

· 论著 ·

藻类活性物质对虾过敏原免疫活性的影响

郝程列¹, 张韬宏², 张爱琳^{1, 3 Δ}

(1 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津; 2 山西省忻州市人民医院检验科, 山西 忻州; 3 天津市农副产品深加工技术工程中心, 天津)

摘要: 目的 藻类活性物质对虾过敏原免疫活性的影响探究。**方法** 实验选取了小球藻粉末, 通过有机试剂的提取, 得到藻多酚提取液, 并与处理虾后得到的虾过敏原抽提物发生络合反应, 应用 SDS-PAGE 电泳技术与免疫印迹 WB 及 ELISA 方法检测虾过敏原的活性。**结果** 海藻多酚提取液与虾类过敏原抽提物发生反应, 使过敏原抽提物溶液中的过敏原蛋白浓度减小, 电泳得到 36KD 的虾过敏原存在于蛋白液中, 免疫活性降低了 9.6%。**结论** 本研究为开发低过敏性、抗过敏性虾类食品, 提高海产品的食用安全性提供理论依据。**关键词:** 藻类多酚; 虾过敏原; ELISA; 免疫印迹; SDS-PAGE 电泳技术**中图分类号:** R254.1**文献标识码:** A**DOI:** 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.64.005**本文引用格式:** 郝程列, 张韬宏, 张爱琳. 藻类活性物质对虾过敏原免疫活性的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(64): 10-12.

Effects of Algae Active Substances on Immune Activity of Shrimp Allergens

HAO Cheng-lie¹, ZHANG Tao-hong², ZHANG Ai-lin^{1, 3 Δ}

(1 Tianjin Agricultural University, School of food science and Bioengineering, Tianjin; 2 Clinical laboratory, Xinzhou People's Hospital of Shanxi Province, Xinzhou, Shanxi; 3 Tianjin agricultural and sideline products deep processing technology Engineering Center, Tianjin)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of algae active substances on immune activity of shrimp allergens. **Methods** Chlorella powder was extracted by organic reagent, the extraction of algae polyphenols was obtained, and complex reaction with the shrimp allergen extract after treatment of shrimp, the activity of shrimp allergens was detected by SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting with WB and ELISA. **Results** Seaweed polyphenols extract and shrimp allergens extract reaction, reduce allergen protein concentration in allergen extract solution, the 36KD shrimp allergen produced by electrophoresis was found in the protein solution, and its immune activity was reduced by 9.6%. **Conclusion** This study provides a theoretical basis for developing hypersensitive and anti allergic shrimp foods and improving the food safety of seafood.**KEY WORDS:** Algal polyphenol; Shrimp allergen; ELISA; Immunoblotting; SDS-PAGE electrophoresis

0 引言

食品过敏性疾病是一个新兴的、全球性的健康性问题。食品过敏问题已经成为食品安全卫生领域中颇受关注的热点和重点^[1]。食物过敏作为新的食品安全问题之一, 广泛引起了消费者的密切关注。虾是易致敏食品中一类, 虾类过敏不仅妨碍过敏人群对味道鲜美、营养丰富的虾类产品的摄取, 而且对过敏人群存在着安全隐患, 严重危及生命^[2]。目前降低过敏原活性的方法有物理方法, 如热处理、高压处理、辐照、超声波处理等, 还有化学方法。陈瑜^[3]选取阿魏酸、茶多酚两种多酚化合物, 使其与虾类过敏原抽提物发生络合反应, 研究结果发现, 其都与虾过敏抽提物络合发生反应, 使抽提蛋白中的过敏原蛋白浓度减小, 得到了阿魏酸使其免疫活性降低了 7.1%, 茶多酚使其免疫活性降低了 99.9%。苏学素研究了不同茶水提物以及实验了多种食物的透明质酸酶体外抑制实验, 结果发现甜茶、茶叶、鱼腥草有较强的抗过敏作用。

本研究以虾为对象抽提蛋白^[4], 通过对海藻中多酚的提取, 将两者进行络合反应, 最终确定多酚提取液对过敏蛋白及免疫活性产生的一些影响, 从实验中研究, 并利用这些原理开发低过敏性、抗过敏性虾类食品做准备, 为低过敏、抗过敏食品的开发提供理论依据^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料

小球藻购于柏威生物科技, 以虾为对象抽提蛋白, 虾购于天津市华苑物美超市。

1.1.2 实验试剂

牛血清白蛋白, 上海蓝季科技发展有限公司; 羊抗兔

IgG-HRP 抗体, 天津晟佰昊生物科技有限公司; 福林酚, 天津晟佰昊生物科技有限公司; 邻苯三酚, 天津晟佰昊生物科技有限公司; HT2134 透析袋 (6000-8000), 优博生物有限公司; 其他涉及到的试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器及设备

酶标仪: 赛默飞科技有限公司; VE-386 型转移电泳槽: 北京原平华皓生物科技有限公司; LGJ-18S 冷冻干燥机: 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 海藻抗过敏活性的提取

采用冰醋酸、乙醚与乙酸乙酯 (1:1) 比例分离提取分离。

1.3.2 多 (总) 酚含量的测定 (Folin-Ciocalteu 试剂法)

以没食子酸为标准品, 利用测定福林酚法测定总多酚。

1.3.3 虾丙酮粉的制备

将虾去壳、头、尾、肠线后放在匀浆器中匀浆, 1g 样品大约用 1ml 的生理盐水悬浮。冰悬浮 5min 后加入 4 倍体积的冷丙酮, 索氏抽提, 冷冻干燥, 得到虾丙酮粉。

1.3.4 虾过敏原蛋白的抽提

称取 10g 虾丙酮粉, 用配置好的 KCl 抽提液置冰箱冷藏室抽提过夜 (1:15)。8000r/min 离心后, 缓慢装入透析袋中, 用纯水透析隔夜放置, 透析到无离子析出, 冻干备用。

1.3.5 虾过敏原抽提物与海藻多酚反应物的制备

称 5g 的干燥好的粉末放置于烧杯中, 加入纯水, 配置成 5mg/ml 的蛋白溶液, 量取多酚提取液中的碱性酚馏分 0 μL、600 μL、800 μL 的分别为样品一、二、三, 每个样品设置三个平行。

1.3.6 考马斯亮蓝法测定蛋白含量

取待测样品溶液 1ml 至试管中, 移液管移入 5ml 考马斯亮蓝溶液, 用蒸馏水调零, 测吸光度。

基金项目: 国家自然科学基金 (31601421), 天津市大学生创新项目 (201610061157)。

作者简介: 郝程列, 大学本科, 研究方向: 食品质量与安全。

Δ 通讯作者: 张爱琳, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 食品质量与安全检测技术。

1.3.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析虾过敏原

配制分离胶为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶下层分离胶, 配制 SDS 变性 5% 聚丙烯酰胺凝胶上层积层胶。

1.3.8 免疫印迹检测处理后虾过敏原的活性。

1.3.9 酶联免疫吸附实验法检测处理后虾过敏原的活性

抗体经过包被、洗涤、封闭, 后在波长 OD450 下用酶标仪测定。

2 结果

2.1 没食子酸标准曲线

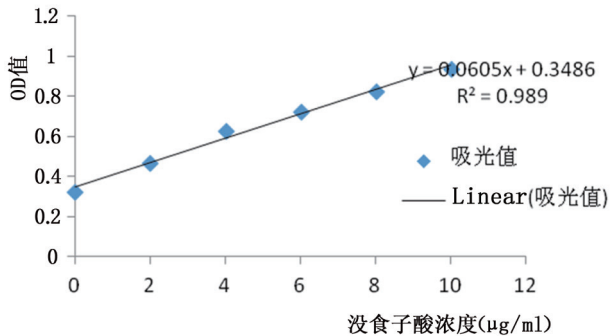


图 1 多酚含量标准曲线

没食子酸标准曲线见图 1, 线性回归方程为 $y = 0.060x + 0.0348$ ($R^2 = 0.989$), 由此可知, 没食子酸浓度在 0.001–0.010 mg/ml 范围内成线性关系。

2.2 海藻多酚的提取结果分析

实验选取的小球藻, 其总酚含量为 1.98%, 实验中的碱性酚馏分经测定的酚含量较高, 选择碱性酚馏分处理虾过敏原提取物^[6]。

2.3 蛋白质的标准

采用牛血清白蛋白为标准蛋白进行测定, 绘制标准曲线见图 2。

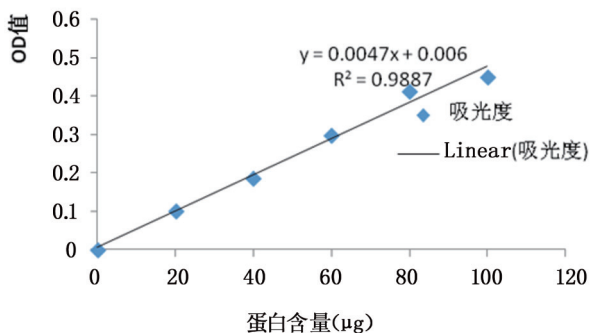


图 2 蛋白质标准曲线

由图 2 可知, 蛋白质含量的标准曲线方程为 $y = 0.004x + 0.006$, $R^2 = 0.988$, 方程呈线性相关。根据此标准曲线, 将蛋白样品的 A595 值代入上述方程, 即可获得蛋白样品的含量。由此可得, 样品 1、2、3 组的蛋白质含量分别为 73.75 μg、43.50 μg、38.50 μg。以样品 1 为对照, 多酚提取液处理后的样品 2 与样品 3, 蛋白含量有不同程度的降低且效果显著, 分别降低了 41% 与 48%。

2.4 多酚化合物与虾过敏原提取物反应产物的电泳分析

虾过敏原提取物与小球藻多酚提取物反应的上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 分析结果见图 3 和表 1。

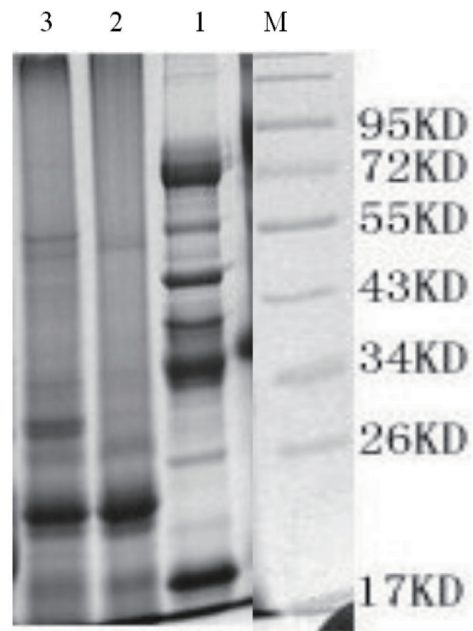


图 3 藻多酚提取液处理虾过敏原提取物后的 SDS-PAGE 图谱

注: M 为分子质量标准; 1: 未处理的虾过敏原提取物的蛋白液条带; 2: 600 μL 藻多酚提取液处理液的蛋白液条带; 3: 800 μL 藻多酚提取液处理的蛋白液条带。

根据电泳图谱图 3 可以看出, 样品 1 的蛋白条带较明显, 明显存在 36KD 和 72KD 的蛋白条带, 其 SDS-PAGE 分析证实了 36KD 虾过敏原存在于未处理的蛋白样液中, 样品 2 的蛋白条带与样品 3 的蛋白条带的较少, 而且比较相似^[7]。每一种样品电泳条带的分析如表 1 所示。

表 1 样品 SDS-PAGE 分析

样品	1	2	3
72		55	55
55		26	30
48		19	26
36		17	19
26		(4 条)	17
21			(5 条)
19			
最富集的条带 (KD)	36、72	22	22

2.5 免疫印迹检测反应物的活性

根据图 4 免疫印迹结果我们可以看出, 样品有 1 条免疫条带, 分子量分别为 72KD、55KD、48KD、36KD; 样品 2 有条免疫带, 分子量分别为 72KD、48KD; 样品 3 有两条免疫带, 分子量分别为 72KD、48KD。未处理的虾过敏原提取物在 36KD 出现了一条具有免疫活性的条带, 而海藻多酚提取处理后的样液中, 没有出现具有免疫活性的条带, 这证实了图 3 藻多酚提取液处理虾过敏原提取物后的 SDS-PAGE 图谱结果^[8]。

2.6 ELISA 对反应物免疫活性的分析

选用人血清为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP 抗体为二抗, 对多酚处理后的虾过敏原进行了免疫印迹分析, 结果如图 5 所示。由图 5 分析可得, 海藻多酚提取液较未处理的样品都有所降低^[9], 不同海藻多酚提取液浓度分别由吸光值 0.052 降低至 0.049 (400 μL)、0.047 (600 μL)、0.051 (800 μL), 免疫活性分别降低了 5.7%、9.6%、1.9%, 这是因为处理后的样品中几乎不含过敏原蛋白, 因此免疫活性降低^[10]。

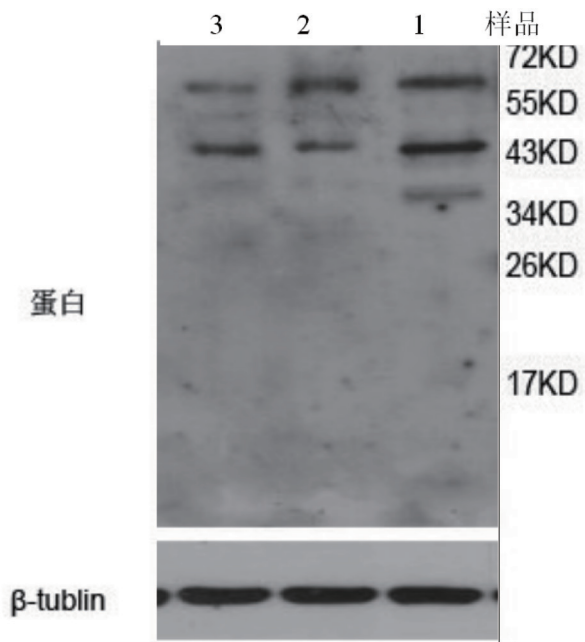


图4 藻多酚提取液处理后虾过敏原抽提物的免疫印迹图谱
注：M 为分子质量标准；1：未处理的虾过敏抽提物的蛋白液条带；2：600 μ L 藻多酚提取液处理液的蛋白液条带；3：800 μ L 藻多酚提取处理的蛋白液条带。

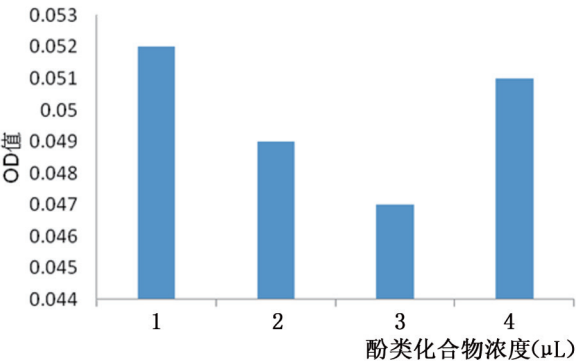


图5 藻多酚提取液处理后虾过敏原抽提物免疫活性的影响
注：1：未处理的虾过敏抽提物的蛋白液；2：400 μ L 藻多酚提取液处理的蛋白液；3：600 μ L 藻多酚提取液处理液的蛋白液；4：800 μ L 藻多酚提取液处理的蛋白液。

3 结论

本研究电泳结果表明^[11]，多酚提取液未处理的虾蛋白条带明显，分子量 36KD；多酚提取液处理液后的蛋白条带较少。免疫印迹分析鉴定，未处理的虾过敏原抽提物在 36KD 出现了一条具有免疫活性的条带，而海藻多酚提取处理后的样液中，没有出现具有免疫活性的条带，达到了降低过敏原活性的目的^[12]。ELISA 测得海藻多酚提取液较未处理的样品都有所降低，不同海藻多酚提取液浓度分别由吸光值 0.052 降低至 0.049（400 μ L）、0.047（600 μ L）、0.051（800 μ L），免疫活性分别降低了 5.7%、9.6%、1.9%。

参考文献

[1] 陈红兵. 食物过敏研究新动态 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1085-1086.
[2] 黄建芳, 林婷婷, 向军俭, 等. 河虾主要过敏组分的分离、纯化、鉴定及其致敏性分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(05): 444-446, 452.
[3] 陈瑜. 多酚化合物对虾类过敏原免疫活性的影响及抗过敏活性的研究 [D]. 中国海洋大学, 2012.
[4] 林洪, 郑礼娜, 李振兴, 等. 刀额新对虾主要过敏原蛋白的肽指纹图谱鉴定与分析 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2009, 39(05): 919-924.
[5] 甘育鸿, 张子敬, 吕应年, 等. 海发菜中总酚提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. 广东医学院学报, 2016, 34 (2): 113-116, 120.
[6] 郑礼娜. 虾类过敏原的活性分析及其抗原表位的研究 [D]. 中国海洋大学, 2011.
[7] 张丽斌, 熊何健, 吴靖娜, 等. 羊栖菜中多酚的提取制备及体外抗氧化活性研究 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(32): 40-47.
[8] 李冰心, 李颖畅, 励建荣. 海藻多酚的提取及其生物活性研究进展 [J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(05): 12-15, 22.
[9] 曲词. 海黍子多酚的提取分离及其生物活性研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
[10] 王钦富, 王永奇, 于超, 等. 炒紫苏叶醇提取物对过敏模型小鼠的抗过敏作用及机制 [J]. 中草药, 2006 (37): 1532-1535.
[11] 周贞兵, 戴腾飞, 王士长, 等. 马尾藻多酚的提取分离提纯及抗菌活性检验 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7809-7811, 7825.
[12] 杨会成, 郑斌, 郝云杉, 等. 具有抑制活性的海藻多酚联合提取工艺优化研究 [J]. 浙江海洋学院报: 自然科学版, 2014, 33 (2): 147-153.