

花生内源过敏原蛋白 Ara h 2 的分离纯化及鉴定

Purification and identification of endogenous allergy protein Ara h 2 in peanut

朱青青 张文举 蔡琴 陈沁

ZHU Qing-qing ZHANG Wen-ju CAI Qin CHEN Qin

(上海大学生命科学学院, 上海 200444)

(School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

摘要: Ara h 2 蛋白是花生的主要过敏原蛋白之一, 为获得高纯度的花生 Ara h 2 蛋白, 以新鲜花生为原料, 通过蛋白浸提、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析, 十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)回收等方法分离得到目的蛋白, 并运用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI—TOF/MS)对其进行鉴定。结果表明: 该方法可得到纯度较高的纯化蛋白; 经质谱鉴定后确定该蛋白为 Ara h 2 蛋白, 两个同种异型物分子量分别为 18.5 kD (Ara h 2.01) 和 20.1 kD (Ara h 2.02); 层析柱分离和 SDS—PAGE 电泳回收的得率分别为 31.4% 和 18.6%。

关键词: 花生; 过敏原; Ara h 2; 纯化; 质谱

Abstract: Ara h 2 is one of the major allergen in peanut. Raw peanut was subjected to a series of sequential treatments, such as protein extraction, DEAE-Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS—PAGE) recovery. The purified protein was identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI—TOF/MS). The results showed that the highly purified protein could be obtained by this method and was identified as Ara h 2 by MALDI—TOF/MS. The molecular weights of two constituents were 18.5 kD (Ara h 2.01) and 20.1 kD (Ara h 2.02). Recovery rate of column chromatography separation and SDS—PAGE electrophoresis were 31.4% and 18.6%, respectively.

Keywords: peanut; allergen; Ara h 2; purification; mass spectrometry

近年来, 食物过敏引起了人们的广泛关注。据世界粮农组织(FAO)1995 年报告, 90% 以上的食物过敏是由牛奶、蛋、鱼、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果类和小麦引起

的^[1], 其中花生致敏人数占食物过敏的 59%^[2], 相对于其他过敏原而言, 花生过敏具有长期性、普遍性, 甚至威胁生命等特点。目前国际免疫联合会命名小组委员会认可的花生过敏原有 11 种, 其中 Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、Ara h 6 属于主要过敏原, 可被 90% 花生过敏患者识别^[3]。而 Ara h 2 被认为是致敏性最强的花生过敏原之一, 其 cDNA 序列全长为 477 bp, 编码 158 个氨基酸, 分子量 17~20 kD, pI 为 5.2, 约占花生蛋白总量的 10%^[4]。Ara h 2 有 Ara h 2.01 和 Ara h 2.02 两个亚型^[5], 称为同种异型物, Ara h 2.02 比 Ara h 2.01 多 1 个由 12 个氨基酸构成的 IgE 结合表位, 因此其致敏性可能更严重^[6]。

为深入研究花生过敏机理, 获得大量高纯度的花生 Ara h 2 蛋白是关键。对于 Ara h 2 的分离纯化方法已有很多报道, 如 Burks^[7,8]、张英坤^[9]等通过花生脱脂, 离子交换层析等方法分离得到 Ara h 2 蛋白。由于脱脂时使用的有机溶剂丙酮等可能会使蛋白质变性或沉淀^[10,11], 在本研究中花生不经过脱脂, 粗提蛋白直接过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱, 并用 SDS-PAGE 和 MALDI—TOF/MS 分离、纯化并鉴定目的蛋白, 为进一步开展花生过敏原 Ara h 2 致敏机理研究提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

花生: 四粒红, 购于上海市某大型超市;
预染 Marker: 天根生化科技(北京)有限公司;
DEAE-Sepharose Fast Flow 预装柱: 博格隆(上海)生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器

垂直板型电泳槽: PowerPac™ Basic 型, 美国 BIO-RAD 公司;

蛋白纯化仪: AKTA Purifier 型, 美国 General Electric 公司;

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31201306)

作者简介: 朱青青(1990—), 女, 上海大学在读硕士研究生。

E-mail: zq102314@163.com

通讯作者: 陈沁

收稿日期: 2015—05—29

恒温磁力搅拌器:81-2 型,上海志威电器有限公司;
超微量分光光度计:NanoDrop 2000 型,上海在途生物
科技有限公司;
高速多功能粉碎机:HCP-200 型,上海旗箭粉碎机公司;
台式高速冷冻离心机:Biofuge Stratos 型,德国贺利氏有
限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 花生总蛋白的提取及 SDS—PAGE 分析 花生去红
衣,组织破碎后液氮研磨,得花生粉末。5 g 花生粉末浸于
100 mL,20 mmol/L,pH 8.2 Tris—HCl 缓冲液中,4 ℃ 磁力
搅拌 3 h,5 000×g,4 ℃ 冷冻离心 5 min,上清于 25 000×g
再次离心 30 min,上清液经 0.45 μm 过滤膜过滤得蛋白提取
液,—20 ℃ 保存,备用。

将提取得到的花生蛋白粗提液进行 SDS—PAGE 电泳
分析^[12,13]:采用不连续体系 SDS—PAGE 电泳平板凝胶,浓
缩胶浓度为 5%(pH 6.8),分离胶浓度为 19%(pH 8.8),
80 V 恒压电泳 30 min 后,120 V 恒压跑电泳。电泳结束后,
经考马斯亮蓝 R250 染色、醋酸脱色。

1.2.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析 据文
献[14]报道花生蛋白 Ara h 2 等电点为 5.2 左右,采用阴离
子交换树脂 DEAE-Sepharose Fast Flow(16 mm×250 mm)
进行分离。20 mmol/L,pH 8.2 Tris—HCl 平衡 4~5 个柱
体积,流速 2 mL/min;花生蛋白上柱后,先用 Tris—HCl
(20 mmol/L,pH 8.2)漂洗至基线,再用 0~1 mol/L NaCl 连
续梯度洗脱(流速 2 mL/min),280 nm 检测紫外吸收峰,自动
收集器收集洗脱蛋白。

将收集到的洗脱蛋白溶液置于透析袋中,透析 3 次,每
次 2 h。经 3 kD Milipore 超滤管 4 ℃ 下浓缩,备用。

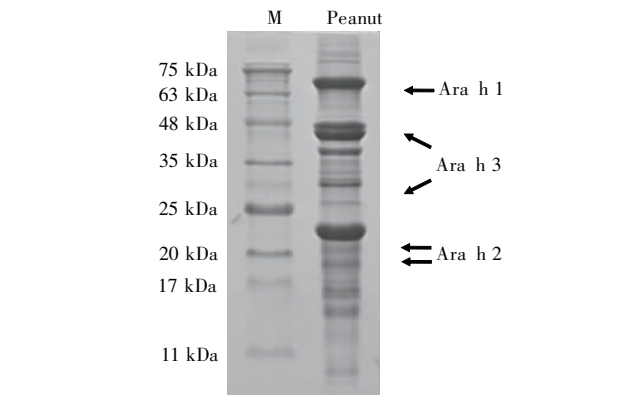
1.2.3 Ara h 2 蛋白的回收及得率的测定 纯化后的目的
蛋白溶液经 SDS—PAGE 电泳,KCl 染色后割下目的条带,
切成细小胶条置于透析袋中进行恒压(100 V,2 h)水平电
泳,结束后置于 20 mmol/L,pH 8.2 Tris—HCl 中透析 4 h,
离心,收集上清液与花生纯化后蛋白进行 SDS—PAGE 电
泳,进行比较对照,鉴定回收结果。

1.2.4 MALDI—TOF/MS 鉴定 Ara h 2 蛋白 将纯化的蛋
白进行 SDS—PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,醋酸脱色后,切
下目的条带,冷冻保存。送至复旦大学蛋白质组中心进行
MALDI—TOF/MS 质谱鉴定。质谱条件:激发波长 335 nm,
加速电压 20 kV,一级质谱误差 100 mg/L,二级质谱误差
0.6 kD。

2 结果与分析

2.1 花生粗提蛋白 SDS—PAGE 分析

花生经液氮研磨、浸提、离心后获得蛋白粗提物,SDS—
PAGE 电泳检测结果如图 1 所示,蛋白电泳检测到至少 10
条主蛋白条带,Ara h 1(65 kDa)和 Ara h 3(14~45 kDa 不
等)含量较高,其中检测到分子量约为 18 kD 和 20 kD 的
两个目的条带,与已报道^[15]的 Ara h 2 分子量相吻合。

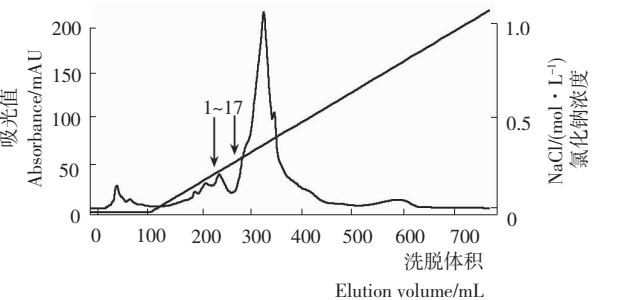


M. 标准蛋白Marker Peanut. 花生蛋白粗提物
图 1 花生蛋白粗提物电泳结果

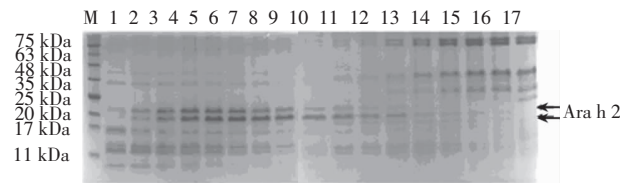
Figure 1 SDS—PAGE of extraction products of
crude peanut proteins

2.2 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析法分离
Ara h 2 蛋白

在 pH 8.2 的条件下,花生中带正电荷和不带电的蛋白
首先随缓冲液洗出,带负电的则由于其带电大小不同与
DEAE-Sepharose Fast Flow 结合能力有所不同。在洗脱过
程中,随 NaCl 离子强度增大,带负电的蛋白依次被洗脱下
来。将收集到的洗脱蛋白溶液进行 SDS—PAGE 电泳,从而
确定目的蛋白 Ara h 2 被洗脱下来时 NaCl 浓度,电泳结果见
图 2(b),表明目的蛋白 Ara h 2 在 0.2~0.3 mol/L NaCl
(图 2(a)箭头所指位置)时被洗脱下来,且随着 NaCl 离子强
度的增大,洗脱蛋白溶液中 Ara h 2 的含量逐渐增大后又逐
渐减少。收集目的蛋白含量较大的洗脱溶液用以回收。



(a) 阴离子交换层析洗脱曲线

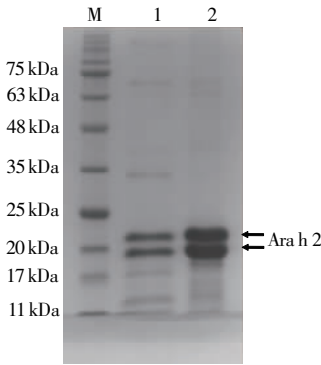


M. 蛋白质标准Marker 1~17. 纯化后含Ara h 2蛋白的洗脱液电泳图
(b) 0.2~0.3 mol/L NaCl洗脱蛋白SDS—PAGE电泳图

图 2 阴离子交换层析分离纯化花生过敏原 Ara h 2
Figure 2 Purification of peanut allergen Ara h 2 by
anion-exchange chromatography

2.3 电泳回收 Ara h 2 蛋白及其得率计算

由图 2(b)可知,纯化后含目的蛋白 Ara h 2 的溶液中有少量杂带,因此,进行 SDS—PAGE 电泳后割胶回收以进一步纯化。由图 3 可知,目的蛋白得到富集,蛋白密度扫描该蛋白纯度>95%(图略),表明 SDS—PAGE 电泳回收 Ara h 2 蛋白的方法可行,此法可迅速获得一定量纯度较高的 Ara h 2 蛋白。经过计算,花生 Ara h 2 蛋白在粗提、纯化、回收各步骤的蛋白得率见表 1,纯化后目的蛋白的回收率可达到 18.6%。



M. 蛋白质标准 Marker 1. 纯化后花生蛋白
2. SDS—PAGE 电泳回收纯化后的蛋白

图 3 电泳回收纯化后蛋白电泳图

Figure 3 SDS—PAGE of recovered purification protein

表 1 花生过敏原 Ara h 2 各步骤得率

Table 1 Recovery rate of peanut allergen Ara h 2 in every step

样品	蛋白质浓度/(mg·mL ⁻¹)	体积/mL	含量/mg	回收率/%
粗提蛋白	11.200	5.00	5.60	100.0
纯化蛋白	0.110	16.00	1.76	31.4
回收蛋白	0.083	12.50	1.04	18.6

2.4 花生过敏原 Ara h 2 的质谱鉴定

采用 MALDI—TOF/MS 测得肽质量指纹谱(PMF),并在数据库中查询识别的方式鉴定蛋白质,是目前蛋白质组学研究中最普遍应用的蛋白鉴定方法。本研究对目的蛋白 Ara h 2 进行 MALDI—TOF/MS 分析得到一个一级质谱(图 4)和 7 个二级质谱(图略)。根据一级和二级质谱数据使用 GPS Explore 软件(软件版本号:V3.6,ABI)进行分析,分析结果使用 MASCOT(软件版本号:V2.1,Matrix Science,U.K)搜库软件对 NCBI nr 数据库比对。目的蛋白 Ara h 2 的两个同系物 Ara h 2.01, Ara h 2.02 分别与登录号 gi|224747150和 gi|26245447 具有 100%同源性,分子质量分别为 18.5 kD 和 20.1 kD,肽段序列比对结果见表 2,表明本研究得到的纯化蛋白即为花生过敏原蛋白 Ara h 2。

表 2 花生过敏原 Ara h 2 质谱鉴定肽段序列比对结果

Table 2 Comparison of peptides in peanut allergen Ara h 2 by mass spectroscopy

起始位点	终止位点	肽段序列
56	62	RDEDSYGRD
136	142	RQQEQQFKR
93	102	RGAGSSQHQCRC
93	102	RGAGSSQHQCRC
23	31	RQQWELQGDRR
92	102	RRGAGSSQHQCRC
92	102	RRGAGSSQHQCRC
23	32	RQQWELQGDRRC
23	32	RQQWELQGDRRC
122	128	RQQEQQFKR
79	88	RGAGSSQHQCRC
79	88	RGAGSSQHQCRC
21	29	RQQWELQGDRR
78	88	RRGAGSSQHQCRC
78	88	RRGAGSSQHQCRC
21	30	RQQWELQGDRRC
21	30	RQQWELQGDRRC

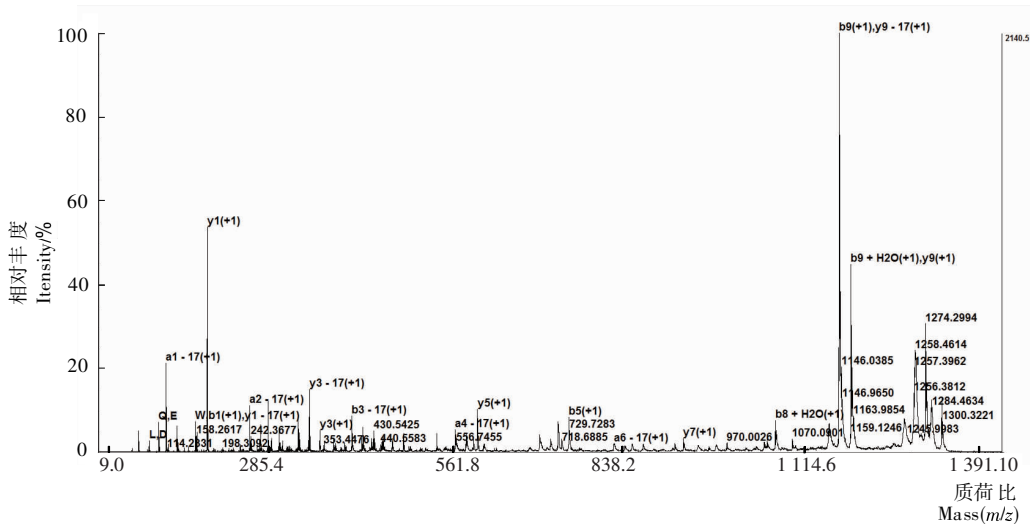


图 4 花生过敏原 Ara h 2 MALDI—TOF/MS 质谱图
Figure 4 MALDI—TOF/MS spectrum of peanut allergen Ara h 2

3 讨论

离子交换层析主要是利用各蛋白所带电荷不同即与层析柱结合能力的不同,通过增强洗脱液离子浓度,将各蛋白分离开来。通过对比每管收集量、洗脱速度和洗脱时间对纯化结果的影响,发现每管收集量越大,目的蛋白浓度越小,则混入杂蛋白的可能性越大;洗脱速度太慢,很多目的蛋白很难被洗下来;洗脱时间越短,NaCl 浓度增大越快,则会导致目的蛋白还没来得及收集就和其他蛋白一起洗脱下来。由图 2 可知,0.2~0.3 mol/L NaCl 线性洗脱时得到目的蛋白,而该 NaCl 浓度与罗春萍^[16]、Lehmann^[17]等的研究不同。原因可能是阴离子交换柱、填料等购买厂家不同,蛋白质与交换柱结合能力略有差异导致结果不同;Lehmann 在分离纯化 Ara h 2 时使用强阴离子交换柱,目的蛋白在 0.15 mol/L NaCl 时线性洗脱下来。

本研究采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱,发现分辨率更好,但目的蛋白得率略低,可能是因为两个原因:① 部分蛋白混入其他管中,由于浓度太小没有收集;② 在使用超滤管浓缩时,由于 Ara h 2 含有很多疏水基团,会非特异性地结合到滤膜上,造成蛋白损失。本研究采用 0~1 mol/L NaCl 连续梯度洗脱,增强离子浓度而降低蛋白与介质电荷,从而得到连续的洗脱蛋白,较之阶段洗脱离子浓度跨度大能更好地分离纯化蛋白。

4 结论

花生过敏问题日益得到人们的关注,为深入研究花生过敏原的致敏特性及其免疫学功能,获得纯化的花生过敏原蛋白是关键。本试验以新鲜花生为原料,采用阴离子交换层析及 SDS—PAGE 电泳回收的方法纯化回收得到高纯度(95%)的花生过敏原蛋白 Ara h 2,此方法简单、快速,易操作。经 SDS—PAGE 电泳和 MALDI—TOF—MS 检测鉴定目标蛋白为 Ara h 2 两个同系物,分子量分别为 18.5 kD 和 20.1 kD。为进一步开展 Ara h 2 蛋白的后续研究提供了依据。

参考文献

1 何强. 天然食品原料中的过敏原及其控制方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 253~256.

2 Li Hao, Yu Jian-mei, Ahmedna M, et al. Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 762~768.

3 Mueller G A, Gosavi R A, Pomés A. Ara h 2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity[J]. Allergy, 2011, 66: 878~885.

4 Schäppi G F, Konrad V, Imhof D, et al. Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures[J]. Allergy, 2001, 56(12): 1 216~1 220.

5 Apostolovic D, Luykx D, Warmenhoven H. Reduction and alkylation of peanut allergen isoforms Ara h 2 and Ara h 6; characterization of intermediate- and end products[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1 834(12): 2 832~2 842.

6 韩远龙, 吴志华, 李璞, 等. 花生过敏原结构及加工研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 310~315.

7 Burks A W, Williams L W, Helm R M, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patient with atopic dermatitis and positive peanut challenges[J]. Allergy Clin. Immunol, 1991, 88(2): 172~179.

8 Burks A W, Williams L W, Connaughton C, et al. Identification of a major peanut allergen, Ara h II, in patient with atopic dermatitis and positive peanut challenges[J]. Allergy Clin. Immunol, 1992, 90(6): 962~969.

9 张英坤, 陈红兵. 离子交换层析法分离花生过敏原 Ara h 2 的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 259~262.

10 吴海强, 余晓, 刘志刚. 食品过敏原指纹图谱快速检测研究(三)——花生总蛋白 2-DE 指纹图谱和蛋白点 MALDI—TOF/MS 分析[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(3): 271~273.

11 Koppelman S J, Vlooswijk R A A, Knippels L M J, et al. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia and Valencia, bred in different parts of the world[J]. Allergy, 2001, 56(2): 132~137.

12 何伟逸, 吴序栎, 刘志刚, 等. 阴离子交换层析法分离纯化花生主要过敏原 Ara h 1 的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 768~771.

13 宋宏新, 刘立新, 柏红梅, 等. 牛乳中蛋白质的电泳分析技术研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 51~53.

14 张雅军, 张浩, 杨选, 等. 花生主要致敏物质及其脱敏方法研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 312~318.

15 William Palmer G, Dibbern Jr D A, Wesley Burks A, et al. Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity[J]. Clinical Immunology, 2005, 115(3): 302~312.

16 罗春萍, 高金燕, 胡纯秋, 等. 花生过敏原 Ara h 6 的分离纯化及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 76~80.

17 Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, et al. High-yield expression in Escherichia coli, purification, and characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 31(2): 250~259.