

研究报告

腰果主要过敏原 Ana o 2 原核表达及免疫学鉴定

康晨¹, 闫娟娟¹, 姜琛², 张嘉懿², 谢万珍¹, 毕宏晨¹, 李会强¹

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2. 天津市儿童医院检验科, 天津 300074)

摘要:目的 构建 Ana o 2 重组表达质粒, 原核表达重组蛋白并评价其免疫活性。方法 将 Ana o 2 基因构建到 pET-28a(+) 载体中, 测序正确的重组质粒转化 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 诱导表达目的蛋白并进行质谱鉴定。利用腰果过敏阳性血清, 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和蛋白质免疫印记 (Western blot) 法评价重组 Ana o 2 的免疫活性。结果 重组蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 表明分子量为 54 kD, 与理论值相符, 经质谱鉴定为 Ana o 2。ELISA 结果显示, 用重组 Ana o 2 检测腰果过敏阳性血清与阴性血清特异性 IgE 抗体 (sIgE) 水平差异有统计学意义 ($t=2.44, P<0.05$)。Western blot 结果表明, 重组 Ana o 2 与腰果过敏患者血清反应性良好。结论 利用原核系统表达了 Ana o 2, 并且重组 Ana o 2 与腰果过敏患者血清具有良好的反应性。

关键词: Ana o 2; 基因克隆; 重组蛋白; 特异性 IgE 抗体; 腰果过敏

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)01-0010-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.01.002

Prokaryotic expression and identification of recombinant cashew nut allergen Ana o 2KANG Chen¹, YAN Juanjuan¹, JIANG Chen², ZHANG Jiayi², XIE Wanzhen¹,
BI Hongchen¹, LI Huiqiang¹(1. College of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China;
2. Department of Medical Laboratory, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China)

Abstract: Objective To express the cashew nut allergen Ana o 2 and identify its immunological activity. **Methods** Ana o 2 gene was synthesized and inserted into the pET-28a(+) expression vector. The recombinant plasmid pET-28a(+)-Ana o 2 was constructed and sequenced. The correct recombinant plasmid was transformed into Rosetta (DE3), and the recombinant Ana o 2 protein was expressed and purified. The purified recombinant protein was identified by mass spectrometry. The immunological activity of the recombinant Ana o 2 protein was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and protein immunoblot (Western blot). **Results** As determined by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the molecular weight of the recombinant protein was approximately 54 kD, which was consistent with the theoretical value. The recombinant protein was identified as Ana o 2 by mass spectrometry. ELISA result showed that the level of specific immunoglobulin E (sIgE) in cashew-allergic sera was significantly different from that in negative sera ($t=2.44, P<0.05$). Western blot result showed that recombinant Ana o 2 had good reactivity with cashew-allergic sera. **Conclusion** A recombinant expression vector of Ana o 2 had been successfully constructed. Recombinant Ana o 2, which was expressed by prokaryotic system, had good reactivity with cashew-allergic sera.

Key words: Ana o 2; gene clone; recombinant protein; specific immunoglobulin E; cashew allergy

食物过敏是被致敏机体在重复暴露于相同食物所产生的特定免疫反应, 对机体产生不良影

响^[1]。食物过敏的患病率在过去的几十年内不断攀升, 目前全世界约有 2%~3% 的成年人和 5%~10% 的儿童患有食物过敏^[2]。中国的食物过敏患病率在十年中由 3.5% 上升到 7.7%^[3]。食物过敏通常起病迅速, 某些严重反应甚至危及生命, 严重影响患者生活质量, 也占用了大量的医疗资源^[4], 因此, 用高效的检测方法准确诊断食物过敏、提出预防和控制食物过敏的措施至关重要^[4-5]。

过敏原特异性 IgE (sIgE) 抗体检测是评估食物

收稿日期: 2019-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81772259)

作者简介: 康晨 女 主管技师 研究方向为食物过敏实验诊断

E-mail: kangchen101@126.com

通信作者: 李会强 男 教授 研究方向为标记免疫分析方法和

食物过敏实验诊断及核心技术

E-mail: lihuiqiang1965@163.com

过敏的重要指标^[1]。过敏原组分诊断(component-resolved diagnosis, CRD)通过使用过敏原单个组分对患者 sIgE 抗体进行检测^[6],减少其他过敏原的交叉反应,评估特定食物过敏表型、严重程度和患病风险^[7],是重要的诊断方法。在天然过敏原中,某些单一过敏原含量低、提取难于标准化、批次间不稳定,通过纯化难以获得大量的高纯度过敏原^[7],因此,重组过敏原成为实现 CRD 的有效方法。

坚果过敏占食物诱发过敏反应致死人数的 18%~40%^[8],其中腰果占坚果过敏的 15%~34%^[9]。在我国一些地区,腰果可占食入性过敏原的 8.50%,也是引起支气管哮喘最重要的食入性过敏原(17.80%)^[10-11]。腰果过敏的发病年龄从 2 个月至 27 岁不等,平均发病年龄为 3 岁^[12]。腰果过敏首发症状多为皮肤与呼吸道的症状,或伴随胃肠道和心血管症状^[13]。已知腰果过敏组分有 3 种:7S 球蛋白 Ana o 1、11S 球蛋白 Ana o 2 和 2S 白蛋白 Ana o 3^[14]。其中,Ana o 2 为腰果主要贮藏蛋白,在以往研究中可与超过半数的腰果过敏阳性血清 sIgE 特异性结合^[12]。Ana o 2 作为 11S 球蛋白,是 cupin 超家族蛋白成员,天然为六聚体形式,与大豆、花生、杏仁的 11S 球蛋白具有同源性^[15]。本研究利用原核表达系统大量表达了重组 Ana o 2,纯度高、免疫活性强,为实现腰果组分诊断提供优质抗原。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

紫外分光光度计(美国 Thermo),PCR 仪、电泳装置均购自美国 Bio-Rad,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore),ELx-800 酶标仪(美国 Biotek),水平摇床,超声破碎仪,96 孔板。

原核表达载体 pET-28a(+),*E. coli* TOP 10 感受态细胞、*E. coli* Rosetta (DE3)感受态细胞、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高纯度质粒提取试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、*T*₄ DNA 连接酶均购自大连宝生物公司,蛋白分子量标准 Marker、BCA 试剂盒均购自美国 Thermo,羊抗人 IgE-HRP(美国 Sigma),HRP 底物 A 液(四甲基联苯胺)、B 液(过氧化氢)均购自北京索莱宝,HRP 化学发光底物(美国 GE),基因合成及测序由安徽通用生物系统有限公司完成。

1.1.2 血清标本

腰果过敏患者及阴性血清由天津市儿童医院提供。纳入标准:具有荨麻疹、皮炎、哮喘或胃肠道不适等典型的临床过敏症状^[1,13],血清总 IgE >

100 kU/L,腰果 sIgE > 0.35 kU_A/L。血清分装后于 -20 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET-28a(+)-Ana o 2 的构建

查询 GenBank,获得 Ana o 2 氨基酸序列 AAN76862,分别利用 DNASTar、SignalP5.0、TMHMM 生物信息学软件分析蛋白的二级结构和抗原性、信号肽、跨膜区,加入酶切位点 *EcoR* I (GAATTC) 和 *Xho* I (CTCGAG),委托公司合成基因序列。将获得的 Ana o 2 基因与 pET-28a(+)质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,回收产物后用 *T*₄ DNA 连接酶进行 4 °C 过夜连接,获得重组质粒 pET-28a(+)-Ana o 2。将重组质粒转化 *E. coli* TOP 10 感受态细胞并挑取单克隆进行酶切鉴定,阳性结果测序。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的重组质粒提取,转化 *E. coli* Rosetta (DE3)感受态细胞,涂布含卡那霉素和氯霉素抗性的 LB 平板 37 °C 过夜培养。挑取单个菌落接入含卡那霉素和氯霉素抗性的 LB 液体培养基,37 °C 220 r/min 扩大培养至吸光度 600 nm (OD₆₀₀) 为 0.4~0.6 时,取出部分菌液作为未诱导,剩余菌液中加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),37 °C 220 r/min 诱导 3 h。表达完成后将诱导和未诱导的菌液分别于 9 000 r/min 离心 5 min(离心半径 0.85 cm),收集后的菌体沉淀加入裂解液[0.1 mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS):5% Triton-X100:10 mmol/L 溶菌酶=7:2:1],冰上超声破碎。超声后分出诱导菌液于 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min(离心半径 0.95 cm),分别收集上清和沉淀。12%分离胶进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白表达情况,并将目的蛋白切胶送至上海生工进行质谱分析。

1.2.3 重组蛋白的复性及纯化

将以包涵体的形式存在的重组蛋白复性纯化,用包涵体洗涤液[含 Tris-HCl pH=8.5,1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),100 mmol/L NaCl,1% Triton X-100]重悬包涵体沉淀,超声洗涤,13 000 r/min 离心 10 min(离心半径 0.95 cm),收集沉淀。用包涵体溶解液(50 mmol/L Tris-HCl pH=8.5,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L β-巯基乙醇,2 mmol/L 脱氧胆酸钠,8 mol/L 尿素)将沉淀缓慢充分溶解,13 000 r/min 离心 10 min(离心半径 0.95 cm),收集上清于透析袋中。在含 4、3、2、1、0 mol/L 尿素的梯度复性液中 4 °C 透析 24~36 h,得到稳定可溶的重组蛋白。

1.2.4 重组蛋白的免疫活性评价

用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测腰果过敏血清 sIgE: 将重组蛋白用碳酸盐缓冲液(CBS)(0.05 mol/L, pH = 9.6)稀释到终浓度 1 μg/ml, 在96孔板中每孔加入 125 μl, 4 °C 包被过夜, 加入0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤3次, 拍干。每孔加入 250 μl 1%牛血清白蛋白(BSA), 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次, 拍干。每孔加入 100 μl 1:20 稀释的血清, 每份血清做复孔, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 拍干。每孔加入 100 μl 1:2 000 稀释的羊抗人 IgE-HRP, 37 °C 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次, 拍干。每孔加入 HRP 底物 A 液、B 液各 50 μl, 避光显色 10 min。每孔加入 50 μl 终止液终止显色, 用酶标仪检测 OD₄₅₀, 使用 GraphPad Prime 5 对检测结果进行非配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

用蛋白质免疫印记(Western blot)法评价重组蛋白反应性: 将重组蛋白用 70 V 恒压 1.5 h 转移到 PVDF 膜上; 加入 3% BSA 封闭, 室温慢摇 2 h; TBST 洗 3 次, 10 min/次; 将 9 例腰果过敏阳性血清及阴性对照分别 1:10 稀释至 1 ml, 室温慢摇孵育 2 h, 洗涤; 加入 1:10 000 稀释的羊抗人 IgE-HRP, 室温慢摇孵育 1 h, 洗涤; 最后加入 HRP 化学发光底物, 避光反应 3 min, 曝光拍照。

2 结果

2.1 表达载体 pET-28a(+)-Ana o 2 构建和鉴定

去除 1-14aa 信号肽, 将优化后的 Ana o 2 基因和表达载体 pET-28a(+) 分别进行 *EcoR* I-*Xho* I 双酶切, 酶切产物按照模式构建图(图 1)连接, 构建重组表达载体 pET-28a(+)-Ana o 2。将重组质粒 pET-28a(+)-Ana o 2(约 6.7 kb)经 *EcoR* I-*Xho* I 双酶切鉴定(图 2), 可见约 1.3 kb 处有一亮条带为 Ana o 2 优化基因, 5.3 kb 左右处亮条带为载体 pET-28a(+)酶切后片段。

2.2 重组 Ana o 2 诱导表达及质谱鉴定

2.2.1 重组 Ana o 2 诱导表达及纯化

重组 Ana o 2 分子量理论值为 54 kD, 由 SDS-PAGE 结果所示(图 3), 经 IPTG 诱导后的阳性菌, 比未诱导菌体蛋白在理论大小处明显多出一条带。与诱导后菌体蛋白的上清部分比较, 目的蛋白主要存在于沉淀中。

大量的重组蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中, 是由于异源蛋白在大肠埃希菌宿主中高效表达时, 没有形成正确折叠。为了得到有免疫活性的蛋白, 需要把包涵体形式的重组蛋白变复性处理, 使

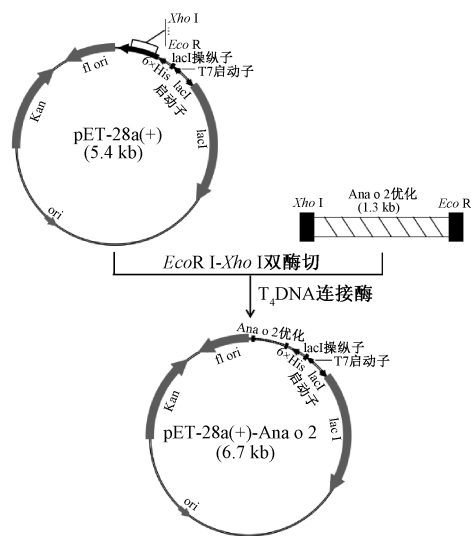
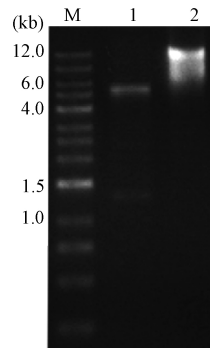
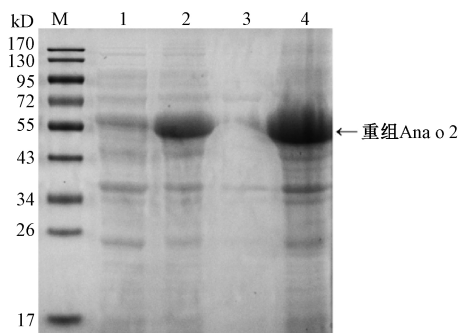


图 1 重组质粒 pET-28a(+)-Ana o 2 的构建
Figure 1 Construction of recombinant plasmid pET-28a(+)-Ana o 2



注: M: Marker; 1: pET-28a(+)-Ana o 2 经 *EcoR* I-*Xho* I 双酶切; 2: pET-28a(+)-Ana o 2

图 2 重组质粒 pET-28a(+)-Ana o 2 的 *EcoR* I-*Xho* I 双酶切鉴定
Figure 2 Identification of recombinant plasmid pET-28a(+)-Ana o 2 digested with *EcoR* I-*Xho* I

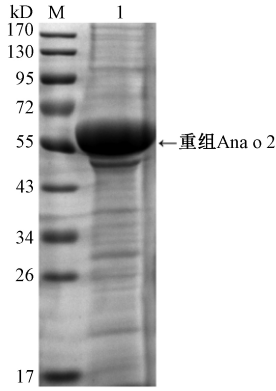


注: M: Marker; 1: 未诱导菌体蛋白; 2: 诱导后菌体蛋白; 3: 诱导菌体裂解后上清; 4: 诱导菌体裂解后沉淀

图 3 Ana o 2 重组蛋白的表达

Figure 3 Inducible expression of recombinant Ana o 2

其稳定可溶。由 SDS-PAGE 扫描所示(图 4), 复性后的重组蛋白纯度约为 90%, BCA 法检测重组蛋白浓度为 1.2 mg/ml。



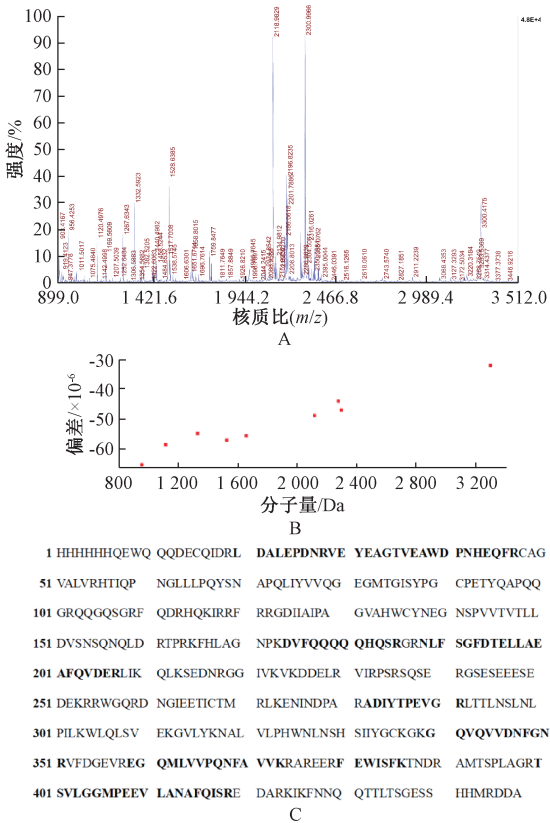
注: M: Marker; 1: Ana o 2 重组蛋白复性后蛋白

图 4 重组 Ana o 2 的复性纯化结果

Figure 4 Purification and renaturation of recombinant Ana o 2

2.2.2 重组蛋白质质谱分析结果

复性处理后的目的蛋白质谱结果如图 5 所示, 重组蛋白分子量为 51.4 kD, 等电点为 6.27。图 5A 为目的蛋白肽段及碎片类型离子串联质谱解析, 图 5B 为目的蛋白肽段及碎片离子质量数实测值与理论值误差范围分布, 图 5C 中加粗标记的序列为二级质谱与理论值匹配的序列, 共有 9 个肽段串联质



注: A: 重组 Ana o 2 肽指纹图谱; B: 重组 Ana o 2 的误差分布; C: 重组 Ana o 2 肽段分析

图 5 Ana o 2 重组蛋白的质谱鉴定

Figure 5 Identification of recombinant protein Ana o 2 by mass spectrometry

谱得到匹配, 质量数相符肽段序列覆盖率为 27%, 与目标蛋白 Ana o 2 比对结果为通过, 匹配分数 666 分。

2.3 重组 Ana o 2 免疫活性评价

2.3.1 重组 Ana o 2 的 ELISA 检测

通过 ELISA 法, 检测了 17 例腰果过敏阳性血清和 5 例阴性对照血清中 Ana o 2-sIgE 的含量。如图 6 所示, 腰果过敏血清与阴性对照血清 Ana o 2-sIgE 水平差异有统计学意义 ($t = 2.44, P < 0.05$)。截断值取阴性血清 OD₄₅₀ 平均值加 2 倍标准差, 得出 17 例腰果过敏血清中, 有 9 例 (52.9%) 可以与重组 Ana o 2 反应。

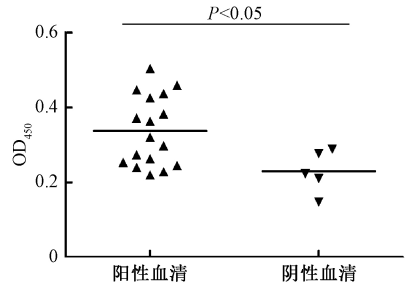
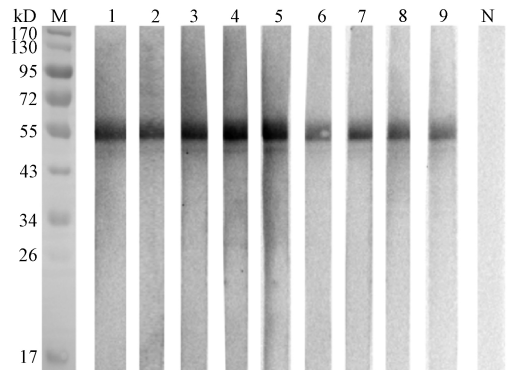


图 6 重组 Ana o 2 与血清 sIgE 反应性分析

Figure 6 sIgE reactivity of human serum against recombinant Ana o 2

2.3.2 重组 Ana o 2 的 Western blot 检测

将重组 Ana o 2 与 9 例 ELISA 筛选出的 Ana o 2 阳性反应血清和阴性对照进行 Western blot, 结果如图 7 所示, 重组 Ana o 2 与 9 例阳性血清均有不同强度的反应, 阴性对照未显示条带。结果表明, 重组 Ana o 2 可以与腰果过敏血清 sIgE 结合, 具有免疫活性。



注: M: Marker; 1~9: 腰果过敏阳性血清; N: 阴性对照 TBST

图 7 重组 Ana o 2 的 Western blot 结果

Figure 7 Western blot analysis of recombinant Ana o 2

3 讨论

腰果作为主要的食物过敏原, 会引发皮肤、胃肠道、呼吸道严重的食物过敏症状。腰果的主要过

敏原是 Ana o 1、Ana o 2 和 Ana o 3,都属于种子贮藏蛋白。Ana o 1 分子量为 50 kD,是 7S 豌豆球蛋白,耐热耐水解^[16]。Ana o 2 是 11S 球蛋白,占总贮藏蛋白的 50%,因此被称为腰果主要贮藏蛋白^[17]。天然 Ana o 2 约 55 kD,由 33 kD 的酸性大亚基、21 kD 的碱性小亚基组成,天然通常呈六聚体形式^[15]。Ana o 3 分子量为 12.6 kD,是 2S 白蛋白,可以抵抗机体的胃蛋白酶和胰蛋白酶的水解作用^[14]。在以往的研究中,这三种过敏原与腰果过敏阳性血清 sIgE 结合率分别为 50%、62%、81%^[12],因此 Ana o 2 作为腰果主要过敏原组分,在腰果 sIgE 检测中有重要意义。

本研究将 pET-28a(+)-Ana o 2 重组质粒转入 Rosetta(DE3)感受态细胞中进行表达,获得重组 Ana o 2。载体 pET-28a(+)带有 His 标签,便于纯化,同时 T7 启动子含 *lacI* 编码基因,提高稳定性,在 IPTG 诱导下可以大量表达。在本研究中,利用 Rosetta(DE3)感受态细胞增加了稀有密码子的表达,提高了表达效率,短时间内获得了大量高纯度的重组 Ana o 2。

CRD 利用纯化或重组的过敏原检测针对个体过敏原的 sIgE,可以进一步确定患者的过敏组分,区分不同的过敏症状,评估症状严重及耐受程度,成为 IgE 介导的食物过敏反应诊断及预后判断中的重要工具^[8]。有研究利用腰果过敏组分 Ana o 1、Ana o 2、Ana o 3 区分对腰果过敏和耐受的儿童,并评估过敏风险。三个过敏原结合性别、过敏史、sIgE 水平、皮肤点刺试验(SPT)的 c 指数(一致性指数)分别为 0.905、0.928、0.914^[16]。由于单一过敏组分在天然蛋白中含量不一,某些成分提取过程中容易降解,提取方法也难于标准化,批次间的性质不稳定,通过纯化方法很难获得大量高纯度的单一组分过敏原^[7],因此重组表达成为了获得大量高纯度的单一组分过敏原的重要途径,可为 CRD 提供重要检测原料。

在对重组 Ana o 2 的免疫活性评价中,Western blot 结果显示重组 Ana o 2 与腰果过敏阳性血清有比较明显的特异性结合,说明与患者血清中 sIgE 抗体有较好的结合能力。ELISA 结果显示有 52.9% 的腰果过敏阳性血清具有重组 Ana o 2-sIgE,与以往的研究结果^[12]相近。重组 Ana o 2-sIgE 在腰果过敏血清和阴性血清中的水平差异有统计学意义($t = 2.44, P < 0.05$),重组 Ana o 2 可以区分阳性和阴性血清,可作为已知抗原用于单组分-sIgE 抗体检测试剂制备。阴性血清本底 OD₄₅₀ > 0.200,与重组 Ana o 2 有一定非特异性结合。一方面,原核表达系

统缺少真核生物的蛋白合成后的修饰机制^[18],通过异源性表达获得的重组 Ana o 2 与天然 Ana o 2 构象有区别,免疫活性也有差异;另一方面,可以通过继续优化包被条件降低本底 OD 值。为了提高诊断效率,提高检测腰果过敏阳性血清的灵敏度和特异性,降低阴性血清的非特异反应,研究方向将继续对 Ana o 2 的抗原表位进行筛选优化。将筛选出的高反应肽段进行串联融合,进一步提高对腰果过敏阳性标本的检出率,减少交叉反应,从而获得高效的重组 Ana o 2 抗原,推进腰果过敏的单组分分子诊断研究。

参考文献

- [1] BOYCE J A, ASSA A A, BURKS A W, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126 (Suppl 6): S1-S58.
- [2] TANG M L, MULLINS R J. Food allergy: is prevalence increasing? [J]. Intern Med J, 2017, 47(3):256-261.
- [3] YAN H, JING C, LI H Q. Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999 [J]. Pediatr Int, 2010, 52(5):820-824.
- [4] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1):41-58.
- [5] MURARO A, WERFEL T, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy [J]. Allergy, 2014, 69(8):1008-1025.
- [6] TUANO K S, DAVIS C M. Utility of component-resolved diagnostics in food allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(6):32-39.
- [7] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, PFEIFER S, BUBLIN M. Applications of molecular diagnostic testing in food allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(9):56-63.
- [8] SMEEKENS J M, BAGLEY K, KULIS M. Tree nut allergies: allergen homology, cross-reactivity, and implications for therapy [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(7):762-772.
- [9] MCWILLIAM V, KOPLIN J, LODGE C, et al. The prevalence of tree nut allergy: a systematic review [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(9):54-66.
- [10] DI L L, WANG L X, MA X, et al. Allergic sensitization in patients with rhinitis and bronchial asthma in Ningxia region of China [J]. J Eval Clin Pract, 2019:1-4.
- [11] SUN X, ZHAO J, WANG Q, et al. Prevalence of allergen sensitization among 15 534 patients with suspected allergic diseases in Henan Province, China [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2019, 37(2):57-64.
- [12] VAN DER VALK J P, DUBOIS A E, GERTH VAN WIJK R, et al. Systematic review on cashew nut allergy [J]. Allergy, 2014, 69(6):692-698.
- [13] TUFAIL T, SAEED F, UI AIN H B, et al. Cashew nut allergy;

- immune health challenge[J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 86(2):209-216.
- [14] REITSMA M, BASTIAAN-NET S, SFORZA S, et al. Purification and characterization of *Anacardium occidentale* (cashew) allergens Ana o 1, Ana o 2, and Ana o 3[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(5):1191-1201.
- [15] XIA L X, WILLISON L N, PORTER L, et al. Mapping of a conformational epitope on the cashew allergen Ana o 2; a discontinuous large subunit epitope dependent upon homologous or heterologous small subunit association [J]. Mol Immunol, 2010, 47(9):1808-1816.
- [16] VAN DER VALK J P, GERTH VAN WIJK R, VERGOUWE Y, et al. sIgE Ana o 1, 2 and 3 accurately distinguish tolerant from allergic children sensitized to cashew nuts[J]. Clin Exp Allergy, 2017, 47(1):113-120.
- [17] SATHE S K, SZE-TAO K W C, WOLF W J, et al. Biochemical characterization and *in vitro* digestibility of the major globulin in cashew nut (*Anacardium occidentale*) [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(8):2854-2860.
- [18] GASSER B, SALOHEIMO M, RINAS U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview[J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7(1):11-28.

研究报告

成都市海产品中副溶血性弧菌耐药特征及多位点序列分型

尤祯丹^{1,2}, 蒋玉涵^{1,2}, 陈传君^{1,2}, 蒲春如^{1,2}, 蒋艳^{1,2}, 杜娟兰^{1,2}, 邓英³, 张白玉³, 严立恒³, 韩国全^{1,2}, 颜其贵³
(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学食品加工与安全研究所, 四川 雅安 625014; 3. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要:目的 了解成都市不同种类的海产品中副溶血性弧菌的污染程度、耐药情况、毒力基因分布、基因分型情况, 为成都市食源性副溶血性弧菌流行及其风险评估提供基础数据。方法 参照 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》, 从不同种类的海产品中分离副溶血性弧菌疑似菌株, 通过生化试验及 16S rDNA 测序进行准确鉴定; 采用纸片扩散法对分离株进行药敏试验, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 检测与其致病性相关的 2 个毒力基因, 对分离株进行多位点序列分型分析。结果 从采集的 380 份海产品中 104 份样品检出副溶血性弧菌, 总检出率为 27.4%。药敏试验表明, 97.1% (101/104) 的分离株具有耐药性, 其中对氨苄西林的耐药率最高 (95.2%, 99/104)。分离株 *trh* 基因携带率为 12.5% (13/104), *tdh* 基因携带率为 1.0% (1/104); 104 株分离株共分为 38 个 ST 型, 其中 ST1801、ST392、ST413 型分离率较高, 分离株未出现流行克隆群。结论 流通过程中不同种类海产品副溶血性弧菌污染率、耐药情况、毒力基因分布存在差异, 可能与养殖环境、运输条件等有关。

关键词: 副溶血性弧菌; 耐药性; 毒力基因; 多位点序列分型

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)01-0015-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.01.003

Antimicrobial resistance and multilocus sequence typing analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in Chengdu

YOU Zhendang^{1,2}, JIANG Yuhan^{1,2}, CHEN Chuanjun^{1,2}, PU Chunru^{1,2}, JIANG Yan^{1,2}, DU Juanlan^{1,2}, DENG Ying³, ZHANG Baiyu³, YAN Liheng³, HAN Guoquan^{1,2}, YAN Qigui³
(1. Sichuan Agricultural University Food College, Sichuan Ya'an 625014, China; 2. Institute of Food Processing and Safety of Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014, China; 3. Sichuan Agricultural University College of Veterinary Medicine, Sichuan Chengdu 611130, China)

Abstract: Objective To find out the contamination, antimicrobial resistance, virulence gene distribution and genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* in different kinds of marine products in Chengdu. Increase the basic data on the prevalence and risk assessment of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Chengdu. **Methods** According to GB 4789.7-

收稿日期: 2019-12-26

作者简介: 尤祯丹 女 硕士生 研究方向为水产品质量安全控制 E-mail: 9634246434@qq.com

通信作者: 韩国全 男 副教授 研究方向为微生物与食品安全及农产品加工与品质控制 E-mail: hans_980306@sicau.edu.cn