

淡水鱼类主要过敏原的模拟肠胃液消化

刘光明, 黄园园, 蔡秋凤, 翁凌, 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:采用 Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)和免疫印迹(Western-blot)方法,通过模拟肠胃液消化实验分析淡水鱼类肌肉中主要过敏原小清蛋白(parvalbumin, PV)的消化特性。Tricine-SDS-PAGE 结果显示,纯化的鲫、鲢 PV 在模拟胃液消化实验中反应 5~30 min 明显分解,而在模拟肠液消化实验中 4 h 仍未见明显分解。鲫、鲢肌浆蛋白在模拟胃液消化实验中,肌浆蛋白中的 PV 比纯化 PV 的分解时间明显延长,消化 30~60 min 仍未被完全分解,而其它肌浆蛋白消化 10~30 min 就完全分解。采用抗 PV 多克隆抗体的 Western-blot 显示,该抗体能特异识别 PV 及其降解产物。研究结果表明,淡水鱼类 PV 相对于非过敏蛋白具有较高的消化稳定性,而胃蛋白酶能较好地分解该过敏原。

关键词: 鲫; 鲢; 模拟肠胃液消化; 小清蛋白; Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: TQ 93; S 917

文献标识码: A

食物过敏是人类常见的一种免疫性疾病,主要由食物中的蛋白质引起。食物过敏的主要症状有哮喘、荨麻疹等,严重时会引起休克甚至危及生命^[1]。近年来,因食用水产品而发生过敏的比率逐年增高^[2-3],因此,开展水产品过敏研究具有重要的现实意义。

随着研究的深入,不同种类水产品的过敏原陆续被发现。小清蛋白(parvalbumin, PV)是鱼类的主要过敏原。PV 是一种 Ca²⁺ 结合型的水溶性蛋白,分子量在 10~14 ku,已有文献报道鳕(*Gadus morrhua*)^[4]、鲮鱼^[5]、大西洋鲑鱼^[6]、鲤^[7]等多种鱼类 PV 能引起人类 IgE 介导的过敏反应。

鲫(*Carassius auratus cuvieri*)是一种成长快、适应能力强、疾病少、肉质细嫩、经济效益高的优质淡水鱼类;鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)广泛分布于亚洲东部,随处可见于我国各大水系,是我国淡水养殖的“四大家鱼”之一。以这两种具有重要经济价值和食用价值的淡水鱼为研究对象,通过模拟肠胃液消化实验分析比较鱼类 PV 与其他蛋白质的消化稳定性,以期为保障水产品安全性、提高水产品利用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜活鲫和鲢购自厦门市集美菜市场。即杀取肉后直接用于实验。

Tricine-SDS-PAGE 所用的标准蛋白分别为 GE 公司和 Fermentas 公司产品,Western-blot 所用的标准蛋白为 New England BioLab 公司产品,DEAE-Sephrose 为 Pharmacia 公司产品,山羊兔 IgG-HRP 为 Pierce 公司产品,猪胰蛋白酶、猪胰凝乳蛋白酶为 Sigma 公司产品,猪胃蛋白酶,兔抗鲢 PV 特异性多克隆抗体由本研究室制备^[8],其它试剂均为国产分析纯。

主要仪器设备有组织捣碎机(Kinematica,瑞士),高速冷冻离心机(Beckman,美国),凝胶成像仪(Vilber Lourmat,法国),电泳仪及电转移装置(Bio-Rad,美国),恒温水浴锅(Memmert,德国),微量蛋白测定仪(ND-1000,德国)等。

1.2 肌浆蛋白的制备

鱼类过敏原小清蛋白主要存在于鱼肉肌浆蛋白中^[5-6]。取新鲜鱼肉用组织捣碎机于 10 倍体

收稿日期:2010-02-24 修回日期:2010-04-10

资助项目:国家自然科学基金项目(20872049,30871947);福建省自然科学基金(2008J0067);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(2008A002)

通讯作者:曹敏杰, Tel:86-592-6180378, E-mail:mjcao@jmu.edu.cn

积(v/w)的冰冷 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)捣碎。重复 3 次(每次不超过 30 s,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^[9-10]。

1.3 PV 的纯化

按 1.2 的方法制备粗提的鱼肉肌浆蛋白,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,所得沉淀溶于适量的 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5);将溶液置于透析袋中,以 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)透析 24 h,期间更换 3 次透析液;最后将透析后溶液于 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-Sephrose,然后用缓冲液充分流洗未吸附蛋白(流速 1 mL/min),待流洗到蛋白浓度约为 0 时,用 0~0.5 mol/L NaCl 进行线性洗脱吸附的蛋白,以每管 3 mL 收集,测 A₂₈₀ 和 A₂₂₀,获得纯化的 PV^[8,11]。

1.4 PV 的模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)消化

SGF 参照美国药典方法^[12]配制,参与消化反应的猪胃蛋白酶水解底物牛血红蛋白的活力为 272 U/mg prot,1 L 胃液中含 NaCl 2 g,用 HCl 调 pH 至 1.2。体外 SGF 消化参照 Thomas 等^[13]的方法,并作适当修改。在玻璃试管中加入 SGF,于 37 °C 预热 15 min,再将纯化的过敏蛋白加入试管中混匀,总反应体系为 1 mL,胃蛋白酶与 PV 的比例为 1:50(w:w),37 °C 水浴锅中振荡反应。分别在反应 0、1、2、5、10、15、30、60 min 后取出 100 μL 反应液于 1.5 mL 离心管中,加入 30 μL 200 mmol/L Na₂CO₃ 混匀使其中止反应,置于冰上。其中 0 min 样品是将含有胃蛋白酶的 SGF 先与 Na₂CO₃ 中和终止反应,再加入一定量的蛋白底物;对照反应不加蛋白酶。

1.5 PV 的模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)消化

SIF 参照美国药典方法^[12]配制,参与反应的猪胰蛋白酶、猪胰凝乳蛋白酶活力分别为 325 U/mg prot 和 62 U/mg prot,SIF 消化实验反应体系为 500 μL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)。由于两种酶活力的差异,胰蛋白酶与底物的比例设为 1:400(w/w);胰凝乳蛋白酶与底物的比例为 1:50(w/w)。反应在 37 °C 下进行,反应进行一定时间后取出 50 μL 反应液于 95 °C 加热 5 min 终止反应,置于冰上。其中 0 min 样品是将含有

蛋白酶的 SIF 先加热失活终止反应,再加入一定量的蛋白底物;对照反应不加蛋白酶^[14]。

1.6 Tricine-SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

Tricine-SDS-PAGE 参照文献^[15]进行,考马斯亮蓝 R-250 染色;Western-blot 依照 Towbin 法^[16]进行,以二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色。

2 结果

2.1 PV 的纯化

由于 PV 的分子量比较小,用普通的 SDS-PAGE 不能分析其小分子量蛋白条带的降解情况。Tricine-SDS-PAGE 可分离分子量在 1~100 ku 的蛋白质,主要用于分辨分子量小于 30 ku 的蛋白质。所以本实验采用 Tricine-SDS-PAGE 分析比较鱼类过敏原 PV 的体外模拟消化结果。图 1 是鱼类过敏原 PV 的纯化结果,从图中可以看出两种鱼的 PV 分子量均为 10 ku 左右。该结果与文献报道的鱼类 PV 一致^[4-8]。

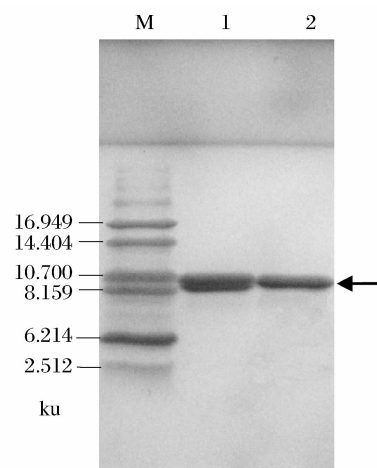


图 1 纯化的鲫、鲢小清蛋白

M. 标准蛋白; 1. 鲫的小清蛋白; 2. 鲢的小清蛋白。

Fig. 1 Purified PVs from crucian carp and silver carp

M. protein marker; 1. PV of crucian carp; 2. PV of silver carp.

2.2 纯化鲫 PV 的模拟胃肠液消化

纯化鲫 PV 的体外 SGF、SIF 消化结果见图 2。从图中可知,胃蛋白酶作用 1 min, PV 即开始降解,5 min 后,原始 PV 条带已被完全分解。随着时间的延长,在 2~6 ku 之间逐级产生低分子量的降解条带,消化 60 min 后,在 2 ku 处仍然能观察到一条微弱的蛋白带(图 2-A)。与甲壳类产品过敏原(原肌球蛋白)的 SIF 消化结果^[17]不

同的是,鲫 PV 在 SIF 消化中,对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶都有很强的耐降解性,消化 4 h 后 PV 仍然没有被降解(图 2-B,C)。

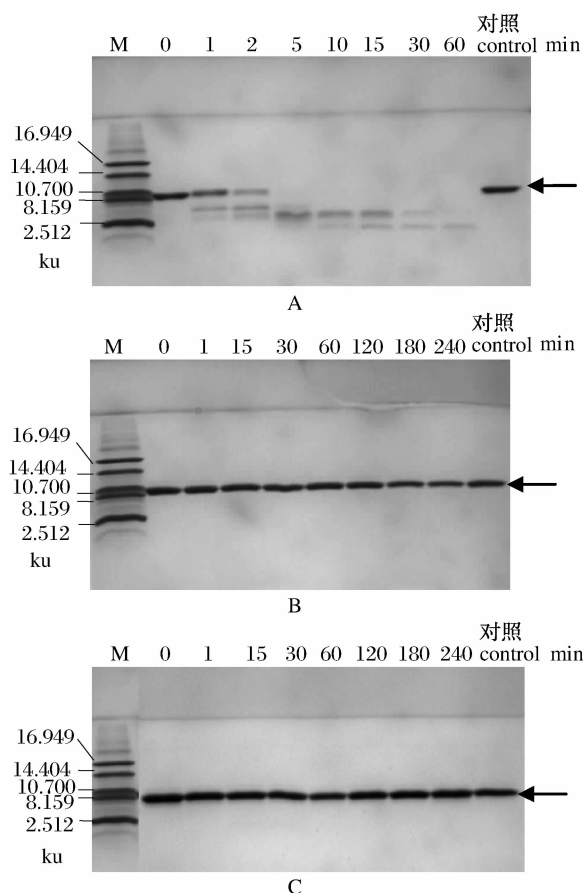


图 2 纯化鲫小清蛋白的模拟胃、肠液消化

M. 标准蛋白; A. 胃蛋白酶; B. 胰蛋白酶; C. 胰凝乳蛋白酶。

Fig. 2 SGF and SIF digestion on purified PV of crucian carp

M. protein marker; A. pepsin; B. trypsin; C. chymotrypsin.

2.3 纯化鲢 PV 的模拟胃肠液消化

鲢 PV 与鲫 PV 的消化模式有些不同,在胃蛋白酶的作用下,鲢 PV 能被降解但是较鲫的慢。10 min 后 PV 开始降解,60 min 原始 PV 条带被完全降解,并产生分子量约为 3 ku 大小的降解产物条带(图 3-A)。与鲫 PV 相似,鲢 PV 在胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶的作用下,同样比较稳定。不同的是在胰蛋白酶消化 15 min 后,在 6 ku 处产生一分解产物,该条带随着时间的延长,越来越明显,但即使消化 4 h 也不能被完全分解,具有很强的耐消化性(图 3-B,C)。

2.4 鱼肉肌浆蛋白中 PV 的 SGF 消化

已有的研究表明,小清蛋白主要存在于鱼肉肌浆蛋白中^[5-6,8]。由于鱼肉肌浆蛋白中含有胰蛋白

酶内源性抑制剂,干扰胰蛋白酶分解的测定效果以及胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶对纯化 PV 不产生明显降解等原因,所以本文仅研究了肌浆蛋白的 SGF 消化。鲫、鲢肌浆蛋白的 SGF 消化结果见图 4。PV 在肌浆蛋白中的含量很高,与纯化 PV 一样,两种鱼肉肌浆蛋白在胃蛋白酶作用下都能被降解。尽管两种鱼肌浆蛋白的浓度有所不同,但从蛋白条带的分解速率看,鲢肌浆蛋白比鲫肌浆蛋白较易被分解。随着消化时间的延长,40 ku 处的蛋白被逐渐分解,其产生的降解条带也被逐渐分解。鲫肌浆蛋白在 25 ku 和 16 ku 处的条带分别在 30 min 和 60 min 被完全分解(图 4-A),而鲢的这两个条带在 15 min 和 30 min 就被完全分解(图 4-B)。相对于纯化 PV 和肌浆蛋白中的其他蛋白,肌浆蛋白中 PV 的分解时间明显延长,消化 30~60 min 仍可观察到 PV 及小分子量的降解产物。

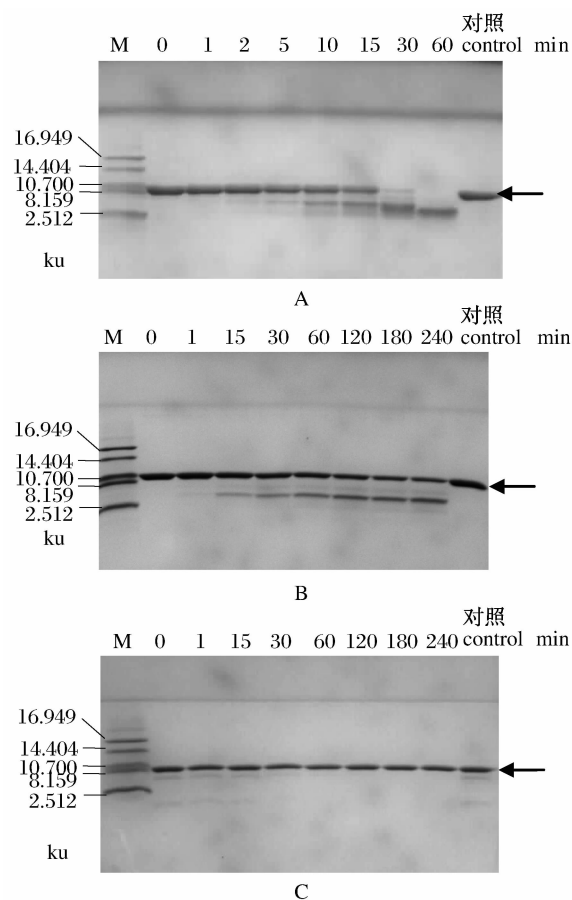


图 3 纯化鲢小清蛋白的模拟胃、肠液消化

M. 标准蛋白; A. 胃蛋白酶; B. 胰蛋白酶; C. 胰凝乳蛋白酶。

Fig. 3 SGF and SIF digestion on purified PV of silver carp

M. protein marker; A. pepsin; B. trypsin; C. chymotrypsin.

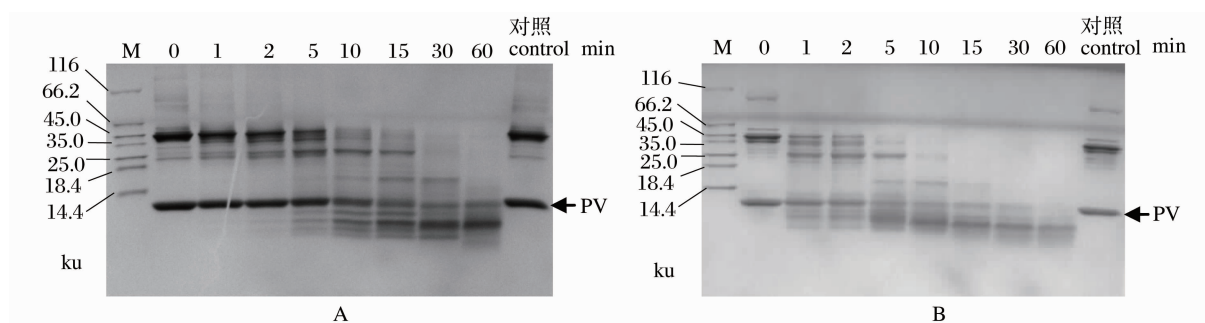


图4 鱼肌肉肌浆蛋白的SGF消化

M. 标准蛋白; A. 鲫; B. 鲢。

Fig. 4 SGF digestion on fish sarcoplasmic proteins

M. protein marker; A. crucian carp; B. silver carp.

2.5 鱼肉肌浆蛋白PV经SGF消化后产物的Western-blot分析

为了详细分析肌浆蛋白中PV的降解情况,采用兔抗鲢PV特异性多克隆抗体以Western-blot分析粗提鱼肉肌浆蛋白的SGF降解过程及其产物。从图5可以看到,两种鱼类PV具有相似的降解规律,鲫PV(图5-A)和鲢PV(图5-B)

均在5 min开始逐渐被酶解消化,并产生微弱的降解产物;随着消化时间的延长,原始PV条带逐渐减弱,至60 min被完全分解。尽管SGF消化PV产生的多条微弱降解条带仍能被抗PV多克隆抗体识别,但显色条带较模糊,表明降解产物的免疫原性得到了有效破坏。

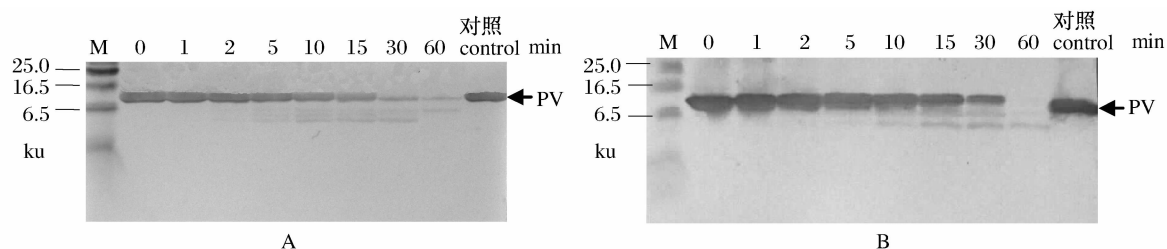


图5 鱼肉肌浆蛋白SGF消化产物的Western-blot分析

M. 标准蛋白; A. 鲫; B. 鲢。

Fig. 5 Western-blot analysis of digested products in fish sarcoplasmic proteins by SGF

M. protein marker; A. crucian carp; B. silver carp.

3 讨论

为了明确淡水鱼类主要过敏原小清蛋白(PV)的消化稳定性,本文依据美国药典方法,对纯化的鲫、鲢PV及肌肉肌浆蛋白进行了体外SGF、SIF消化。结果发现,纯化鲫PV经SGF消化1 min即开始降解,5 min后原始PV条带已被完全分解,并产生2~6 ku的低分子量降解条带,消化60 min在2 ku处仍能观察到一条微弱的蛋白带。该结果与Untersmayr等^[18]进行SGF消化时发现鳕鱼PV在1 min就能被分解基本一致。而纯化鲢PV与鲫PV的消化模式有些不同,在胃

蛋白酶的作用下,鲢PV能被降解但较鲫PV的降解速度慢,10 min时PV开始降解,60 min原始PV条带被完全降解,并产生约为3 ku大小的降解产物。

目前为止,尚未见有关鱼类PV用SIF消化的文献报道。本文研究发现纯化鲫PV、鲢PV的SIF消化模式相似,在胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶的作用下,同样比较稳定,作用4 h均未被完全分解。从报道的鱼类PV一级结构看^[5-6],PV含有多个胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶酶切位点,但在本实验中未观察到有效酶解。推测原因可能是由于PV未经过胃蛋白酶消化,其胰蛋白酶和胰凝乳蛋

白酶的作用位点没有完全暴露出来。因此,今后有必要按照人体内部的消化顺序、消化时间来开展3种蛋白酶联合对PV消化作用的详细研究。纯化鲫PV、鲢PV的SIF消化实验中不同的是鲢PV在胰蛋白酶消化15 min产生约为6 ku的降解条带,该条带随着时间延长而逐渐加强,这可能是由于这两种鱼PV的一级结构有差异而导致的。

不同消化酶作用同一种PV所产生的降解产物是有差别的,这是因为不同消化酶对肽段的特异性分解位点不同所致。如胃蛋白酶有较广泛的底物特异性,但优先选择苯丙氨酸或酪氨酸残基的C末端降解,胰蛋白酶特异选择Lys和Arg残基的P₁位置,而胰凝乳蛋白酶则优先选择靠紧芳香族氨基酸(Tyr, Trp, Phe)和Leu的P₁位置^[19]。

已有的研究表明,鱼类过敏原小清蛋白主要存在于鱼肉肌浆蛋白中^[5-6,8]。本文针对鲫、鲢肌浆蛋白的SGF消化实验结果显示,肌浆蛋白中PV经消化30~60 min仍未被完全分解,而肌浆蛋白中其它蛋白质消化10~30 min就被完全分解。值得指出的是,由于肌浆蛋白中其他蛋白的存在,PV经SGF消化分解的时间比纯化PV明显延长。为了更清楚地了解在其他蛋白一起参与消化时过敏原PV的分解情况,我们采用兔抗鲢PV特异性多克隆抗体对鱼肉肌浆蛋白的消化产物进行了Western-blotting分析,结果显示胃蛋白酶作用60 min原始PV条带几乎完全分解,该分解趋势与使用纯化PV一致。

本文研究结果提示,在鱼类过敏原PV的消化过程中,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶几乎不发生作用,而胃蛋白酶对过敏蛋白及其免疫原性的分解破坏有较好效果。这与我们最近报道的蟹类主要过敏原原肌球蛋白的消化结果正好相反^[17],表明不同来源的水产动物过敏原其消化特性也是有差别的。本研究可为今后开发低过敏性鱼类加工产品提供理论参考。

参考文献:

- [1] Mills E N, Breiteneder H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins[J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(6): 409-414.
- [2] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: A review[J]. *Marine Biotechnol (NY)*, 2003, 5(4): 339-348.
- [3] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(2): 119-121.
- [4] Aas K, Jebsen J W. Studies of hypersensitivity to fish: Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod[J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1967, 32(1): 1-20.
- [5] Hamada Y, Tanaka H, Ishizaki S, et al. Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(8): 1149-1156.
- [6] Lindström C D, van Dô T, Hordvik I, et al. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Scand J Immunol*, 1996, 44(4): 335-344.
- [7] Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L, et al. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo and calcium-bound forms of carp parvalbumin[J]. *Gut*, 2000, 46(5): 661-669.
- [8] 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.
- [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] 黎锋,吴海强,戈早川,等. 利用胶束电动毛细管电泳比较五种提取鲫鱼总蛋白方法研究[J]. *水生生物学学报*, 2008, 32(1): 125-128.
- [11] 刘光明,梁银龙,苏文金,等. 鲤鱼小清蛋白的纯化及其过敏原性鉴定[J]. *食品科学*, 2009, 30(3): 188-191.
- [12] US Pharmacopoeia, the National Formulary. Simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, TS[M] // The United States Pharmacopoeia 23, The National Formulary 18, The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 1995: 2053.
- [13] Thomas K, Aalbers M, Bannon G A, et al. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2004, 39(2): 87-98.
- [14] Fu T J, Abbott U R, Hatzos C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—A comparative study[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50

- (24):7154-7160.
- [15] 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.
- [16] 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 U S A, 1979, 76 (9): 4350-4354.
- [17] 黄园园,刘光明,周利亘,等. 蟹类主要过敏原的模拟肠胃液消化及其对过敏性的影响[J]. 中国食品学报,2009,9(4):15-22.
- [18] Untersmayr E, Poulsen L K, Platzer M H, *et al.* The effects of gastric digestion on codfish allergenicity [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115 (2): 377-382.
- [19] Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro* [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(10):1269-1273.

Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion of freshwater fish parvalbumins

LIU Guang-ming, HUANG Yuan-yuan, CAI Qiu-feng, WENG Ling, 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: The physicochemical properties of most food allergens confer stability to the proteolytic in the digestive tract, which increases the probability of reaching the intestinal mucosa, where absorption and interaction with the immune system can occur. Stability in simulated gastric fluid is supposed to be an important parameter for the estimation of food allergenicity. The digestive stability of a major fish allergen (parvalbumin, PV) and nonallergenic proteins from the muscle of crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in a standard simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) digestion assay system was compared. Proteinases including pepsin, trypsin and chymotrypsin from porcine were used to simulate digestive proteinases from human. The results were evaluated by means of Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) and Western-blot. Fish PV was purified to homogeneity by 70% – 100% ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sepharose following heat treatment and a protein with molecular weight of approximately 10 ku was finally obtained. In SGF assay of purified crucian carp PV and silver carp PV, similar results were obtained, the original PV band was almost completely degraded within 60 min and some stable peptide fragments were observed. In SIF assay of purified PV, both trypsin and chymotrypsin could not degrade PV effectively in 4 h. In SGF digestion on fish sarcoplasmic proteins, nonallergenic proteins were rapidly degraded within a short period of time, while the digestion of PV was prolonged to some degree. Western-blot analysis indicated that the polyclonal antibody against silver carp PV can specifically detect the PV and its degraded products. In conclusion, our present results indicate that fish PV is more resistant to proteinase digestion than non-allergenic proteins and pepsin treatment is more effective than trypsin and chymotrypsin in reducing the hypersensitivity. It should be remembered that our present study only measured the antigenicity which may not completely equate to allergenicity. Thus, to further evaluate the allergenicity alteration of PV after proteinase treatment, experiments such as the release of histamine from basophiles and skin prick test are required. In addition, the amount of undigested PVs that has to persist in gastrointestinal digestion to induce food allergy is also needed to be studied.

Key words: *Carassius auratus cuvieri*; *Hypophthalmichthys molitrix*; simulated gastrointestinal digestion; parvalbumin; Tricine-SDS-PAGE

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