

结构,引起出血,进一步的研究表明^[1-3]该毒素直接作用在兔肠道血管壁的内皮细胞,但对小鼠、大鼠和豚鼠则不显示毒性作用。

本研究初步结果显示,分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品中的生孢梭菌,其代谢产物显示出对 ICR 小鼠致死的毒性作用,死亡时间多在 10 min 内,平均 5~7 min。且含毒素的培养液加热处理后仍保留毒性,且 A-F 多价抗肉毒毒素诊断血清对小鼠的死亡无保护作用,说明分离自浓缩乳清蛋白粉及其制品的生孢梭菌其代谢产物含有不同于肉毒毒素的有毒代谢产物。腹腔注射后中毒死亡的小鼠经解剖肉眼见小鼠内脏颜色暗紫,培养液与小鼠血液作用 10 min 后,显微镜下可见红细胞皱缩、破裂、细胞碎片及红细胞凝集等现象。

本文对初步探讨了生孢梭菌毒性代谢产物对 ICR 小鼠的毒性作用,尚需进一步深入研究生孢梭菌是否对人,尤其是对婴幼儿的健康危害作用,需要开展我国乳制品食品中,尤其是婴幼儿配方食品中包括生孢梭菌在内的 SRC 监测,以便更好地开展生孢梭菌风险评估工作。

参考文献

[1] Hara-Kudo Y, Yamakawa Y, Kumagai S. Purification and some

properties of *Clostridium sporogenes* hemorrhagic toxin [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 1996, 227(2):413-418.

[2] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop [J]. *Microb Pathog*, 1997, 22(1):31-38.

[3] Hara-Kudo Y, Ogura A, Noguchi Y, et al. Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* in various animals and cultured cells [J]. *J Med Microbiol*, 1997, 46(4):270-275.

[4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 12—2003 食品卫生微生物检验方法肉毒梭菌及肉毒毒素检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.

[5] FDA. Bacteriological analytical manual: Chapter 17 *Clostridium botulinum* [S]. 2010.

[6] 熊海元, 崔强. 生孢梭菌孢子作为生物指示剂的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(7):354-356.

[7] Usefulness of testing for *Clostridium botulinum* in powdered infant formula and dairy-based ingredients for infant formula [S]. International Commission on Microbiological Specifications for foods, International Union of Microbiological Society, 2013-08-27.

[8] Appendix 1, Microbiological criteria relative to some food products [Z]. Official Journal of the Republic of Algeria, 1998(35).

[9] 婴儿配方奶粉和婴儿配方用乳制品成分中肉毒梭菌检测的有用性[R]. 国际微生物学会联合会报告, 2013.

[10] Barash J R, Hsia J K, Arnon S S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas [J]. *J Pediatr*, 2010, 156(3):402-408.

论著

3 种不同方法提取芒果致敏原组分分析

侯丽英¹, 张盈莹¹, 朱黎娜¹, 谷冬梅², 林书祥³, 李会强¹

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 3. 天津市儿童医院, 天津 300204)

摘要:目的 评价 3 种芒果致敏原提取方法, 分析与血清特异性 IgE 结合的芒果蛋白成分, 为临床检测 sIgE 提供最佳抗原制备方法。方法 分别用三氯乙酸沉淀法、三氯乙酸/丙酮沉淀法、裂解液提取法粗提芒果蛋白, 并通过 SDS-PAGE 和二维电泳技术分析不同提取方法提取的芒果蛋白组分, 用免疫印迹和二维免疫印迹的方法鉴定粗提液中与患者特异性 IgE 结合的蛋白成分。结果 3 种方法提取的蛋白组分不同, 单例病人血清与 3 种不同方法提取的蛋白结合的强度和所识别的蛋白组分存在一定差异, 三氯乙酸沉淀法和三氯乙酸/丙酮法提取的蛋白反应条带主要是 30、40、44、47 和 90 kD, 而裂解液提取的蛋白反应条带主要是 23、32、40、46、73、90 kD。结论 3 种提取方法各有特点, 三氯乙酸沉淀法提取的芒果蛋白粗提液致敏原组分较完整, 重复性好, 操作简便, 能够满足检测芒果 sIgE 所需已知抗原的要求。

关键词:食物; 致敏; 芒果; 特异性 IgE; 致敏原制备; 免疫印迹

中图分类号: R155; S667. 7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0417-05

DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2014. 05. 003

收稿日期: 2014-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371882)

作者简介: 侯丽英 女 硕士生 研究方向为食物过敏原鉴别与应用研究 E-mail: wfhly19901108@163.com

通讯作者: 李会强 男 教授 研究方向为标记免疫分析方法学研究及致敏性疾病的实验室诊断 E-mail: lihuiqiang1965@163.com

Mango allergen components analysis by three different extracting methods

HOU Li-ying, ZHANG Ying-ying, ZHU Li-na, GU Dong-mei, LIN Shu-xiang, LI Hui-qiang

(College of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract: Objective To evaluate three extracting methods for mango proteins and analyze the protein components which could bind with serum specific IgE (sIgE) of allergy patients. To provide an optimal antigen extraction protocol for clinical detection of allergen specific IgE. **Methods** Proteins were extracted from mango using trichloroacetic acid precipitation method, trichloroacetic acid/acetone precipitation method and lysate extraction method, respectively. The total protein components were analyzed by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis. Immunoblot technique and two-dimensional immunoblot technique were used to identify protein components which could combine with specific IgE. **Results** Protein components extracted by three methods were different. The single patient serum showed different affinity and binding sites in the immunoblot assay. Protein components from trichloroacetic acid precipitation method and trichloroacetic acid/acetone precipitation method reacted with patient serum mainly at 30, 40, 44, 47 and 90 kD, while that from lysate extraction method reacted with patient serum at mainly 23, 32, 40, 46, 73 and 90 kD. **Conclusion** Three kinds of extraction methods had different characteristics, and trichloroacetic acid precipitation method was more complete, reproducible, easy to operate and could meet the requirements of mango sIgE detection.

Key words: Food; allergy; mango; specific IgE; allergen preparation; western blot

食物致敏是指机体免疫系统对摄入的食物产生的不良反应^[1]。近年来,食物致敏已成为人们日益关注的食品安全和公共卫生问题,据统计,约2%~10%的人受到食物致敏的干扰^[2]。芒果(*Mangifera indica*)是备受人们喜爱的热带水果之一,属于漆树科(*Anacardiaceae*),杧果属(*Mangifera*),芒果含有大量的蛋白质,因此具有很大的致敏潜能^[3]。据报道,对食物过敏的儿童中芒果致敏的发生率为0.23%^[4],芒果致敏可引起接触性皮炎、血管性水肿、哮喘和腹痛等症状,严重者可引起全身致敏甚至休克。临床上诊断食物致敏主要依靠过敏病史、皮内点刺试验(SPT)和血清特异性IgE(specific IgE, sIgE)检测等^[5]。目前国内外学者用丙酮沉淀法、酚抽法及乙醇提取法等方法发现芒果中含有多种致敏原组分,其中已经命名的是40 kD的致敏原Mani 1和30 kD的致敏原Mani 2^[6]。由于食物蛋白比较复杂,不同提取方法得到的致敏原组分不同,因此,提取致敏原组分的完整性是制备标准化致敏原的前提条件。本研究将用3种不同方法提取芒果果肉中的致敏原,用芒果致敏患者血清中的sIgE作为“探针”,采用免疫印迹的方法,探究不同提取方法提取的致敏原组分差异,分析致敏原提取的完整性,以期找出检测芒果致敏的最佳提取方法,从而为建立最佳芒果致敏原提取工艺和提高临床检测特异性IgE检测的准确性提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品及血清来源

新鲜芒果购自天津三义庄菜市场,芒果致敏患者血清来自天津医科大学总医院。

芒果致敏阳性病例3例(均为男性,年龄35~40岁),临床诊断依据包括:典型临床过敏史,血清总IgE>100 kU/L,芒果sIgE>0.35 kU/L等。阴性对照血清1例,选自无任何过敏史的健康体检人群。

1.1.2 主要仪器与试剂

垂直板型电泳仪、二维电泳系统、凝胶成像系统和半干转仪均购自美国BIO-RAD。

硫脲、碘乙酰胺、载体两性电解质IPG-buffer、pH=3~10的干胶条均购自美国GE,丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵(AP)、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、尿素、二硫苏糖醇(DTT)、Trise-base、矿物油均购自美国Sigma,蛋白分子量标准(编号:26616,美国Thermo),羊抗人IgE-Ap(美国Sigma),甲醇、冰乙酸、甘油、三氯乙酸(TCA)等其他试剂均为国产分析纯,溶液配制用水均为Milli-Q超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 制备芒果蛋白粗提液

A:三氯乙酸沉淀法(TCA法)。参考文献[6]的方法改进,取10 ml研磨充分的芒果匀浆,加入4倍体积-20℃预冷的含50%TCA的水溶液,上下颠倒混匀,于4℃沉淀过夜,其间震荡几次;4℃9 000 r/min离心30 min。弃上清,将沉淀悬浮于-20℃预冷的含0.07%β-巯基乙醇的丙酮溶液中,涡旋,离心20 min,弃上清。悬浮、沉淀共重复3次。最后将沉淀在室温下干燥,得到粗提蛋白。将沉淀研磨成粉末,加入适量裂解液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT,40 mmol/L Tris),震荡混匀,

4 ℃溶解过夜,4 ℃ 9 000 r/min离心 30 min,收集上清,分装,-80 ℃保存,备用。

B:三氯乙酸/丙酮沉淀法(TCA/丙酮法)。取 10 ml 研磨充分的芒果匀浆,加入 4 倍体积 -20 ℃ 预冷的含 10% TCA、0.07% β -巯基乙醇的丙酮溶液中,上下颠倒混匀,于 -20 ℃ 沉淀过夜,其间震荡几次;4 ℃ 9 000 r/min 离心 30 min。后续步骤同三氯乙酸沉淀法。

C:裂解液提取法。取 5 g 新鲜芒果果肉,在液氮中充分研磨,用匀浆器搅碎,加入 5 ml 裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT,40 mmol/L Tris),震荡混匀后,冰上静置 30 min,使蛋白质充分溶解到裂解液中。4 ℃ 12 000 r/min 离心 1 h,取上清液,分装,-80 ℃ 保存,备用。

1.2.2 芒果粗提液蛋白组分分析

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术,用不连续系统进行垂直板电泳,对 3 种不同方法提取的芒果蛋白粗提液进行分析,浓缩胶为 5%,分离胶为 10%,蛋白样品与上样缓冲液 1:1 混合,煮沸 5 min,每孔上样 10 μ l,65 V 恒压堆积 20 min,135 V 恒压分离,待溴酚蓝指示到达底部,电泳完毕,考马斯亮蓝染色 1 h,脱色液充分洗脱。

采用二维电泳进一步对不同方法提取的芒果蛋白粗提液进行分析。水化上样及第一向等电聚焦:分别取 100 μ l 不同方法提取的蛋白样品与等量水化上样缓冲液混合,用移液器吸取 125 μ l 混合样品均匀铺在胶条槽内,将 7 cm 胶条胶面朝下覆盖在蛋白样品上,然后覆盖矿物油 2 ml。设定的等电聚焦程序见表 1。胶条的平衡与第二向 SDS-PAGE 电泳:将胶条分别在平衡缓冲液 I 和平衡缓冲液 II 中平衡 10 min 后,放在干燥的滤纸上,备用。制备 10% 的分离胶,待充分凝固后,将胶条放入两块玻璃板的缝隙,胶面对着短玻璃板,然后用约 50 ℃ 的 0.5% 低熔点琼脂糖封胶液灌入玻璃板缝隙中,轻轻把胶条推到分离胶面上,待琼脂糖凝固后,即可开始电泳。65 V 恒压 10 min,135 V 恒压分离,直到溴酚蓝跑到玻璃板底部为止。考马斯亮蓝染色 1 h,脱色液充分洗脱。

表 1 等电聚焦电泳程序与参数

Table 1 Isoelectric focusing procedures and parameters

步骤	电压/V	时间	目的
水化	50	14.0 h	主动水化
1	250	0.5 h	除盐
2	500	0.5 h	除盐
3	4 000	3.0 h	升压
4	4 000	20 000.0 Vh	聚焦
5	500	任意时间	保持

注:步骤 1~5 为等点聚焦电泳程序步骤

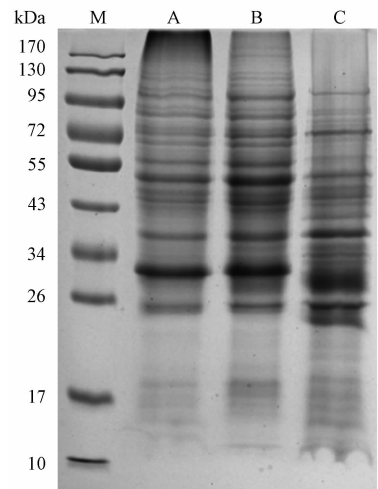
1.2.3 与血清 sIgE 结合的致敏原组分分析

用不同方法提取的芒果蛋白粗提液作为抗原,用芒果致敏患者血清中的 sIgE 作为探针进行 Western blot 试验:将 3 种方法提取的蛋白粗提液进行 SDS-PAGE 电泳,干转膜仪 15 V 电压下 30 min 将蛋白转移到聚偏氟乙稀(PVDF)膜上,用 5% 脱脂奶室温封闭 2 h;封闭结束后,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。将已封闭的 PVDF 膜剪成细条,2 例阳性血清和 1 例阴性血清分别与 3 种方法提取的蛋白进行 4 ℃ 孵育过夜,血清均用 TBST 稀释 10 倍。洗 3 次,加入二抗(羊抗人 IgE-AP),TBST 稀释 1 000 倍,室温摇床孵育 2 h。洗 3 次,最后加入 AP 底物显色。同时,将三氯乙酸沉淀法提取的蛋白进行二维电泳,并进行半干转,用 1 例阳性血清进行 Western blot 试验,方法同上。

2 结果

2.1 芒果蛋白粗提液蛋白组分分析

3 种不同方法提取的芒果蛋白粗提液经 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色后显示出不完全相同的蛋白条带,见图 1。三氯乙酸沉淀法提取的芒果蛋白和三氯乙酸/丙酮沉淀法提取的蛋白基本相同,显示出 10 条可辨的蛋白质条带,分子量分别为 25、30、40、44、47、55、70、73、90、100 kD,其中 25、30、40、47 kD 组分条带染色较深,含量较高,为主带。而裂解液提取法得到的蛋白条带为 9 条,分子量分别为 23、25、29、40、47、73、100 kD,主带有 4 条,分子量分别为 23、25、29、40 kD。



注:M:Marker;A:TCA法;B:TCA/丙酮法;C:裂解液法

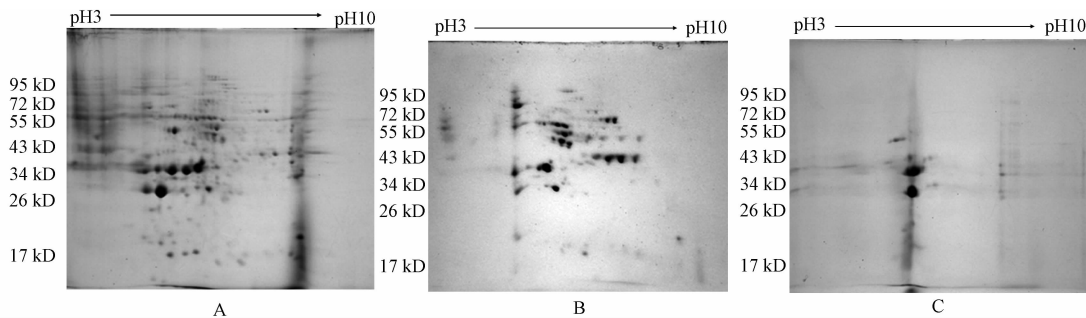
图 1 芒果蛋白提取液 SDS-PAGE 分析结果

Figure 1 Extraction of mango protein liquid SDS-PAGE analysis results

用二维电泳方法对 3 种不同提取方法所提取的芒果蛋白进行分离和检测,结果有较大差异,见

图2。TCA法在酸性端存在少量的横条纹和纵向条纹,说明有一定的干扰物质存在,分子量17~99 kD,蛋白在pH=4~9的范围内。TCA/丙酮法提取的蛋白分子量集中在30~99 kD,在pH=4~8范围内,大部分点与TCA法分布一致。裂解液法提取的蛋白明显丢失,分子量30~47 kD,集中

在pH=6的位置。在3种提取方法的电泳图谱中TCA沉淀法可减少芒果蛋白在提取过程中的损失,具有更好的提取率和重复性,蛋白质组分较完整,因此,选择TCA沉淀法进行二维免疫印迹试验,鉴别芒果致敏原组分。



注:A:TCA法;B:TCA/丙酮法;C:裂解液法

图2 芒果蛋白提取液二维电泳分析结果

Figure 2 Extraction of mango protein liquid 2-DE analysis results

2.2 能与血清 sIgE 结合的蛋白组分分析

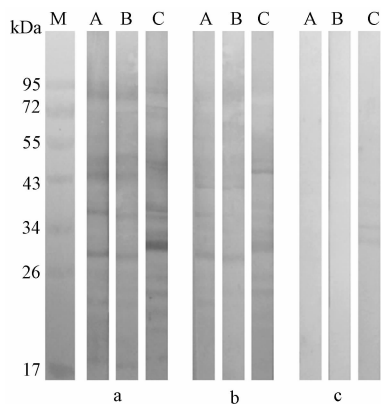
不同提取方法得到的芒果蛋白粗提液经 Western blot 分析,分别使用单例阳性血清和单例阴性血清作为探针,见图3。病人血清与TCA法和TCA/丙酮法提取的蛋白反应条带基本一致,而与裂解液提取法反应条带不完全相同。a病人血清与TCA法和TCA/丙酮法提取的蛋白反应条带主要是30、40、44、47、90 kD,而与裂解液提取的蛋白反应条带主要是23、32、40、46、73、90 kD,以32 kD处反应最强。b病人血清与TCA法和TCA/丙酮法提取的蛋白反应条带清晰可辨的是30、40、44、90 kD,裂解液提取的蛋白反应条带主要是23、32、47、90 kD。C病人血清为阴性对照,无反应条带出现。

采用TCA法提取的芒果蛋白粗提液与单例阳性病人血清做二维免疫印迹,见图4。致敏原组分与血清特异性IgE结合的蛋白组分大部分分布在30~90 kD,集中在pH=4~7,在分子量为40、44和70 kD的位置存在分子量大小相同而等电点不同的几种能与血清特异性IgE结合蛋白组分。少数血清特异性IgE结合的蛋白组分散在分布在17~30 kD之间。

3 讨论

近年来,芒果致敏越来越引起人们的重视。目前,临床上仍广泛使用芒果蛋白粗提液进行体内外诊断和免疫治疗,因此,保证芒果蛋白粗提液致敏原组分的完整性和制备标准化致敏原是提高诊断致敏性疾病准确性的前提,也是进行致敏原蛋白组学分析的基础。

Paschke等^[7]用52例芒果致敏患者血清对芒果



注:M:Marker;a、b:单例阳性血清;c:单例阴性血清; A:TCA法;B:TCA/丙酮法;C:裂解液法

图3 芒果蛋白粗提液 Western blot 结果

Figure 3 Mango extract protein by Western blot analysis results

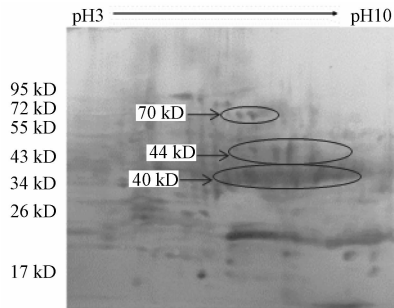


图4 TCA法提取的芒果蛋白二维免疫印迹结果(单例血清)

Figure 4 Mango TCA extract protein by 2-D immunoblot analysis results (single serum)

粗提蛋白进行检测,共有8个特异性IgE结合条带,分子量分别为14、16、25、30、40、43、50、67 kD,并根据国际规则将40 kD的致敏原命名为Mani 1,30 kD的致敏原命名为Mani 2。Renner等^[8]对2例芒果

致敏患者进行研究,发现分子量为 27 kD 的蛋白是芒果主要致敏原。本研究中,我们采用 3 种不同的方法提取芒果蛋白质,通过 SDS-PAGE 分析主要蛋白条带,TCA 法和 TCA/丙酮法提取的主要蛋白质分子量为 25、30、40、44、47、55、70、73、90 和 100 kD,而裂解液法提取的蛋白质分子量分别为 23、25、29、40、47、73 和 100 kD,此结果与蒋鹏课题组^[9]的报道相似。二维电泳结果显示裂解液法提取的蛋白分子量在 30~47 kD,集中在 pH=6 的位置,未到达良好分离效果,说明裂解液法提取的芒果蛋白不适合应用于二维电泳。TCA 法提取的芒果蛋白质分子量从 17~99 kD,蛋白在 pH=4~9 的范围内。TCA/丙酮法提取的蛋白分子量集中在 30~99 kD,在 pH=4~8 范围内,此结果与 Andrade 课题组^[10]的报道相似。表明我们提取的芒果蛋白粗提液含有芒果主要致敏原组分,可作为制备特异性 IgE 检测的重要抗原材料,其中部分蛋白条带的差异可能是由于芒果果系、成熟程度、地域差异和实验室条件的不同等因素造成的。

本研究用 2 例芒果致敏阳性血清分别与 3 种方法提取的蛋白粗提液进行 Western blot 试验,鉴别芒果蛋白中的致敏原组分。结果显示裂解液法提取的芒果蛋白与 2 例病人血清结合的主要条带是 23、32、47、90 kD,TCA 法与 TCA/丙酮法的血清 sIgE 结合条带基本一致,2 例病人血清结合的主要蛋白条带是 30、40、44、90 kD,此结果与 Paschke 课题组^[11]的报道相似。2 例病人血清结合的条带略有差异,可能是由于血清中的 sIgE 水平不同造成的。阴性对照血清无反应条带出现。二维电泳显示 TCA 法的蛋白组分比较完整,重复性较好,用 1 例病人血清与 TCA 法蛋白粗提液进行二维免疫印迹,结果显示致敏原组分与血清特异性 IgE 结合的蛋白组分大部分分布在 30~90 kD,集中在 pH=4~7,除此之外,在低分子量(<30 kD)区域还散在分布一些反应的点,说明有些含量较少的蛋白与血清 sIgE 结合较强。

纵观本研究结果,我们初步认为 TCA 法提取的芒果蛋白粗提液致敏原组分较完整,重复性好,操作简便,收获量大,提取的蛋白质适合用于血清 sIgE 检测的标准抗原,可以应用于临床诊断芒果致敏性疾病。此外,我们需要进一步收集病例,寻找与群体 sIgE 有高结合频率的重要芒果致敏原组分进行重组表达,采用人工复合抗原取代天然抗原,为临床检测芒果致敏原提供标准化抗原,从而提高芒果致敏性疾病的诊断水平。

参考文献

- [1] 曹军皓,阎有功. 食物过敏的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(13):1985-1987.
- [2] Scott H. Epidemiology of food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology,2011,127(3):594-602.
- [3] 吴序栋,张红云,刘志刚,等. 芒果过敏的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(2):185-187.
- [4] 黄志英,程宝金,万瑜,等. 853 例过敏性疾病患儿体外过敏原检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(17):2087-2089.
- [5] 单立新,任杰,李会强,等. 中国对虾肉中与虾过敏患者血清特异性 IgE 结合的组分分析[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(6):494-497.
- [6] Panchout F,Letendre J,Bultelle F,et al. Comparison of protein-extraction methods for gills of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), and application to 2DE[J]. J Biomol Tech,2013,24(4):218-223.
- [7] Paschke A,Kinder H,Zunker K,et al. Characterization of allergens in mango fruit and ripening dependence of the allergenic potency[J]. Food and Agricultural Immunology,2001,13(1):51-61.
- [8] Renner R,Hipler C,Treudler R,et al. Identification of a 27 kDa protein in patients with anaphylactic reactions to mango[J]. J Investig Allergol Clin Immunol,2008,18(6):476-481.
- [9] 蒋鹏,刘玲,何黎. 芒果果实提取液中蛋白质组份分析及免疫活性鉴定[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2008,24(10):795-796.
- [10] Andrade J M,Toledo T T,Nogueira S B,et al. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening[J]. J Proteomics,2012,75(11):3331-3341.
- [11] Paschke A,Kinder H,Zunker K,et al. Characterization of cross-reacting allergens in mango fruit[J]. Allergy,2001,56(3):237-242.