

## 论著

## 辐照对虾过敏原抗原性的影响

顾可飞 高美须 李春红 潘家荣

(农业部农业核技术与农产品加工重点实验室/中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100094)

**摘要:**目的 探索辐照对海产品脱敏的效果,研究辐照对虾过敏原抗原性的影响。方法 利用 SDS-PAGE 纯化的虾过敏原(原肌球蛋白)制备高效价、高特异性多克隆抗体,通过酶联免疫实验研究以 3、5、7、10 kGy 的辐照剂量处理对虾过敏原与患者特异性血清抗体 IgE 及多抗的免疫亲和力的影响。结果 原肌球蛋白经辐照处理后,与患者特异性血清抗体 IgE 及鼠源多抗 IgG 的免疫亲和力下降。结论 辐照可降低原肌球蛋白的致敏性。

**关键词:** 卤虫;辐照;钴;抗原

## Effect of Irradiation on Antigenic Properties of Allergen in Shrimp

GU Ke-fei, GAO Mei-xu, LI Chun-hong, PAN Jia-rong

(Institute of Agro-food Science and Technology, CAAS/Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology and Agro-Food Processing of MOA, Beijing 100094)

**Abstract:** **Objective** To study the effect of irradiation on reduction of the allergenicity of shrimp. **Method** Polyclonal antibody was prepared using shrimp allergen (Tropomyosin TM) purified by SDS-PAGE and treated with irradiation at 3, 5, 7 and 10 kGy. The affinity of irradiated TM binding to polyclonal antibody and IgE of patient allergic to shrimp was examined by ELISA. **Results** It was found that shrimp allergen (TM) after treating with irradiation, the affinity of IgE of patient allergic to shrimp and mouse polyclonal antibody IgG binding to irradiated TM was dose dependently reduced. **Conclusion** The results indicated that antigenic properties of shrimp was changed and the allergenicity can be reduced by irradiation.

**Key word:** Artemia; Irradiation; Cobalt; Antigens

近年来有关食源性虾过敏的报道屡见不鲜<sup>[1,2]</sup>, 虾与蟹等甲壳类动物及其制品是联合国粮农组织提出的 8 大类引起过敏的食物中重要的一类<sup>[3,4]</sup>, 因此研究辐照降低虾过敏原致敏性对保护消费者食品安全有着积极的意义。

1999 年 Lee Y K 和 Myung-woo byun 等<sup>[5,6]</sup> 报道辐照可破坏虾过敏原抗原表位,降低其致敏性。科学研究发现辐照技术可以促进生物大分子的降解、交联和分子构象的改变,降低蛋白质的热稳定性,破坏其抗原决定簇,可以做为降低食物过敏反应的重要技术。本研究以我国海虾的主要过敏原原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)为对象,分析其辐照免疫学效应。

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 冷冻海虾于 2005 年 9 月份购自北京某超市,虾患者特异性血清抗体 IgE 由青岛海洋大学提供,辐照源来自本所辐照源<sup>60</sup>Co。

主要实验设备 DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-

24D 型垂直电泳槽及转印装置(北京六一仪器厂)、荣华 FS-1 高速可调匀浆机(江苏荣华仪器厂)、TCL-16A 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器厂)、Genesis25XL 冷冻干燥机(美国 Virtis)。

BaIb/c 小鼠 中科院遗传所实验动物研究室。

试剂 牛血清白蛋白(BSA)、丙烯酰胺(Tris)、甲叉丙烯酰胺(Bis)、十二烷基磺酸钠、巯基乙醇、低分子量标准蛋白质、生物素标记羊抗人 IgE 抗体、二氨基联苯胺(DAB)、四甲基联苯胺(TMB)、辣根过氧化物酶标记的亲合素、吐温-20、硝酸纤维素膜(NC)均购自美国 Sigma 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 虾过敏原的提取 提取方法参考 Myung-woo byun 等的方法并略做修改<sup>[5]</sup>。冷冻虾解冻,于蒸馏水中煮沸 10 min,去虾壳及背部黑静脉,以体积比 1:1 将虾肉与 0.15% 磷酸盐缓冲液(pH 7.2, PBS)混合,于匀浆机中以 10 000 r/min 匀浆,匀浆液以 11 000 r/min 离心 30 min,取上清液(将此溶液作为全虾过敏原 whole shrimp allergen(WA)鉴定),上清液经硫酸铵(60%)沉淀、等电点(pH4.5)沉淀(重复 3 次),离心(同上),取离心后沉淀溶于 PBS 中透析(每次 6 h,共 3 次),透析后液体分成 2 份:1 份为虾

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470999)

作者简介:顾可飞 女 硕士生

通讯作者:潘家荣 男 研究员

高美须 女 副研究员

过敏原溶液 (allergen solution, AS), 直接冻存, 1 份冷冻干燥制成过敏原粉 (allergen powder, AP)。

1.2.2 虾过敏原鉴定 利用 15 % 的分离胶 (含 15 % Tris 和 Bis)、5 % 的浓缩胶 (含 5 % Tris 和 Bis) 将 WA、AS、AP 电泳分离后, 在 290 mA 下转印 1 h, 取出 NC (硝酸纤维素膜), 室温在封闭液 PBST (含 0.5 % BSA 和 0.1 % 吐温 - 20) 中封闭 2 h, 以洗涤液 TBST (含 0.5 % 吐温 - 20 的磷酸盐缓冲溶液 pH 7.4) 洗 3 次, 加封闭液、患者特异性血清抗体 IgE, 37 °C 下反应 2 h, 用 TBST 洗 3 次, 加入生物素标记羊抗人 IgE 抗体, 37 °C 下反应 2 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素反应 2 h, 洗后加入 DAB 底物显色 15 min, 以水冲洗终止反应<sup>[7]</sup>。

1.2.3 虾过敏原纯化及动物免疫 利用李振兴等<sup>[7]</sup>的方法制备纯化免疫原并免疫小鼠制备多抗, 血清离心后于 - 20 °C 冰箱中保存。

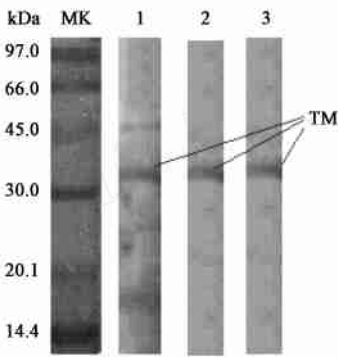
1.2.4 多克隆抗体 (IgG) 效价的测定 采用间接酶联免疫实验的方法, 用 AS 包被 96 孔酶标板, 每孔 150  $\mu$ l, 4 °C 过夜 (12 h), 0.5 % 封闭液 PBST, 37 °C 封闭 1 h, 磷酸盐缓冲溶液 (PBST, pH 7.4) 洗涤 3 次, 加入梯度稀释的抗血清, 每孔 100  $\mu$ l, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 加入 HRP 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 每孔 100  $\mu$ l, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 加入 TMB 显色液显色, 每孔 50  $\mu$ l, 37 °C 孵育 15 min, 2 mol/L 硫酸终止反应, 每孔 50  $\mu$ l, 测定 450 nm 处吸光值 (A 值)。

1.2.5 辐照处理 分别取 AS (0.8 mg/ml) 及 AP (0.2 g) 于试管中; 全虾做真空包装, 室温下以 0.3、5、7、10 kGy 剂量辐照处理 ( $n = 5$ )。辐照后样品立即贮于 - 20 °C 冰箱中。辐照后的全虾按 1.2.1 方法提取: 在 0.15 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 10 000 r/min 下匀浆, 11 000 r/min 离心 30 min, 去除沉淀, 取上清液 (irradiation whole shrimp allergen, RWA) 备用。

1.2.6 间接竞争酶联免疫实验分析辐照前后过敏原的免疫亲和性 以 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液将包被抗原 (RWA、AS、AP) 稀释成浓度为 6  $\mu$ g/ml, 包被 96 孔酶标板, 每孔 100  $\mu$ l, 4 °C 孵育 12 h, PBST 洗涤 3 次; 封闭液 (含 2.0 % 脱脂奶) 每孔 150  $\mu$ l 封闭, 于 37 °C 温箱中孵育 1 h (以下均在 37 °C 下操作) 后洗涤 3 次, 加入经 PBS 缓冲液稀释一定浓度的抗血清 (人 IgE 或鼠 IgG) 及 50 倍稀释的辐照后 (RWA、AS、AP) 各 50  $\mu$ l 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 加入经 PBS 稀释 1 000 倍的羊抗鼠 IgG2HRP 或生物素标记二抗液 100  $\mu$ l 孵育 1 h, 洗涤后加入底物显色液 (DAB 或 TMB), 每孔 100  $\mu$ l, 孵育 15 min; 每孔加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu$ l 终止反应, 于酶标仪测定各孔的 A<sub>450</sub> 值 ( $n = 5$ )。

## 2 结果与分析

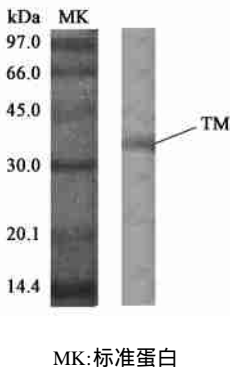
2.1 过敏原蛋白质的鉴定 三种存在状态的 TM: 全虾过敏原提取液 (WA)、过敏原溶液 (AS)、过敏原粉 (AP) 经电泳分离后, 在分子量约 36 kD 处有 1 条蛋白带, 与前人报道的虾过敏原 TM 的分子量相符<sup>[5]</sup>。以人血清抗体 IgE 进行免疫转印检测证实 (如图 1), 其为虾的主要过敏原。利用薄层扫描测定过敏原灰度值, 并与标准蛋白比较确定过敏原的量, 经考马斯亮蓝染色, 确定为过敏原后, 将其切下作为免疫原<sup>[7]</sup>。



1: 全虾过敏原提取液 (WA); 2: 虾过敏原溶液 (AS);  
3: 虾过敏原粉 (AP); MK: 标准蛋白。

图 1 过敏原的 SDS - PAGE/免疫转印图谱

2.2 多抗的鉴定及效价的测定 由于多抗的制备需高度纯化的过敏原, 如果纯度过低, 制备的抗体特异性会受到相当程度的影响, 进而可能使制备的多抗无法满足抗原抗体特异反应的需要。利用 SDS - PAGE 方法纯化的过敏原免疫动物, 制备的多克隆抗体的效价能满足实验的需要, 其效价如图 3。免疫转印检测鼠源多抗的特异性 (如图 2), 发现只有过敏原蛋白质与多抗有特异性反应, 表明此方法制备的多抗, 具有很强的特异性。



MK: 标准蛋白

图 2 鼠抗血清的免疫转印图

2.3 辐照对过敏原免疫亲和力的影响 以过敏原溶液 (AS)、过敏原粉 (AP)、全虾 (WA) 为辐照对象做辐照处理, 比较不同的存在状态下过敏原对辐照的敏感性。其中全虾经辐照后, 按 1.2.1 的方法提取, 辐照后提取液 (RWA) 于冰箱中冻存备用。

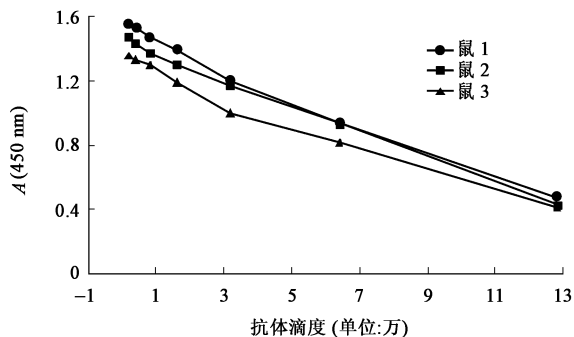
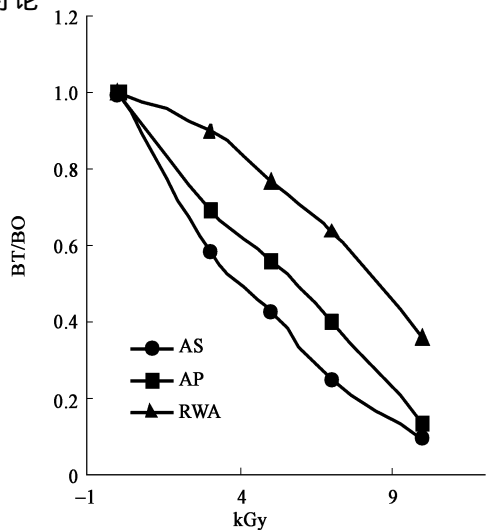


图 3 抗血清的效价

间接竞争酶联免疫实验(CI - ELISA)证明辐照后 TM 的量随着辐照剂量的增加而减少,这说明辐照改变了的抗原 TM 特性,其结果如图 4、5 所示。图 4 表明,人血清 IgE 对辐照后的过敏原溶液、过敏原粉及全虾辐照后过敏原提取液的识别率较未辐照的低。当辐照剂量达 7 kGy 时,过敏原溶液及过敏原粉与人血清 IgE 的结合率降低了约 50 %,而在 10 kGy 时其结合率均降至 20 % 以下。从图 5 可以看出,多抗 IgG 与辐照后 3 种过敏原 TM(RWA、AS、AP)的结合力随着辐照剂量的增加而减小,当辐照剂量在 3 kGy 时,过敏原溶液的结合力为辐照前的 50 %,当达到 10 kGy 时其结合力低于 10 %。而过敏原粉在辐照剂量为 7 kGy 时结合力降至 50 %。

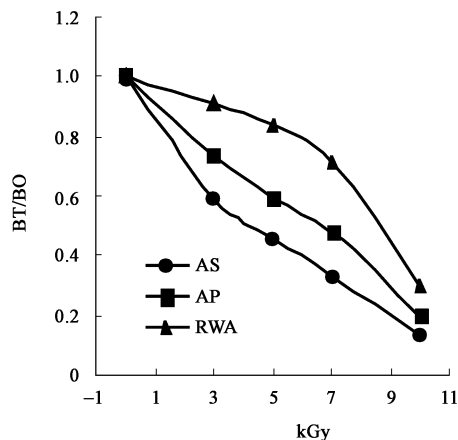
另外从图 4、5 还可以看出,辐照后的溶液(AS)、过敏原粉(AP)及全虾辐照后提取液(RWA)与多抗 IgG 及 IgE 的结合力降低程度的顺序为 AS > AP > RWA。这一结果说明过敏原的不同存在状态对辐照的敏感性不同。

### 3 讨论



AS:过敏原溶液;AP:过敏原粉;RWA:辐照后全虾过敏原提取液  
BT 与 BO 分别代表抗体与辐照前和辐照后的过敏原的结合力

图 4 辐照后过敏原与 IgE 的结合力



AS:过敏原溶液;AP:过敏原粉;RWA:辐照后全虾过敏原提取液。

BT 与 BO 分别指抗体与辐照前和辐照后的过敏原的结合力

图 5 辐照后过敏原与 IgG 的结合力

全虾过敏原提取液(WA)、过敏原溶液(AS)、过敏原粉(AP)经人血清抗体 IgE 鉴定,其反应均为阳性(图 1)。CI - ELISA 实验发现沸水处理后过敏原溶液与患者特异性血清抗体 IgE 仍具有很强的结合力,这说明 TM 具有很强的热稳定性,热处理后的过敏原仍具免疫原性<sup>[8]</sup>。

用 SDS - PAGE 制备的微量过敏原免疫小鼠,提取到高效价多抗,表明过敏原具有很强的免疫原性(图 3)。CI - ELISA 实验证明,辐照后过敏原溶液(AS)、过敏原粉(AP)及全虾辐照后提取液(RWA)与 IgE 的结合力随着辐照剂量的增加而降低,其中 AS 和 AP 在 10 kGy 时其结合率低于 20 %,RWA 在 10 kGy 时其结合力低于 40 % (图 4)。TM 与多抗 IgG 的结合力随着辐照的剂量增加而降低,AS 在 10 kGy 时结合力低于 20 %,而 AP、RWA 均低于 40 % (图 5),这表明辐照改变了过敏原 TM 的抗原性。分析不同存在状态的过敏原 TM,AS、AP 在辐照剂量为 7 kGy 时,其与人体特异性抗体 IgE 和鼠源多抗 IgG 的结合力均低于 50 %,三者的降低程度顺序为 AS > AP > RWA,分析认为过敏原表现出的这种不同的敏感性是由于水的存在影响了辐照的效应所致。据 Thayer<sup>[9]</sup> 报道,辐照剂量在 10 kGy 及以下,食品的营养成分如蛋白质及脂肪均不发生显著性改变,这说明在安全的辐照剂量下,辐照可降低虾过敏原 TM 的致敏性。

### 参考文献

- [1] 许岩,许红. 食用虾爬子引起过敏性休克 1 例[J]. 沈阳医学院学报,2000,2(2):108.
- [2] 安爱芝,孙月芹. 食坑虾引起过敏性休克 1 例[J]. 医学理论与实践,2003,16(8):87.
- [3] DEAN D M, HUGH A S, RONALD A S. Food Allergy: Adverse reactions to foods and food additives[M]. Second Edition USA

论著

高效液相色谱法测定玉米中的黄曲霉毒素

高秀芬 计融 李燕俊 王玉平

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

**摘要:**目的 建立一种定量检测玉米中黄曲霉毒素的高效液相色谱方法。方法 样品用甲醇-盐酸溶液提取、正己烷脱脂,再经二氯甲烷萃取和硅胶柱净化,最后与 TFA 进行衍生反应,以甲醇-乙腈-水为流动相,C<sub>18</sub>柱分离并通过荧光检测器定量。结果 4 种黄曲霉毒素在 15 min 内得到良好的基线分离,样品中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.04、0.02、0.10 和 0.04 μg/kg。0.10 ~ 50.00 μg/kg AFB<sub>1</sub> 加标回收率为 78.2 % ~ 85.9 %,相对标准偏差为 10 % ~ 16 %;10.00 和 40.00 μg/kg 总黄曲霉毒素加标回收率分别为 86.5 % 和 89.2 %,相对标准偏差分别为 13 % 和 9.2 %。盲样测定结果在给定浓度范围内。结论 该方法灵敏度高、稳定性好、成本低,可以用于玉米中黄曲霉毒素的定量检测,并具有推广应用的前景。

**关键词:**黄曲霉毒素类;色谱法,高压液相;玉米

Determination of Aflatoxins in Corns by High Performance Liquid Chromatography

GAO Xiu-fen, JI Rong, LI Yan-jun, WANG Yur-ping

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** **Objective** A high performance liquid chromatographic method for the quantitative determination of aflatoxins in corns was established. **Methods** The samples were extracted with methanol-hydrochloric acid, defatted with hexane. The extracts were cleaned by liquid-liquid partitioning with dichloromethane and then applied to silica-gel purification column. After reaction with trifluoroacetic acid, four kinds of aflatoxins were quantified by reverse-HPLC with fluorometric detector, using methanol-toluene-water as mobile phase. The baseline separation of four kinds of aflatoxins was achieved within 15 minutes. **Results** The detection limits for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> were 0.04, 0.02, 0.10 and 0.04 μg/kg, respectively. The recoveries of samples spiked with AFB<sub>1</sub> of 0.10 ~ 50.00 μg/kg were 78.2 % ~ 85.9 %, with the relative standard deviations of 10 % ~ 16 %. The recoveries of samples spiked with total aflatoxins of 10.00 and 40.00 μg/kg were 86.5 % and 89.2 %, respectively, with the relative standard deviations of 13 % and 9.2 %, respectively. The detections of a blind sample gave results within the given range of concentration. **Conclusion** This method is highly sensitive, stable with low cost, and can be used to detect aflatoxins in corn quantitatively.

**Key word:** Aflatoxins, Chromatography, High Pressure Liquid; Corn

Blackwell science inc,1997.

[4] NEIL C E O,LEHRER S B. Seafood allergy and allergens:a review: the Institute of Food Technologists [ C ]. Expert Panel Food Satety Nutrition,2000.

[5] BYUN M W, KIM J H. Effects of Gamma Radiation on the Conformational and Antigenic Properties of a Heat-Stable Major Allergen in Brown Shrimp[J]. Food Protect ,2000 ,7 :940 - 944.

[6] LEEJ W, YOOK H S, LEE K H,et al. Conformational changes of myosin by gamma radiation[M]. Radiat Phys Chem , 1999.

[7] 李振兴,林洪,靳晓梅,等. 利用电泳纯化的微量虾类过敏原制备多克隆抗体[J]. 水产学报,2005 ,30 (2) :281-284.

[8] NAGPAL S, RAJAPPA L, METCAEFE D, et al. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (Penaeus indicus) [J]. Allergy Clin Immunol,1989 ,83 (1) :26-36.

[9] THAYER D W. Food irradiation: benfits and concerns [J ]. J Food Qual ,1990 ,13 :147-169.

[收稿日期 :2007 - 02 - 01]

中图分类号 :R15 文献标识码 :A 文章编号 :1004 - 8456(2007)02 - 0102 - 04

基金项目 :“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”课题(2001BA804A3205)

作者简介:高秀芬 女 硕士

通讯作者:计融 男 研究员

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net