

论著

重组人乳铁蛋白致敏性的初步研究

刘珊^{1,2}, 陈惠芳³, 王小丹^{1,2}, 冯晓莲^{1,2}, 李晨汐^{1,2}, 徐海滨^{1,2}

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 3. 广州医学院第二附属医院/呼吸疾病国家重点实验室/广州市过敏反应与临床免疫重点实验室, 广东 广州 510260)

摘要:目的 初步评价牛乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白(rhLf)的致敏性。方法 通过生物信息学分析和消化稳定性试验了解 rhLf 致敏的可能性。结果 生物信息学分析显示 rhLf 与已知致敏原乳转铁蛋白和卵转铁蛋白有序列同源性, 与 Asp f 2、Ole e 10 和 Ole e 9 存在结构相似性。消化稳定性试验显示 rhLf 在胃液中易被消化成小片段, 在肠液中不易被消化。结论 rhLf 具有一定的潜在致敏可能性。

关键词:重组蛋白; 人乳铁蛋白; 转基因食品; 致敏性; 食品安全

中图分类号: TS201.6; Q513.2; Q811.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0107-06

Preliminary assessment of recombinant human lactoferrin for allergenic potential

Liu Shan, Chen Huifang, Wang Xiaodan, Feng Xiaolian, Li Chenxi, Xu Haibin
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To evaluate the allergenic potential of recombinant human lactoferrin (rhLf) expressed by genetically modified cow in milk. **Methods** Bioinformatics searches and digestibility assay were conducted to investigate the allergenic potential of rhLf. **Results** Bioinformatics searches showed that there was high-level similarity between rhLf and some known allergens, such as lactotransferrin and ovotransferrin in amino acid sequence, and Asp f 2, Ole e 10 and Ole e 9 in structure. Digestibility assay showed that rhLf broke down into small fragment rapidly during gastric fluid digestion, while it was resistant to intestinal fluid digestion. **Conclusion** RhLf has allergenic potential.

Key words: Recombinant protein; human lactoferrin; transgenic food; allergenicity; food safety

随着转基因生物研究、开发及商业化进程的快速发展,人们对其可能存在的安全性问题更加关注,致敏是蛋白质的毒性表现之一,也是目前评价转基因生物表达的外源蛋白安全性的一个主要方面。尽管目前评价致敏性的方法很多,但由于致敏性在生物体内的表现差异很大,许多方法的灵敏度和特异性尚有所欠缺,本研究选用了国际同行比较认可的生物信息学和体外消化稳定性两种方法^[1-2]。

乳铁蛋白是一类广泛存在于哺乳动物体液中的天然糖蛋白,大约由 690 个氨基酸组成,分子量为 80 kDa 左右,具有参与铁代谢、抑菌、抗炎、调节免

疫功能、抗氧化等多方面的作用^[3],在我国可以作为食品营养强化剂使用,也可在婴幼儿配方食品中添加^[4-5]。本次研究对象重组人乳铁蛋白是由转人乳铁蛋白基因的牛在乳汁中分泌的,本研究试图通过生物信息学方法比较重组蛋白与已知致敏蛋白的氨基酸序列及结构是否具有同源性;将转基因生物反应器生产的重组蛋白分别在模拟胃肠消化体系和猪消化液中进行消化,根据该蛋白被消化的时间和消化产物,判断其在胃肠消化过程中的稳定性。综合两方面的结果初步分析重组人乳铁蛋白的致敏性,为其安全性评价提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

蛋白质;模拟胃肠液消化的阴性对照蛋白为酪蛋白(α -casein),阳性对照蛋白为胰蛋白酶抑制剂(STI)。样品蛋白包括人乳铁蛋白(hLf)和重组人乳铁蛋白(rhLf),rhLf 来源于北京济普霖生物技术有限公司培育的转人乳铁蛋白基因牛产的牛奶,由

收稿日期:2012-12-09

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08011-005)

作者简介:刘珊 女 副研究员 研究方向为食品安全与毒理
E-mail: liushan78@hotmail.com

通信作者:徐海滨 男 研究员 研究方向为食品安全与毒理
E-mail: hbxu1231602@vip.sina.com

中国科学院过程工程研究所通过膜纯化工艺分离纯化,经冻干工艺制成。由于纯化工艺中除盐不彻底,冻干粉中含有11%的氯化钠,其余均为蛋白质,其中重组人乳铁蛋白的纯度为95%以上。将阴性、阳性对照蛋白及样品蛋白配置成相应浓度的溶液,模拟胃液消化蛋白溶液(5 g/L),模拟肠液消化蛋白溶液(2 g/L)。

模拟胃消化液(SGF)和肠消化液(SIF):试验前检测模拟胃液中胃蛋白酶活力为3 200 U/ml。

猪生理胃液(GF)和肠液(IF):通过胃瘘和肠瘘收集的猪空腹胃液和肠液。由于一次收集的胃液有限,实验用胃液为多次收集所得,试验前检测猪空腹胃液胃蛋白酶活力为1 744 ~ 2 360 U/ml不等。

1.1.2 仪器与试剂

NuPAGE® 4%~12% Bis-tris 预制梯度胶(1.0 mm,15孔);PVDF膜(Bio-Rad);感光胶片(Kodak);电泳仪及凝胶成像系统(Bio-Rad)等。

一抗为兔抗人乳铁蛋白抗体(Sigma),使用时稀释100倍;二抗为过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,使用时稀释160 000倍;上样缓冲液;蛋白质 marker (Invitrogen);ECL显色试剂盒(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析^[1,6-7]

选择3个致敏蛋白数据库:在线致敏原数据库(The Allergen Online Database)^[7];食品安全致敏原数据库(Allergen Database for Food Safety)^[8];致敏蛋白结构数据库(Structural Database of Allergenic Proteins)^[7]。将重组蛋白的氨基酸序列与数据库中

的已知致敏原进行序列或结构同源性比对,比对方式包括全长比对、80个氨基酸片段序列相似性比对、连续8个氨基酸相同的精确比对以及结构相似性比对。

1.2.2 体外消化稳定性分析^[9]

参照农业部行业标准,用模拟消化液或生理消化液37℃消化对照蛋白(阴性对照蛋白酪蛋白,阳性对照蛋白胰蛋白酶抑制剂)及重组蛋白,时间分别为0 s、15 s、30 s、1 min、2 min、5 min、10 min、20 min、30 min、60 min,同时设37℃水浴孵育0 s和60 min的胃、胰蛋白酶以及模拟胃肠缓冲液中目的蛋白。将终止消化的样品溶液用4%~12% Bis-tris 预制梯度胶(1.0 mm,15孔)分离,上样量为10 μl(约含蛋白质0.5 μg)。电泳分离后进行Western blot,用化学发光法显色并用感光胶片压片。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 序列同源性比对

将rhLf的氨基酸序列(不包括前导序列)与3个致敏原数据库进行比对。通过全长比对(Full Fasta)获得E值,E值<3.9E-07时,认为rhLf与已知致敏原具有较高的序列同源性。通过80个氨基酸片段序列相似性比对获得序列一致性,若其>35%,则认为rhLf与已知致敏原具有较高的序列同源性。通过连续8个氨基酸相同的精确比对获得匹配记录,若rhLf与已知致敏原具有8个完全匹配的连续氨基酸,则认为两者具有较高的序列同源性。结果见表1~3。

表1 在线致敏原数据库比对结果

Table 1 Search results against the Allergen Online Database

| 过敏原 | 物种 | 编号 | 序列长度 | 序列一致性 | E值 | 匹配记录 |
|----------------------------------|----|------------------------|------|--------|----------|------|
| 乳转铁蛋白前体 | 牛 | NP_851341; GI:30794292 | 708 | 82.50% | 0.0 | 58 |
| 卵转铁蛋白;伴清蛋白;血清转铁蛋白;致敏原Gal d 3(前体) | 鸡 | P02789; GI:1351295 | 705 | 66.26% | 2E-154 | 11 |
| 卵转铁蛋白 | 鸡 | CAA26040; GI:757851 | 705 | 65.40% | 6.8E-154 | 8 |

表2 致敏蛋白结构数据库比对结果

Table 2 Search results against the Structural Database of Allergenic Proteins

| 过敏原 | 物种 | 编号 | 序列长度 | 序列一致性 | E值 | 匹配记录 |
|-------------------------------|----|--------------------|------|--------|----------|------|
| 致敏原Gal d 3(卵转铁蛋白;伴清蛋白;血清转铁蛋白) | 鸡 | P02789/GI:1351295 | 705 | 51.73% | 2.6E-149 | 11 |
| 致敏原Gal d 3(卵转铁蛋白) | 鸡 | CAA26040/GI:757851 | 705 | 51.45% | 8.5E-149 | 8 |

表3 食品安全致敏原数据库比对结果

Table 3 Search results against the Allergen Database for Food Safety

| 过敏原 | 编号 | 序列长度 | 序列一致性 | E值 | 匹配记录 |
|---------------------------------|--------------------------------|------|-------|----------|------|
| 乳转铁蛋白;乳铁蛋白(前体) | P24627; GI:30794292 | 689 | 68.5% | 0.0 | 18 |
| 卵转铁蛋白;伴清蛋白;血清转铁蛋;致敏原Gal d 3(前体) | P02789; GI:1351295/ GI:757851; | 693 | 51.7% | 1.6E-178 | 4 |

2.1.2 三维结构同源性比对

与食品安全致敏原数据库进行 Motif-based 三维结构比对获得 E 值, E 值 < 0.01 时, 认为 rhLf 与已知致敏原具有较高的结构同源性。结果显示 rhLf 与 Motif ADFS_0056 具有相似的三维结构 (E 值 = 1.4E-014)。

含有 Motif ADFS_0056 的致敏原有 5 种, 见表 4。

2.1.3 同源性比对结果汇总

综合对上述 3 个致敏蛋白数据库的搜索结果, 与 rhLf 具有较高的序列或结构同源性的致敏原主要有 5 种, 见表 5。

表 4 含有 Motif ADFS_0056 的致敏原
Table 4 Allergens containing Motif ADFS_0056

| 过敏原 | 过敏原通用名称 | 物种 | 编号 |
|----------|---------------|-----|--|
| Asp f 2 | 致敏原 Asp f 2 | 烟曲霉 | P79017/GI:83300352; GI:664852; GI:66849502 |
| Bos d 2 | 乳转铁蛋白 | 牛 | P24627/GI:30794292 |
| Gal d 3 | 卵转铁蛋白 | 鸡 | P02789/GI:1351295; GI:757851 |
| Ole e 10 | 致敏原 Ole e 10 | 油橄榄 | Q84V39/GI:29465664 |
| Ole e 9 | β-1,3-葡聚糖酶样蛋白 | 油橄榄 | Q94C86/GI:14279169 |

表 5 3 个致敏原数据库比对结果汇总

Table 5 Summary results against three Allergen Databases

| 过敏原 | 在线致敏原数据库 | | | 食品安全致敏原数据库 | | | 致敏蛋白结构数据库 | | |
|----------------|----------|---------|-----------|------------|-----------|------|-----------|---------|-----------|
| | 全长 | 80 个氨基酸 | 连续 8 个氨基酸 | 80 个氨基酸 | 连续 8 个氨基酸 | 三维结构 | 全长 | 80 个氨基酸 | 连续 8 个氨基酸 |
| Bos d 2 (牛) | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| Gal d 3 (鸡) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Asp f 2 (烟曲霉) | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Ole e 10 (油橄榄) | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Ole e 9 (油橄榄) | - | - | - | - | - | + | - | - | - |

2.2 消化稳定性

本研究所用凝胶均为 15 孔, 从左往右依次为: 泳道 1, Marker; 泳道 2, 0 s 热稳定性样品; 泳道 3, 60 min 热稳定性样品; 泳道 4 ~ 13, 0 s、15 s、30 s、1 min、2 min、5 min、10 min、20 min、30 min、60 min 模拟消化样品; 泳道 14, 消化酶 0 s 热稳定性样品; 泳道 15, 消化酶 60 min 热稳定性样品。其中 Marker 分子量从上往下依次为: 260、160、110、80、60、50、40、30、20、15、10、3.5 kDa。在模拟胃液、生理胃液、模拟肠液、生理肠液中阴性对照蛋白酪蛋白很快被消化, 阳性对照蛋白胰蛋白酶抑制剂 60 min 仍稳定存在, 说明消化体系有效。

模拟胃液中天然人乳铁蛋白和重组人乳铁蛋白消化图谱相似, 均在 2 min 内被消化, 但出现一条 3 kDa 左右的条带, 这个小片段在 60 min 内未全部消化 (图 1、2)。

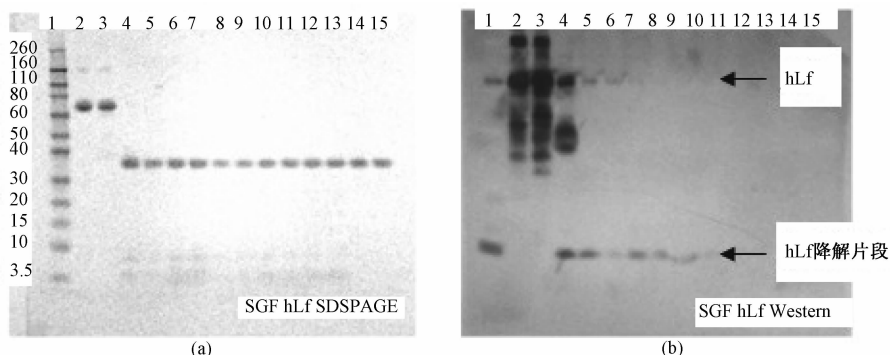
2.2.2 生理胃液的消化结果

hLf 和 rhLf 在体内胃液中消化程度低于模拟胃液, 消化后产生了一个 30 ~ 40 kDa 的大片段, 在消化过程中可继续被降解 (图 3、4)。

2.2.3 模拟肠液的消化结果

在模拟肠液中, 天然和重组人乳铁蛋白 60 min 内均没有完全消化, 且出现 60 kDa 左右的条带见 (图 5、6)。

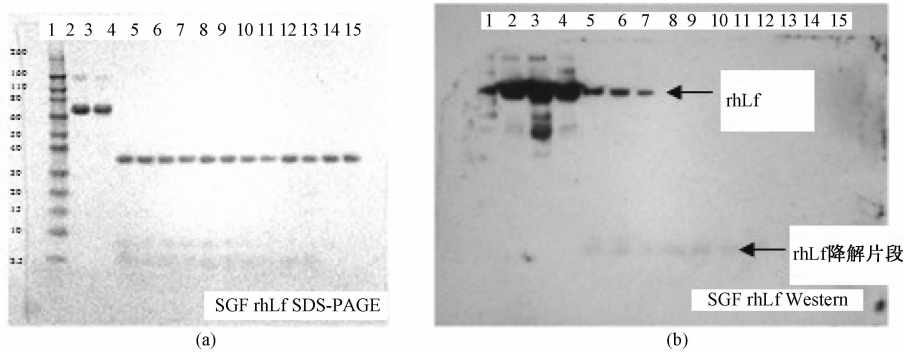
2.2.1 模拟胃液的消化结果



a: 考马斯亮蓝染色后的电泳图; b: 蛋白印迹杂交图

图 1 人乳铁蛋白在模拟胃液中的消化结果

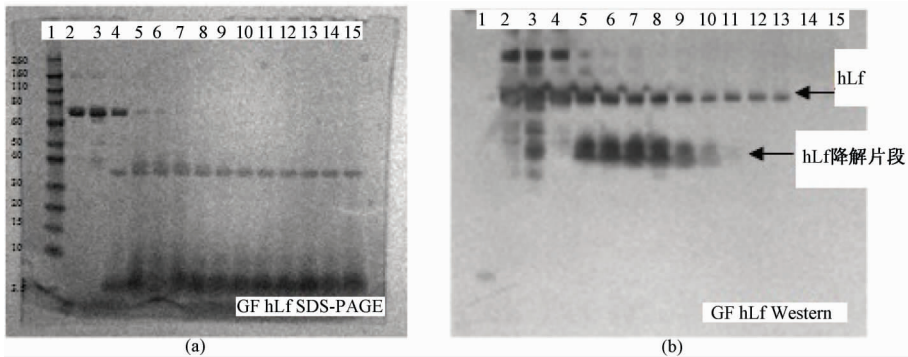
Figure 1 Digestion pattern of human lactoferrin in SGF test



a: 考马斯亮蓝染色后的电泳图; b: 蛋白印迹杂交图

图2 重组人乳铁蛋白在模拟胃液中的消化结果

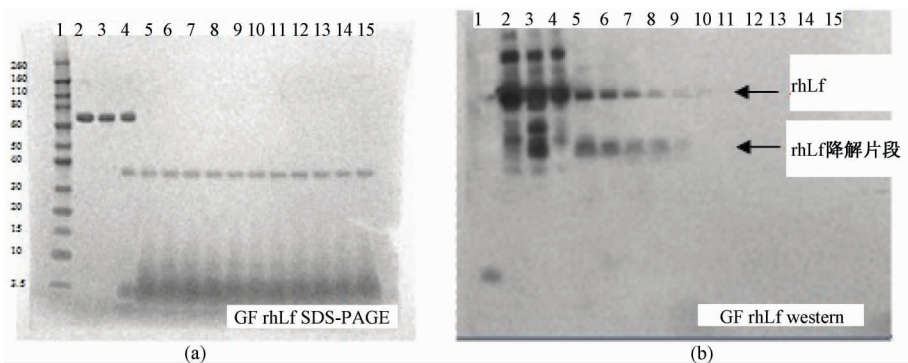
Figure 2 Digestion pattern of recombinant human lactoferrin in SGF test



a: 考马斯亮蓝染色后的电泳图; b: 蛋白印迹杂交图

图3 人乳铁蛋白在生理胃液中的消化结果

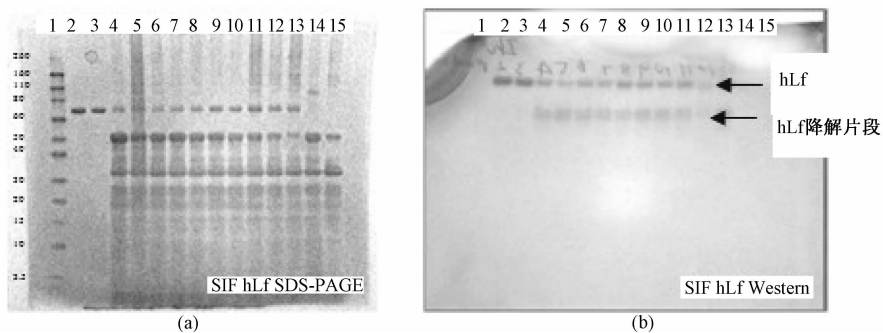
Figure 3 Digestion pattern of human lactoferrin in GF test



a: 考马斯亮蓝染色后的电泳图; b: 蛋白印迹杂交图

图4 重组人乳铁蛋白在生理胃液中的消化结果

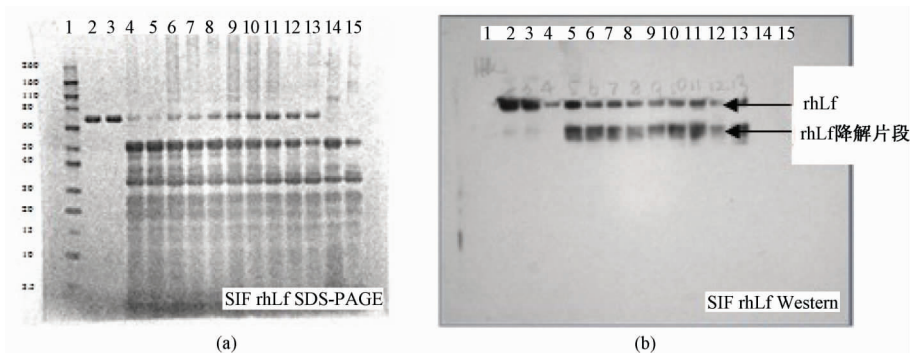
Figure 4 Digestion pattern of recombinant human lactoferrin in GF test



a: 考马斯亮蓝染色后的电泳图; b: 蛋白印迹杂交图

图5 人乳铁蛋白在模拟肠液中的消化结果

Figure 5 Digestion pattern of human lactoferrin in SIF test



a:考马斯亮蓝染色后的电泳图;b:蛋白印迹杂交图

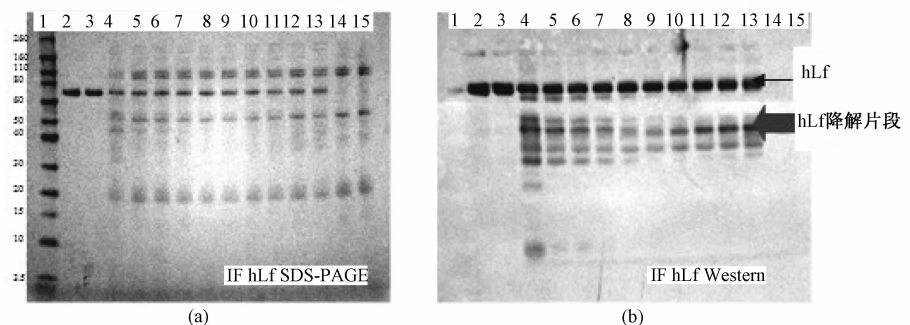
图6 重组人乳铁蛋白在模拟肠液中的消化结果

Figure 6 Digestion pattern of recombinant human lactoferrin in SIF test

2.2.4 生理肠液的消化结果

天然和重组人乳铁蛋白在生理肠液中 60 min

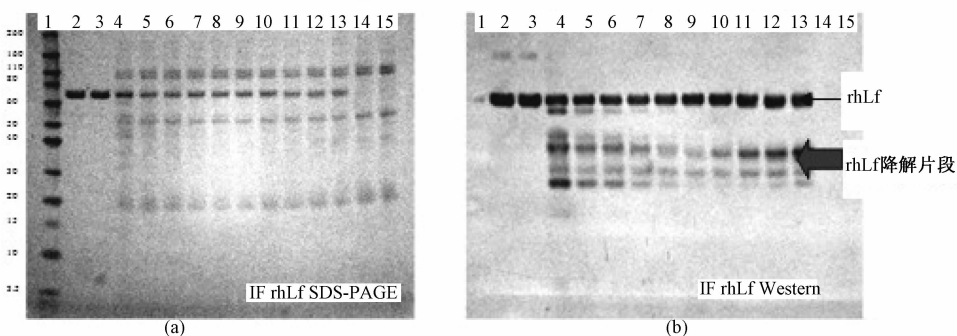
内仍未被消化,降解产生多个片段(见图7、8)。



a:考马斯亮蓝染色后的电泳图;b:蛋白印迹杂交图

图7 人乳铁蛋白在生理肠液中的消化结果

Figure 7 Digestion pattern of human lactoferrin in IF test



a:考马斯亮蓝染色后的电泳图;b:蛋白印迹杂交图

图8 重组人乳铁蛋白在生理肠液中的消化结果

Figure 8 Digestion pattern of recombinant human lactoferrin in IF test

3 讨论

食物过敏是一种常见的临床现象,轻者出现皮肤或肠道的刺激症状,重者可发生过敏性休克甚至死亡。由于诊断方法不同,各国研究报道的人群食物过敏率差异很大,一般儿童的发生率高于成人,有报道称儿童食物过敏率约为8%,成人约为2%^[10]。引起食物过敏的致敏原大都来源于食物中的蛋白质,而与过敏反应相关的仅为其部分抗原决定簇,目前已经报道的能引起过敏的氨基酸序列有近2000条,每年还有新的序列被发现^[11]。

本研究中采用了全长比对、80个氨基酸片段序列相似性比对、连续8个氨基酸相同的精确比对以及结构相似性比对4种比对方式。2001年FAO/WHO的导则中只将全长比对应用于少于80个氨基酸的序列,这是由于将全长比对应用于80个以上氨基酸序列的相似性分析时结果该如何判定尚未明确。近年有研究者提出若以E值<3.9E-07作为判断阈值,其效率与80个氨基酸片段序列相似性比对应序列一致性>35%的效率相同^[6]。在本研究中全长比对的E值远远低于3.9E-07,与80个氨基酸

片段序列相似性比对的结果一致。本研究中生物信息学分析结果提示 rhLf 与已知致敏原牛乳转铁蛋白、鸡卵转铁蛋白存在序列和结构相似性,提示具有潜在致敏的可能性。后两种转铁蛋白存在于常见致敏食物牛奶和鸡蛋中。乳铁蛋白属转铁蛋白家族,进化比较保守,研究表明不同来源的乳铁蛋白具有相当高的氨基酸序列同源性^[12],因此本研究中重组人乳铁蛋白显示出与牛、鸡的转铁蛋白的结构同源性这一结果并不意外。此外,近期有文献报道^[13],目前比较常用的基于序列一致性的过敏原生物信息学分析存在一定局限性、灵敏度和/或特异度不高,即可能对一段序列的过敏性做出假阳性或假阴性的误判。

为进一步了解重组蛋白的致敏可能性,本研究还进行了消化试验,结果表明:天然人乳铁蛋白和重组人乳铁蛋白的消化谱相似,即易被胃蛋白酶消化,不易被胰蛋白酶消化。本实验中乳铁蛋白在模拟胃液和生理胃液中的消化结果差别比较大,模拟胃液中目标蛋白 5 min 内全部降解、只留下 3 kDa 左右的片段,而生理胃液中乳铁蛋白消化不完全、天然蛋白和重组蛋白均出现 30~40 kDa 的大片段,甚至天然乳铁蛋白 60 min 未被完全消化,推测与胃蛋白酶活力差异有关。模拟胃液在试验前用胃蛋白酶新鲜配制,经检测胃蛋白酶活力为 3 200 U/ml;生理胃液是通过瘘管收集的猪胃液,每次从每头猪采集的胃液分别冻存储存,由于每次收集的胃液量有限,不能保证用同一份胃液消化天然和重组蛋白,试验前测得生理胃液胃蛋白酶活力为 1 744~2 360 U/ml 不等。无论是模拟肠液还是生理肠液对乳铁蛋白的消化能力都很弱,至 60 min 未完全消化。本研究中胃液消化试验显示天然及重组人乳铁蛋白消化后均有 3 kDa 左右的片段稳定存在,与文献报的乳铁蛋白肽的分子量一致。乳铁蛋白肽除不能结合铁离子外,具有乳铁蛋白的所有生物学活性,如抗菌、抗病毒、参与免疫反应等,而且其杀菌活性比乳铁蛋白高,由于分子量很小,一般认为不具有抗原性^[14-15]。由于蛋白质经口摄入后先经胃液消化后方进入肠道,根据不抵抗胃液抵抗肠液消化的结果判断该蛋白致敏可能性不大。

过敏患者血清筛选试验在致敏性评价过程中具有十分重要的意义,尤其对于生物信息学分析结果中有阳性发现的蛋白质。本研究的目标蛋白是人来源的重组蛋白,如果能以对母乳过敏的患者血

清对目标蛋白进行筛选是最有说服力的,但是临床上即使是母乳喂养的婴幼儿过敏患者要确诊是母乳过敏也很困难、收集这种目标血清可操作性更低。因此,本研究中未能进行血清学筛选试验。但在下一步的研究中将选择 IgE 水平较高的过敏患者血清进行非特异血清筛选试验,为重组蛋白的致敏性评价提供更充足的依据。综合上述两方面试验结果,转基因牛表达的重组人乳铁蛋白具有一定的潜在致敏可能性。

参考文献

- [1] Food and Agriculture Organization, World Health Organization. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods [R]. Rome, Italy: FAO/WHO, January 2001.
- [2] Goodman R E, Tetteh A O. Suggested improvements for the allergenicity assessment of genetically modified plants used in foods [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011, 11: 317-324.
- [3] 陈车生, 袁勤生. 乳铁蛋白的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2008, 10(1): 62-66.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 14880—2012 食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [5] 刘青, 庞世琦, 潘丙珍, 等. 市售进口婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白含量的检测 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(5): 460-463.
- [6] Andre S, Gary B, Scott M. The use of E-scores to determine the quality of protein alignments [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 54: S26-S31.
- [7] 赵杰宏, 韩洁, 赵德刚. 转基因作物标记蛋白潜在致敏性的生物信息学预测 [J]. *中国烟草学报*, 2010, 16(3): 76-79.
- [8] Allergen database for food safety [DB/OL]. Japan: NIHS-DNFI, (2013-02-19) [2013-03-05]. <http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>.
- [9] 中华人民共和国农业部. 农业部 869 号公告—2—2007 转基因生物及其产品食用安全检测模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] 甄宇江. 食物致敏原与食品安全 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 224-235.
- [11] Bruce G H. Food safety of proteins in agricultural biotechnology [M]. CRC Taylor & Francis, 2007: 209-222.
- [12] 陈力俊, 姜铁民. 乳铁蛋白生物学功能及基因表达 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 7-12.
- [13] Lida Z, Yuyi H, Zehong Z, et al. SORTALLER: predicting allergens using substantially optimized algorithm on allergen family featured peptides [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(16): 2178-2179.
- [14] 冯兴华, 王建华, 仰雅麟. 乳铁蛋白肽 (Lactoferricin) 作用机制研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(1): 23-26.
- [15] 彭涛, 吕自力, 王安江, 等. 乳铁蛋白肽的研究进展 [J]. *草食家畜*, 2008, (3): 6-10.