

# 热蒸加工对大菱鲆过敏原免疫原性的影响

李振兴, 黄榕芳, 吴玟静, 林洪\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

**摘要:** **目的** 研究热蒸加工方式对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)过敏原免疫原性的影响。**方法** 利用热蒸处理对大菱鲆鱼肉进行了不同时间的加工, 利用 SDS-PAGE 测定大菱鲆蛋白质组分和蛋白质含量的变化, 并采用免疫印迹和间接 ELISA 分析热蒸加工对过敏原免疫原性的影响。**结果** 大菱鲆经过热蒸加工后, 其肌肉组分中分子量在 40~65 kDa 的蛋白有很大程度地降解, 而分子量在 10~12 kDa 的蛋白组分有增加的现象。免疫印迹的结果表明热蒸后的大菱鲆蛋白质组分与血清 IgE 特异性结合的能力减弱, 但与兔源小清蛋白抗体有强烈地反应, 特别是在分子量 18 kDa 的位置出现了一条能够与人血清 IgE 结合的蛋白质, 有可能是新的过敏原组分。**结论** 热蒸加工可以降低大菱鲆过敏原的免疫活性, 但在加工过程中可能有新的过敏原条带产生, 在进行过敏原检测时有必要考虑加工方式对过敏原结构和活性的影响, 以便得到更可靠的结果。

**关键词:** 大菱鲆; 过敏原; 热蒸; 免疫原性

## Effects of steam processing on allergen immunogenicity of *Scophthalmus maximus*

LI Zhen-Xing, HUANG Rong-Fang, WU Wen-Jing, LIN Hong\*

(Food Science and Engineering College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the effects of the steam processing on allergen immunogenicity of *Scophthalmus maximus*. **Methods** The composition and content of *Scophthalmus maximus* after steam processing for different periods were detected by SDS-PAGE, and the changes of the immunological activity of allergen protein were detected by Western-blot and indirect ELISA. **Results** The muscle component of *Scophthalmus maximus* after steam process appeared a high degree of degradation of proteins with the molecular weight of 40~65 kDa while an increase of proteins with the molecular weight of 10~12 kDa. The Western blot results showed that the capacity of the proteins of *Scophthalmus maximus* after steam processed to response specifically to serum IgE was not as strong as before, but showed a strong reaction to parvalbumin antibodies. What's more, a protein with a molecular weight of 18 kDa, a new potential allergen component, showed up, which could combine with human serum IgE. **Conclusion** The results showed that steam processing could decrease the immune activities of fish allergen proteins. However, new allergy proteins were produced in the process. Therefore it is necessary to take account of the effects of processing on the structure and activity of the allergy proteins during detection in order to obtain more reliable results.

**KEY WORDS:** *Scophthalmus maximus*; allergen; steam; immunogenicity

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD28B05)

\*通讯作者: 林洪, 博士, 教授, 研究领域: 水产品安全与质量控制。Email: linhong@ouc.edu.cn

## 1 引言

研究表明,食物过敏原在加工过程中会发生变性、聚合和化学修饰等一系列变化,而这些变化能够影响其引发过敏反应的能力,表现为与血清特异性IgE结合能力的变化<sup>[1~3]</sup>。这些变化多种多样,比如经焙烤或油炸的花生过敏原其IgE结合能力显著增强<sup>[4]</sup>,而高压加热却可以降低花生过敏原的免疫原性<sup>[5]</sup>。随着人们对过敏原认识的深入,在日常生活中尽可能避免摄入过敏原从而减轻过敏疾病的危害成为大家的共识,这要求有准确可靠的检测方法,但目前的检测方法基本上是针对未加工的食品<sup>[6]</sup>。由于加工过程中过敏原的变化导致假阳性和假阴性的检测结果时常出现,因此有必要对加工后过敏原免疫原性的变化情况进行研究,为进一步开发准确可靠的过敏原检测方法提供基础数据。

食品加工的方式主要分为热蒸加工和非热蒸加工两类,在我们日常生活中,热蒸加工是最常见的加工手段,是我国传统的食品加工方式,其产品具有营养损失少,口感好等特点。因此,本研究以我国养殖量大、营养丰富的高端水产品——大菱鲆为研究对象,研究热蒸加工方式对其过敏原免疫原性的影响,一方面明确热蒸对大菱鲆过敏原免疫原性的影响,为开发低过敏性的水产食品提供技术支持,另一方面探讨热蒸后的大菱鲆过敏原与IgE结合能力的变化,为提高鱼类过敏原检测方法的准确性和可靠性提供技术支持。

## 2 仪器与试剂

### 2.1 实验仪器

HP Scanjet G4050型平板扫描仪(美国惠普公司);电泳仪DYY-7C(北京市六一仪器厂);酶标仪(RS-232C, Thermo LabSystems);冷冻离心机(BR4i, 法国Jouan);恒温孵育箱(WGP-350, 上海安亭科技仪器厂);冷冻干燥机(FD1, Heto);DYCZ-40A半干转印仪(北京六一仪器厂);TU1810型紫外可见分光光度计(北京普析仪器有限公司);Tanon180凝胶成像系统(上海天能有限公司)。

### 2.2 主要材料与试剂

大菱鲆(活品,购于青岛利群超市);0.45 μm PVDF膜(Millipore公司);阳性血清取自青岛大学医

学院附属医院,分装存于-80℃超低温冰箱;HRP-羊抗人IgE(KPL公司);丙酮(烟台市双双化工有限公司);DTT(二硫苏糖醇)(Solarbit);Tris碱(青岛福林生物化学有限公司);吐温-20(天津市大茂化学试剂厂);SDS(十二烷基磺酸钠,山东爱博科技贸易有限公司);双丙烯酰胺(济南爱博经贸有限公司);过硫酸铵(济南爱博经贸有限公司);2-巯基乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司);四甲基二乙胺(TEMED)(AMRESCO);Pierce ECL蛋白印迹底物(Thermo Scientific),以上试剂如果没有特别说明,均为分析纯级试剂。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 大菱鲆鱼肉的热蒸加工

将大菱鲆进行“三去”处理后,取背部肌肉6份,每份约50g,将其中一份冷藏备用,其他5份分别放入清洁干燥的容器中。向蒸锅中加入适量的水,在电磁炉中加热至沸腾。将鱼肉放在带孔的隔板上,同时放入蒸锅中,分别在5min、10min、15min、20min、30min后,取出鱼肉,并迅速冷却至室温,放在4℃冰箱中备用。

#### 2.3.2 大菱鲆肉蛋白质组分的分析

将处理后的5组样品和未处理的样品分别称重,按1:2(w/v)的比例加入Tris-Gly(pH 8.3)+0.05%的DTT抽提液,2000 r/min组织捣碎机匀浆后,于4℃条件下振荡抽提12h,9000 r/min离心15min,收集上清液,过滤除去悬浮于溶液上层的油脂,4℃保存。所得沉淀重复抽提5h后,采用同样的方法处理,将上清液与第一批上清液合并,于4℃条件下在双蒸水中透析24h,采用Bradford法测定蛋白质浓度,分装保存于-40℃冰箱中备用。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法对处理后的大菱鲆进行蛋白质组分分析,浓缩胶浓度为5%(w/v),分离胶浓度为15%(w/v),蛋白样品浓度为1mg/mL,加样品缓冲液后沸水浴5min。电泳结束后取下凝胶用考马斯亮蓝R-250染色,脱色后采用凝胶成像仪采集图像,并进行分析。

#### 2.3.3 免疫印迹法分析热蒸加工对大菱鲆过敏原与过敏患者血清特异性IgE/小清蛋白抗体结合能力的影响

参照张轶群等<sup>[7]</sup>的方法并略有改进,处理后的大菱鲆样品过SDS-PAGE后,采用半干转印仪,恒流30mA转印3h,将凝胶上的蛋白条带转移到PVDF膜上。转移完毕后,用丽春红S对PVDF膜进行染色,

检测蛋白条带是否转移成功,采用PBST脱色。将膜浸泡在封闭液(5%牛血清白蛋白/PBST)中2h,然后用PBST洗涤3次,每次5min,下面的洗涤方法相同。一抗采用过敏患者血清特异性IgE(1:10)/兔源小清蛋白抗体(1:10000),室温下过夜孵育后洗涤,二抗采用HRP标记的羊抗人IgE(1:2000)/HRP标记的羊抗兔IgG(1:2000),37℃孵育1h后,洗涤,然后将PVDF膜浸没在ECL蛋白印迹底物中孵育1min,在凝胶成像仪中曝光成像,并采用凝胶分析软件对IgE/IgG结合能力进行分析。

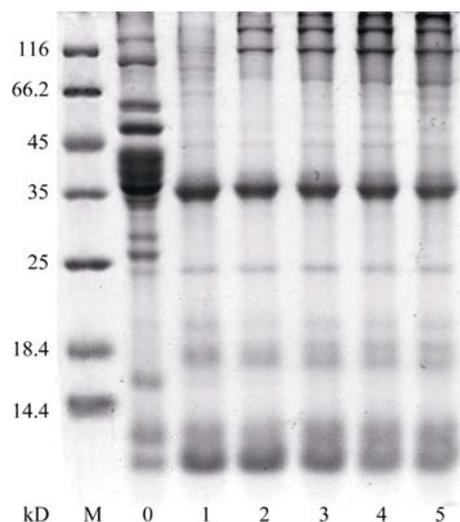
### 2.3.4 采用间接酶联免疫法对蒸处理的大菱鲆过敏原免疫原性进行分析

参考李小燕<sup>[8]</sup>的方法并略作改进,用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6)将样品稀释至10 μg/mL,100 μL/孔于4℃过夜,用含0.1% Tween-20的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤3次,每次5min,将孔内剩余液体拍干,下面的洗涤方法相同,加入含1%BSA的PBST,300 μL/孔,37℃封闭1.5h,洗涤,加入用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 稀释液)稀释20 000倍的兔抗小清蛋白多克隆抗体,100 μL/孔,37℃孵育1.5h,洗涤,再加入HRP-羊抗兔IgG(1:5 000),100 μL/孔,37℃孵育1h,洗涤。加入四甲基联苯胺(TMB)底物溶液,100 μL/孔,37℃避光显色20min后,加入2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(50 μL/孔)终止反应,用酶标仪测定450 nm处的吸光值OD<sub>450</sub>,分析热蒸处理对大菱鲆过敏原免疫原性的影响。

## 3 结果

### 3.1 热蒸加工对大菱鲆肌肉蛋白质组分的影响

采用SDS-PAGE对5组经过不同热蒸处理时间的大菱鲆蛋白组分进行分析,以未经热蒸加工的大菱鲆蛋白组分作对照。结果如图1所示,在未经过热蒸加工的鱼肉蛋白提取液中,蛋白组分较多;经过热蒸加工后鱼肉中蛋白组分明显减少,33~41 kDa、48~57 kDa蛋白大部分缺失。37 kDa、24 kDa蛋白以及10~12 kDa的小清蛋白有很强的耐热性,其中,分子量为11 kDa的小清蛋白比12 kDa的小清蛋白更加耐热。这与Hansen等<sup>[9]</sup>的研究结果一致,>40 kDa的鱼肉蛋白具有热不稳定性,而低分子量的蛋白具有极好地热稳定性。此外,24 kDa、37 kDa蛋白极可能是小清蛋白的二聚体、三聚体<sup>[10]</sup>,由此可见小清蛋白及其多聚体热稳定性极强。



M: 蛋白分子量标准; 0: 未加工; 1: 蒸 5 min; 2: 蒸 10 min; 3: 蒸 15 min; 4: 蒸 20 min; 5: 蒸 30 min

图1 大菱鲆肌肉蛋白组分的电泳分析

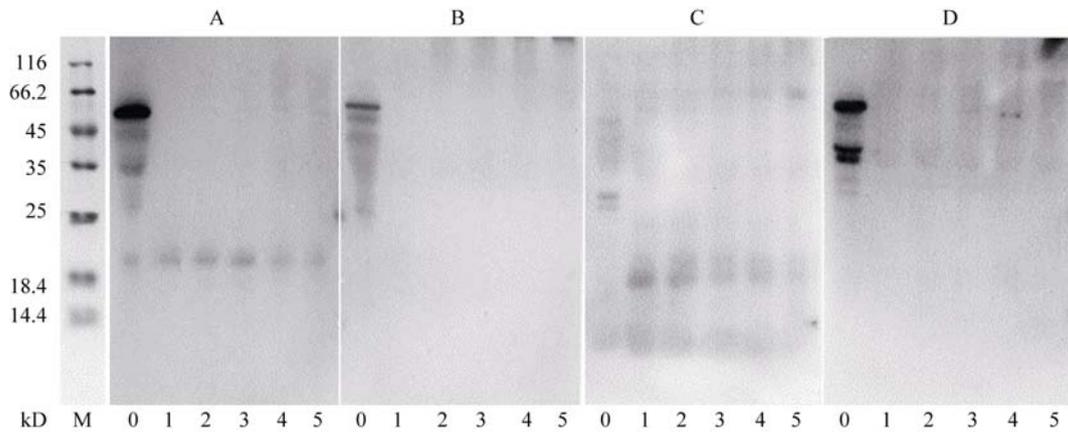
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of muscle protein of *Scophthalmus maximus*

从图1中还可看出,经过热蒸加工后的大菱鲆鱼肉蛋白组分中,在17~18 kDa左右出现了两条新的蛋白条带,热蒸处理5 min时,鱼肉蛋白组分基本重新稳定,随着热蒸处理时间地延长,蛋白组分及各组分含量并没有明显的变化。

### 3.2 热蒸加工对大菱鲆过敏原与过敏患者血清特异性IgE结合能力的影响

选用鱼类过敏患者的血清,采用免疫印迹法对未经过热蒸加工的鱼肉蛋白及经过不同时长热蒸加工的鱼肉蛋白各组分免疫活性进行对比分析,结果如图2所示。

可以看出,未经过热蒸加工的大菱鲆蛋白组分中阳性反应较强烈的蛋白为60 kDa、50 kDa及35 kDa左右,而在加热后,由于分子量>35 kDa的蛋白均有不同程度的缺失,在免疫印迹反应中也未出现这一分子量范围的阳性蛋白条带;35 kDa蛋白虽然有很好的耐热性,在热蒸加工后依然存在,但已丧失了免疫活性;样品A对20 kDa蛋白反应较强,且该蛋白的免疫活性随着热蒸处理时间的增加并未有明显变化,免疫活性基本稳定;除35 kDa蛋白外,与样品B有阳性反应的蛋白条带在热蒸加工后含量减少,甚至缺失,导致热蒸加工后的鱼肉与之无阳性反应;样品C对未经处理的20 kDa蛋白没有阳性反应,但与热蒸加工后的该蛋白条带产生了结合,此外还与热蒸加



M: 蛋白分子量标准; 0: 未加工; 1: 蒸 5min; 2: 蒸 10min; 3: 蒸 15min;  
4: 蒸 20min; 5: 蒸 30min; A、B、C、D: 4 份过敏患者血清

图 2 热蒸加工前后大菱鲂过敏原与过敏患者血清特异性 IgE 免疫印迹分析

Fig. 2 Western-blot analysis of human serum specific-IgE reactivity to allergens from *Scophthatmus maximus* before and after heating

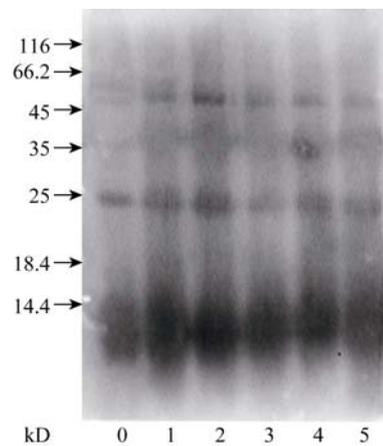
工后新产生的 18 kDa 蛋白以及分子量 11~12 kDa 的小清蛋白阳性反应较强, 经过热蒸加工后, 小清蛋白的免疫活性并未受到影响, Hansen<sup>[9]</sup>等人的研究也证实小清蛋白经过 4 h 的水煮处理依然保持其免疫活性; 样品 D 对于未经处理的鱼肉 60 kDa、40 kDa 及 35 kDa 蛋白反应强烈, 而经过热蒸处理后阳性反应也消失。

经过热蒸加工后, 鱼肉中大部分致敏蛋白的免疫活性随着蛋白条带的缺失而丧失, 分子量 35 kDa 蛋白虽然有很好的热稳定性, 但其过敏原性却被热蒸加工过程所破坏; 分子量为 20 kDa 的蛋白经过热蒸加工后免疫活性并未降低, 甚至有所增加; 热蒸加工后在 18 kDa 左右出现一条新的蛋白条带, 且该条带存在免疫活性, 而它在未经理热蒸加工的鱼肉样品中是缺失的, 这表明经过热蒸加工后, 鱼肉蛋白中产生了新的致敏蛋白。

### 3.3 热蒸加工对大菱鲂过敏原与兔源小清蛋白抗体结合能力的影响

利用兔抗小清蛋白多克隆抗体, 通过免疫印迹法对未经理热蒸加工的鱼肉及经过不同时长热蒸加工的鱼肉蛋白各组分免疫活性进行对比分析, 结果如图 3 所示。可以看出, 热蒸加工前后, 鱼肉中主要过敏原为分子量 11~12 kDa 的小清蛋白、分子量为 24 kDa、35 kDa 及 50 kDa 的蛋白。

与图 1 的电泳结果进行对比, 发现经过热蒸加工, 分子量为 50 kDa 的蛋白在 SDS-PAGE 分析中基本不可见, 而在免疫印迹实验结果中, 该蛋白条带的过敏



0: 未加工; 1: 蒸 5min; 2: 蒸 10min; 3: 蒸 15min;  
4: 蒸 20min; 5: 蒸 30min;

图 3 热蒸加工前后大菱鲂过敏原与兔抗蓝点马鲛小清蛋白多克隆抗体结合免疫印迹分析

Fig. 3 Western-blot analysis of rabbit anti-spanish mackerel parvalbumin polyclonal antibodies reactivity to allergens from *Scophthatmus maximus* before and after heating

原性并没有消失, 说明其抗体结合位点热稳定性强, 并未随着蛋白变性甚至降解而失去活性。这些阳性蛋白条带无论从分子量还是从耐热性来看, 都极有可能是小清蛋白的二聚体、三聚体以及四聚体, 还有待进一步分析。

### 3.4 采用间接酶联免疫法分析大菱鲂过敏原 IgG 结合能力的变化

采用间接酶联免疫法对热蒸加工后的大菱鲂过

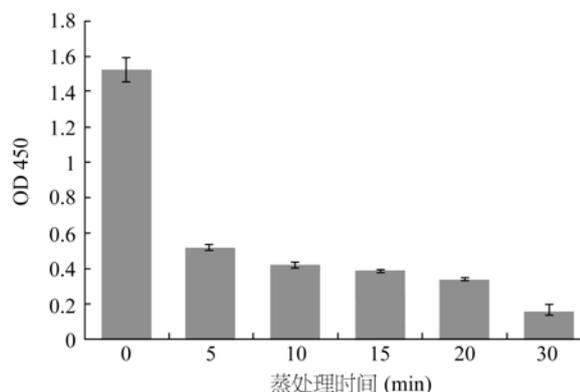


图4 间接ELISA对过敏原免疫活性的分析

Fig. 4 Indirect ELISA of allergen immune activity

敏原的免疫原性进行分析,结果如图4所示。

图4结果表明,5组经过不同热蒸处理时间的大菱鲂过敏原的免疫原性有了大幅降低。蒸5 min时,大菱鲂过敏原免疫原性降低了67.9%;蒸10 min时,鱼肉过敏原免疫原性降低了72.5%;经过热蒸处理15 min后,鱼肉过敏原免疫原性降低了77.6%;蒸20 min后,鱼肉过敏原免疫原性降低了74.6%;经过30 min的热蒸加工后,鱼肉过敏原免疫原性降低了89.2%。这说明随着热蒸处理时间的增加,大菱鲂过敏原的免疫原性呈递减趋势,但在最初的5 min内下降幅度最大,热蒸处理5 min至20 min时大菱鲂过敏原免疫原性下降幅度不明显,而经过热蒸处理30 min后,大菱鲂过敏原免疫原性又有较大的降幅。

## 4 讨论

目前很多研究都表明通过加工可以降低食物过敏原的免疫原性。加热后鱼肉蛋白的变化是十分复杂的,Hansen等<sup>[9]</sup>人研究表明经过水煮处理的鱼肉过敏原免疫活性显著降低,而Bernhisel<sup>[11]</sup>等研究发现鱼肉罐头与水煮处理的鱼肉相比过敏原性又有更大程度地降低,双盲对照实验中有新鲜鱼肉过敏患者对鱼肉罐头反应呈阴性。此外,Helbling等<sup>[10]</sup>的研究显示,6名鳕鱼过敏患者中有2人对鳕鱼鱼糜SPT试验结果为阳性。而由本实验结果可以知道,经过热蒸加工后的大菱鲂鱼肉蛋白组分中,在17~18 kDa左右出现了两条新的蛋白条带,而且热蒸加工后新出现的18 kDa左右蛋白条带存在免疫活性,它在未经过热蒸加工的鱼肉样品中是缺失的,这表明经过热蒸加

工后,鱼肉蛋白中产生了新的致敏蛋白,新条带的来源以及这个新IgE结合条带的过敏特性还需要进一步研究确定。

经热蒸加工后鱼肉中的蛋白质条带数目有大大地减少,但对于一些热稳定性良好的蛋白,其过敏原性所受的影响较低;经热蒸加工的大菱鲂过敏原与兔源小清蛋白抗体有一定的结合能力,其中分子量为50 kDa的蛋白很可能是小清蛋白的二聚体、三聚体以及四聚体<sup>[12]</sup>,但其聚合的机制以及其抗体结合位点热稳定性的变化情况尚且未知,需要继续深入地大菱鲂等鱼类过敏原及表位进行研究。热蒸加工可使鱼肉过敏原蛋白的免疫活性降低,蒸5 min后大菱鲂的免疫原性降低67.9%,蒸30 min后其免疫原性降低89.2%。日常生活中对鱼肉加工的蒸处理时长一般为10 min左右,实验结果表明,这种处理方式可以降低水溶性鱼肉过敏原免疫活性70%左右,对其致敏风险有一定程度地降低,但是其过敏原性还需要在临床上进一步验证。

综上所述,加工方法对大菱鲂过敏原的免疫原性造成的影响是多种多样的,在研发低过敏性水产品时,有必要对新产生的过敏原进行临床检测,而在建立过敏原检测方法时,对加工后产生的新过敏原进行鉴定具有重要意义,以获得更加客观准确的检验结果。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Mills EN, Sancho AI, Rigby NM, *et al.* Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(8): 963-969.
- [3] Cuadrado C, Cabanillas B, Pedrosa MM, *et al.* Influence of thermal processing on IgE reactivity to lentil and chickpea proteins [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(11): 1462-1468.
- [4] David A, Schmitt, Jacqueline B, Nesbit, Barry K, *et al.* Processing can alter the properties of peanut extract preparations [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58: 1138-1143.
- [5] Cabanillas B, Soheila J, Maleki, Rodríguez J, *et al.* Heat and pressure treatments effects on peanut allergenicity [J]. *Food Chem*, 2012, 132: 360-366.
- [6] Li ZX, Zhang YQ, Lin H. Quantitative analysis of shrimp allergen in food matrices using a protein chip based on sandwich immunoassay [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, (231): 47-54.

- [7] 张轶群, 李振兴, 林洪, 等. 果糖和木糖在美拉德反应中对虾类过敏原活性影响的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(29): 11-14.
- [8] 李小燕, 李振兴, 林洪, 等. 菲律宾蛤仔过敏原可视化抗体微阵列玻片的检测方法[J]. 水产学报, 2010, 34(3): 422-427.
- [9] Hansen TK, Skov SP, Poulsen LK, *et al.* Allergenic activity of processed fish [J]. *J Allergy Clin Immunol News Suppl*, 1994, 2: 445.
- [10] Helbling A, Lopez M, Lehrer SB. Fish allergy: is it a real problem with surimibased products? [J]. *IntArch Allergy Immunol*, 1992, 99: 452.
- [11] Bernhisel-Broadbent J, Strause D, Sampson H A. Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 90(4): 622-627.
- [12] Das Dore S, Chopin C, Villaume C, *et al.* A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (*Gad m1*) encoded by a gene distinct from that of *Gad c 1* [J]. *Allergy*, 2002, 57 (72): 79-83.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



李振兴, 博士, 副教授, 研究领域: 水产品中蛋白质的安全与质量控制。  
E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn



林洪, 博士, 教授, 研究领域: 水产品安全与质量控制。  
E-mail: linhong@ouc.edu.cn

## “食品安全追溯信息系统”专题约稿

“食品安全追溯信息系统”是指运用规模化养殖技术、计算机技术、自动识别技术等现代化技术, 来完成对食品从生产源头到销售终端安全控制与追溯体系的建立, 从而满足人们对安全食品的需求。《中华人民共和国食品安全法》明确了食品安全追溯的要点, 规定企业在食品生产环节、加工环节、流通环节都要有能够实现追溯所要记录的内容, 强化了“从农田到餐桌”的全程监管。“食品安全追溯信息系统”在2008年北京奥运会期间已成功应用。目前, 食品安全追溯系统正逐步走进普通市民的生活。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品安全追溯信息系统”专题, 围绕食品安全追溯信息系统的功能、构建、应用、管理等问题展开讨论, 计划在2013年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在10月15日前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

### 投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [tougao@chinafoodj.com](mailto:tougao@chinafoodj.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部