

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 中不同亚型 小清蛋白的提纯与鉴定

孙礼瑞¹, 林 洪¹, 李振兴^{1,*}, 赵金霞², 林 航², 罗 晨¹, 田盛兰¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 以牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 为研究对象, 以Tris、甘氨酸和二硫苏糖醇的混合溶液为提取液, 加入不同量的硫酸铵分级纯化小清蛋白, 应用免疫印迹法、酶联免疫法及质谱法进行鉴定。最终提纯得到3种不同分子质量的蛋白 (PVI、PVII和PVIII), 所得蛋白纯度大于90%, 血清学实验证明其与小清蛋白特异性IgG及IgE抗体均有结合能力, 质谱鉴定得到PVII和PVIII分子质量分别为12 151 Da和11 645 Da, pI值分别为5.14和4.69。该方法满足牙鲆小清蛋白提取纯化要求, 得到的3种蛋白是牙鲆小清蛋白的不同亚型, 且均具有过敏性。

关键词: 鱼过敏原; 小清蛋白亚型; 牙鲆; 纯化; 鉴定

Purification and Characterization of Parvalbumin Isotypes from Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

SUN Lirui¹, LIN Hong¹, LI Zhenxing^{1,*}, ZHAO Jinxia², LIN Hang², LUO Chen¹, TIAN Shenglan¹

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: Parvalbumins were extracted and purified from the muscle of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). A mixed solution of Tris, glycine, and DL-dithiothreitol was used as the extraction solvent. Parvalbumins were purified by adding ammonium sulfate to different degrees of saturation, and then identified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western-blot and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Three proteins (PVI, PVII and PVIII) with different molecular masses were obtained with high purity (> 90%). Serological results demonstrated that each of these parvalbumins had the ability of binding to the specific IgG and IgE. The molecular masses of PVII and PVIII were determined to be 12 151 and 11 645 Da with Isoelectric point (pI) of 5.14 and 4.69, respectively. This method can meet the requirements for the extraction and purification of parvalbumins. These proteins were proved to represent different isotypes of parvalbumins with allergenicity.

Keywords: fish allergen; parvalbumin isotypes; Japanese flounder; purification; identification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180706-084

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 12-0308-07

引文格式:

孙礼瑞, 林洪, 李振兴, 等. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 中不同亚型小清蛋白的提纯与鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 308-314. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180706-084. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Lirui, LIN Hong, LI Zhenxing, et al. Purification and characterization of parvalbumin isotypes from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Food Science, 2019, 40(12): 308-314. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180706-084. <http://www.spkx.net.cn>

随着生活水平的提高, 人们对食物的营养要求也越来越高, 鱼类因含有丰富的蛋白质、多不饱和脂肪酸和

脂溶性维生素被消费者青睐, 因此对鱼类的消费量也越来越大。然而, 鱼类是世界粮农组织和世界卫生组织公

收稿日期: 2018-07-06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (201762004)

第一作者简介: 孙礼瑞 (1990—) (ORCID: 0000-0001-5059-5354), 男, 博士研究生, 研究方向为食品安全性。

E-mail: yzslr1222@foxmail.com

*通信作者简介: 李振兴 (1978—) (ORCID: 0000-0002-7866-681X), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

认的八类食物过敏原之一^[1]。据统计,在西方及亚洲国家,对鱼类过敏的人群比例在0.2%~2.29%,以儿童居多,且呈上升趋势,高于鸡蛋、坚果、小麦及花生过敏人群^[2]。目前,对过敏原的治疗并没有有效的方法,只能避免消费者接触过敏原。因此,欧盟、美国等发达国家建立了完善的食品标签法规,规定食品包装上强制对鱼肉进行标示^[3-6]。

鱼肉中存在的过敏原主要有小清蛋白、胶原蛋白、卵黄蛋白、醛缩酶及鱼精蛋白等,其中小清蛋白能够引起90%对鱼过敏的患者过敏^[7-8]。小清蛋白是一种EF-手型结构的钙离子结合蛋白,分子质量在10~12 kDa之间,等电点(isoelectric point, pI)在3~5之间,存在于肌肉骨骼细胞中并参与肌肉松弛过程^[9]。1971年Elsayed等^[10]从鳕鱼肌肉中首次发现,且具有致敏作用,致敏强度与小清蛋白浓度有关,研究报道鱼类小清蛋白安全限量为27.3 mg^[11]。很多鱼中小清蛋白存在2~5个不同的亚型, α -小清蛋白和 β -小清蛋白是最常见的小清蛋白亚型,蛋白质结构相似,均含有108~109个氨基酸,但氨基酸序列不同,同源性仅在50%~80%,2种亚型的小清蛋白均能引起过敏反应,但 β -小清蛋白与IgG和IgE的结合能力强于 α -小清蛋白^[12]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)主要分布在中国、朝鲜半岛和日本沿海,属于硬骨鱼纲,鲆科,是目前我国重要的海水养殖经济鱼类之一。关于牙鲆小清蛋白的提取、纯化及表征研究虽有报道^[13-14],但是针对其亚型的研究较少。本实验提取、纯化并鉴定牙鲆小清蛋白的不同亚型,并对其过敏原性、氨基酸序列等进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牙鲆购于青岛市利群超市。

二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘化乙酰胺(iodoacetamide, IAM)、三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane THAM, Tris)、甘氨酸(Gly)、尿素、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)制备试剂盒、SDS、蛋白质分子质量标准(Marker)、吐温-20、BCA蛋白浓度测定试剂盒、羊抗兔IgG-HRP抗体 北京索莱宝科技有限公司; iBand缓冲液试剂盒、免疫印迹显色液 美国Thermo Fisher公司; 乙腈、甲醇、乙酸(均为色谱级) 美国默克公司; 硫酸铵、碳酸氢铵(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 兔抗鱼IgG抗体、鼠抗鱼IgE抗体 上海华大基因科技有限公司; 羊抗鼠IgE-HRP标记抗体 美国SBA公司。

1.2 仪器与设备

JS39D-250匀浆机 中国九阳股份有限公司; VG3 S025涡旋振荡器 德国IKA公司; Protean IEF Cell等电点聚焦仪、Mini-PROTEAN Tetra cell电泳仪、SDS-PAGE凝胶制备模具 美国Bio-Rad公司; iBlot2免疫印迹转膜仪、iBand免疫印迹孵育仪、酶标仪、EASY-nLC 1000液相色谱仪、Q Exactive™质谱仪 美国Thermo Fisher公司; 3K-15台式高速冷冻离心机 美国Sigma公司; Tanon-4200SF凝胶成像仪 上海天能科技有限公司; MD3544透析袋 上海源叶生物科技有限公司; Unique R-20超纯水机 北京康铭泰克科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小清蛋白的提取与纯化

取牙鲆背部白肉于烧杯中,加入含0.1 mol/L Tris、0.5 mmol/L甘氨酸、1 mmol/L DTT溶液(肉:抽提液=1:5),4℃过夜抽提。4℃、4 000×g离心20 min,取上清液于锥形瓶中,90℃加热10 min,4℃、10 000×g离心20 min,取上清液于烧杯中,加入硫酸铵至饱和度达60%,4℃沉降8 h,4℃、10 000×g离心20 min,取上清液于新烧杯中,再次加入硫酸铵粉末饱和度达100%,4℃沉降4 h,4℃、10 000×g离心20 min,留沉淀,加入超纯水复溶,透析6 h,应用BCA方法测定蛋白含量,-40℃冻存储备用。

1.3.2 SDS-PAGE分析

参照Laemmli^[15]的方法做不连续电泳体系,制备15%的分离胶和5%的浓缩胶,将样品稀释至1 mg/mL,取30 μ L与10 μ L上样缓冲液(4×)混合,沸水浴7 min,8 000×g离心5 min,精确吸取10 μ L样品加入到样品槽中。接通电源,浓缩胶电压设置为70 V,分离胶电压设置为120 V。电泳结束后用考马斯亮蓝染色,脱色后进行拍照。

1.3.3 免疫印迹

免疫印记由iBlot及iBand设备操作完成。将1.3.2节中未经染色的电泳胶置于iBlot滤纸和PVDF膜中间,转印程序设置如下:20 V,1 min;23 V,4 min;25 V,2 min。转印完成后将带有蛋白的PVDF膜置于iBand缓冲液中润湿。

吸取5 mL iBand缓冲液润湿iBand卡片上段,保持底端干燥,将PVDF膜蛋白面朝下转移至卡片中央,向4个缓冲池由上到下分别加入6 mL iBand缓冲溶液、2 mL二抗(羊抗兔IgG-HRP抗体或羊抗鼠IgE-HRP)、2 mL iBand缓冲溶液及2 mL的一抗(兔抗鱼IgG抗体和鼠抗鱼IgE抗体,2 000倍稀释),常温孵育1.5 h。孵育结束后,转移PVDF膜至发光成像仪托盘上,蛋白面朝上,加入显色液,发光成像拍照,曝光时间为10~60 s。

1.3.4 间接酶联免疫 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 法

牙鲆肉中不同亚型小清蛋白与IgG、IgE的结合能力由间接酶联免疫法测定。准确吸取100 μ L提取的小清蛋白加入到96孔酶标板中, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h。加入100 μ L PBST试剂(1%吐温-20的磷酸盐缓冲液)洗板3次后, 用1% BSA和5%脱脂奶粉过夜封闭, 次日, 再用PBST试剂洗涤3次。每孔加入100 μ L兔抗鱼IgG抗体或鼠抗鱼IgE抗体(分别200、400、800、1 600、3 200、6 400倍稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1.5 h。PBST试剂3次洗涤后, 每孔加入100 μ L羊抗兔IgG或羊抗鼠IgE抗体(2 000倍稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h。再次洗涤3次, 每孔加入100 μ L TMB显色液, 37 $^{\circ}$ C避光孵育10 min, 孵育结束后加入2 mol/L硫酸终止反应, 最后在405 nm波长下测得吸光度。

1.3.5 不同亚型小清蛋白的胶内酶解

将1.3.2节染色后不同亚型的小清蛋白电泳胶粒切下, 参考Offengenden等^[16]方法, 对胶粒进行预处理并胰蛋白酶酶解。将胶点放入1.5 mL离心管中, 加入1 mL水振荡清洗10 min, 向每一离心管中加入1 mL胶内消化脱色液(50%乙腈、50 mmol/L碳酸氢铵), 振荡清洗至胶粒变白, 真空抽干乙腈, 加入10 mmol/L的DTT, 56 $^{\circ}$ C孵育1 h。孵育完成后移除多余的DTT, 加入55 mmol/L IAM, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 移除多余的IAM, 加入25 mmol/L碳酸氢铵溶液清洗8 min, 重复2次。再次加入脱色液清洗8 min, 真空抽干。加入0.15 μ g/ μ L胰蛋白酶(50 mmol/L NH_4CO_3 稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育8 h。加入0.1%甲酸溶液终止消化, 酶解后的肽段依次使用50%乙腈-5%甲酸溶液和100%乙腈提取, -30 $^{\circ}$ C冷冻备用。

1.3.6 液相色谱-串联质谱鉴定

1.3.6.1 液相色谱条件

色谱柱: Acclaim PepMap C₁₈ (75 μ m $\times$ 150 mm, 3 μ m); 流动相: A相为0.1%甲酸溶液, B相为0.1%甲酸-乙腈溶液; 流速400 nL/min; 液相色谱梯度洗脱程序见表1; 柱温40 $^{\circ}$ C; 进样体积10.0 μ L; 六通阀: 0~4 min, 质谱(A位), 4~60 min, 废液(B位)。

表1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	流速/(nL/min)	流动相A/%	流动相B/%	曲线
0	400	95.0	5.0	线性梯度
4	400	95.0	5.0	线性梯度
30	400	60.0	40.0	线性梯度
35	400	20.0	80.0	线性梯度
45	400	20.0	80.0	线性梯度
45.1	400	95.0	5.0	线性梯度
52	400	95.0	5.0	线性梯度

1.3.6.2 质谱条件

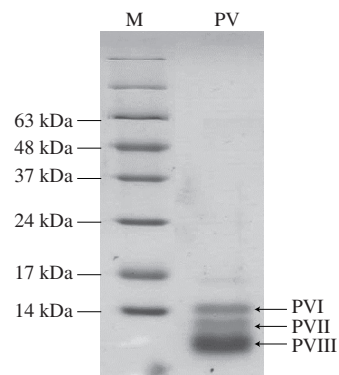
质谱分析在纳喷电离源正离子模式下电离; 离子源离子化电压为2 000 V; 应用高分辨的Orbitrap分析肽段母离子及其二级碎片, 分辨率设为17 500; 一级质谱扫描范围为 m/z 350~1 800, 分辨率70 000; 扫描模式: 数据依赖性扫描程序; 自动增益控制: 5E4; 信号阈值5 000 ions/s, 最大注入时间200 ms, 为减少母离子的重复扫描设置动态排除时间为15 s。

1.3.6.3 数据分析

应用Proteome Discoverer 1.3进行数据分析。参考数据库: NCBI牙鲆蛋白数据库, 酶切方式: Trypsin/P, 漏切位点: 2, 一级母离子质量误差容忍度: δ 10, 二级碎片离子的质量误差容忍度: 0.02 Da, 固定修饰: 半胱氨酸烷基化, 可变修饰: 甲硫氨酸的氧化和蛋白N端的乙酰化, 肽段分数大于20, 肽段确信度: High。

2 结果与分析

2.1 牙鲆肉中小清蛋白的分离纯化



M.标准蛋白Marker, 下同。

图1 牙鲆不同亚型小清蛋白SDS-PAGE图

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of parvalbumins from Japanese flounder

如图1所示, 牙鲆小清蛋白共有3个亚型, 每个亚型之间分离明显, 分子质量在12~14 kDa, 应用Image J软件对电泳图进行分析, 应用该方法提取得到的小清蛋白纯度达到90%以上, 且PVIII的含量明显多于PVI和PVII, 是牙鲆肉中最主要的小清蛋白。

2.2 不同亚型牙鲆小清蛋白的免疫印迹法鉴定

如图2所示, 3个亚型的牙鲆小清蛋白与兔抗鱼IgG抗体和鼠抗鱼IgE抗体均能结合, 说明其具有过敏性。应用Image J软件分析, 以灰度值代表过敏原与抗体的结合强度, IgG免疫印迹实验中, PVI、PVII和PVIII的灰度值所占比例分别为18.98%、12.43%和68.58%, PVIII与IgG的结合能力分别是PVI的3.6倍和PVII的5.5倍; IgE免

疫印迹实验中, PVI、PVII和PVIII的灰度值所占比例分别为15.36%、10.20%和74.42%, PVIII与IgE的结合能力分别是PVI的4.9倍和PVII的7.3倍。

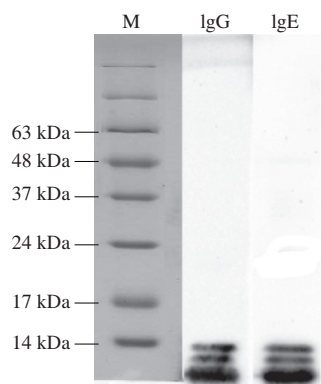


图2 牙鲆不同亚型小清蛋白免疫印迹结果

Fig. 2 Western-blot of parvalbumins from Japanese flounder

2.3 牙鲆小清蛋白与IgG和IgE抗体结合能力分析

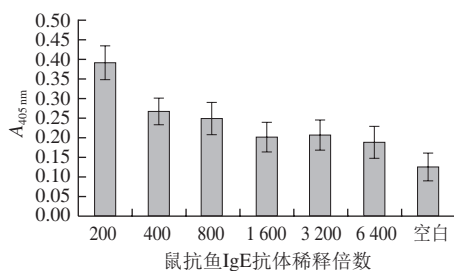
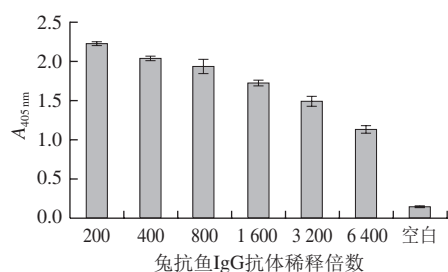


图3 间接ELISA分析小清蛋白与IgG和IgE抗体的结合能力

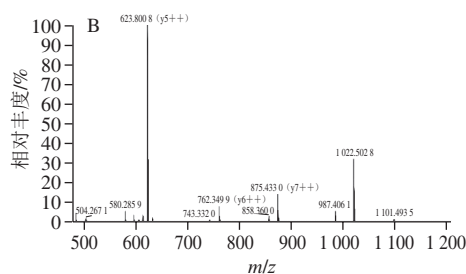
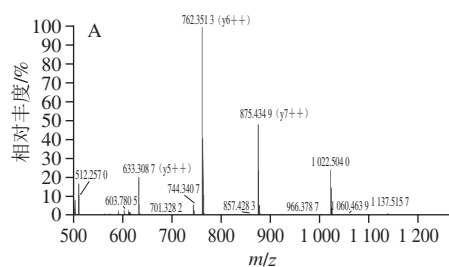
Fig. 3 Analysis of IgG- and IgE-binding capacities of parvalbumins from Japanese flounder by indirect ELISA

由于3个亚型小清蛋白均能够与IgG和IgE结合, 因此应用间接ELISA法分析其结合能力。一抗分别为兔抗鱼IgG抗体和鼠抗鱼IgE抗体, 设定浓度梯度, 稀释倍数分别为200、400、800、1600、3200和6400, 二抗分别为羊抗兔IgG-HRP抗体和羊抗鼠IgE-HRP抗体, 稀释倍数为2000。如图3所示, 小清蛋白均能够与小清蛋白特异性IgG和IgE抗体结合, 并呈一抗浓度依赖性, 随着一抗稀释倍数的增加, 结合能力逐渐下降, 尤其是与IgG抗体结合能力的退减尤为明显, 当一抗200~6400倍稀释时,

小清蛋白与IgG结合能力整体下降了46.7%; 与IgE结合能力整体下降了47.4%。

2.4 不同亚型牙鲆小清蛋白的质谱鉴定

将图1中3个不同亚型小清蛋白电泳胶切下, 分别进行蛋白提取, 胰蛋白酶酶解后进行Nano-LC-MS测定, 数据由Proteome Discoverer 1.3分析, 与NCBI蛋白库进行匹配, 根据蛋白的匹配率确定目标蛋白的种类。由图4所示, 通过SDFIEEDELK和SHFIEEDELK片段确证提纯的蛋白含有牙鲆小清蛋白XP_019938975.1和XP_019958408.1。由表2可见, PVI、PVII和PVIII均匹配为牙鲆小清蛋白, 其中PVI和PVII被鉴定与XP_019958408.1匹配度高, 分子质量为12 151 Da, pI值为5.14, 但PVII蛋白得分略高于PVI; PVIII被鉴定与XP_019938975.1匹配度高, 分子质量为11 645 Da, pI值为4.69。但通过2.1节电泳结果分析, PVI的分子质量应在14 kDa左右, 与XP_019958408.1蛋白分子质量不相符, 最终确定PVII为XP_019958408.1, PVIII为XP_019938975.1。为研究PVI和PVII的序列差异, 分析了氨基酸序列的修饰情况, 由表3可知, PVI肽段的修饰数量明显多于PVII, 修饰类型有磷酸化修饰(Phospho)和泛素化修饰(GlyGly), 推测PVI分子质量的增加, 可能是由PVII被修饰后增加了磷酸和甘氨酸基团引起的, PVI可能是PVII修饰后蛋白。



m/z 633.3087、762.3513及875.4349为XP_019938975.1特征肽段SDFIEEDELK的离子; m/z 623.8008、762.3499及875.4330为XP_019958408.1特征肽段SHFIEEDELK的离子。

图4 SDFIEEDELK (A) 和SHFIEEDELK (B) 二级离子质谱图

Fig. 4 Tandem mass spectra of peptides SDFIEEDELK (A) and SHFIEEDELK (B)

表2 牙鲆小清蛋白的质谱鉴定结果
Table 2 Mass spectrometric identification of parvalbumins from Japanese flounder

小清蛋白亚型	蛋白编号	分子质量/Da	pI值	预测氨基酸序列	蛋白得分	特征肽段
PVI	XP_019958408.1	12 151	5.14	1 mafqklldds kiaaalaeck dagtfcchkf 31 fscgltgks tedvkafsi idqdkshfie 61 edelklifqn fkenaraltd aetkftlkag 91 didgdgkigd aefvamvkv	30 030	SHFIEEDELK
PVII	XP_019958408.1	12 151	5.14	1 mafqklldds kiaaalaeck dagtfcchkf 31 fscgltgks tedvkafsi idqdkshfie 61 edelklifqn fkenaraltd aetkftlkag 91 didgdgkigd aefvamvkv	32 513	SHFIEEDELK
PVIII	XP_019938975.1	11 645	4.69	1 mslasklse ditaalaeck aagsfnhkkf 31 fakvglsaks padikaafav idqdkshfie 61 edelklifqn fsasaraltd aetkftlkag 91 dsldgdgkigd defaamvkv	25 315	SDFIEEDELK

表3 PVI和PVII肽段修饰情况对比
Table 3 Comparison of the modified peptides of PVI and PVII

PVI发生修饰肽段	肽段得分期望值 (<0.01)	修饰类型	PVII发生修饰肽段	肽段得分期望值 (<0.01)	修饰类型
KFFSTCGLTGK	0.009 4	Phospho (ST) ^a	ALTDAETK	0.026	Phospho (ST)
ALTDAETKTFLK	0.000 2	Phospho (ST)	ALTDAETKTFLK	0.002	Phospho (ST)
ALTDAETKTFLK	0.001 1	Phospho (ST)	ALTDAETKTFLK	0.000 27	Phospho (ST)
LLDDSKIAAALAECK	0.003 9	Phospho (ST)	AFSIIDQDKSHFIEEDELK	0.000 4	Phospho (ST)
LLDDSKIAAALAECK	0.04	Phospho (ST)	AFSIIDQDKSHFIEEDELK	0.000 57	Phospho (ST)
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	0.001 3	Phospho (ST)			
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	4.10×10 ⁻⁶	Phospho (ST)			
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	0.000 77	Phospho (ST)			
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	1.00×10 ⁻³	Phospho (ST)			
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	8.50×10 ⁻⁵	Phospho (ST)			
AFSIIDQDKSHFIEEDELK	0.001 7	GlyGly (K) ^b			

注：a. 该肽段中被修饰的氨基酸为丝氨酸或苏氨酸；b. 肽段中被修饰的氨基酸为赖氨酸。

3 讨论

小清蛋白作为鱼类的主要过敏原，拥有2~5个亚型，分子质量在11~12 kDa之间，pI值在3~5之间，具有热稳定性^[17]。根据该性质，小清蛋白提取过程通过热处理的方法去除杂蛋白，盐析方法进行纯化，最终得到纯度较高的不同亚型小清蛋白；通过免疫印迹及ELISA方法鉴定提取的蛋白具有过敏性，质谱鉴定得到其氨基酸序列、分子质量及pI值，为今后的过敏原的评估提供技术支持。

国内外关于小清蛋白的提取与纯化方法已有许多报道，合理的提纯方法应提取得到纯度较高的所有的亚型，常见的提取液有Tris、Tris-HCl、甘氨酸、磷酸盐缓冲液、氯化钠、柯卡氏液等。Hamada^[13]和Kobayashi^[14]等应用氯化钠及磷酸盐溶液提取牙鲆中的小清蛋白，后用液相色谱方法进行分离纯化，均提取到纯度较高的小清蛋白，但仅得到1个亚型；Li Zheng^[18]、Beale^[19]及Liu Rong^[20]等采用Tris-HCl作提取试剂，均得到不同亚型的小清蛋白，且纯度大于90%；Ma Jiaju等^[21]采用不同的提取试剂对大菱鲆中的小清蛋白进行提取，结果发现

Tris、DTT和甘氨酸的混合溶液提取效果最好，得到的蛋白量较多，且蛋白活性高。DTT是一种还原剂，能够有效的抑制蛋白质中半胱氨酸被氧化，防止分子内或分子间形成二硫键形成聚合蛋白，有利于提高蛋白提取量，蛋白纯化及结构分析等。本实验最终选择Tris、DTT和甘氨酸混合溶液作为提取液，得到3种不同亚型的小清蛋白，且纯度均大于90%（图1）。由于小清蛋白具有一定的热稳定性，在纯化过程中常用水浴加热的方法去除非耐热性杂蛋白^[22]。小清蛋白经加热去除杂蛋白后，需要进一步的纯化以去除耐热性杂蛋白，常用的方法为柱层析法和盐析法，柱层析法根据蛋白物理化学性质不同，选用不同填料的柱子将目标蛋白分离纯化，是蛋白质提取最常用的方法。Hamada等^[13]选用Sephadex G-75凝胶层析柱和液相色谱法对牙鲆小清蛋白进行提取纯化，虽然得到纯度较高的牙鲆小清蛋白，但是由于色谱柱的容量限制导致其进样体积，造成纯化效率低；盐析法根据蛋白质在不同浓度盐溶液中溶解度的差异进行分离，马涛等^[23]采用硫酸铵盐析后，通过Qxl-Sephrose离子交换柱和凝胶过滤的方法，从三文鱼中提取得到纯度大于90%的小清蛋白；傅玲琳等^[24]用30%的硫酸铵饱和度盐析虾中原肌球蛋白，无需层析柱，获得高纯度的原肌球蛋白；Ma Jiaju等^[21]采用分级盐析法，先加入硫酸铵粉末至饱和度达60%，去除杂蛋白，最终继续加硫酸铵调节饱和度达100%，得到高纯度的大菱鲆不同亚型小清蛋白，相比于柱层析法，其操作简单、成本低，避免了因层析法导致的蛋白损失及蛋白稀释，更适合于目标蛋白的批量提取^[21]。本实验选择该方法对牙鲆小清蛋白进行纯化，最终得到纯度大于90%的3种不同亚型的小清蛋白，操作简单，蛋白得率约为0.2%。

NCBI蛋白库中对牙鲆小清蛋白氨基酸序列有很多的报道，均是从分子方面分析出小清蛋白的氨基酸序列，但是目前还鲜有报道从蛋白方面分析并验证其氨基酸序列^[25]。本实验切下电泳得到的不同亚型小清蛋白胶粒，经提取、酶解后经液相色谱-质谱测定，最终确定3个亚型的氨基酸序列，其中PVI和PVII与同一个小清蛋白（牙鲆小清蛋白XP_019958408.1）匹配度高，与电泳实验结果进行对比从而确定PVII为该蛋白。质谱分析发现，PVI肽段的修饰数量明显多于PVII，推断PVI可能为PVII的修饰产物；另一方面，蛋白的确证依赖于数据库的蛋白种类，NCBI数据库中牙鲆小清蛋白的种类有13种，本研究鉴定的仅有XP_019938975.1和XP_019958408.1，并不能排除PVI为新型亚型的可能性，需要进一步的确证。

目前，有研究发现鱼类小清蛋白的过敏性主要依赖于小清蛋白的浓度、种类差别及蛋白分子特性的差异影响作用不显著，不同鱼类之间小清蛋白的含量不同，但相同浓度下小清蛋白与IgE的结合能力相似^[18,26-30]。由

于小清蛋白亚型之间分子质量差别较小,增加了分离纯化的难度,因而导致同物种间不同亚型小清蛋白过敏原性的研究报道较少。Li Zheng等^[18]从草鱼肌肉中提取得到3种不同亚型的小清蛋白(PVI、PVII和PVIII),结合高效液相色谱仪将这3个亚型分离纯化,进而对其过敏性进行研究,研究发现,相同浓度下3个亚型与IgE的结合能力基本一致,进一步说明相比于分子性质,小清蛋白的浓度是影响其致敏性的关键因素。Guo Fangfei等^[30]从血鲷中提取得到2种不同亚型的小清蛋白,分子质量分别为14 kDa和12 kDa,血清学实验验证了12 kDa亚型与抗体的结合能力强于14 kDa亚型。本实验提取得到3种小清蛋白亚型,蛋白含量PVIII>PVI>PVII,同样免疫印迹法结果显示,IgG及IgE抗体结合能力PVIII最强,其次为PVI, PVII最弱,与蛋白的含量正相关,与上述研究结果相符,因此PVIII为牙鲆中最主要的过敏原。

4 结 论

牙鲆肉经Tris、甘氨酸和DTT的混合溶液提取,热处理去除非耐热性蛋白,硫酸铵分级沉淀法提纯得到3种不同亚型的牙鲆小清蛋白(PVI、PVII和PVIII),蛋白含量PVIII>PVI>PVII;经免疫印迹法和ELISA实验鉴定,提取的蛋白均具有过敏性,能够与IgG和IgE抗体结合,且呈一定的浓度依赖性,其中PVIII结合能力最强,为牙鲆主要过敏原。提取的蛋白经液相色谱-串联质谱法鉴定,鉴定得到PVII为牙鲆小清蛋白XP_019958408.1,分子质量为12 151Da, pI值为5.14, PVIII为牙鲆小清蛋白XP_019938975.1蛋白,分子质量为11 645Da, pI值为4.69, PVI与PVII与同一蛋白相匹配, PVI可能是PVII的修饰后蛋白。

参考文献:

- [1] HEFLE S L, NORDLEE J A, TAYLOR S L. Allergenic foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1996, 36: S69-S89. DOI:10.1080/10408399609527760.
- [2] SHARP M F, LOPATA A L. Fish allergy: in review[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2014, 46(3): 258-271. DOI:10.1007/s12016-013-8363-1.
- [3] Commission directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs, OJ L109[R]. 2000: 29-42.
- [4] Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients, OJ L 310[R]. 2007: 11-14.
- [5] Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, OJ L 304, 22. 11[R]. 2011: 18-63.
- [6] FDA. Food allergen labeling and consumer protection act[R]. Silver Spring: US Food and Drug Administration, 2004.
- [7] PEREZGORDO M, CUESTAHERRANZ J, MAROTO A S, et al. Identification of sole parvalbumin as a major allergen: study of cross-reactivity between parvalbumins in a Spanish fish-allergic population[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2011, 41(5): 750-758. DOI:10.1111/j.1365-2222.2011.03721.x.
- [8] CARRERA M, CANAS B, GALLARDO J M. Rapid direct detection of the major fish allergen, parvalbumin, by selected MS/MS ion monitoring mass spectrometry[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(11): 3211-3220. DOI:10.1016/j.jprot.2012.03.030.
- [9] KUEHN A, SWOBODA I, ARUMUGAM K, et al. Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 179: 1-8. DOI:10.3389/fimmu.2014.00179.
- [10] ELSAYED S, AAS K. Isolation of purified allergens (Cod) by isoelectric focusing[J]. International Archives of Allergy & Applied Immunology, 1971, 40(3): 428-438. DOI:10.1159/000230425.
- [11] BALLMER-WEBER B K, FERNANDEZ-RIVAS M, BEYER K, et al. How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2015, 135(4): 964-971. DOI:10.1016/j.jaci.2014.10.047.
- [12] CAI Q F, LIU G M, LI T, et al. Purification and characterization of parvalbumins, the major allergens in red stingray (*Dasyatis akajei*)[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(24): 12964-12969. DOI:10.1021/jf103316h.
- [13] HAMADA Y, SATO T A, ISHIZAKI S, et al. Expression and evaluation of IgE-binding capacity of recombinant Pacific mackerel parvalbumin[J]. Allergy International, 2004, 53(3): 271-278. DOI:10.1111/j.1440-1592.2004.00344.x.
- [14] KOBAYASHI A, KOBAYASHI Y, SHIOMI K. Fish allergy in patients with parvalbumin-specific immunoglobulin E depends on parvalbumin content rather than molecular differences in the protein among fish species[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2016, 80(10): 2018-2021. DOI:10.1080/09168451.2016.1189318.
- [15] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0.
- [16] OFFENGENDEN M, FENTABIL M A, WU J. N-glycosylation of ovomucin from hen egg white[J]. Glycoconjugate Journal, 2011, 28(3/4): 113-123. DOI:10.1007/s10719-011-9328-3.
- [17] SHIOMI K, HAMADA Y, SEKIGUCHI K, et al. Two classes of allergens, parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel [*Anguilla japonica*] and bigeye tuna [*Thunnus obesus*][J]. Fisheries Science, 1999, 65(6): 943-948. DOI:10.2331/fishsci.65.943.
- [18] LI Z, YOU J, LUO Y K, et al. Purification and characterization of parvalbumin isotypes from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(26): 6212-6218. DOI:10.1080/09168451.2016.1189318.
- [19] BEALE J E, JEEBHAY M F, LOPATA A L. Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax*[J]. Molecular Immunology, 2009, 46(15): 2985-2993. DOI:10.1016/j.molimm.2009.06.018.

- [20] LIU R, KRISHNAN H B, XUE W, et al. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(1): 458-463. DOI:10.1021/jf103942p.
- [21] MA J J, RAMESH P T, LI Z X, et al. Optimisation of an extraction technique of fish allergens suitable for detection and diagnosis[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2017, 35(1): 24-31. DOI:10.17221/578/2015-CJFS.
- [22] ARIF S H, JABEEN M, HASNAIN A U. Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 31(1): 121-137. DOI:10.1111/j.1745-4514.2007.00104.x.
- [23] 马涛, 王一侠, 金振涛, 等. 三文鱼过敏原小清蛋白分离纯化及免疫结构鉴定[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(4): 1-5. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2017.04.001.
- [24] 傅玲琳, 富舒洁, 王彦波, 等. 凡纳对虾原肌球蛋白硫酸铵沉淀分离纯化方法的优化[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 187-192. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718030.
- [25] 龚小玲, 鲍宝龙, 杨桂梅, 等. 牙鲆变态早期cDNA文库的构建和parvalbumin基因的克隆[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 467-472. DOI:10.3321/j.issn:1000-0615.2005.04.006.
- [26] YUKIHIRO K, TAO Y, CHENG T Y, et al. Quantification of major allergen parvalbumin in 22 species of fish by SDS-PAGE[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 345-353. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.08.037.
- [27] KOBAYASHI A, KOBAYASHI Y, SHIOMI K. Fish allergy in patients with parvalbumin-specific immunoglobulin E depends on parvalbumin content rather than molecular differences in the protein among fish species[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2016, 80(10): 2018-2021. DOI:10.1080/09168451.2016.1189318.
- [28] KUEHN A, SCHEUERMANN T, HILGER C, et al. Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2010, 153(4): 359-366. DOI:10.1159/000316346.
- [29] GRIESMEIER U, VÁZQUEZ-CORTÉS S, BUBLIN M, et al. Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species[J]. Allergy, 2010, 65(2): 191-198. DOI:10.1111/j.1398-9995.2009.02162.x.
- [30] GUO F F, KUBOTA H, SHIOMI K. Purification, immunological properties and molecular cloning of two allergenic parvalbumins from the crimson sea bream, *Erynnis japonica*[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 835-840. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.11.046.