

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

汪宁^{1,2}, 蔡秋凤¹, 刘光明¹, 陈昭华¹, 王锡昌², 苏文金¹, 曹敏杰^{1*}

(1. 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;

2. 上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:小清蛋白是鱼类的主要过敏原,对该蛋白的研究不仅有利于过敏原检测方法的建立也可为低致敏性水产品的开发提供理论依据。通过组织捣碎、冷冻离心、热处理、Superdex 75 凝胶过滤等方法从鲢白色肉中纯化得到过敏原小清蛋白。Tricine-SDS-PAGE 显示,在非还原条件下,该蛋白呈分子量分别为 12 ku、14 ku、24 ku 的 3 个条带。而在还原条件下,仅有分子量为 12 ku 的条带。Western-blotting 分析表明,分子量为 12 ku、14 ku 和 24 ku 的这 3 个条带都与小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体(PARV-19)发生特异性反应,提示它们均为小清蛋白的不同形态。用纯化的小清蛋白制备多克隆抗体,经 Protein A Sepharose 亲和层析纯化得到高纯度的免疫球蛋白 G(IgG)。Dot-blot 检测发现,抗体稀释至 1/51200 时仍能与纯化的小清蛋白有显色反应。用制备的多克隆抗体进行 Western-blotting 分析,能特异地检测 4 种鱼(鲤、鲢、鲫、黄鳝)中的小清蛋白。

关键词:鲢;小清蛋白;纯化;多克隆抗体

中图分类号:Q 51; S 917

文献标识码:A

国内外因食用鱼而引起过敏的事例常有报道^[1-2]。Aas 等^[3-4]对鳕(*Gadus macrocephalus*)的研究发现,鱼体肌肉中的主要过敏原是小清蛋白(parvalbumin),它能引起 IgE 介导的过敏反应。小清蛋白是一种水溶性钙结合蛋白,在肌肉的舒张运动中起着重要作用。其分子量大约为 12 ku,等电点(pI)为 3.9~5.5。根据一级结构的氨基酸序列分析,小清蛋白可进一步分为 α 型(109 个氨基酸)和 β 型(108 个氨基酸)。 α 型的 pI 大于 5.0,而 β 型的 pI 小于 4.5^[5]。小清蛋白对 pH、温度以及各种变性剂都有较强的抗性,并且很难被蛋白酶所降解。利用圆二色谱对其结构研究显示,小清蛋白在蛋白酶酶解和高温下仍保持过敏性的原因主要是由于其构象的特殊性和重折叠能力较强引起的^[6]。对鲤、鲢、金枪鱼等的研究进一步证实了小清蛋白也是这些鱼的主要过

敏原。小清蛋白在鱼体内的分布和含量依鱼的种类、大小、肌肉的类型而不同,它主要分布在骨骼肌的白色肉中^[7-10]。采用分子生物学的方法,在罗非鱼的其他组织包括心脏、脑、鳃、肾、卵巢、睾丸中也发现了小清蛋白基因的存在^[11]。

尽管国际上对鱼类过敏的研究已有较多报道,但大多集中在海水鱼上,而对淡水鱼的研究极少。我国是淡水鱼生产和消费大国,因食用淡水鱼而引起过敏的现象时有发生,因此,研究淡水鱼的过敏原具有特别重要的意义。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)属鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),广泛分布于亚洲东部,是我国淡水养殖的“四大家鱼”之一,具有重要的经济价值。本文以鲢为研究对象,旨在从肌肉中纯化小清蛋白并制备高特异性的多克隆抗体,建立淡水鱼类过敏原检测与诊断方法。

收稿日期:2008-12-28 修回日期:2009-06-08

资助项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目(2008BAD94B09);国家自然科学基金项目(30871947,20872049);福建省自然科学基金项目(2008J0067);集美大学中青年创新团队基金(2006A002)

通讯作者:曹敏杰, Tel:0592-6180378; E-mail:mjcao@jmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

鲜活鲢、鲤、鲫和黄鳍鲷购自厦门集美市场。活鱼即杀后,去内脏,取背部骨骼肌白色肉立即使用或在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。

1.2 试剂

Superdex 75 10/300 GL 和 Protein A Sepharose 为 GE Healthcare 公司产品。电泳用标准蛋白样品液分别从 Bio-Rad(6.5~200 ku)和 Fermentas(14.4~116 ku)公司购得。小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体(PARV-19)来自 Sigma 公司。兔抗小鼠 IgG-HRP 为 DAKO 公司产品。羊抗兔 IgG-HRP 和二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)为 Pierce 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器设备

高速冷冻离心机(Beckman, 美国),凝胶成像仪(Syngene, 英国),组织捣碎机(Kinematica, 瑞士),蛋白质纯化系统(GE Healthcare, 瑞典),电泳槽及电转移装置(Bio-Rad, 美国),pH 计(Beckman, 美国),紫外分光光度计(NanoDrop, 德国),超滤装置(Millipore, 美国),恒温水浴锅(Memmert, 德国)等。

1.4 方 法

肌浆蛋白的制备 取鲢白色肉 15 g,切碎后置于 4 倍体积冰冷的缓冲液中(含有 5 mmol/L EDTA 的 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5),用组织捣碎机捣碎。将悬浮液于 8 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min,上清经 4 层绢布过滤后所得溶液即为肌浆蛋白^[12]。鲤、鲫、黄鳍鲷的肌浆蛋白制备方法同此。

小清蛋白的纯化 将制备好的鲢鱼肌浆蛋白溶液置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中热处理 30 min,然后在 12 000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min,取上清液用 YM-5 超滤膜进行超滤浓缩。随后上样于用缓冲液(含有 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0)平衡过的 Superdex 75 凝胶过滤预装柱,然后用相同缓冲液洗脱,流速为 0.4 mL/min,收集各组分并分别测定它们在 220 nm 和 280 nm 下的吸光值,进行 Tricine-SDS-PAGE 检测。

小清蛋白的热稳定性分析 取纯化的小清

蛋白在 100 $^{\circ}\text{C}$ 热水浴中孵育 0、1、2、4、6 h,取出后立即置于冰上。然后 12 000 \times g 离心 20 min 取上清作电泳分析,并用 PARV-19 作为一抗,兔抗小鼠 IgG-HRP 为二抗进行 Western-blotting 分析。

兔抗鲢小清蛋白抗血清的制备和纯化 参照文献[13]在厦门大学医学院动物实验中心进行。纯化的小清蛋白(0.5 mL)混合等体积弗氏佐剂,肌肉注射体重为 2 kg 的健康雄性新西兰家兔,共注射 4 次,最后一次注射 5 d 后耳静脉采血,测定效价后颈动脉采血。用 Protein A Sepharose 亲和层析柱(1 cm \times 5 cm)纯化血清获得兔抗鲢小清蛋白 IgG。

不同鱼类的小清蛋白的免疫学分析 用纯化的兔抗鲢小清蛋白多克隆抗体为一抗,羊抗兔 IgG-HRP 为二抗进行 Western-blotting 分析。

Tricine-SDS-PAGE、SDS-PAGE 和 Western-blotting Tricine-SDS-PAGE 和 SDS-PAGE 分别参照文献[14-15]进行,电泳结束后,以考马斯亮蓝染色。Western-blotting 参照 Towbin 法^[16]进行,以二氨基联苯胺(DAB)显色。

2 结果与分析

2.1 小清蛋白的纯化

样品经 Superdex 75 凝胶过滤柱,收集各组分并进行紫外检测。在 280 nm 波长下,得到 3 个主要吸收峰;在 220 nm 波长下,也得到 3 个主要吸收峰(图 1)。经 Tricine-SDS-PAGE 检测,目的蛋白主要出现在 220 nm 波长下第一个吸收峰中即集中在 31~34 管出现(图 2-A),分子量分别为 12、14 和 24 ku,其中 12 ku 的条带为主要组分。对 33 管加 β -巯基乙醇处理后,24 ku 的条带消失,表明 24 ku 的条带可能是通过二硫键形成产生的小清蛋白二聚体。随后的 Western-blotting 分

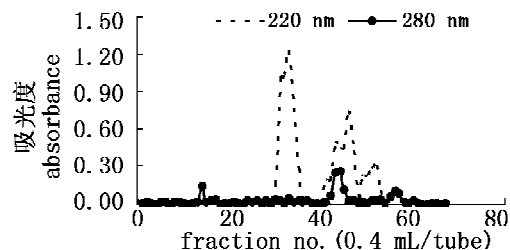


图 1 鲢肌肉小清蛋白 Superdex 75 凝胶过滤柱层析结果

Fig. 1 Superdex 75 gel-filtration chromatography of parvalbumin derived from silver carp skeletal muscle

析显示,这3个条带都与小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体(PARV-19)产生特异性反应(图2-B),提示它们均为小清蛋白的不同形式。

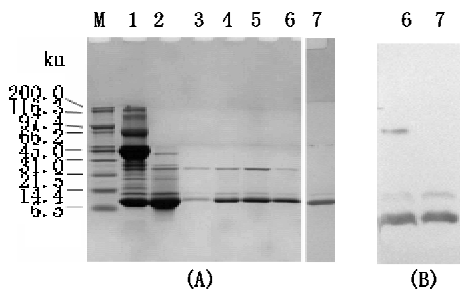


图2 Superdex 75 凝胶过滤纯化小清蛋白的

Tricine-SDS-PAGE 分析(A)和 Western-blotting (B)

M. 标准蛋白;1. 肌浆蛋白;2. 热抽提后的上清;3. 31 管;
4. 32 管;5. 33 管;6. 34 管;7. 33 管(加 β -巯基乙醇)

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE (A) and Western-blotting (B)

analysis of parvalbumin purified by

Superdex 75 gel-filtration chromatography

M. protein marker;1. crude sarcoplasmic protein;2. supernatant
after heat treatment;3. No. 31;4. No. 32;5. No. 33;6. No. 34;
7. No. 33 (with β -mercaptoethanol)

2.2 小清蛋白的热稳定性分析

对多种鱼类的研究表明,如同所有过敏原,小清蛋白的过敏原性非常稳定^[5,7,9]。因此本实验对纯化的鲢小清蛋白进行长时间高温加热,观察其热稳定性以及免疫原性的变化。如图3A所示,随着加热时间的延长,分子量为24 ku的聚合物的量逐渐增加,至2 h时达到最大值。此后,分子量更大的条带(40 ku)逐渐形成,而分子量为12 ku的含量逐渐减少。图3-C为利用小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体对应的 Western-blotting 结果。12 ku和14 ku的条带在加热2 h后不发生免疫交叉反应,24 ku的条带在加热4 h后不发生免疫交叉反应,加热过程形成的大分子聚合物(40 ku)也不发生免疫交叉反应。在 β -巯基乙醇存在下,分子量为12 ku的小清蛋白条带比较稳定,较之未加 β -巯基乙醇的样品(图3-A),聚合物的形成量明显较少(图3-B)。对应的 Western-blotting 结果表明,小清蛋白经加热3 h后,不发生免疫交叉反应(图3-D)。综合图3-A~D的结果可知,鲢小清蛋白对高温具有较强的抗性,加热会促进该蛋白多聚物的形成。但随着加热时间的延长(4 h),该蛋白不能与小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体有效结合,推测这是由于长时间加热处理导致

小清蛋白分子中抗原决定簇发生改变所致。

2.3 兔抗鲢小清蛋白抗血清的制备及纯化

目前对鱼类过敏原小清蛋白的免疫学检测大多使用小鼠抗蛙小清蛋白单克隆抗体,由于鱼类过敏的普遍存在,制备针对鱼类小清蛋白的特异性抗体十分必要。本研究利用高纯度小清蛋白为抗原免疫新西兰家兔,获得了高滴度抗血清。按 Dot-blot 法检测多克隆抗体效价,固定抗原的浓度,将抗血清分别稀释为原浓度的1/200、1/400、1/800……1/25600、1/51200,结果如图4所示。由图可知,抗体稀释至51 200倍时仍能与抗原有明显的显色反应。采用 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化抗血清,以0.1 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱,收集纯化的抗体。SDS-PAGE 分析结果如图5所示。在 β -巯基乙醇还原作用下,该蛋白为由分子量50 ku的重链和25 ku的轻链组成,表明纯化所得的抗体为IgG。

2.4 不同鱼类小清蛋白的免疫学分析

采用纯化的兔抗鲢小清蛋白多克隆抗体检测不同鱼类之间小清蛋白的免疫交叉性。3种淡水鱼(鲤、鲢、鲫)和一种海水鱼(黄鳍鲷)的肌浆蛋白电泳条带存在明显的差异(图6)。通过 Western-blotting 分析,该多克隆抗体与4种鱼都在12 ku有较强的免疫交叉反应,与鲢中的14 ku条带也能产生反应,而与其他蛋白条带均没有免疫交叉反应。说明制备的抗体具有较高的特异性,能特异地检测不同鱼中分子量为12 ku的小清蛋白。

3 讨论

鱼肌肉蛋白根据其组成不同,可分为肌原纤维蛋白、肌浆蛋白、肌基质蛋白和异质组织蛋白4大部分。小清蛋白是肌浆蛋白的主要组成部分。研究表明,小清蛋白分子量为12 ku左右且存在多种形式,不同鱼中存在2~5种不同形式的小清蛋白,且与鱼龄有关^[17]。Arif等^[20]通过免疫印迹反应在4种鳢中检测到2~3种不同形式的小清蛋白。本研究纯化得到的小清蛋白在非还原条件下,SDS-PAGE 呈现分子量分别为12、14和24 ku的3个条带,它们都能与单克隆抗体 PARV-19 发生免疫交叉反应,其中12 ku和14 ku的条带可能为两种不同形式的小清蛋白,而24 ku的条带则是小清蛋白的二聚体。

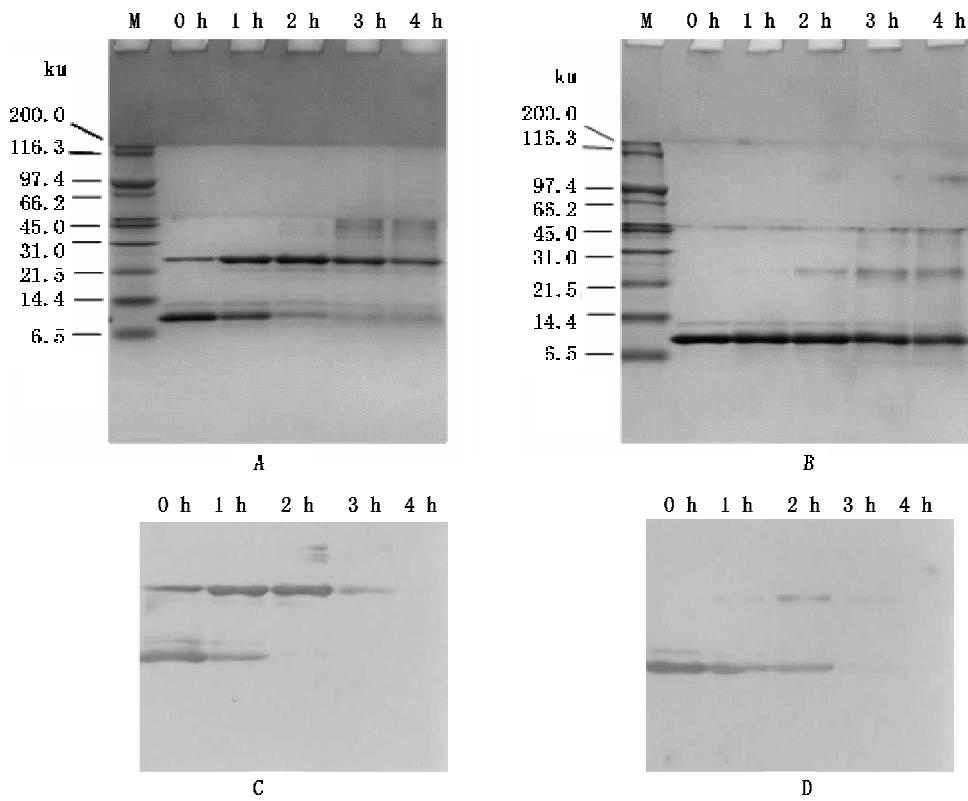


图3 100 °C加热不同时间对小清蛋白的影响

A. Tricine-SDS-PAGE; B. 加 β-巯基乙醇后的 Tricine-SDS-PAGE; C. Western-blotting; D. 加 β-巯基乙醇后的 Western-blotting; M. 标准蛋白

Fig. 3 The effect of heating treatment at 100 °C on parvalbumin

A. Tricine-SDS-PAGE; B. Tricine-SDS-PAGE with β-mercaptoethanol; C. Western-blotting; D. Western-blotting with β-mercaptoethanol; M. protein marker

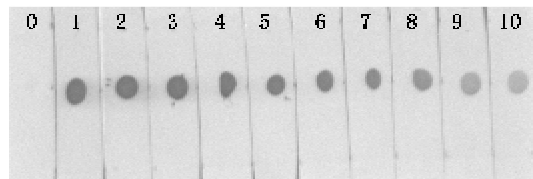


图4 Dot-blot 测定多克隆抗体效价

0. 阴性对照(牛血清白蛋白); 1. 未稀释; 2. 1/200; 3. 1/400; 4. 1/800; 5. 1/1600; 6. 1/3200; 7. 1/6400; 8. 1/12800; 9. 1/25600; 10. 1/51200

Fig. 4 Dot-blot detection of rabbit anti silver carp parvalbumin polyclonal antibody

0. negative control(BSA); 1. without dilution; 2. 1/200; 3. 1/400; 4. 1/800; 5. 1/1600; 6. 1/3200; 7. 1/6400; 8. 1/12800; 9. 1/25600; 10. 1/51200

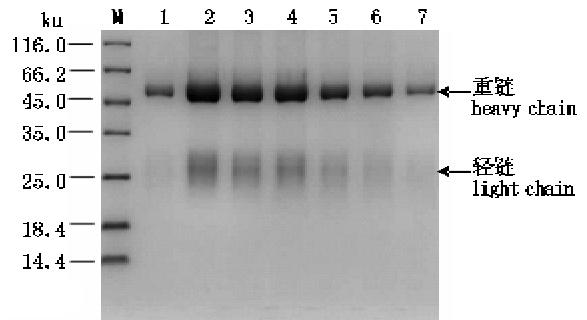


图5 兔抗鲢小清蛋白多克隆抗体的纯化

M. 标准蛋白; 1~7. 不同时间洗脱下来的 IgG

Fig. 5 Analysis of the purification of rabbit anti silver carp parvalbumin IgG by SDS-PAGE

M. protein marker; 1-7. eluted fractions of IgG

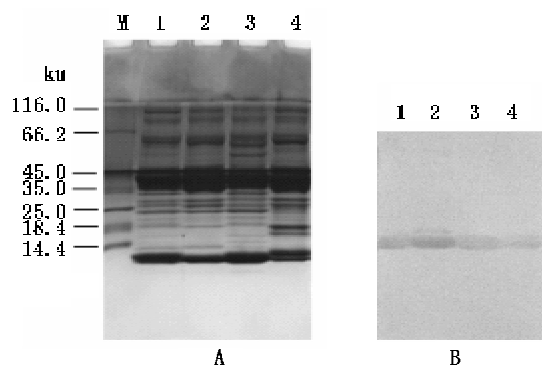


图6 兔抗鲢小清蛋白多克隆抗体
对不同鱼类的分析

A. Tricine-SDS-PAGE; B. Western-blotting; M: 标准蛋白;
1. 鲤; 2. 鲢; 3. 鲫; 4. 黄鳍鲷

Fig. 6 Analysis of rabbit anti silver carp
parvalbumin antibody for different fishes

A. Tricine-SDS-PAGE; B. Western-blotting; M: protein marker;
1: common carp; 2: silver carp; 3: crucian carp; 4: sea bream

根据已报道的鱼类小清蛋白氨基酸序列得知,小清蛋白高度保守,各种类之间的同源性很高,序列中几乎不含酪氨酸和色氨酸^[7, 9]。因此,不能依据 280 nm 波长的吸收值判断小清蛋白的含量。另外,由于小清蛋白的分子量较小,采用普通的 SDS-PAGE 对小清蛋白的分离和聚焦效果较差,蛋白条带容易呈弥散状。因此本研究改用 Tricine-SDS-PAGE 对其进行分离,效果良好。

Davis 等^[18]报道,在对小清蛋白热处理过程中,70 ~ 80 °C 时二硫键将断裂;80 ~ 90 °C 时会形成分子内或分子间相互作用、二硫键重新排列;90 ~ 100 °C 时会形成新的聚合物。Ross 等^[19]的研究也表明二聚体是由小清蛋白分子间 Cys-18 的 SH-基团结合形成的产物。本研究中,在样品处理时若加入 β-巯基乙醇,电泳结果显示 24 ku 的二聚体条带消失。在小清蛋白的热稳定性研究中,加入 β-巯基乙醇,能有效的阻止蛋白聚合体的形成,这与 Arif 等^[20]报道的结果一致。

本研究制备得到的兔抗鲢小清蛋白多克隆抗体通过 Dot-blot 检测后有较高的效价。经 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化后,Western-blotting 分析显示该抗体对 4 种鱼小清蛋白均有高度的特异性,表明此抗体可为今后研究鱼类过敏原以及鱼类过敏诊断试剂的开发提供帮助。

本研究有待进一步深入,以期获得单一的不同形式的小清蛋白及它们抗原表位间的异同。

参考文献:

- [1] 李振兴,林洪,曹立民. 低过敏性海产食品的研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 202 - 205.
- [2] 蒋玉银,刘志刚,温岸玲. 鲤鱼主要变应原的分离、鉴定与纯化 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(8): 947 - 949.
- [3] Aas K, Jepsen J W. Studies of hypersensitivity to fish: Partial purification and crystallization of a major allergenic component of cod [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1967, 32(1): 1 - 20.
- [4] Aas K, Elsayed S. Physico-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish) [J]. *Dev Biol Stand*, 1975, 29: 90 - 98.
- [5] Chen L, Hefle S L, Taylor S L, *et al.* Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15): 5577 - 5582.
- [6] Bugajska-Schretter A, Grote M, Vangelista L, *et al.* Purification, biochemical, and immunological characterization of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin [J]. *Gut*, 2000, 46: 661 - 669.
- [7] 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: 1149 - 1156.
- [8] Lim D L, Neo K H, Goh D L, *et al.* Missing parvalbumin: implications in diagnostic testing for tuna allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115: 874 - 875.
- [9] Van Do T, Hordvik I, Endresen C, *et al.* Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish allergen M [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42: 345 - 353.
- [10] Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, *et al.* Allergy to fish parvalbumins: Studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 1314 - 1320.
- [11] Lee S J, Ju C C, Chu S L, *et al.* Molecular cloning, expression and phylogenetic analyses of parvalbumin in tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *J Exp Zool*, 2007, 307: 51 - 61.
- [12] 翁凌,陈申如,蒋欣静,等. 真鲷肌肉蛋白的分解及影响因素 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2006, 11(4): 305 - 309.

- [13] 杜雪莉, 周利亘, 王锡昌, 等. 黄鳍鲷骨骼肌伴肌动蛋白的纯化及其抗体制备 [J]. 水产学报, 2008, 32(3): 465-469.
- [14] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE [J]. Nat Protoc, 2006, 1: 16-22.
- [15] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [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 USA, 1979, 76: 4350-4354.
- [17] Focant B, Vandewalle P, Huriaux F. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea*: comparison with the turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Comp Biochem Physiol, 2003, 135B: 493-502.
- [18] Davis P J, Williams S C. Protein modification by thermal processing [J]. Allergy, 1998, 53(46): 102-105.
- [19] Ross C, Tilghman R W, Hartmann J X, et al. Distribution of parvalbumin isotypes in adult snook and their potential applications as species-specific biomarkers [J]. J Fish Biol, 2005, 51(3): 561-572.
- [20] Arif S H, Jabeen M, Hasnain A. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumin [J]. J Food Biochem, 2007, 31(1): 121-137.

Purification and polyclonal antibody preparation of parvalbumin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skeletal muscle

WANG Ning^{1,2}, CAI Qiu-feng¹, LIU Guang-ming¹,
CHEN Zhao-hua¹, WANG Xi-chang², SU Wen-jin¹, CAO Min-jie^{1*}

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

2. College of Food and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Parvalbumin is the major allergen of fish species. Investigation into this protein is beneficial not only to detecting allergen, but also to producing aquatic products with low allergenicity. In the present study, parvalbumin from the skeletal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) was first purified to homogeneity by homogenization, centrifugation, heat treatment extraction and gel filtration chromatography on Superdex 75. Purified parvalbumin revealed three protein bands with molecular mass of 12, 14 and 24 ku, respectively, as detected by Tricine-SDS-PAGE under non-reducing conditions while under reducing conditions, only a band corresponding to 12 ku was detected. Western-blotting using anti-frog parvalbumin monoclonal antibody (PARV-19) positively reacted with the three protein bands of 12, 14 and 24 ku, suggesting they are different forms of parvalbumin. A polyclonal rabbit anti-silver carp parvalbumin antibody was prepared and immunoglobulin G (IgG) was purified by Protein A Sepharose affinity column. Dot-blot revealed that the antibody reacted with parvalbumin even after dilution to 1/51200, suggesting its higher titer. Western-blotting analysis indicated that parvalbumins from four fishes (common carp, silver carp, crucian carp, sea bream) can all be detected by the polyclonal antibody specifically.

Key words: silver carp; parvalbumin; purification; polyclonal antibody

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