验确证。酶联免疫吸附测定和免疫印迹分析结果显示,纯化的胶原蛋白和小清蛋白分别与鱼类过敏患者阳性血清发生特异性反应,且二者之间无免疫交叉反应。体外模拟胃液消化实验和 SDS-PAGE 分析结果显示,胶原蛋白和小清蛋白均具有较高的消化稳定性。结果提示,日本鳗胶原蛋白和小清蛋白具有较高的消化稳定性和免疫原性,二者可引发不同患者的 IgE 介导特异性超敏反应。

**关键词:**日本鳗鲡;胶原蛋白;小清蛋白;过敏原;免疫分析;免疫交叉反应;模拟胃液消化  
**中图分类号:** Q 515<sup>+</sup>.1; Q 512<sup>+</sup>.6; S 917  
**文献标识码:** A

食物过敏主要是由于食物过敏原刺激机体免疫反应引起的 IgE 介导型超敏反应。调查显示有 1%~2% 的成年人对食物过敏,儿童的食物过敏发生率达到 8%<sup>[1]</sup>。一般来说,食物中 90% 的过敏原是蛋白质,这些蛋白质能耐受食品加工、加热和烹调,能抵抗胃肠道消化酶并穿过肠道黏膜表面而被吸收,从而引发荨麻疹、哮喘、呕吐、腹泻、过敏性休克等症状,严重的过敏反应甚至危及生命<sup>[2]</sup>。研究表明鱼类小清蛋白能引起 IgE 介导的过敏反应,是鱼类主要过敏原。小清蛋白分子量约为 12 ku,是一种钙离子结合型水溶性蛋白,对热、化学变性以及蛋白水解酶都比较稳定,主要存在于鱼类白色肉中<sup>[3-4]</sup>。胶原蛋白也是鱼类过敏原,直接食用会产生严重的健康问题。鱼类胶原蛋白主要为 I 型,是白色、不透明、无支链的纤维型蛋白质,由三条分子量约 100 ku 的  $\alpha$  链形成的螺旋结构<sup>[5-6]</sup>。

以日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)为研究对象,从鱼皮和鱼肉中纯化得到胶原蛋白,从鱼肉中纯化得到小清蛋白,应用酶联免疫吸附测定、免疫印迹分析和体外模拟胃液消化实验分析目标蛋白的

免疫原性和消化稳定性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料与试剂

日本鳗鲡购自厦门市集美菜市场。现杀取肉,置于 -20 °C 保存备用。

SDS-PAGE 所用的标准蛋白为 Fermentas 公司产品,Western-blotting 所用的标准蛋白为 New England BioLab 公司产品,DEAE-Sepharose 为 GE Healthcare 公司产品,山羊抗人 IgE-HRP 和小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体为 Sigma 公司产品,兔抗小鼠 IgG-HRP 为 Denmark 公司产品,山羊抗兔 IgG-HRP 为 Pierce 公司产品,兔抗鲨鱼胶原蛋白多克隆抗体及猪胃蛋白酶由本研究室制备<sup>[7-8]</sup>,13 份鱼类过敏患者血清及无过敏正常人对照血清由厦门市第二医院和集美大学医疗中心提供,13 位过敏患者均有典型的过敏病史,主要症状包括荨麻疹、哮喘、过敏性鼻炎等。

#### 1.2 胶原蛋白的纯化

将新鲜鱼肉和鱼皮分别放于 10 倍体积 0.1 mol/L NaOH 中组织捣碎,4 °C 搅拌 1 d,4 °C,

收稿日期:2010-07-12 修回日期:2010-09-23

资助项目:国家自然科学基金项目(20872049);福建省自然科学基金(2008J0067,2010J0612,2010J01044);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(NCETFJ-2007);集美大学创新团队基金(2010A005);福建省科技计划重点项目(2010N0019)

通讯作者:曹敏杰,E-mail:mjcao@jmu.edu.cn

16 000 × g, 离心 15 min, 去上清。沉淀溶于 10% 正丁醇, 充分匀浆, 4 °C 搅拌 12 h, 4 °C, 12 000 × g, 离心 10 min, 去上清。超纯水洗 3~4 次, 离心去上清。沉淀溶解于 0.5 mol/L HAc, 充分匀浆, 4 °C 搅拌 3 d, 4 °C, 16 000 × g, 离心 20 min, 去沉淀, 上清用 4 mol/L NaCl 缓慢盐析到 NaCl 最终浓度为 0.9 mol/L, 4 °C, 16 000 × g, 离心 20 min。沉淀用 0.5 mol/L HAc 复溶, 0.1 mol/L HAc 为外液透析 3 d, 每天换液一次, 透析后样品冻干<sup>[6-7]</sup>。

### 1.3 肌浆蛋白的制备和小清蛋白的纯化

鱼类过敏原小清蛋白主要存在于鱼肉肌浆蛋白中。称取 60 g 鱼肉, 剁碎, 加入 10 倍体积 (v/w) 冰冷的 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 用组织捣碎机捣碎 (15 s × 5 次, 中间间隔 1 min), 将悬浮液于 8 000 × g 离心 10 min, 上清即为粗提的鱼肉肌浆蛋白<sup>[9-10]</sup>。将制备的粗提鱼肉肌浆蛋白, 置于 100 °C 水浴加热 10 min, 冷却至室温, 然后于 15 000 × g 离心 15 min, 所得上清进行 70%~100% 的饱和硫酸铵盐析, 离心后所得沉淀溶于适量 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 透析 24 h, 期间更换 3 次透析液; 透析后溶液于 10 000 × g 离心 10 min, 取上清上样于预先平衡好的阴离子交换柱 DEAE-Sepharose, 然后用缓冲液充分流洗未吸附蛋白 (流速 1 mL/min), 流洗到蛋白浓度约为 0 时, 用 0~0.5 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱吸附蛋白, 3 mL/管收集, 测  $A_{230}$  和  $A_{220}$ <sup>[10-12]</sup>。

### 1.4 SDS-PAGE 和 2D-PAGE

SDS-PAGE 参照 Laemmli 法<sup>[13]</sup>进行。双向电泳操作分为两部分, 第一部分是等电聚焦, 第二部分是 SDS-PAGE。等电聚焦: 将蛋白样品、水合液 (7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲及 2% CHAPS)、1 mol/L DTT、pH 4~7 的两性电解质及溴酚蓝以一定比例混合配制为 150 μL 上样液, 混匀后取 125 μL 上样液点样于电泳槽两极间, 将胶条放入电泳槽中, 胶条酸性端对应电泳槽正极, 碱性端对应电泳槽负极, 取一定量的甘油覆盖电泳槽, 盖上盖子将电泳槽置于等电聚焦电泳仪中, 于 20 °C 下进行等电聚焦。等电聚焦结束之后, 取出胶条, 超纯水冲洗、吸干, 将胶条先后置于含 2% DTT 及 2.5% IAA 的平衡缓冲液 (含 6 mol/L 尿素、2% SDS、50 mmol/L pH 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液、20% 甘油及 0.002% 溴酚蓝) 中, 分别平衡 20 min。然

后进行 SDS-PAGE 电泳<sup>[13-14]</sup>。

### 1.5 免疫印迹分析

Western-blotting 依照 Towbin 法<sup>[15]</sup>, 一抗为 1:300 稀释的兔抗鲨鱼胶原蛋白多克隆抗体, 二抗为 1:1 000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP, 二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色。Dot-blot<sup>[14]</sup>: 剪两块边长约为 5 mm 的正方形硝酸纤维素膜 (NC 膜), 做好标记。将蛋白分别点样在 NC 膜中央。点样结束后, 用 5% 脱脂奶室温下封闭 1.5 h。TBST 洗膜 5 min × 3 次, 加入稀释的一抗 (1:2 000 稀释的小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体, 或 1:5 稀释的鱼类过敏患者血清), 4 °C 反应 16 h。TBST 洗膜 5 min × 5 次, 加入稀释的二抗 (1:2 000 稀释的兔抗小鼠 IgG-HRP, 或 1:2 000 稀释的羊抗人 IgE-HRP), 在室温下反应 2 h。TBST 洗膜 5 min × 5 次, DAB 显色 30 min。

### 1.6 酶联免疫吸附反应 (ELISA) 测定

将蛋白样品 (200 ng, 100 μL/孔) 于 4 °C 包被 16 h, TBST 洗涤 (5 × 每孔 200 μL)。加入 5% 脱脂奶 (每孔 200 μL) 于 37 °C 封闭 1.5 h, TBST 洗涤 (3 × 每孔 200 μL)。加入 1:5 稀释的鱼类过敏患者血清 (每孔 50 μL) 于 37 °C 孵育 2.5 h, TBST 洗涤 (5 × 每孔 200 μL)。加入 1:2 000 稀释的羊抗人 IgE: HRP (每孔 100 μL) 于 37 °C 孵育 2 h, TBS-T 清洗 (5 × 每孔 200 μL)。TMB (每孔 100 μL) 避光显色 20 min, 2 mol/L 硫酸溶液 (每孔 50 μL) 终止反应, 酶标仪测  $OD_{450}$  值<sup>[8]</sup>。

### 1.7 模拟胃液 (simulated gastric fluid, SGF) 消化

SGF 参照美国药典方法<sup>[16]</sup>配制, 参与消化反应的胃蛋白酶活力为 8 185 U/mg 蛋白, 1 L 胃液中含 NaCl 2 g, 用 HCl 调 pH 1.2。体外 SGF 消化参照文献<sup>[8, 17]</sup>的方法: 在 2 只玻璃试管中加入 900 μL SGF, 于 37 °C 预热 15 min。分别向两只试管中加入 1 mg/mL 的蛋白 80 μL, 样品试管立即加入 20 μL 酶液 (蛋白和酶比例为 5:1), 对照试管加入未加酶的等体积模拟胃液。在 37 °C 水浴锅中振荡反应, 分别在反应 0、1、5、15、30、60、120 min 后取出 20 μL 反应液于含有 10 μL 终止液 ( $Na_2CO_3$ ) 的离心管中, 混匀使其中止反应, 置于冰上。

## 2 结果

### 2.1 胶原蛋白的纯化及确认

经过碱溶、酸溶、盐析、冻干等方法分别纯化

得到日本鳗鲡鱼皮和鱼肉的胶原蛋白(图 1-A), 鱼肉和鱼皮的胶原蛋白很相似,包括两条  $\alpha$  亚基 ( $\alpha_1$  和  $\alpha_2$ ) 和 1 条  $\beta$  链,  $\alpha_1$  链分子量约为 120 ku,  $\alpha_2$  链分子量约为 110 ku,  $\beta$  链分子量约为 250 ku。应用兔抗鲨鱼胶原蛋白多克隆抗体的 Western-blotting(图 1-B) 结果显示,日本鳗鲡胶原蛋白可与兔抗鲨鱼胶原蛋白多克隆抗体发生特异性杂交,证实从日本鳗鲡中纯化的目标蛋白样品确为胶原蛋白。

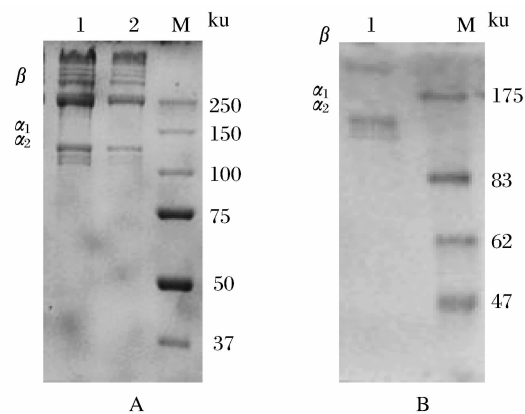


图 1 纯化日本鳗鲡胶原蛋白的 SDS-PAGE(A) 和 Western-blotting 分析(B)

1. 鱼皮胶原蛋白; 2. 鱼肉胶原蛋白; M. 标准蛋白。

Fig. 1 SDS-PAGE(A) and Western-blotting(B) analysis of purified collagen from Japanese eel

1. collagen extracted from fish skin; 2. collagen extracted from fish muscle; M. protein marker.

## 2.2 小清蛋白的纯化及确认

制备的日本鳗鲡鱼肉肌浆蛋白经过 70% ~ 100% 的硫酸铵分级盐析,透析后上样于 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱,用 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱。经过 DEAE-Sepharose 柱层析后,小清蛋白分为两种亚型,未吸附部分得到的小清蛋白为 PV- I 型,吸附部分得到的小清蛋白为 PV- II 型(图 2)。

SDS-PAGE 电泳分析显示,日本鳗鲡鱼肉肌浆蛋白在 110、52、50、41、35、30、28、11 ku 有特征蛋白(图 3,泳道 1 所示)。经过 100 °C 水浴加热后,所提取的肌浆蛋白只剩下位于 11 ku 左右的两条分子质量非常接近的条带,还有 30 ku 附近一条很模糊的条带(图 3,泳道 2 所示)。图 3 泳道 3 是经过 70% ~ 100% 硫酸铵盐析,再经过 24 h 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 透析后的样品,从

图中可见到在 30 ku 和 25 ku 处仍有模糊的条带。经 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱层析后,分子量位于 11 ku 附近的两条条带被分开:分子量较高的蛋白未被吸附,为 PV- I ;分子量较低的蛋白被吸附,为 PV- II 。

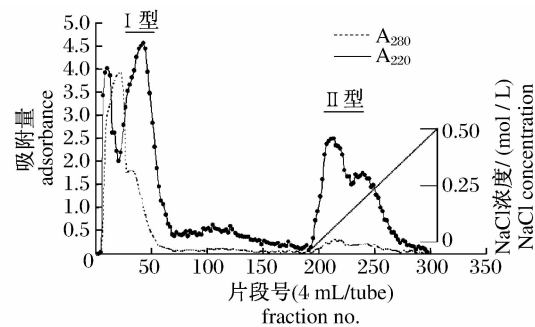


图 2 日本鳗鲡小清蛋白的 DEAE-Sepharose fast flow 离子交换柱层析(2.5 × 10.9 cm)

Fig. 2 DEAE-Sepharose fast flow column chromatography of purified parvalbumin from Japanese eel

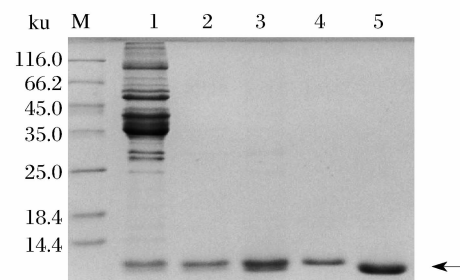


图 3 纯化日本鳗鲡小清蛋白的 SDS-PAGE 分析  
M. 标准蛋白; 1. 鱼肉肌浆蛋白; 2. 100 °C 加热后上清; 3. 硫酸铵盐析样品; 4. PV- I ; 5. PV- II 。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified parvalbumin from Japanese eel

M. protein marker; 1. myosinogen from fish muscle; 2. supernatant after 100 °C water bath 10 min; 3. fractionation with ammonium sulphate; 4. PV- I ; 5. PV- II 。

日本鳗鲡两种亚型小清蛋白的 2D-PAGE 分析结果显示(图 4),PV- I 型分子量约为 12 ku, pI 约为 5.3; PV- II 型分子量约为 11.5 ku, pI 约为 5.0。

以小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体(1:2 000 稀释)作为一抗,HRP 标记的兔抗小鼠 IgG(1:2 000 稀释)作为二抗,分别通过 Dot-blot 对日本鳗 PV- I 和 PV- II 进行鉴定。结果如图 5 所示,纯化的 PV- I 和 PV- II 都与小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体发生特异性杂交斑点,证实二者都是小清蛋白,且是不同的两个亚型。

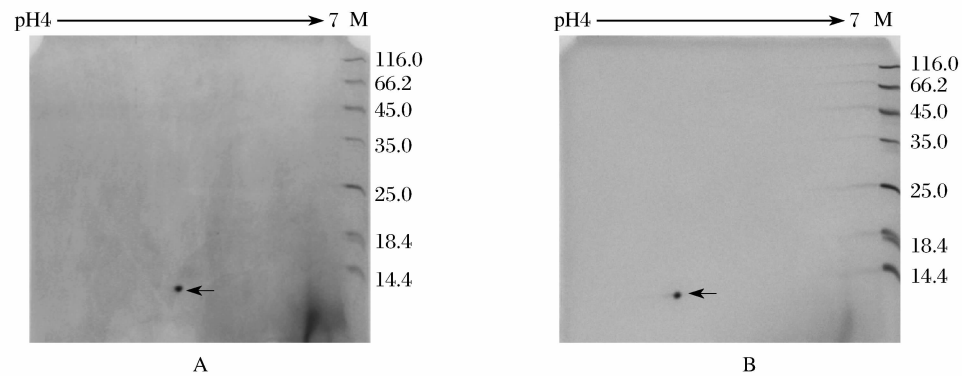


图4 纯化日本鳎小清蛋白 PV- I (A) 和 PV- II (B) 的 2D-PAGE 分析

M. 标准蛋白。

Fig. 4 2D-PAGE analysis of purified parvalbumin PV- I (A) and PV- II (B) from Japanese eel

M. protein marker.

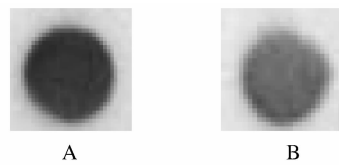


图5 纯化日本鳎小清蛋白 PV- I (A) 和 PV- II (B) 的 Dot-blot 分析

Fig. 5 Dot-blot identification of purified parvalbumin PV- I (A) and PV- II (B) from Japanese eel

### 2.3 纯化日本鳎胶原蛋白和小清蛋白与血清特异性 IgE 反应的 ELISA 测定

分别以纯化的日本鳎胶原蛋白和小清蛋白为抗原包被在 96 孔聚苯乙烯平板上,鱼类过敏患者血清作为一抗(1:5 稀释),以无过敏的正常人血清为阴性对照,与 1:2 000 稀释的羊抗人 IgE-HRP 反应后,TMB 显色后  $OD_{450}$  值如表 1 所示。无过敏的正常人血清中由于缺少与小清蛋白特异

表 1 纯化蛋白与鱼类过敏患者血清 ELISA 检测结果

Tab. 1 ELISA analysis of purified proteins reaction to sera from fish allergy

抗原 antigen	免疫 number of serum	$OD_{450}$	结果 result	评价 remarks		
胶原 collagen	0002	$0.083 \pm 0.008$	-	negative control		
	6415	$0.086 \pm 0.007$	-			
	5588	$0.089 \pm 0.008$	-			
	8807	$0.090 \pm 0.006$	-			
	7071	$0.087 \pm 0.011$	-			
	9666	$0.388 \pm 0.018$	+			
	5277	$0.370 \pm 0.023$	+			
	0149	$0.354 \pm 0.015$	+			
	parvalbumin- I	0002	$0.086 \pm 0.008$		-	negative control
		9666	$0.108 \pm 0.011$		-	
5277		$0.102 \pm 0.009$	-			
8807		$0.103 \pm 0.008$	-			
7071		$0.105 \pm 0.100$	-			
8277		$0.101 \pm 0.009$	-			
4989		$0.095 \pm 0.007$	-			
0612		$0.106 \pm 0.008$	-			
3132		$0.097 \pm 0.009$	-			
6415		$0.565 \pm 0.025$	+			
5588		$0.487 \pm 0.018$	+			
1030		$0.342 \pm 0.015$	+			
1529		$0.315 \pm 0.015$	+			

· 续表 1 ·

抗原 antigen	免疫 number of serum	OD <sub>450</sub>	结果 result	评价 remarks
parvalbumin- II	0002	0.085 ± 0.008	-	negative control
	9666	0.088 ± 0.006	-	
	5277	0.092 ± 0.005	-	
	6415	0.093 ± 0.008	-	
	5588	0.095 ± 0.009	-	
	1030	0.102 ± 0.008	-	
	1529	0.096 ± 0.007	-	
	8807	0.506 ± 0.019	+	
	7071	0.460 ± 0.015	+	
	8277	0.438 ± 0.012	+	
	4989	0.429 ± 0.015	+	
	0612	0.418 ± 0.014	+	
	3132	0.404 ± 0.016	+	

性结合的 IgE, 几乎没有颜色反应, 450 nm 处的吸光值很低; 鱼类过敏患者阳性血清在 450 nm 处的吸光值为无过敏正常人血清的两倍以上, 且纯化的 CO 和 PV 与不同的鱼类过敏患者阳性血清 IgE 发生特异性反应, 二者无免疫交叉反应。

#### 2.4 纯化日本鳗鲡胶原蛋白和小清蛋白与血清特异性 IgE 反应的 Dot-blot 鉴定

纯化的日本鳗鲡胶原蛋白与 3 份鱼类过敏患者血清(编号为 9666、5277、0149)的 Dot-blot 出现斑点, PV-I 与 4 份鱼类过敏患者血清(编号为 6415、5588、1030、1529)的 Dot-blot 出现斑点, PV-II 与 6 份鱼类过敏患者阳性血清(编号为 8807、7071、8277、4989、0612、3132)的 Dot-blot 出现斑点, 而无过敏的正常人血清的 Dot-blot 没有颜色反应。

#### 2.5 模拟胃液(SGF)消化

日本鳗鲡胶原蛋白的 SGF 消化结果如图 6-A,  $\beta$  链分解速率很快(1 min 分解完全),  $\alpha 1$  链降解较慢(1 h 分解完全)。降解产物主要出现在 97 ~ 116 ku、80 ~ 97 ku 和 66 ~ 97 ku 三段内, 97 ~ 116 ku 之间的降解产物又在 1 h 出现明显分解, 80 ~ 97 ku 之间的降解产物随着时间的延长而减少, 66 ~ 97 ku 之间的降解产物随着时间的延长而增加。肌浆蛋白的 SGF 消化结果见图 6-B, 随着消化时间的延长, 40 ku 处的蛋白被逐渐分解; PV 在肌浆蛋白中的含量很高, 其产生的降解条带也被逐渐分解; 肌浆蛋白在 25 ku 和 16 ku 处的条带分别在 15 min 和 30 min 就被完全分解。相对于肌浆蛋白中的其他蛋白, PV 的分解时间明显延长, 消化 30 ~ 60 min 仍可观察到 PV 及其小分子量的降解产物。

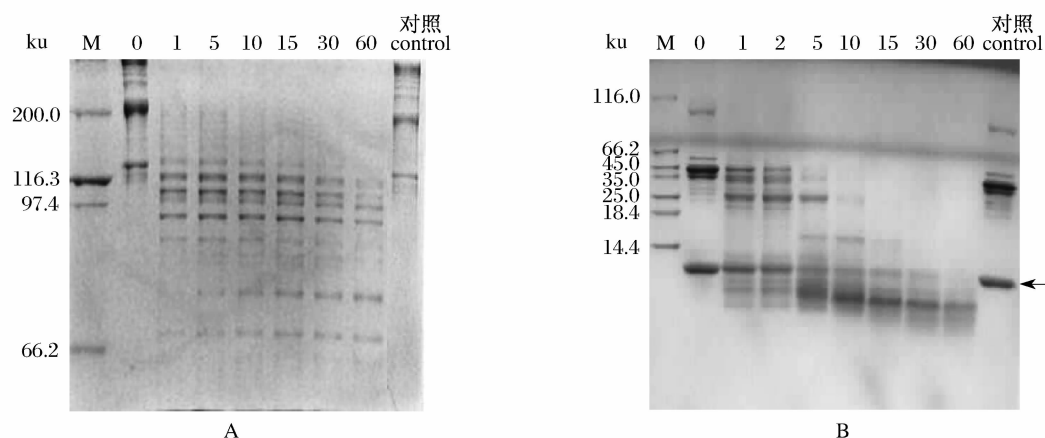


图 6 纯化日本鳗鲡胶原蛋白(A)和肌浆蛋白(B)的 SGF 消化

Fig. 6 SGF digestion of purified collagen(A) and myosinogen(B) from Japanese eel

### 3 讨论

国外学者发现了鱼类特异性过敏原为胶原蛋白<sup>[5]</sup>和小清蛋白<sup>[18]</sup>。其中鱼类胶原蛋白主要有 I 型和 V 型,本文采用碱溶、酸溶、盐析、冻干等方法纯化得到日本鳗鲡 I 型胶原蛋白,与文献中的胶原蛋白组成相同<sup>[6-7]</sup>。鱼皮与鱼肉胶原蛋白的组成也十分相似,均含有一个  $\beta$  亚基,它的大小约为 250 ku;同时也存在着两条  $\alpha$  亚基,分子量约为 120 ku 与 110 ku,纯化的胶原蛋白可被兔抗鲨鱼胶原蛋白多克隆抗体特异性识别。日本鳗鲡胶原蛋白的体外模拟胃液消化分解显示, $\beta$  亚基 1 min 就被消化降解,而  $\alpha$  亚基在 1 h 的消化降解才明显,消化产物主要在 66 ~ 116 ku 之间,结果表明胶原蛋白具有较高的消化稳定性。

本文采用加热、饱和硫酸铵分级盐析、DEAE-Sephrose 阴离子交换层析等方法纯化得到两种亚型的小清蛋白(PV-I 和 PV-II)。纯化的两种亚型日本鳗鲡小清蛋白均可与鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体发生特异性杂交反应。对实验中纯化得到的两种类型的小清蛋白进行双向电泳分析,可知二者都为酸性蛋白,且等电点接近,PV-I 型分子量约为 12 ku,  $pI$  约为 5.3;PV-II 型分子量约为 11.5 ku,  $pI$  约为 5.0。接下来将对两种类型的小清蛋白进行氨基酸测序,然后同 GenBank 数据库中的日本鳗鲡小清蛋白序列(BAF98922)<sup>[3]</sup>进行比对,分析其同源性并确定蛋白类型。日本鳗鲡小清蛋白的体外模拟胃液消化分解显示,消化 30 ~ 60 min 仍可观察到小清蛋白及小分子量的降解产物,结果表明小清蛋白同样具有较高的消化稳定性,该结果与我们的前期报道相似<sup>[17]</sup>。

值得指出的是,应用 13 份鱼类过敏患者阳性血清的 ELISA 和免疫印迹分析结果一致显示,纯化的胶原蛋白、小清蛋白分别与 3 份、10 份不同的阳性血清发生特异性的 IgE 结合反应,且无免疫交叉反应。而以胶原蛋白和肌浆蛋白为酶解底物进行体外模拟胃液消化实验,则可比较胶原蛋白中不同亚基之间、肌浆蛋白中小清蛋白和其它耐热性蛋白之间的抗消化性,结果显示胶原蛋白  $\alpha$  亚基和小清蛋白均具有较高的消化稳定性。实验结果提示,日本鳗鲡胶原蛋白和小清蛋白均具有较高的消化稳定性和免疫原性,二者可能引发不同患者的 IgE 介导特异性超敏反应。接下来将

利用过敏动物模型及更多的鱼类过敏患者阳性血清,深入研究鱼类胶原蛋白与小清蛋白的过敏原性,探讨不同加工处理及酶解消化过程中过敏蛋白的结构与性质变化。

#### 参考文献:

- [1] Sampson H A. Food allergy. Part 1. Immunopathogenesis and clinical disorders [J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103(5): 717-728.
- [2] Lopata A L, Lehrer S B. New insights into seafood allergy [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009, 9(3): 270-277.
- [3] Shiomi K, Hamada Y, Sekiguchi K, et al. Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna [J]. Fish Sci, 1999, 65(6): 592-595.
- [4] Heizmann C W, Berchtold M W, Rowlerson A M. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982, 79(23): 7243-7247.
- [5] Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of collagen as a new fish allergen [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(3): 285-291.
- [6] Zhang M, Liu W T, Li G Y. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*) [J]. Food Chem, 2009, 115(5): 826-831.
- [7] 陈申如, 蔡扬鹏, 周琼, 等. 鲨鱼鱼皮、鱼骨胶原蛋白的纯化及其特性的初步研究 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 173-178.
- [8] Huang Y Y, Liu G M, Cai Q F, et al. Stability of major allergen tropomyosin and other proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(5): 1196-1201.
- [9] Cao M J, Shao W, Li Y, et al. Identification of a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of silver carp [J]. J Food Biochem, 2004, 28(3): 373-386.
- [10] 汪宁, 蔡秋凤, 刘光明, 等. 鲢骨骼肌过敏原小清蛋白的分离纯化及多克隆抗体制备与应用 [J]. 水产学报, 2010, 34(1): 41-46.
- [11] Liu G M, Wang N, Cai Q F, et al. Purification and characterization of parvalbumins from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90(6): 1034-1040.
- [12] 梁银龙, 曹敏杰, 郭川, 等. 蟹类原肌球蛋白基因的

- 克隆与表达[J]. 水产学报,2009,33(1):24-29.
- [13] Laemmli U K, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation [J]. *J Mol Biol*,1970,47(1):69-85.
- [14] 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 4版. 北京:科学出版社,2005.
- [15] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:Procedure and some applications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(9):4350-4354.
- [16] US Pharmacopoeia, the National Formulary. Simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, TS[M] // *The United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18. The United States Pharmacopeial Convention, Inc: Rockville, MD, 1995:2053.*
- [17] 刘光明,黄园园,蔡秋凤,等. 淡水鱼类主要过敏原的模拟肠胃液消化[J]. 水产学报,2010,34(7):1136-1141.
- [18] Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod[J]. *Scand J Immunol*,1975,4(2):203-208.

## Allergenicity of collagen and parvalbumin from Japanese eel (*Anguilla japonica*)

LIU Guang-ming, SHI Qian-yu, CAI Qiu-feng, PAN Bing-qing,  
WENG Wu-yin, SU Wen-jin, CAO Min-jie\*

(College of Biological Engineering, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety in Fujian Province, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** As the largest producer and consumer of freshwater fish in the world, many people suffer from allergy for consuming freshwater fish in China. However, the allergen profiles of freshwater fish are rarely known. Parvalbumin (PV) and collagen represent the major allergens involved in IgE-mediated food hypersensitivity to fish and fish products. A variety of clinical symptoms, such as urticaria, angioedema, respiratory symptoms (asthma and rhinoconjunctivitis), gastrointestinal symptoms (diarrhea and vomiting) and, in severe cases, fatal anaphylaxis can be caused after ingestion of fish. In this paper, collagen was isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) via alkali dissolving, acid dissolution, salt precipitation, freeze-drying; and two subtypes of parvalbumin (PV-I, PV-II) were purified from Japanese eel with the methods of boiling, fractionation with ammonium sulphate, and DEAE-Sepharose anion-exchange chromatography. Then collagen and parvalbumin were identified by Western-blot with rabbit anti-collagen polyclonal antibody and by Dot-blot with mouse anti-parvalbumin monoclonal antibody respectively. After that, collagen and PV-I, PV-II were detected the cross immunoreaction of IgE binding to the fish-allergenic sera with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Dot-blot, and there is no cross immunoreaction to the fish-allergenic sera among collagen and PV-I, PV-II. Finally, the digestibility of collagen and parvalbumin was analyzed in simulated gastric fluid (SGF) digestion system. And the results showed that collagen and parvalbumin have high digestive stability. In conclusion, our present results indicated that collagen and parvalbumin from Japanese eel have high digestive stability and immunogenicity, and they can induce the IgE-mediated food hypersensitivity of different patients.

**Key words:** Japanese eel (*Anguilla japonica*); collagen; parvalbumin; allergen; immunoassay; cross immunoreaction; simulated gastric fluid digestion

**Corresponding author:** CAO Min-jie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn