

# 鲤鱼小清蛋白过敏原的分离纯化

肖有明<sup>1,2</sup>, 刘红<sup>3</sup>, 陈红兵<sup>1,4</sup>, 高金燕<sup>1,2,\*</sup>

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学食品系, 江西 南昌 330047; 3.江西生物科技职业学院动物科学系, 江西 南昌 330200; 4.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:**以普通鲤鱼为材料, 采用磷酸盐粗提、及离子交换层析的方法, 纯化出鲤鱼中主要过敏原——鲤鱼小清蛋白。结果显示, 采用阴离子交换层析法制取的鲤鱼小清蛋白纯度达 90% 以上, 该方法为过敏原鲤鱼小清蛋白的分离研究提供了可行的实验参数。

**关键词:** 鲤鱼; 小清蛋白; 离子交换层析; 纯化; 过敏原

## Purification of Carp Parvalbumin Allergen

XIAO You-ming<sup>1,2</sup>, LIU Hong<sup>3</sup>, CHEN Hong-bing<sup>1,4</sup>, GAO Jin-yan<sup>1,2,\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2.Department of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3.Department of Animal Science, Jiangxi Biological Science and Technology Vocational College, Nanchang 330200, China; 4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Carp parvalbumin is one of important allergens in carp. The purified carp parvalbumin was botained by anion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose fast flow. The results showed that the purity of the carp parvalbumin is more than 90 percent, which was identified with SDS-PAGE and PAGE. This method can provide a useful way to purify carp parvalbumin allergen.

**Key words:** carp; parvalbumin; anion-exchange chromatography; purification; allergen

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0385-04

鲤鱼以及其他一些鱼类的主要过敏原是小清蛋白(亦称为小白蛋白)<sup>[1-8]</sup>。鱼类小清蛋白主要存在于鱼类动物的肌肉中, 是人们的食用部分。鲤鱼小清蛋白分子量约为 12kD, 是一种比较稳定的钙结合蛋白, 对热、化学变性以及蛋白水解酶都比较稳定<sup>[4-10]</sup>。小清蛋白在低等脊椎动物的肌肉组织中有较高的含量, 而在高等脊椎动物的肌肉组织中则含量较少<sup>[11-12]</sup>, 它已经被证明在许多鱼类肌肉中存在。鲤鱼小清蛋白分为两种,  $\alpha$ -小清蛋白和  $\beta$ -小清蛋白, 前者含 109 个氨基酸、后者含 108 个氨基酸, 它们的性质非常相似, 所以在许多的研究中并不将两者分开, 目前也还没有关于  $\alpha$ -小清蛋白和  $\beta$ -小清蛋白单独致敏性的报道, 因而本方法也不将两者分离。本研究采用磷酸盐粗提、离子交换层析的方法分离鲤鱼中的小清蛋白, 将使分离的鲤鱼小清蛋白纯

度达到 90% 以上, 为进一步的工作提供实验材料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜鲤鱼(建鲤) 南昌市青山湖生鲜市场。

低分子量蛋白标准品 TIANGEN 公司; DEAE-Sepharose Fast Flow GE 公司; 牛血清白蛋白 北京 TBD(通宝达)生物技术发展中心。

### 1.2 仪器与设备

核酸蛋白检测系统 上海青浦沪西仪器厂; pH25-S 酸度计 上海伟业仪器厂; 低温高速离心机 美国贝克曼库尔特有限公司; 紫外分光光度计、电泳仪 BIO-RAD 公司; 生物电泳图像分析系统 上海复日科技有限公司。

收稿日期: 2008-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560096); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540);

江西省自然科学基金项目(0630120); 江西省主要学科科学技术带头人培养项目(赣科发计字[2004]234号)

作者简介: 肖有明(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品卫生与安全。E-mail: youmingshaw@163.com

\* 通讯作者: 高金燕(1967-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品卫生与安全。E-mail: gjy1967@yahoo.com.cn

### 1.3 方法

#### 1.3.1 分离纯化技术路线

鲤鱼肌肉→磷酸盐浸提→抽滤, 滤液煮沸→硫酸铵沉淀→透析→离子交换层析

#### 1.3.2 鲤鱼肌肉的预处理

从市场买回新鲜鲤鱼, 除去内脏、鱼皮和鱼骨, 只选取鲤鱼肌肉, 切成碎块, 放入绞肉机中绞碎。

#### 1.3.3 鲤鱼蛋白的粗提

绞碎的鲤鱼肌肉按比例(肌肉:磷酸盐=1:8, W/V)加入 0.05mol/L、pH7.5 的磷酸盐缓冲液, 搅拌约 0.5h, 静置于 4℃ 冰箱 24h 后取出。过滤后得滤液即蛋白粗提液。

#### 1.3.4 煮沸除杂蛋白

将 1.3.3 中提取的粗蛋白溶液煮沸约 30min, 冷却后抽滤, 得滤液。

#### 1.3.5 硫酸铵沉淀粗蛋白

所得滤液按质量体积比加 60% 硫酸铵(其余直接冷冻保存), 5000r/min 离心 15min, 弃去上清液, 沉淀加入 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液溶解, 放入蒸馏水中透析过夜, 得到粗蛋白溶液。

#### 1.3.6 离子交换层析法提取鲤鱼小清蛋白

据文献报道鲤鱼小清蛋白等电点为 4.7~5.3<sup>[8,13]</sup>, 采用阴离子交换树脂 DEAE-Sepharose Fast Flow(16mm × 250mm) 进行分离。粗提蛋白上柱后, 于波长 280nm 处检测蛋白峰, 用 pH7.5、0.01mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液作平衡液, 加入 0.5mol/L NaCl 进行梯度洗脱。将收集到的各洗脱峰溶液置于透析袋中, 透析 4h; 用超滤管(截留相对分子量 6kD) 于 4℃ 进行浓缩, 冷藏备用。

#### 1.3.7 SDS-PAGE 电泳分析

采用不连续体系 SDS-PAGE 垂直板凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 先恒流 10mA, 约 10min 后, 再恒流 25mA, 电泳 45min 后, 经考马斯亮蓝 R250 染色、醋酸脱色。标准蛋白分子量范围为 12~170kD 之间的 10 种多肽。

#### 1.3.8 PAGE 电泳分析

采用不连续体系 PAGE 垂直板凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 3.75%, 分离胶浓度为 10%, 开始时恒流 10mA, 恒定约 15min, 当染料进入分离胶后, 把电流调至 25mA, 直至染料距前沿底边约 1cm 时, 停止电泳。

#### 1.3.9 蛋白浓度的测定

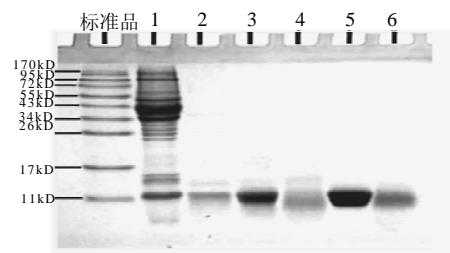
采用考马斯亮兰法(Bradford 法)<sup>[14]</sup>, 用牛血清 BSA 作为标准蛋白配制蛋白质标准溶液, 用蒸馏水溶解配成 1.0mg/ml, 根据实验要求作不同稀释。标准曲线的绘制: 用紫外分光光度计在波长 595nm 处分别测定不同浓度标准蛋白溶液的吸光度, 以吸光度( $A_{595nm}$ )为纵坐标,

标准蛋白含量( $\mu\text{g/ml}$ )为横坐标, 绘制标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 预处理的效果

用考马斯亮蓝法检测, 可知磷酸盐粗提蛋白的浓度约为 5.121mg/ml。从图 1 可以看出, 粗提样品含有至少 15 种蛋白, 成分复杂。未经硫酸铵处理的样品经考马斯亮蓝法检测, 得到浓度为 1.401mg/ml 的蛋白。硫酸铵处理后的样品得到浓度为 1.104mg/ml 的蛋白。从图 1 中 1、2、3 泳道可以看出, 煮沸抽滤后杂蛋白减少很多。



1.粗蛋白; 2.煮沸物抽滤后未经硫酸铵处理的蛋白; 3.煮沸物抽滤后经硫酸铵处理未用离子交换层析分离的蛋白(经三氯乙酸浓缩); 4.离子交换层析第一峰收集物; 5.离子交换层析第二峰收集物(经超滤浓缩); 6.离子交换层析第三峰收集物。

图 1 纯化各阶段收集物 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of collected samples during purification process

### 2.2 离子交换层析结果

鲤鱼蛋白粗提液上柱前, 用 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH7.5)平衡 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱, 然后用 0~0.5mol/L NaCl 缓冲溶液进行线性梯度洗脱, 洗脱结果见图 2。

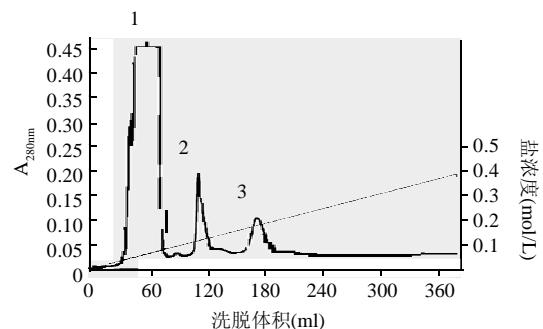
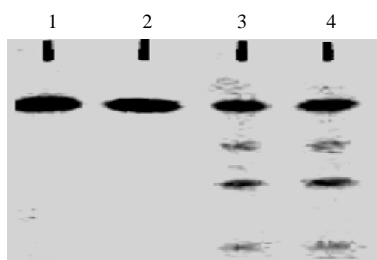


图 2 阴离子交换树脂分离鲤鱼小清蛋白层析曲线

Fig.2 Elution curve of carp parvalbumin from anion-exchange column

从图 2 可以看到, 整个过程得到 3 个洗脱蛋白峰, 将该 3 组分从自动部分收集器中分别收集于锥形瓶中, 经 4℃ 透析脱盐, 超滤管浓缩后, 用于电泳分析, 电泳图谱见图 1 和图 3。



1、2. 离子交换层析第二峰蛋白(经超滤浓缩);  
3、4. 粗提液煮沸后所得滤液。

图3 纯化蛋白和粗蛋白 PAGE 电泳图

Fig.3 PAEG patterns of purified and crude proteins

离子交换层析第二峰收集物经超滤管浓缩后, 上样量达到 22 μg 时, 经 Quantity one 软件分析, 图 1 中 5 泳道中只有一条条带, 分子量为 11.9kD, 其纯度大于 90%, 而据文献报道, 鲤鱼小清蛋白的分子量为 12kD。通过 PAGE 电泳的进一步鉴定, 可知离子交换层析后, 收集的第二峰为目标峰, 所含的纯度已经较高(纯度>90%)。因此, 通过本研究的离子交换层析方法可以得到纯度>90%的鲤鱼小清蛋白。

### 2.3 蛋白质含量变化

#### 2.3.1 蛋白含量测定的标准曲线

采用考马斯亮兰法(Bradford 法), 用牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白配制蛋白质标准溶液, 所作标准曲线见图 4。

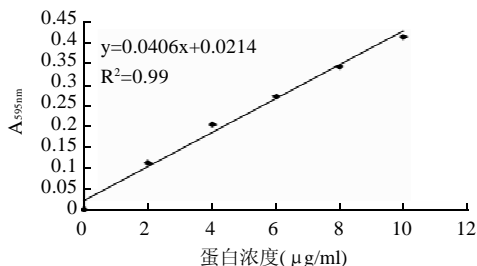


图4 牛血清蛋白浓度的标准测定曲线

Fig.4 Standard determination curve of bovine serum albumin

#### 2.3.2 纯化过程中蛋白总量变换

蛋白总量变换结果见表 1。

表1 纯化过程中蛋白总量的变化

Table 1 Summary of purification procedures of or carp parvalbumin allergen

	蛋白总量(mg)	得率(%)	纯化倍数
粗提物	121.31	100	1
煮沸后滤液	25.01	85.2	4.12
硫酸铵处理物	18.12	76.1	5.10
离子交换第 2 峰收集物	1.02	27.6	32.8

## 3 讨论

### 3.1 预处理过程的影响

从图 1 中 1、2、3 泳道可以看出, 煮沸样品可以除去很多杂蛋白, 使得分离纯化的步骤减少并且效果较好。而据文献报道小清蛋白热稳定性较好, 煮沸对其影响不大。

对比用硫酸铵处理过的样品和只经过煮沸抽滤后直接收集保存的样品, 两种样品的蛋白溶液的浓度相差不大。并且经 SDS-PAGE 检测, 经过硫酸铵处理的样品目标蛋白的纯度未能得到较大提高, 而离子交换层析实验表明, 直接用只经过煮沸抽滤样品进行离子交换层析纯化也能得到较纯小清蛋白, 而硫酸铵处理样品后还须透析过夜等步骤, 费时费力, 效果和不处理相差不大, 所以离子交换层析的样品不采用硫酸铵处理。

### 3.2 离子交换层析条件的选择

离子交换层析主要是利用蛋白质在 pI 上的差异性, 即在一定 pH 值的缓冲体系中, 不同蛋白与离子交换树脂有不同的结合能力, 而不同浓度的 NaCl 可以把不同结合力的蛋白从层析柱上先后洗脱下来。从离子交换层析洗脱曲线(图 2)可以计算出, 在 0.1~0.2mol/L NaCl 的线性梯度洗脱时, 可以得到洗脱峰 2(图 1), 收集该峰溶液, 便可得到较纯的鲤鱼小清蛋白, 但得率较低。其原因主要有几方面: 小清蛋白在上样液中的含量较低; 利用线性梯度进行蛋白洗脱时, 目标蛋白没有完全纯化出来, 有一部分混杂在其他洗脱峰中; 在采用 Tris-HCl 缓冲液进行离子交换凝胶层析时, 温度的变化、空气的流动都会影响核酸蛋白检测器上的蛋白吸光度, 从而使记录仪输出的曲线漂移, 而这些变化与蛋白浓度没有直接相关性, 不利于目标蛋白的监测和蛋白液的收集。

### 3.3 蛋白纯度鉴定方法的可行性

SDS-PAGE 主要根据蛋白质的分子量来区分蛋白, 而聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)是在恒定的、非解离的缓冲系统中来分离蛋白质, 属于非解离电泳。它主要依据分子筛以及电荷的作用来区分蛋白。因而两者结合能够较好的鉴定一种蛋白。当 SDS-PAGE 电泳采用考马斯亮蓝染色后, 单条电泳条带中蛋白质最小检出量为 0.1 μg, 即当蛋白含量少于 0.1 μg 时不能被检出。本实验图 1 中 5 号泳道上样量达到 22 μg 时, 经 Quantity one 分析, 只有一条条带, 相对分子量符合文献报道<sup>[8]</sup>; 而同样样品经 PAGE 电泳分析, 只有一条条带, 因而可以确定所分离蛋白为纯度较高的鲤鱼小清蛋白。如需进一步研究其生化特性, 可对分离蛋白做等电聚焦及质谱等实验来进一步完善。

## 4 结论

鲤鱼是我国消费量很大的淡水鱼, 也是一种常见的

食物过敏原,但目前国内对于淡水鱼食物过敏的研究相对较少,随着人们对于食品安全认识的不断深入,淡水鱼过敏原的研究必将得到广泛开展。根据鲤鱼小清蛋白的主要生化性质,以普通鲤鱼肌肉为原材料,采用阴离子交换层析法可以获得纯度高于90%的过敏原鲤鱼小清蛋白。利用此方法纯化得到的过敏原,将为进一步开展鲤鱼食物过敏的研究提供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] CREPO J F, BLANCO C, CONTREAS J, et al. Food allergy: a clinical and epidemiological study[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1992, 89: 192.
- [2] O'NEIL C, HELBLING A A, LEHRER S B. Allergic reactions to fish[J]. *Clin Rev Allergy*, 1993, 11: 183-200.
- [3] DE MARTINO M, NOVEMBRE E, GaALLI L, et al. Allergy to different fish species in cod allergic children: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1990, 86: 909-914.
- [4] AAS K, ELSAYED S M. Characterization of a major allergen (cod)[J]. *Allergy*, 1969, 44: 333-343.
- [5] ELSAYED S, BENNIC H. The primary structure of allergen M from cod[J]. *Scand J Immunol*, 1975(4): 203-208.
- [6] PASCUAL C, ESTEBAN M M, CRESPO J F. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity[J]. *Pediatr* 1992, 121: 29-34.
- [7] BERNHISEL-BROADBENT J, SCANLON S M, SAMPSON H A. Fish hypersensitivity. I. *In vitro* and oral challenge results in fish-allergic patients[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1992, 89: 730-737.
- [8] BUGAJSKA-SCHRETTTER A, ELFMAN L, FUCHS T, et al. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and  $Ca^{2+}$  depletion[J]. *Allergy Clin Immunol*, 1998, 101: 67-74.
- [9] ELSAYED S, APOLD J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M: locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides[J]. *Allergy*, 1983, 38: 449-459.
- [10] PECHÈRE J F. The significance of parvalbumin among muscular calcium proteins[M]//WASSERMAN R H, CORRADINO R, CARAFOLI E, et al. Calcium-binding proteins and calcium. North Holland: Elsevier, 1997: 213-221.
- [11] LEHKY P, BLUM H E, STEIN E A, et al. Isolation and characterization of parvalbumins from skeletal muscle of higher vertebrates[J]. *Biol Chem*, 1974, 249: 4332-4334.
- [12] GOODMAN M, PECHERE J F. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method[J]. *Mol Evol*, 1977 (9): 131-158.
- [13] 练玉银, 刘志刚, 温岸玲. 鲤鱼主要过敏原的分离、鉴定与纯化[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(8): 947-949.
- [14] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 36-55.