

- coli* strains isolated from retailed smoked fish [J]. *Journal of Natural Sciences Research*, 2016, 6(9): 7-10.
- [27] 张致一, 刘军, 董杰, 等. 天津市市售贝类水产品中副溶血性弧菌污染和耐药状况的调查 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(14): 2413-2415.
- [28] 李平, 黄涵, 钟汶兵. 海口市市售贝类海产品副溶血性弧菌污染调查及耐药和毒力基因研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(4): 366-370.
- [29] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 微生物耐药的基础与临床 (第2版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- [30] 郑林, 祝令伟, 郭学军, 等. 副溶血性弧菌耐药基因的研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(6): 80-85.

研究报告

牡蛎精氨酸激酶稳定性及同源性分析

赵晓涵, 刘文颖, 方磊, 谷瑞增, 凌空, 李国明, 鲁军

(中国食品发酵工业研究院, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

摘要:目的 鉴定从牡蛎中提取的天然蛋白精氨酸激酶(arginine kinase, AK), 并了解其基本性质及同源性。方法 利用硫酸铵盐析、阴离子交换从牡蛎中分离纯化出蛋白, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和圆二色(CD)光谱确定相对分子质量和二级结构, 并研究其稳定性; 用生物信息学软件对牡蛎 AK 和其他 11 种甲壳类、软体类动物过敏原的 AK 氨基酸序列进行比对, 分析它们之间的同源性。结果 分离纯化得到的相对分子量为 40 kDa 的天然蛋白为牡蛎 AK, AK 既不耐热也不耐强酸。牡蛎 AK 与软体类动物过敏原 AK 氨基酸序列的同源性较高, 与甲壳类动物氨基酸序列的同源性在 55%~60% 之间。结论 从牡蛎中提取得到天然 AK, 基本了解牡蛎 AK 的稳定性和同源性, 并为牡蛎 AK 致敏性和致敏机制的全面研究打下基础。

关键词:精氨酸激酶; 提取纯化; 稳定性; 圆二色光谱; 过敏原

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)04-0370-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.004

Study on stability and homology analysis of arginine kinase from oyster

ZHAO Xiaohan, LIU Wenying, FANG Lei, GU Ruizeng, LING Kong, LI Guoming, LU Jun
(China National Research Institute of Food & Fermentation Industry, Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To identify the natural protein arginine kinase (AK) extracted from oysters, and to understand its basic properties and homology. **Methods** AK was isolated and purified from oysters by ammonium sulfate salting out and anion exchange, and the relative molecular mass and secondary structure were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and circular dichroism (CD) spectroscopy. Its stability was also studied. The amino acid sequences of oyster AK and 11 other crustacean and mollusk allergens were compared by bioinformatics software, and their homology was analyzed. **Results** The natural protein with a relative molecular weight of 40 kDa was oyster AK. AK was neither heat-resistant nor acid-resistant. Oyster AK has high homology of mollusk allergen AK amino acid sequence, and homology of crustacean amino acid sequence is 55%-60%. **Conclusion** Natural AK is extracted from oysters, and the stability and homology are basically understood. It will lay the foundation for comprehensive research on sensitization and sensitization mechanism of oysters.

Key words: Arginine kinase; extraction and purification; stability; circular dichroism; allergen

随着人们生活水平的提高和全球化进程的加

快, 食物过敏已成为日益严重的世界性公共卫生问题之一, 患病率迅速增长。海鲜过敏是一种严重的食物过敏, 尤其是在饮食中常见海鲜的沿海地区和海鲜加工工厂中发生^[1]。接触海鲜后立即发生的过敏反应主要是 IgE 介导的 I 型超敏反应, 其特征是胃肠道疾病以及皮肤性荨麻疹、血管性水肿、喉咙发痒, 有时甚至会危及生命^[2]。食物过敏原是指能引起免疫反应的食物抗原分子, 水产

收稿日期: 2020-05-05

基金项目: 中国食品发酵工业研究院强院工程培育专项(院强院 20-功能肽-505); 国家自然科学基金项目(31671963)

作者简介: 赵晓涵 女 研究生 研究方向为功能食品与食品过敏原 E-mail: zhx08240026@163.com

通信作者: 李国明 男 高级工程师 研究方向为功能食品与生物技术 E-mail: gml_1002@163.com

品中已发现的过敏原包括原肌球蛋白(tropomyosin, TM)、精氨酸激酶(arginine kinase, AK)、肌球蛋白轻链(myosinlightchain, MLC)、肌钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium binding protein, SCP)等。软体动物牡蛎因其肉质鲜美,营养价值高,成为全球最受欢迎的海鲜食品之一,全球每年消费量超过300万吨,而太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)约占世界牡蛎消费量的一半^[3]。据报道,对诸如鲍鱼、帽贝、鱿鱼和牡蛎等软体动物的过敏反应经常发生^[4-6]。

无脊椎动物中的AK与脊椎动物中的肌酸激酶(CK)功能类似^[7],是重要的胍基磷酸转移酶之一,在无脊椎动物的细胞能量代谢调控中起关键作用^[8]。但目前AK在作为过敏原方面的研究较少,且主要集中在甲壳类动物尤其是虾蟹的提取纯化、分子克隆及免疫原性分析方面,对于软体动物AK过敏原的研究更是少之又少。牡蛎闭壳肌肉中有较高的AK表达量,AK相对分子质量约为40 kDa,一级蛋白结构含有350个氨基酸,经软件预测牡蛎AK等电点约为6.6,其二级结构含有38.3%的 α -螺旋、19.7%的 β -折叠、32%的 β -转角、13.7%无规卷曲,具有复杂的三四级结构。为了有利于牡蛎AK致敏性的验证和致敏机制的详细探究,本研究使用圆二色(CD)光谱仪从蛋白结构方面对牡蛎AK进行鉴定,并且通过同源性分析推测其具有致敏性,同时为牡蛎AK甚至软体动物过敏原研究提供一些思路和启发。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

双稳态时电泳仪(美国Bio-Rad)、ÄKTA快速蛋白质液相色谱(FPLC)系统(GE Healthcare,美国通用电气医疗集团)、CD光谱仪(英国Chirascan)。

牡蛎购自山东威海;硫酸铵、碳酸氢钠、过硫酸铵、二硫苏糖醇(DTT)均购自北京化工厂,乙二胺四乙酸二钠(EDTA,中国Biotopped),均为分析纯;Tris(超纯级)、考马斯亮蓝R-250(超高纯)均购自美国Amresco;低分子量蛋白Marker、二奎啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 天然AK的纯化

纯化流程主要参考文献^[9]的方法,并作适当修改。取牡蛎闭壳肌,切碎,溶于10倍体积预冷的缓冲液A(50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L EDTA)中,用高速匀浆机匀浆,4 ℃ 11 000×g离心20 min取上清;进行75%~90%硫酸

铵盐析,4 ℃ 11 000×g离心20 min取沉淀。将沉淀溶于少量缓冲液B(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, pH=8.0)中,并于透析液(10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 4 ℃)中透析16 h;最后上样于已用缓冲液B平衡好的HiTrap-Q柱。用缓冲液B洗脱未吸附部分,再用0.5 mol/L NaCl线性洗脱1 h,流速为0.5 mL/min,收集洗脱部分进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.2.2 SDS-PAGE分析

通过SDS-PAGE分析天然AK的相对分子质量。采用5%浓缩胶和15%分离胶进行电泳。将10 μ L样品溶液与10 μ L上样缓冲液混合,100 ℃加热8 min后进行电泳。通过比较低分子量标记蛋白的电泳迁移率来确定相对分子质量。

1.2.3 可溶性蛋白含量测定-BCA法

BCA工作液的配制:根据样品数量,按50 mL BCA试剂A加1 mL BCA试剂B(50:1, V/V)配制适量BCA工作液,充分混匀。

标准曲线的绘制:将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20 μ L加到96孔板的标准品孔中,加标准品稀释液补足到20 μ L。样品测定:加20 μ L待测蛋白样品到96孔板中。精确吸取标准工作液200 μ L于反应孔,37 ℃放置30 min。测定在562 nm波长下的吸光值,根据标准曲线计算出样品蛋白质含量。

1.2.4 CD光谱分析

用CD光谱测量天然AK(0.8 mg/mL)的CD光谱,并将三个光谱的平均值作为最终数据。对于波长分析,以0.2 nm步长和2.0 nm带宽扫描样品,波长范围为190~260 nm,扫描速度为1 200 nm/min。

热稳定性:将200 μ L的AK(0.8 mg/mL)加入比色皿,并插入针式温度计。采用全图谱模式进行热变温,设置主界面参数。温度设置:起始温度为20 ℃,终止温度为92 ℃,步进为6 ℃/次,升温速度为1 ℃/min。

pH值稳定性:分别将100 μ L的AK(0.8 mg/mL)置于离心管中,与等体积pH值为3.0、4.0、5.0、9.0、11.0的缓冲液混合,室温放置1 h后,进行CD光谱分析。

1.2.5 牡蛎AK蛋白与其他水产类过敏原的多序列比对

选取11种已有完整氨基酸序列的过敏原,在Uniprot蛋白数据库中查找对应的序列,其氨基酸序列登录号见表1,使用BioEdit软件对AK蛋白与这11种蛋白的氨基酸序列进行多序列比对,并用

Uniprot 进行 Blastp 以分析同源性。

表 1 12 种不同来源水产品 AK 检索信息

Table 1 Retrieval information of arginine kinase from 12 different sources of aquatic products

过敏原	Uniprot 登录号	来源
*	Q760P6	<i>Crassostrea gigas</i> (太平洋牡蛎)
*	O15990	<i>Liolophura japonica</i> (日本花棘石鳖)
*	O15989	<i>Turbo cornutus</i> (角螺螺)
Oct f 2	G1ESZ9	<i>Amphioctopus fangsiao</i> (短蛸)
*	P51544	<i>Haliotis madaka</i> (日本大鲍)
*	Q9NH49	<i>Callinectes sapidus</i> (蓝蟹)
*	Q9NH48	<i>Eriocheir sinensis</i> (中华绒螯蟹)
Scy s 2	C9EIP1	<i>Scylla serrata</i> (锯缘青蟹)
Scy p 2	H6VGI3	<i>Scylla paramamosain</i> (拟穴青蟹)
Lit v 2	B0FRF9	<i>Penaeus vannamei</i> (南美白对虾)
Pro c 2	H6VGI2	<i>Procambarus clarkii</i> (克氏原螯虾)
*	C7E3T4	<i>Penaeus monodon</i> (斑节对虾)

注: * 表示该过敏原没有被命名

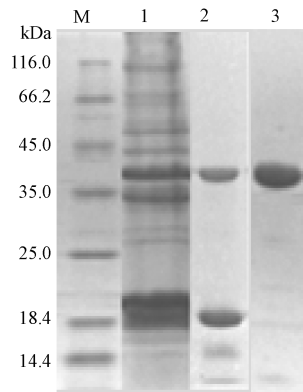
2 结果

2.1 天然 AK 的纯化

对牡蛎中的粗提物进行 SDS-PAGE 电泳分析,如图 1 所示,条带较粗的蛋白组分主要位于相对分子量为 18、20、35 和 40 kDa 处。经 75%~90% 硫酸铵盐析后,沉淀里面只剩 40 和 20 kDa 两个条带。透析后的样品上样于 HiTrap-Q 柱,在 0.1~0.2 mol/L 的 NaCl 浓度下将目的蛋白洗脱下来,使其与另一蛋白分离。通过 SDS-PAGE 分析后确定从第一个蛋白峰收集到的是相对分子量 40 kDa 的蛋白。将纯化的目的蛋白立即用于试验或保存于 -80 °C 冰箱。

2.2 蛋白浓度标准曲线的绘制

根据牛血清白蛋白的梯度浓度和在 562 nm 下的吸光值绘制了标准曲线,标准方程为 $y = 0.858x + 0.3706$, $R^2 = 0.993$,线性关系良好,再将样品的吸



注: M: 标准分子质量蛋白; 1: 牡蛎 AK 粗提物; 2: 75%~90% 硫酸铵盐析的沉淀; 3: HiTrap-Q 柱洗脱后的纯化 AK

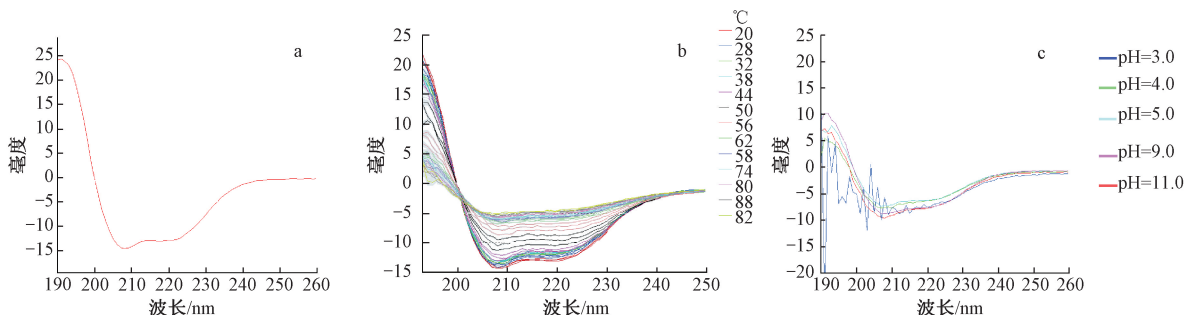
图 1 牡蛎 AK 纯化 SDS-PAGE 图

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified arginine kinase from oyster

光值 1.056 带入方程即可得到样品的蛋白浓度为 0.799 mg/mL。21.5 g 牡蛎闭壳肌提取了 10 mL 蛋白溶液,即每克闭壳肌约提取出 0.37 mg AK。

2.3 CD 光谱分析

CD 光谱在远紫外区域具有肽键吸收信号,并能反映蛋白质二级结构的信息。从图 2(a)中可以看出,天然 AK 信号在 191 nm 处有一正峰,并且在 208 nm 有一明显的负峰,222 nm 处有一平缓的负峰,AK 在 208 nm 处比 222 nm 的 CD 值大,说明 α -螺旋及 β -折叠含量都大于 15%,这两种结构在空间上是分离的,且超过 60% 的折叠链是反平行排列^[10],结果与软件预测的结构相符。CD 光谱热变温试验结果如图 2(b)所示,随着温度的升高 CD 谱带有很大变化,208 和 222 nm 这两处的负峰逐渐变得平缓,蛋白质不断发生变性,二级结构被破坏,证明牡蛎 AK 为热不稳定性蛋白。如图 2(c)所示,AK 在强酸性条件下 ($\text{pH} \leq 3.0$) 二级结构已被破坏,蛋白产生降解,而在弱酸性、中性和碱性条件下 ($\text{pH} \geq 4.0$) 结构较稳定。



注: a: 纯化 AK; b: AK 热稳定性; c: AK pH 值稳定性

图 2 AK 的 CD 光谱

Figure 2 Circular dichroism spectrum of purified arginine kinase

2.4 同源性分析

AK 和其他 11 种甲壳类动物及软体动物的氨基酸序列(已鉴定)进行比对后发现,与软体动物的 AK 比较,牡蛎(*Crassostrea gigas*)AK 蛋白的氨基酸序列与软体动物(*Turbo cornutus*, *Haliotis diversicolor* 和 *Ruditapes philippinarum*)的序列相似度较高,差异氨基酸较少;与其他 6 种甲壳类动物的氨基酸序列比较,整个氨基酸序列中差异氨基酸较多,同源性较低。

12 种 AK 序列的同源性进一步通过 Uniprot 进行 Blastp 分析,在已鉴定的氨基酸序列中,牡蛎 AK 蛋白的氨基酸序列与日本花棘石鳖(*Liolophura japonica*)序列的相似度最高为 66.6%,与角蝶螺(*Turbo cornutus*)、短蛸(*Amphioctopus fangsiao*)、日本大鲍(*Haliotis madaka*)的相似度均在 60% 以上;与其他选定的 7 种甲壳类动物的氨基酸序列比较,尽管它们属于不同的门,AK 氨基酸序列的相似度在 55%~60% 之间。

3 讨论

目前一些学者对不同种类动物中的 AK 过敏原进行了研究并取得进展^[11]。这些试验证明不同虾蟹^[12-13]的 AK 具有致敏性,且牡蛎 AK 与其有一定的同源性,所以推测牡蛎 AK 也为一种过敏原,但尚未见牡蛎 AK 过敏原的相关报道,因此通过试验来填补这方面的空白,以寻求降低甚至消除牡蛎致敏性的方法。

本研究以太平洋牡蛎为对象,通过硫酸铵盐析及阴离子交换等方法分离纯化 AK 蛋白。确定了硫酸铵盐析的最佳饱和度为 75%~90%,经阴离子交换后得到单一的 AK 条带;利用 SDS-PAGE 证实了从牡蛎中提取的相对分子量为 40 kDa 的蛋白是 AK,通过 CD 光谱从二级结构变化发现 AK 为热不稳定和不耐强酸的蛋白,通过 BioEdit 软件对牡蛎 AK 与其他 11 种甲壳类、软体类动物过敏原 AK 的氨基酸序列进行多序列比对,同时分析它们之间的同源性,分析结果发现牡蛎 AK 与软体类动物过敏原 AK 氨基酸序列的同源性较高为 60% 以上,为贝类 AK 之间的免疫交叉反应奠定分子基础。但牡蛎 AK 是否为过敏原仍需进一步验证,且与免疫系统之间相互作用的分子基础尚不清楚,在进行临床试验之前,必须对 AK 进行标准化,标准化的 AK 可能有助于确定过敏反应的分子基础,并有助于制定新

的诊断和治疗策略^[14-15]。迄今为止,蛋白质组学已为鉴定食物来源的致敏蛋白质提供了有力的工具,应将其与免疫学结合以便于更好地探究牡蛎 AK 致敏机制。

参考文献

- [1] 陈红兵,高金燕. 食物过敏反应及其机制[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 7-11.
- [2] BERNHISEL-BROADBENT J, SCANLON S M, SAMPSON H A. Fish hypersensitivity; I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1992, 89(3): 730-737.
- [3] LEUNG P S, CHU K H. cDNA cloning and molecular identification of the major oyster allergen from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Clinical and Experimental Allergy, 2010, 31(8): 1287-1294.
- [4] CARRILLO T, CASTILLO R, CAMINERO J, et al. Squid hypersensitivity: a clinical and immunologic study [J]. Ann Allergy, 1992, 68(6): 483-487.
- [5] CARRILLO T, RODRÍGUEZ DE CASTRO F, BLANCO C, et al. Anaphylaxis due to limpet ingestion [J]. Ann Allergy, 1994, 73(6): 504-508.
- [6] MORIKAWA A, KATO M, TOKUYAMA K, et al. Anaphylaxis to grand keyhole limpet (abalone-like shellfish) and abalone [J]. Ann Allergy, 1990, 65(5): 415-417.
- [7] MÜHLEBACH S M, GROSS M, WIRZ T, et al. Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes [J]. Mol Cell Biochem, 1994, 133-134: 245-262.
- [8] LÓPEZ-ZAVALA A A, GARCÍA-OROZCO K D, CARRASCO-MIRANDA J S, et al. Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine-A molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme [J]. J Bioenerg Biomembr, 2013, 45(6): 511-518.
- [9] 沈苑. 锯缘青蟹精氨酸激酶的分离纯化、分子克隆及过敏性研究[D]. 厦门:集美大学, 2010.
- [10] 沈星灿,梁宏,何锡文,等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 388-394.
- [11] 毛海燕. 拟穴青蟹精氨酸激酶的过敏性及其构效关系的初步研究[D]. 厦门:集美大学, 2013.
- [12] 韩建勋,陈颖,葛毅强. 虾类主要过敏原及其消减技术研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 201-208.
- [13] 林薇,许素玲,周琼艳,等. 蟹类主要过敏原及其消减技术研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(3): 290-296.
- [14] PLATTS-MILLS T A, CHAPMAN M D. Allergen standardization [J]. J Allergy Clin Immunol, 1991, 87: 621-625.
- [15] VAN REE R. Analytic aspects of the standardization of allergenic extracts [J]. Allergy, 1997, 52(8): 795-805.