

碧根果致敏原 Car i 1 的分离纯化及表征鉴定

罗祺书^{1,2}, 唐宇^{1,2}, 张英^{1,2}, 朱伟超^{1,2}, 赵凯文³, 罗水忠⁴, 吴志华^{1,5*}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学食品学院, 南昌 330031;
3. 南昌理工学院医学院, 南昌 330044; 4. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009;
5. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330031)

摘要: **目的** 分离纯化碧根果致敏原 Car i 1, 并对其结构进行表征鉴定。**方法** 以新鲜碧根果果仁为原料, 通过粉碎、脱脂、浸提、粗分级、凝胶过滤层析, 对碧根果致敏原蛋白 Car i 1 进行分离纯化。结合十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、液相色谱-串联质谱法和免疫印迹法 3 种方法对 Car i 1 进行鉴定, 并通过圆二色谱仪与紫外分光光度计表征其二、三级结构。**结果** 本方法纯化获得碧根果致敏原 Car i 1, 单轮制备量可达 5 mg 以上, 且纯度大于 95%, 蛋白质高级结构未被破坏, 能够被全部 3 名碧根果过敏患者的血清准确识别。**结论** 该纯化方法技术路线简单、设备要求低且单次制备量高, 总得率可达 65%, 操作便捷, 为碧根果致敏原 Car i 1 的相关研究奠定了物质基础。

关键词: 碧根果; 致敏原; Car i 1; 分离纯化; 凝胶过滤层析

Separation, purification, identification and characterization of major allergen Car i 1 from *Carya illinoensis*

LUO Qi-Shu^{1,2}, TANG Yu^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, ZHU Wei-Chao^{1,2}, ZHAO Kai-Wen³,
LUO Shui-Zhong⁴, WU Zhi-Hua^{1,5*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. School of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 3. Nanchang Institute of Technology Medical College, Nanchang 330044, China; 4. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 5. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and purify the allergen Car i 1 from *Carya illinoensis*, and characterize and identify its structure. **Methods** Taking fresh *Carya illinoensis* as raw material, the allergen protein Car i 1 of *Carya illinoensis* was isolated and purified by crushing, degreasing, extraction, rough grading and gel filtration chromatography. Car i 1 was identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoblotting, and its secondary and tertiary structures were characterized by circular dichroism and ultraviolet spectrophotometer. **Results** This method purified the allergen

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFF1104002)、国家自然科学基金项目(32160540)、安徽省科技重大专项(202003a06020025)、江西省教育厅项目(GJJ212121)

Fund: Supported by the Key Research and Development Program of China (2023YFF1104002), the National Natural Science Foundation of China (32160540), the Anhui Province Science and Technology Major Project (202003a06020025), and the Jiangxi Provincial Department of Education Project (GJJ212121)

*通信作者: 吴志华, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: wuzhiahua@ncu.edu.cn

*Corresponding author: WU Zhi-Hua, Professor, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: wuzhiahua@ncu.edu.cn

Car i 1 from *Carya illinoensis*, with a single round preparation amount of over 5 mg and a purity of over 95%. The protein's advanced structure was not damaged and could be accurately recognized by the serum of all 3 *Carya illinoensis* allergy patients. **Conclusion** The purification method has the advantages of simple technical route, low equipment requirements, high single preparation quantity, total rate up to 65%, and convenient operation, which lays a material foundation for the related research of allergen Car i 1 from *Carya illinoensis*.

KEY WORDS: *Carya illinoensis*; allergen; Car i 1; separation and purification; size exclusion chromatography

0 引言

近年来,国内外食物过敏患病率高达总人口的 4.9%,且总体发病率都呈上升趋势^[1]。而绝大部分过敏反应都由包含坚果在内的八大类食物致敏原引起的^[2-3]。据统计,中国坚果(树生)市场规模从 2005 年的 99.9 亿元增长到 2022 年的 450 亿元,其中以碧根果等为代表单品坚果市场规模在 300~400 亿左右,越来越受到消费者青睐^[4]。相关数据显示,2022 年,我国坚果仅电商市场规模就达 48.45 亿元^[5],这使得人们接触到坚果致敏原的机会变得更多,增加了食物过敏风险^[6]。

碧根果(*Carya illinoensis*),属胡桃科山核桃属,又称薄壳山核桃、美国山核桃,原产于北美中部和东部以及墨西哥河谷^[7]。据报道,碧根果富含丰富的蛋白、碳水化合物及多种维生素和矿物质元素^[8]。碧根果中含有多种致敏原蛋白^[9],VENKATACHALAM 等^[10]用一批碧根果过敏患者的血清检测碧根果蛋白提取物时,免疫印迹法观察到在 7~66 kDa 范围内存在多个反应带^[11],其中仅有 3 种致敏原 Car i 1^[12]、Car i 2^[13]和 Car i 4^[14]被鉴定。

Car i 1 属于 2s 白蛋白家族,是碧根果中的主要致敏原之一^[15],SHARMA 等^[12]的研究中收集了 28 名碧根果过敏患者血清,其中有 22 位能识别过敏原蛋白 Car i 1。它是一种小分子蛋白,分子量约为 16~18 kDa,是由一个大亚基和一个小亚基通过二硫键组成的异源二聚体^[12],等电点为 5.16,有较强的热稳定性。其与腰果致敏原 Ana o 3 和核桃致敏原 Jug r 1 两种 2s 白蛋白具有相似的三维结构,为主要由 α -螺旋连接成的环状结构。此外,研究人员在这 3 种 2s 白蛋白之间观察到强免疫球蛋白 E (immunoglobulin E)交叉反应,发现 Car i 1 的两个强反应的表位点与 Jug r 1 和 Ana o 3 已知表位点有显著的顺序重叠^[9]。

SHARMA 等^[12]通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术扩增碧根果的 cDNA,然后将其克隆到表达载体中,将表达载体转化到大肠杆菌中,利用亲和层析技术纯化重组蛋白 Car i 1,并通过重组 Car i 1 的免源多克隆抗体,亲和层析纯化天然 Car i 1,然而其分离的天然 Car i 1 纯度较低,存在明显的杂带,且分离数量也有限,而免抗碧根果 IgG 的抑制实验显示重组 Car i 1 相较天然

Car i 1 有所降低。因此,获取纯化的天然致敏原蛋白能够有效推动对 Car i 1 的深入研究;对碧根果过敏机制的研究,也需要建立简单经济的致敏原蛋白纯化技术体系^[16]。已有报道制备了重组 Car i 1 的免源多克隆抗体,亲和层析纯化天然 Car i 1,其分离的蛋白纯度较低,存在明显的杂带^[12],分离数量也较为有限。

硫酸铵沉淀法可用于从大量粗蛋白中浓缩和部分纯化蛋白质,用此方法可以将主要的免疫球蛋白从样品中分离,是免疫球蛋白分离的常用方法^[17]。凝胶过滤层析(size exclusion chromatography, SEC)法是使用有一定大小孔隙的凝胶作层析介质(如葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),利用凝胶颗粒对分子量和形状不同的物质进行分离的层析技术。这两种方法需要的设备简单,操作较为方便,耗时较短,通过这两种方法适当组合,有望分离纯化获得 Car i 1 蛋白。

鉴于此,本研究将碧根果仁经粉碎、脱脂后提取粗蛋白,再经硫酸铵分级沉淀,采用凝胶过滤层析纯化了碧根果致敏原蛋白 Car i 1,利用质谱和免疫印迹鉴定,并对其高级结构进行表征,旨在建立一种操作便捷、设备要求低且单次制备量高的 Car i 1 分离纯化方法,为后续关于碧根果致敏原蛋白 Car i 1 的构效关系和脱敏加工研究提供了物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

碧根果坚果仁市购(原产地南非);碧根果过敏患者血清购于重庆曼纽艾克科技有限公司。

Sephadex G-50 Medium 凝胶层析柱(70 cm×2.6 cm,北京百瑞极公司);蛋白质印迹法(western blot, WB)快速封闭液(天津迈基生物有限公司);生物素化羊抗人 IgE 二抗(美国 Bio-Rad 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-酶标亲和素(欣博盛生物科技有限公司);其他常用生化试剂(分析纯,北京 Solarbio 公司)。

1.2 仪器

FDV 型超细粉碎机(台湾佑琦公司);Centrifuge 5810 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);PHS-3C pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);蛋白质分离纯化系统(包括

HD-1 核酸蛋白检测仪、SB6-100 自动收集器、HD-A 电脑采集器、HL-1 恒流泵, 上海青浦沪西仪器厂); PowerPac 电泳仪、EPS-601 GE Healthcare 电转仪、ChemiDoc 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); SpectraMax M2 酶标仪、SpeedVac 真空浓缩仪、Easy-nLC1200 色谱系统、Q-exactive HF-X 质谱仪(美国 Thermo 公司); MOS-450/AF-CD 圆二色谱仪(法国 Biologic 公司); UV WinLab 紫外分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 研磨脱脂

参考唐宇等^[18]的方法, 将从市场购买的碧根果仁用超细粉碎机加液氮磨碎后过 100 目筛, 磨碎的碧根果仁与石油醚溶液按 1:10 (*m/V*)混合, 磁力搅拌脱脂 2 h 后, 用真空抽滤装置进行固液分离, 弃去液体, 沉淀反复脱脂 2 次, 通风橱自然风干 24 h 后得碧根果脱脂粉。

1.3.2 蛋白浸提

参考 PASTORELLO 等^[19]的方法并略加修改, 将碧根果脱脂粉与磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)溶液(0.02 mol/L, pH 6.8 将 1.59 g Na₂HPO₄·12H₂O 3.51 g NaH₂PO₄·2H₂O 粉末加 900 mL 去离子水, 调 pH 至 6.8 后定容至 1 L)按 1:10 (*m/V*)混合, 4°C 磁力搅拌 2 h 后, 3824 r/min, 4°C 离心 30 min, 收集上清液, 沉淀重复浸提 2 次, -20°C 冻存备用。

1.3.3 硫酸铵沉淀

参考李晓彤等^[17]的方法并进行修改, 量取 10 mL 蛋白溶液, 对照硫酸铵饱和度表, 分别加入硫酸铵粉末至 20%饱和度、40%饱和度、60%饱和度、80%饱和度, 静置 1 h, 6000 r/min 离心 20 min 后收集沉淀; 沉淀分别使用 PBS 溶解。所得上清液与沉淀复溶溶液均置于透析袋中在 4°C 下对其进行透析除盐。

1.3.4 凝胶过滤层析

参考 LIU 等^[20]的方法采用葡萄糖凝胶 Sephadex G-50 Medium[分离范围: 肽及球形蛋白质: 1500~30000 Da; 葡聚糖(线性分子): 500~10000 Da]进行分离纯化, 平衡缓冲液为 pH 6.8, 0.05 mol/L 的 PBS, 洗脱液为含 0.15 mol/L NaCl 的平衡缓冲液, 流速为 0.2 mL/min, 柱长 60 cm, 上样量 7%柱体积, 紫外吸收法 A 280 nm 检测蛋白质, 收集各洗脱峰组分。

1.3.5 蛋白电泳

采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对蛋白进行纯度鉴定^[21]。使用 4%浓缩胶和 12%分离胶, 提取的蛋白稀释至 2 mg/mL, 过柱收集的样品不经稀释, 样品与 5×非还原上样缓冲液 4:1 (*V/V*)混合, 100°C 金属浴加热 5 min。电泳结束后, 经染色、脱色, 对

电泳凝胶进行图像采集并利用 Quantity one 软件进行灰度扫描分析蛋白纯度。

1.3.6 质谱鉴定

将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色, 切下目的蛋白条带^[22], 用水、50%乙腈和 100%乙腈中的 50 mmol/L NH₄HCO₃ 依次洗涤。用 10 mmol/L 三(2-羧乙基)膦[Tris (2-carboxyethyl) phosphine, TCEP]在 100 mmol/L NH₄HCO₃ 中室温还原 30 min, 用 55 mmol/L 碘乙酰胺在 100 mmol/L NH₄HCO₃ 中, 避光条件下进行烷基化 30 min。之后, 用 100 mmol/L NH₄HCO₃ 和 100%乙腈洗涤凝胶片, 然后用真空浓缩仪干燥。最后, 用 12.5 ng/μL 胰蛋白酶在 50 mmol/L NH₄HCO₃ 中于 37°C 下消化 16 h, 用 50%乙腈/5%甲酸提取 2 次, 用真空浓缩仪干燥。样品用 0.1%甲酸重构, 用 MonoSpin™ C₁₈ 色谱柱(1.5 mm×10 μm, 200 Å)脱盐, 然后用真空浓缩仪干燥。

液相色谱条件: 缓冲液 A 为 0.1%甲酸水溶液, 缓冲液 B 为 0.1%甲酸-80%乙腈。实验时, 分析柱温度设置为 55°C。肽段分离的流动相和洗脱梯度为: 0.1%, 0~1 min, B 液线性梯度 2%~10%; 1~81 min, B 液线性梯度 10%~35%; 81~96 min, B 液线性梯度 35%~60%; 96~111 min, B 液线性梯度 60%~100%, 111~120 min; B 液线性梯度 100%, 流速设为 300 nL/min。

质谱条件: 使用 Q Exactive Orbitrap 质谱仪(串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)进行分析。全扫描分辨率设置为 70000, 自动增益控制(automatic gain control, AGC)目标为 3e⁶。MS/MS 扫描分辨率设置为 17500, 隔离窗为 1.8 *m/z*, AGC 目标为 5e⁵。MS 和 MS/MS 扫描的微扫描次数均为 1 次, 最大离子注入时间分别为 50 ms 和 100 ms。每次全扫描后采集 20 个最高强度母离子的二级质谱图谱对肽段二级质谱进行分析; MS 扫描功能和液相色谱溶剂梯度由 Xcalibur 数据系统控制。

1.3.7 血清学鉴定

采用 WB 进行, 参考闵芳芳^[23]的方法并部分修改。纯化的 Car i 1 蛋白经三羟甲基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(tricine-SDS-PAGE)电泳分离后, 通过转膜仪转移至硝化纤维(nitrocellulose, NC)膜上, 转膜条件为 100 V, 400 mA, 60 min。转膜结束后用 WB 快速封闭液封阻 30 min, 加入 1:80 (*V/V*)稀释的碧根果过敏患者的血清, 4°C 孵育 12 h; 含 0.1%吐温-20 的 PBS 洗膜之后加入 1:5000 (*V/V*)稀释的生物素化羊抗人二抗, 室温孵育 1 h; TBST 洗膜后加入 1:60 (*V/V*)稀释的 HRP-酶标亲和素, 室温孵育 1 h, 洗膜后加增强型化学发光剂显色成像即可。所有孵育过程均在摇床上进行。

1.3.8 致敏原结构的表征

参考一个 WU 等^[24]的方法, 将纯化的蛋白用圆二色谱仪检测其二级结构。在氮气吹扫的条件下, 测定条

件为: 扫描波长范围 190~240 nm, 蛋白样品质量浓度为 0.2 mg/mL, 平均扫描速度为 60 nm/min, 比色皿光径为 1 mm, 宽带为 1 nm。结果通过圆二色谱在线分析软件 (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>) 对最终结果进行分析转换, 得到样品的蛋白二级结构各成分单元的含量。

参照 ZHANG 等^[25]的方法, 将纯化的蛋白用 UV WinLab 紫外分光光度计检测其三级结构。测定条件为: 扫描波长范围为 250~360 nm, 比色皿光径为 1 cm, 设置扫描速度为 100 nm/min, 光谱宽带为 2.0 nm, 响应时间为 0.2 s, 波长间隔为 1.0 nm, 蛋白样品质量浓度为 0.2 mg/mL, 体积为 1 mL。

1.3.9 蛋白定量及得率计算

参照李娟等^[26]的方法并进行部分修改, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 以牛血清白蛋白为标准, 作浓度工作曲线, 确定蛋白样品浓度。浓度乘以对应溶液的体积, 即得到粗蛋白/纯蛋白的数量, 用于计算 Car i 1 蛋白的得率, 计算如公式(1)。

$$\text{得率}/\% = \frac{\text{纯化得到的Car i 1的量}}{\text{上样的蛋白中Car i 1的总量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 数据处理

每次实验做 3 次平行, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件(IBM SPSS Statistics 26), 数据作图采用 Origin 软件(2018 64Bit)以及 WPS 2023 进行处理。电泳图与 WB 结果图使用 Image Lab 图像获取和分析软件进行处理。

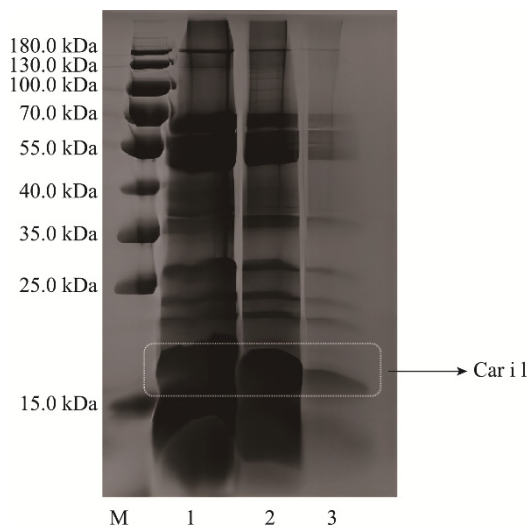
2 结果与分析

2.1 粗蛋白的浸提

如图 1 所示, 使用 pH 为 6.8 的 0.02 mol/L PBS, 按照碧根果脱脂粉:溶液=1:10 (m/V)的比例在 4℃进行浸提 2 h, 6000 r/min 离心 20 min, 取上清即为蛋白粗提溶液。使用考马斯亮蓝法对蛋白浓度进行测定, 其中使用 PBS 第 1 次提取的粗蛋白质量浓度为 18.2 mg/mL, 第 2 次提取的粗蛋白质量浓度在 8.5 mg/mL, 第 3 次提取的粗蛋白质量浓度仅为 0.7 mg/mL。虽然各组获得的蛋白没有明显的组分差别, 但提取次数达到第 3 次时, 粗提蛋白浓度显著下降, 包括目的蛋白 Car i 1 的含量也很低, 因此选取前两次提取的粗蛋白溶液合并进行后续实验。

2.2 硫酸铵沉淀分离

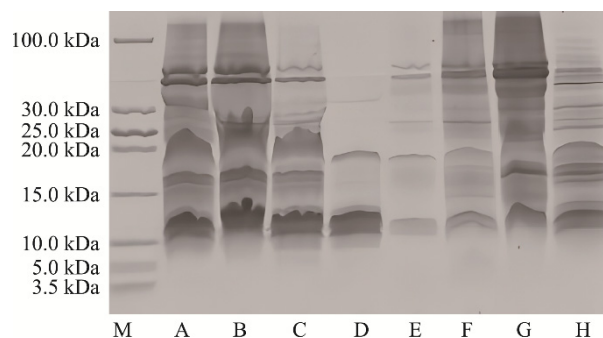
量取 10 mL 粗蛋白溶液, 分别加入硫酸铵粉末至 20% 饱和度、40%饱和度、60%饱和度、80%饱和度, 静置 1 h, 6000 r/min 离心 20 min 后收集沉淀; 4 次沉淀也分别用 PBS 溶解, 电泳分析各组分蛋白组成。如图 2 所示, 泳道 D 中的杂蛋白条带较少, 经灰度扫描分析, 目标条带(17 kD)占比约 14.6%, 且目标蛋白与杂蛋白的分子量差别达到 8 kDa 以上, 可以选用凝胶过滤层析对样品 D 进行进一步的分离, 纯化 Car i 1。



注: M: Maker; 1: PBS 首次浸提液; 2: PBS 第 2 次浸提液; 3: PBS 第 3 次浸提液。

图 1 碧根果粗体蛋白 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE diagram of crude protein extracted from *Carya illinoensis*



注: M: Maker; A: 20%硫酸铵沉淀上清液; B: 40%硫酸铵沉淀上清液; C: 60%硫酸铵沉淀上清液; D: 80%硫酸铵沉淀上清液; E: 20%硫酸铵沉淀复溶溶液; F: 40%硫酸铵沉淀复溶溶液; G: 60%硫酸铵沉淀复溶溶液; H: 80%硫酸铵沉淀复溶溶液。

图 2 碧根果粗蛋白硫酸铵沉淀 SDS-PAGE 图

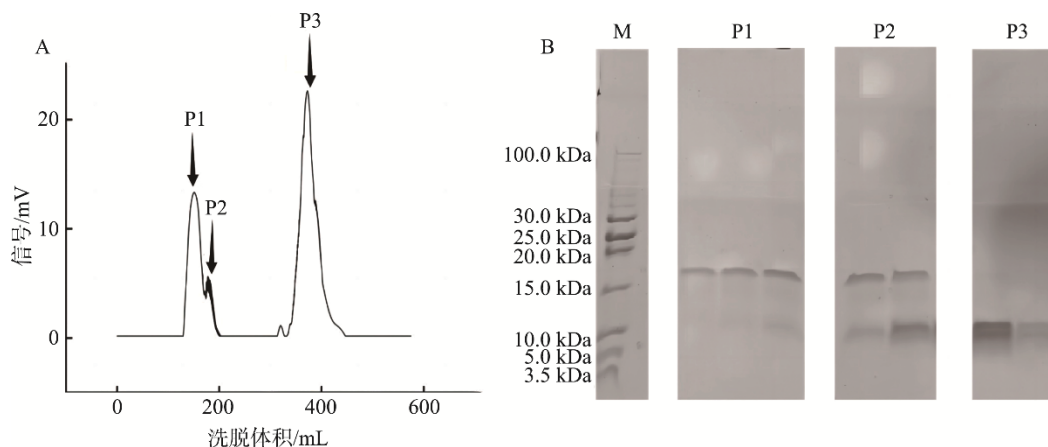
Fig.2 SDS-PAGE diagram of crude protein of *Carya illinoensis* ammonium sulfate precipitation

2.3 致敏原 Car i 1 的纯化

本研究首次尝试硫酸铵分级后, 采用凝胶过滤层析法分离纯化致敏原蛋白 Car i 1, 获得了数量较大, 纯度较高的蛋白。如图 3 所示, 在峰 1 (P1) 中含大量高纯度的致敏原蛋白 Car i 1, 由于使用样品中 Car i 1 分子量最高, 所以最先被洗脱下来^[27]。将峰 1 处收集到的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 可见峰 1 收集到的蛋白电泳结果无明显杂带, 灰度扫描显示, Car i 1 的纯度可达 96.1%。

2.4 致敏原 Car i 1 的质谱鉴定

纯化后的蛋白经电泳、染色, 再用胰蛋白酶进行胶内酶解后使用 MS/MS 进行分析, 得到的肽段信息见表 1。



注: A: 凝胶过滤层析曲线; B: 凝胶过滤层析各峰顶收集液的 SDS-PAGE 电泳图; M: Maker, P1、P2、P3 分别对应凝胶过滤层析曲线图中出现的峰 1, 峰 2, 峰 3。

图 3 凝胶过滤层析分离碧根果致敏原 Car i 1

Fig.3 *Carya illinoensis* allergen Car i 1 extract on size exclusion chromatography

表 1 碧根果致敏原 Car i 1 检测肽段

Table 1 Identification of peptides in *Carya illinoensis* allergen Car i 1 by mass spectrometry

起始位点	终止位点	肽段序列	肽段预测质量/Da
50	56	QQYLNR	821.42
56	62	CQDYLR	854.38
81	100	QCCQQLSQMEEQCQCEGLR	2487.97
104	113	QQQEEGIR	1115.54
104	129	QQQEEGIRGEEMEEMVQCASDLPK	2981.29
113	129	GEEMEEMVQCASDLPK	1884.76
129	136	ECGISSR	808.36

质谱共检测到 7 条 Car i 1 的特征肽段, 与文献中报道的 Car i 1 可能有的 7 个胰蛋白酶切肽段一致^[9], 除信号肽外检测出的肽段覆盖率为 44.05%, 质谱结果认定该蛋白为碧根果致敏原 Car i 1。

2.5 致敏原 Car i 1 的血清识别鉴定

作为一种可靠、经济且高效的蛋白质分析方法, 免疫印迹广泛应用于蛋白质的特异性识别和水平的表征^[28]。利用碧根果过敏患者的血清, 对碧根果粗提蛋白、80%硫酸铵沉淀上清液中蛋白和纯化的目标蛋白进行免疫印迹检测, 结果如图 4 所示。粗蛋白泳道、硫酸铵沉淀上清液泳道和纯化的目标蛋白泳道均有显色, 且 3 个泳道都能看到 Car i 1 对 3 位碧根果过敏患者血清及坚果蛋白血清池都有较强的反应, 说明本研究分离得到的确为碧根果致敏原, 且蛋白 Car i 1 免疫活性保持良好。在纯化蛋白泳道上, 仅见血清对 Car i 1 的识别, 硫酸铵分级组中尚有一条 55 kDa 左右的条带也被部分血清识别, 可能是 Car i 2 或 Car i 4^[13-14], 仍需进一步地深入研究确认, 但纯化后被去除。血清池识

别中, 这个 55 kDa 的条带呈阴性, 而 Car i 1 条带则呈阳性。由此结果推测, Car i 1 不仅是碧根果的主要致敏原, 还可能与其他坚果过敏发生交叉反应。

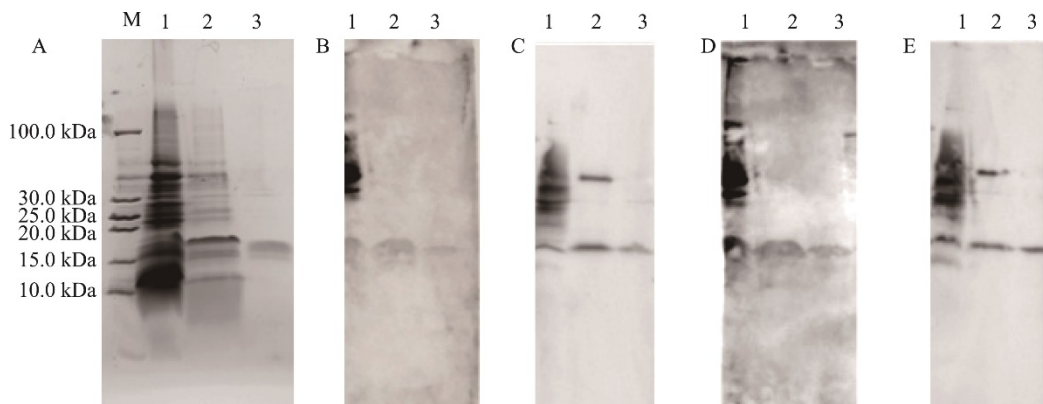
2.6 致敏原 Car i 1 的结构表征

将纯化的碧根果致敏原蛋白 Car i 1 用圆二色谱仪检测其二级结构, 用紫外分光光度计检测其三级结构, 得到的扫描结果如图 5 所示。圆二色谱(circular dichroism, CD)光谱在远紫外区具有肽键吸收信号, 并能反映蛋白质特征二级结构的含量^[29-30]。从图 5 中可以看出, 致敏原蛋白 Car i 1 在 193 nm 处有最大吸收峰, 222 nm (α -螺旋肽键的 $n-\pi^*$ 跃迁)处有一个负的特征肩峰谱带, 表明蛋白质中明显存在 α -螺旋结构。通过圆二色谱在线软件分析, 结果显示 α -螺旋含量占 24.3%, β -折叠含量占 28.4%, β -转角含量占 9.3%, 无规卷曲含量占 38.0%, 这与报道中 2s 白蛋白家族共有的特征相符^[31]。

蛋白质在近紫外处的吸收主要与酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸和二硫键有关^[29], 通过紫外检测可以看出在

250~280 nm 附近有较大吸收峰, 与报道中 Jug r 1^[32]及 Ana o 3^[33]相似, 这与报道中这 3 种蛋白具有一定的结构相似性的结论相符^[12]。由于芳香氨基酸残基的侧链的谱峰常因微区特征的不同而改变, 芳香族氨基酸残基的侧链之间及其和二

硫键的谱峰均可能会产生重叠^[34]。已有研究表明 Car i 1 是由大亚基与小亚基通过二硫键连接组成的异源二聚体^[12], 这可能对 250~280 nm 的吸收峰产生影响, 故而无法在该处看见明显的酪氨酸与色氨酸的特征吸收峰。



注: A: 电泳图; B: 坚果过敏患者血清池血清免疫印迹图; C~E 分别为 3 位碧根果过敏患者血清免疫印迹图; M: 标准蛋白 Maker; 1: 碧根果蛋白粗提物; 2: 碧根果蛋白 80%硫酸铵沉淀上清液; 3: 纯化的 Car i 1。

图 4 碧根果致敏原 Car i 1 的 Western blotting 分析

Fig.4 Western blotting analysis of *Carya illinoensis* allergen Car i 1

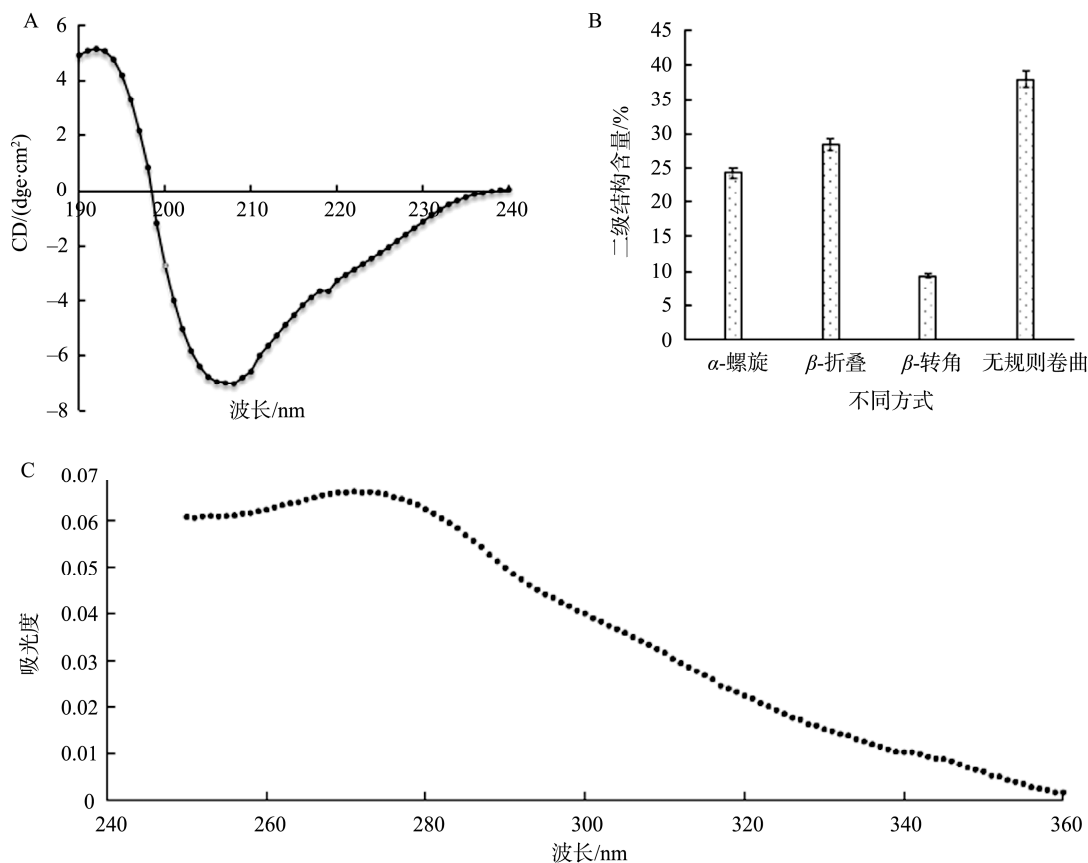


图 5 碧根果致敏原 Car i 1 的 CD 光谱图(A)、结构单元组分图(B)与紫外光谱图(C)

Fig.5 CD spectra (A), structural unit composition (B) and ultraviolet spectrum (C) of the *Carya illinoensis* allergen Car i 1

2.7 碧根果致敏原 Car i 1 的得率及产率计算

已有报道^[9]和实际提取结果都显示,碧根果致敏原蛋白 Car i 1 的含量约占其总蛋白的 2%。本研究中,100 g 碧根果干果中可以得到约 35 g 碧根果脱脂粉,每 10 g 碧根果脱脂粉能制备约 33 mg 目的蛋白 Car i 1,总得率约为 65%。在凝胶过滤层析法分离纯化过程中,每次上样 80%硫酸铵分级上清液 5 mL(蛋白质量浓度为 9.6 mg/mL),可纯化获得 Car i 1 蛋白 5 mg,能够实现致敏原蛋白的高效制备。

3 结 论

以碧根果仁为原料,分离纯化可得到纯度约 95%的天然碧根果致敏原蛋白 Car i 1,总得率为 65%,单次实现 5 mg 左右致敏原蛋白 Car i 1 的制备。纯化的蛋白保持自身高级结构,能够被全部 3 位碧根果过敏患者的血清准确识别。本方法纯化 Car i 1 的技术路线简单、对设备要求低且制备量大,为进一步研究碧根果致敏原 Car i 1 的结构和功能奠定了物质基础。

参考文献

- [1] SICHERER SH, SAMPSON HA. Food allergy: Recent advances in pathophysiology and treatment [J]. *Annual Rev Med*, 2009, 60: 261–277.
- [2] 傅玲琳,王彦波. 食物过敏:从致敏机理到控制策略[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 1–19.
FU LL, WANG YB. Food allergy: From allergenic mechanism to control strategy [J]. *Food Sci*, 2021, 42(19): 1–19.
- [3] TISON K, PROCTOR K, ESTREM H, et al. Systematic development of a patient-centered outcomes measure to assess the psychosocial impact of food allergy in routine clinical practice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(2): AB100.
- [4] 刘文裕. 我国中西部坚果市场分析--以红瓜子为例[J]. *全国流通经济*, 2021, (13): 3–5.
LIU WY. Analysis of the nut market in central and western China—A case study of red melon seeds [J]. *Nat Circulat Econ*, 2021, (13): 3–5.
- [5] 朱美乔. 我国坚果产业发展势头强劲[N]. 2023-07-11.
ZHU MQ. Strong momentum in the development of China's Nut Industry [N]. 2023-07-11.
- [6] YANG WK, KIM DS, SON E, et al. Reduction of allergy effects of peanut sprout extract in a systemic anaphylaxis food allergy mouse model [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2021, 62(4): 637–647.
- [7] 吉钦,潘利华,李贺兴,等. 红外预处理对低温压榨碧根果油品质及贮藏稳定性的影响[J]. *食品科学*: 1–10. [2024-02-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=>
JI Q, PAN LH, LI HX, et al. The impact of infrared pretreatment on the quality and storage stability of low-temperature pressed macadamia nut oil [J]. *Food Sci*: 1–10. [2024-02-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=>
- [8] 黄梅,姚小华,杨水平,等. 不同时间真空贮藏对薄壳山核桃品质的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2022, 40(3): 458–64.
HUANG M, YAO XH, YANG SP, et al. The effect of different duration vacuum storage on the quality of thin shell walnuts [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2022, 40(3): 458–464.
- [9] CLERMONT K, GRAHAM CJ, LLOYD SW, et al. Proteomic analysis of pecan (*Carya illinoensis*) nut development [J]. *Foods*, 2023, 12(4): 866.
- [10] VENKATACHALAM M, TEUBER SS, PETERSON WR, et al. Antigenic stability of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] proteins: Effects of thermal treatments and *in vitro* digestion [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(4): 1449–1458.
- [11] MALANIN K, LUNDBERG M, JOHANSSON S. Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut [J]. *Allergy*, 1995, 50(12): 988–991.
- [12] SHARMA GM, IRSIGLER A, DHANARAJAN P, et al. Cloning and characterization of 2S albumin, Car i 1, a major allergen in pecan [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(8): 4130–4139.
- [13] ZHANG Y, LEE B, DU WX, et al. Identification and characterization of a new pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] allergen, Car i 2 [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(20): 4146–4151.
- [14] SHARMA GM, IRSIGLER A, DHANARAJAN P, et al. Cloning and characterization of an 11S legumin, Car i 4, a major allergen in pecan [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(17): 9542–9452.
- [15] MORALES-AMPARANO MB, VALENZUELA-CORRAL A, MONTFORT GRC, et al. Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen [J]. *J Proteom*, 2021, 248: 104348.
- [16] JIAO Y, ZHANG J, PAN C. Integrated physiological, proteomic, and metabolomic analyses of pecan cultivar 'Pawnee' adaptation to salt stress [J]. *Sci Reports*, 2022, 12(1): 1841.
- [17] 李晓彤,徐兵洁,张进,等. 帕米尔牦牛乳蛋白分离及 α -乳白蛋白纯化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(14): 188–194.
LI XT, XU BJ, ZHANG J, et al. Separation and α -lactalbumin purification study of pamiir yak milk proteins [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(14): 188–194.
- [18] 唐宇,徐骥远,张英,等. 巴西坚果过敏原 Ber e 1 的分离纯化及表征鉴定[J]. *食品科学*, 2022, 43(18): 286–291.
TANG Y, XU JY, ZHANG Y, et al. Isolation, purification, and characterization of the allergen Ber e 1 from Brazil nuts [J]. *Food Sci*, 2022, 43(18): 286–291.
- [19] PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, et al. Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102(6): 1021–1027.
- [20] LIU MH, LIU F, NG TB, et al. New fungal protein from *Pleurotus ferulae* lanzi induces AMPK-mediated autophagy and G1-phase cell cycle arrest in A549 lung cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 244: 125453.
- [21] 王俊娟,李欣芮,陈成,等. 花生主要过敏原 Ara h 1 线性 B 细胞表位的预测及鉴定[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 106–112.
WANG JJ, LI XR, CHEN C, et al. Prediction and identification of linear B-Cell epitopes of the major peanut allergen Ara h 1 [J]. *Food Sci*, 2021, 42(17): 106–112.
- [22] 王成宾,胡晓飞,孙亚宁,等. 花生致敏蛋白及其检测方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(18): 292–299.
WANG CB, HU XF, SUN YN, et al. Research progress on peanut allergenic proteins and their detection methods [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(18): 292–299.
- [23] 闵芳芳. 基于表位含量和 Caco-2 细胞模型评价新疆小麦的致乳糜泻毒性[D]. 南昌:南昌大学,2019.

- MIN FF. Evaluation of gluten toxicity in Xinjiang wheat based on epitope content and Caco-2 cell model [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [24] WU Z, LIAN J, ZHAO R, *et al.* Ara h 2 cross-linking catalyzed by MTGase decreases its allergenicity [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3): 1195–1203.
- [25] ZHANG Y, WU Z, LI K, *et al.* Allergenicity assessment on thermally processed peanut influenced by extraction and assessment methods [J]. *Food Chem*, 2019, 281: 130–139.
- [26] 李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. *中国生物制品学杂志*, 2000, 13(2): 118–120.
LI J, ZHANG YT, ZENG W, *et al.* Determination of total protein content using coomassie brilliant blue method [J]. *Chin J Biol Prod*, 2000, 13(2): 118–120.
- [27] 杨艳, 于宁, 康文瀚, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白分离纯化方法优化及IgG结合能力分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(19): 6377–6384.
YANG Y, YU N, KANG WH, *et al.* The optimization of isolation and purification methods for beta-lactoglobulin, a milk allergen, and analysis of its IgG binding capacity [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(19): 6377–6384.
- [28] SANDERS BJ, KIM DC, DUNN RC. Recent advances in microscale western blotting [J]. *Anal Methods*, 2016, 8(39): 7002–7013.
- [29] 黄汉昌, 姜招峰, 朱宏吉. 紫外圆二色光谱预测蛋白质结构的研究方法[J]. *化学通报*, 2007, (7): 501–506.
HUANG HC, JIANG ZF, ZHU HJ. Study on the prediction of protein structure by ultraviolet circular dichroism spectroscopy [J]. *Chem Bull*, 2007, (7): 501–506.
- [30] WALLACE BA, JANES RW, MILES A, *et al.* Tools and resources for circular dichroism spectroscopy [J]. *Biophys J*, 2020, 118(3): 470a.
- [31] DRESKIN SC, KOPPELMAN SJ, ANDORF S, *et al.* The importance of the 2S albumins for allergenicity and cross-reactivity of peanuts, tree nuts, and sesame seeds [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(4): 1154–1163.
- [32] GUO X, JIANG S, LI X, *et al.* Sequence analysis of digestion-resistant peptides may be an efficient strategy for studying the linear epitopes of Jug r 1, the major walnut allergen [J]. *Food Chem*, 2020, 322: 126711.
- [33] 肖志文, 胡帅, 金雪玲, 等. 腰果过敏原 Ana o 3 蛋白的分离纯化及热稳定性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(6): 71–80.
XIAO ZW, HU S, JIN XL, *et al.* Isolation, purification, and thermal stability study of cashew allergen Ana o 3 protein [J]. *J Food Sci Technol*, 2022, 40(6): 71–80.
- [34] 冯永君, 张长铠, 陈雅丽, 等. 火菇素的圆二色性与溶液二级结构[J]. *化学学报*, 2000, 58(7): 816.
FENG YJ, ZHANG CK, CHEN YL, *et al.* Circular dichroism and solution secondary structure of firefly luciferin [J]. *Acta Chim Sin*, 2000, 58(7): 816.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



罗祺书, 硕士研究生, 主要研究方向为生物与医药。

E-mail: yihai104070030@163.com



吴志华, 教授, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: wuzhihua@ncu.edu.cn