

## 实验技术与方法

## 花生过敏患者血清中抗 Ara h1 的 IgG 与 IgE 分离纯化研究

何伟逸<sup>1</sup>, 李瑶<sup>1</sup>, 景江珊<sup>2</sup>, 冯玥<sup>1</sup>, 幸鹏<sup>1</sup>, 黄海珍<sup>1</sup>, 吴序标<sup>1</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>

(1. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学化工学院, 广东 深圳 518060)

**摘要:** Ara h1 是花生的一种主要致敏原蛋白, 能够使花生过敏患者产生特异的 IgG 与 IgE, 从而导致花生过敏症状。Ara h1 与其特异 IgG 和 IgE 的结合是导致花生致敏的一个重要原因。本研究利用 Protein A 亲和层析柱与 Ara h1 作为配体的亲和层析柱纯化抗 Ara h1 的 IgG 与 IgE。高纯度的抗 Ara h1 特异 IgG 与 IgE 对探讨研究其与 Ara h1 之间相互作用具有重要意义。

**关键词:** 血清; Ara h1; 亲和层析; 抗体纯化; 免疫; 食物致敏; 过敏; 花生过敏患者

**中图分类号:** R155; R392.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2014)04-0340-04

**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2014.04.009

## Purification of anti-Ara h1 antibody from peanut allergy serum

HE Wei-yi, LI Yao, JING Jiang-shan, FENG Yue, XING Peng, HUANG Hai-zhen, WU Xu-li, LIU Zhi-gang  
(Allergic Reactions and Immunology Research Institute of Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518060, China)

**Abstract:** Ara h1 is a major allergen proteins in peanut, which can make peanut allergic patients produce specific IgG and IgE. Ara h1 and the specific binding of IgG and IgE is an important cause of peanut allergy. Protein A affinity chromatography and affinity chromatography with Ara h1 as a ligand were used to purify anti-Ara h1 IgG and IgE. Purified specific IgG and IgE antibodies have important significance for the study of allergen and antibody interactions.

**Key words:** Serum; Ara h1; affinity chromatography; antibody purification; immune; food allergy; allergy; peanut allergy sufferers

花生是八大类食物致敏原之一, 在美国约有 300 万人对花生及坚果类食物过敏, 并且有上升的趋势<sup>[1]</sup>。花生致敏引起的症状主要表现为咽喉水肿、荨麻疹、哮喘、过敏性休克, 严重者危及生命<sup>[2]</sup>。花生过敏属于即时性过敏, 通常也叫 I 型变态反应, 是机体对致敏原物质产生的一种变态反应<sup>[3]</sup>。研究表明<sup>[2,4]</sup>, 食物特异性 IgE 和 IgG 在食物过敏发病机制中有重要的影响。花生致敏原是一种球蛋白, 主要是花生球蛋白和花生伴球蛋白<sup>[5]</sup>。目前发现的多种花生致敏原中 Ara h1 和 Ara h2 被认为是主要致敏原, 90% 的花生过敏患者对二者过敏<sup>[6]</sup>。其中 Ara h1 是主要致敏原中含量最多

的一种蛋白, 分子量为 63.5 kD, pI = 4.5, 占花生总蛋白的 12% ~ 16%<sup>[7]</sup>。为了更加深入地研究花生致敏原与其抗体的相互作用, 探讨花生致敏机理, 纯化出有代表性的致敏原抗体非常重要。亲和层析法是纯化抗体的常用方法, 吴光辉等<sup>[8]</sup>利用 Protein A 亲和层析法快速分离纯化出了鲫鱼血清中的 IgM。Robotham 等<sup>[9]</sup>利用亲和层析法从坚果过敏患者血清中分离出了抗 Jug r1 的特异 IgE。本研究利用花生主要致敏原 Ara h1 为配体制备亲和层析柱, 从花生过敏患者血清中纯化特异的抗 Ara h1 免疫球蛋白 IgG 和 IgE, 探索特异 IgG 与 IgE 的纯化方法。

收稿日期: 2014-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101280); 广东省自然科学基金 (S2012010008514); 深圳市重点实验室项目 (CXB201104220023A); 深圳市技术创新计划 (CXZZ20130320165017541)

作者简介: 何伟逸 男 硕士生 研究方向为食物致敏

E-mail: hewei55@163.com

通讯作者: 吴序标 男 副教授 研究方向为食品致敏及食品安全

E-mail: wxl@szu.edu.cn

刘志刚 男 教授 研究方向为过敏性疾病

E-mail: lzg@szu.edu.cn

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

## 1.1.1 血清与致敏原

花生过敏患者血清由深圳市儿童医院提供, 花生致敏原 Ara h1 由深圳大学免疫学研究所提供。

## 1.1.2 主要仪器与试剂

可自行填装的实验室用层析柱 XK 16/20 column、Protein A 亲和层析柱、蛋白快速纯化仪均购自美国 GE, 酶标仪(美国 BioTek)、垂直板型电泳槽

和 model(法国 Vilber Lourmat)、洗板机(美国 Bio-Rad)、低温高速离心机。

溴化氰(CNBr)活化的亲和层析填料(美国 GE),生物素标记的羊抗人 IgE 抗体、HRP 标志的鼠抗人 IgG 抗体、链霉亲和素均购自美国 Southern Biotech,BCA 蛋白定量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、NaCl 均购自美国 Sigma。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Ara h1 作为配体的亲和层析柱的制备

准确称取 3 g CNBr 活化的亲和层析填料装于烧杯中,加入 100 ml HCl 缓冲液(1 mmol/L, pH = 2.5)浸泡 0.5 h,溶胀后得到 9 ml 的凝胶颗粒,用 500 ml HCl 缓冲液(1 mmol/L, pH = 2.5)反复冲洗、过滤凝胶颗粒。再将凝胶颗粒倒入装有 15 ml  $\text{NaHCO}_3$ -NaCl 偶联缓冲溶液( $c_{\text{NaHCO}_3} = 0.1 \text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.5 \text{ mol/L}$ , pH = 8.3)的小烧杯中,加入 100 mg 配体 Ara h1 与填料混匀,于 4 °C 冰箱中过夜使二者充分偶联。将偶联了配体的填料填充于空的 XK 16/20 column 层析柱中,用 75 ml 偶联缓冲液洗净未与填料结合的 Ara h1。以 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH = 8.0)填充介质,静置 1 h。用醋酸-NaCl 缓冲液( $c_{\text{醋酸}} = 0.1 \text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.5 \text{ mol/L}$ , pH = 4.0)与 Tris-HCl-NaCl 缓冲液( $c_{\text{Tris-HCl}} = 0.1 \text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 0.5 \text{ mol/L}$ , pH = 8.0)交替冲洗 3 次。即制备好 Ara h1 作为配体的亲和层析柱。

### 1.2.2 Protein A 亲和层析柱纯化花生过敏患者血清中总 IgG

取 5 ml 花生过敏患者血清用生理盐水(含 0.9% NaCl)稀释 10 倍,再以 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,得到约 50 ml 上柱血清样品。在 ÄKTApurifier 全自动层析仪系统下,用生理盐水平衡 Protein A 亲和层析柱。将血清样品上 Protein A 亲和层析柱,待紫外吸光值 > 100 时收集流出液用于后续 IgE 的纯化试验。待血清样品全部上柱后用生理盐水平衡,甘氨酸(200 mmol/L, pH = 2.3)洗脱结合在 Protein A 柱上的 IgG,待紫外吸光值曲线上升时用装有 150  $\mu\text{l}$  Tris-HCl(1 mol/L, pH = 9.0)的 10 ml 离心管收集洗脱峰。

### 1.2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定纯化的 IgG

分别取花生过敏患者血清、生理盐水洗脱液、甘氨酸洗脱液各 80  $\mu\text{l}$ ,均加入 20  $\mu\text{l}$  5 × Loading Buffer,100 °C 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 3 min。取 6  $\mu\text{l}$  蛋白样品加于 SDS-PAGE 凝胶上样孔中,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,先 80 V 恒压 15 min,再 120 V 恒压 40 min。电泳结束后经考马斯亮蓝 R 250 染色、醋酸脱色。

### 1.2.4 抗 Ara h1 的 IgG 抗体纯化与效价测定

在 ÄKTApurifier 全自动层析仪系统下,用生理盐水平衡 Ara h1 作为配体的亲和层析柱,流速 1.5 ml/min。取由 Protein A 纯化出的总 IgG 抗体以生理盐水稀释 1 倍,由 A 泵将蛋白样品上柱,用生理盐水平衡,收集洗脱峰。待紫外曲线平稳时,以甘氨酸缓冲液(200 mmol/L, pH = 2.3)替换生理盐水,用于特异免疫球蛋白 IgG 的洗脱,当有吸收峰出现时用装有 50  $\mu\text{l}$  Tris-HCl(1 mol/L, pH = 9.0)的离心管收集洗脱液。

利用 ELISA 法测定抗 Ara h1 的 IgG 效价。用碳酸盐包被液将 Ara h1 稀释至 1  $\mu\text{g/ml}$ ,每孔 100  $\mu\text{l}$  包被 96 孔板,空白对照孔用 PBS 包被。4 °C 冰箱过夜,次日 PBS 洗板,每孔加入 200  $\mu\text{l}$  3% BSA-PBS 于 37 °C 孵育 2 h。PBST 洗板,用 1% BSA-PBST 倍比稀释特异 IgG 抗体 10 ~ 40 960 倍。分别吸取 100  $\mu\text{l}$  加入到 96 孔板中,每个浓度 3 个平行孔,阴性对照用正常人血清替代,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗板 3 次,加入 100  $\mu\text{l}$  HRP 标志的鼠抗人 IgG(PBST 稀释 3 000 倍)作为二抗,37 °C 孵育 1 h。弃去孔内的二抗,PBST 洗板 5 次。每孔加入 TMB 显色液 100  $\mu\text{l}$  于 37 °C 孵育 12 min,然后每孔加入 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液(2 mol/L)终止反应,用自动酶标仪在 450 nm 处检测吸光值。

### 1.2.5 抗 Ara h1 的 IgE 抗体的纯化与效价测定

用生理盐水平衡 Ara h1 为配体的亲和层析柱,流速 1.5 ml/min,将通过 Protein A 去除总 IgG 的血清上柱,上柱完毕后用生理盐水洗脱未特异结合的非特异蛋白,收集洗脱峰。盐浓度曲线与紫外吸收曲线平稳时,以甘氨酸缓冲液(200 mmol/L, pH = 2.3)替换生理盐水,将结合在柱子上的抗 Ara h1 的特异 IgE 洗脱下来,收集洗脱峰。采用 ELISA 法测定抗 Ara h1 的特异 IgE 效价,方法同 1.2.4。

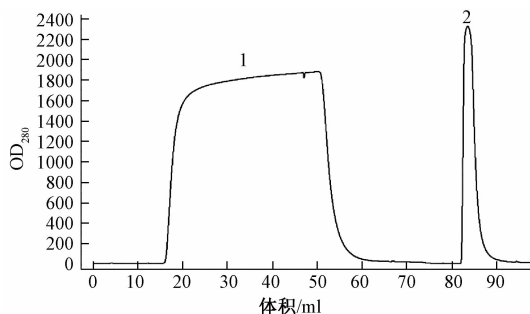
## 2 结果与分析

### 2.1 Protein A 亲和层析柱纯化花生过敏患者血清中总 IgG

Protein A 为金黄色葡萄球菌的细胞壁组分,与人 IgG 的 Fc 片段具有强特异性结合能力<sup>[8]</sup>。从图 1 的洗脱结果可知,出现 2 个明显吸收峰,其中 1 号峰是不能与 Protein A 特异结合的血清蛋白,由生理盐水洗脱下来;2 号峰是总 IgG,能够与 Protein A 特异结合,可由甘氨酸缓冲液(200 mmol/L, pH = 2.3)将其洗脱下来。

### 2.2 总 IgG 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定结果

取上柱前的花生过敏患者血清、上柱后 1 号峰

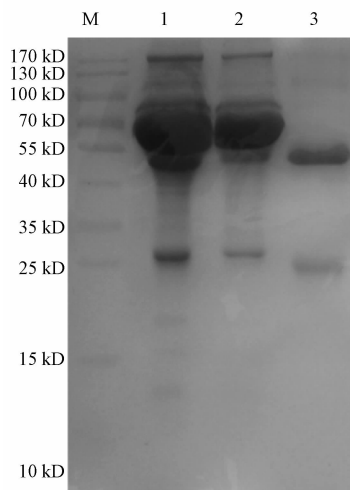


注:1号峰为不能与 Protein A 特异结合的血清蛋白;  
2号峰为能够与 Protein A 特异结合的总 IgG

图1 Protein A 纯化花生过敏患者血清总 IgG 峰型图

Figure 1 Purification of total IgG by Protein A

收集液与 2 号峰收集液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。结果(见图 2)显示,IgG 主要由重链和轻链组成,重链是一个 50 kD 的蛋白,轻链是一个 25 kD 的蛋白。2 号孔的 50 与 25 kD 蛋白条带相比一号孔明显变淡变细,但依然有一点,可能原因是上柱的蛋白量太大,超过了 ProteinA 亲和层析柱与 IgG 的最大结合量。3 号孔是与 ProteinA 特异结合的 IgG,在 50 与 25 kD 处有两条明显的条带,分别为 IgG 的重链与轻链条带。而在 100 kD 处有比较淡的条带,而 1 号与 2 号孔却没有,推测其为重链的二聚体所致。



注:M 为蛋白 Marker;1 为花生过敏患者血清蛋白;  
2 为 1 号峰洗脱收集蛋白(Protein A 去除 IgG 的血清蛋白);  
3 为 2 号峰洗脱收集蛋白(ProteinA 纯化的总 IgG)

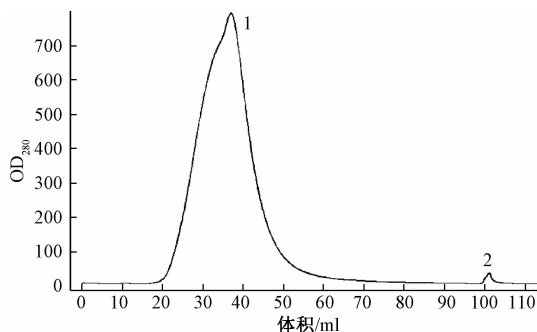
图2 纯化总 IgG 的电泳结果分析

Figure 2 SDS-PAGE of protein from peanut allergy serum

### 2.3 抗 Ara h1 的 IgG 抗体的纯化与效价测定结果

抗 Ara h1 的 IgG 抗体纯化结果如图 3 所示,1 号峰为非特异 IgG,不能与柱中的抗原配体(Ara h1)特意结合;2 号峰为抗 Ara h1 的特异 IgG,可与柱中的抗原配体(Ara h1)特意结合。特异 IgG 抗体由甘氨酸缓冲液(200 mmol/L, pH = 2.3)洗脱下来。采用 ELISA 法测定纯化 IgG 效价,阴性对照 OD<sub>450</sub> =

0.182,空白对照 OD<sub>450</sub> = 0.064,具体结果见表 1,吸光值随着倍比稀释浓度降低而减小,收集所得的特异 IgG 效价在 1:2 560 左右。通过透析将获得的 IgG 保存于 PBS 缓冲液中,于 -20 °C 冰箱保存。



注:1号峰为非特异 IgG;2号峰为抗 Ara h1 的特异 IgG

图3 抗 Ara h1 特异 IgG 纯化峰型图

Figure 3 Purification of anti-Ara h1 IgG by affinity chromatography

表1 抗 Ara h1 特异 IgG 的 ELISA 分析

Table 1 ELISA analysis of anti-Ara h1 IgG

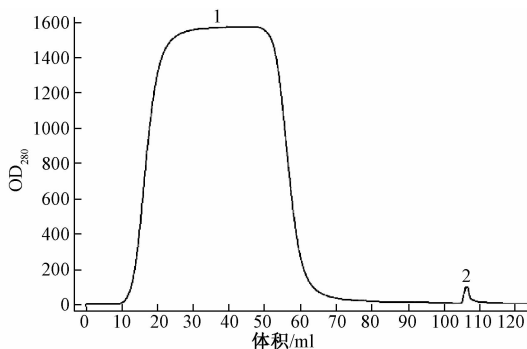
稀释倍数	OD <sub>450</sub>	阳性/阴性
10	2.319	+
20	2.184	+
40	1.583	+
80	1.346	+
160	1.137	+
320	1.004	+
640	0.810	+
1 280	0.551	+
2 560	0.370	+
5 120	0.233	-
10 240	0.215	-
20 480	0.194	-
40 960	0.186	-

注:当(样品孔吸光值 - 空白管吸光值)/(阴性对照管吸光值 - 空白管吸光值) > 2.1 时,判定为 + (阳性);反之为 - (阴性)

### 2.4 抗 Ara h1 的 IgE 抗体的纯化与效价测定结果

IgG 是血清中含量最多的免疫球蛋白(约占 70%),而 IgE 含量最少,但是过敏患者血清中特异 IgE 会明显增多。本试验在以 Protein A 去除血清中总 IgG 的基础上,采用 Ara h1 为配体的亲和层析柱纯化花生过敏患者血清中抗 Ara h1 的特异 IgE,结果见图 4。在生理盐水条件下,血清中的大部分蛋白不能与柱子结合,而抗 Ara h1 的 IgE 与柱中 Ara h1 配体结合能力较强,后用甘氨酸缓冲液(200 mmol/L, pH = 2.3)在低 pH 值情况下洗脱下来。由于 IgE 的含量较低,因此 2 号峰相对 1 号峰窄小。收集 2 号峰洗脱液,利用 ELISA 法测定其效价,阴性对照 OD<sub>450</sub> = 0.163,空白对照 OD<sub>450</sub> = 0.056,具体结果见表 2,吸光值随着倍比稀释浓度降低而减小,效价在 5 120 左右。试验结果表明,

Ara h1 作为配体的亲和层析柱能够有效纯化抗 Ara h1 的 IgE 抗体。通过透析将获得的 IgE 保存于 PBS 缓冲液中,于 -20 ℃ 冰箱保存。



注:1号峰为血清中非特异结合蛋白;2号峰为抗 Ara h1 的特异 IgE

图4 抗 Ara h1 特异 IgE 纯化峰型图

Figure 4 Purification of anti-Ara h1 IgE by affinity chromatography

表2 抗 Ara h1 特异 IgE 的 ELISA 分析

Table 2 ELISA analysis of anti-Ara h1 IgE

稀释倍数	OD <sub>450</sub>	阳性/阴性
10	2.566	+
20	2.274	+
40	1.982	+
80	1.679	+
160	1.557	+
320	1.350	+
640	1.112	+
1 280	0.752	+
2 560	0.417	+
5 120	0.337	+
10 240	0.217	-
20 480	0.196	-
40 960	0.169	-

注:当(样品孔吸光值-空白管吸光值)/(阴性对照管吸光值-空白管吸光值) > 2.1 时,判定为+(阳性);反之为-(阴性)

### 3 讨论

食物致敏是食品安全领域的一个重大课题,文献报道 90% 以上的食物致敏反应是由牛奶、蛋类、鱼类、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果类和小麦引起<sup>[10]</sup>。花生致敏与其它食物致敏不同,其具有长期性,90% 花生过敏患者对其终生过敏<sup>[11]</sup>。花生致敏已成为食物致敏中的一个重要健康问题,在我国也应当引起高度的重视。开展花生致敏研究,探讨花生主要致敏原与其特异抗体间的相互作用,分离纯化特异抗体是研究的一个重要环节。

本研究利用亲和层析原理对抗 Ara h1 的特异抗体进行分离纯化。亲和层析是一种吸附层析,抗

原(或抗体)和相应的抗体(或抗原)发生特异性结合,而这种结合在一定条件下又是可逆的。因此将抗原(或抗体)固相化后,可以使存在液相中的相应抗体(或抗原)选择性地结合在固相载体上,从而与液相中的其他蛋白质分开,达到分离提纯的目的。

花生过敏患者血清中抗花生抗原的特异 IgG 与 IgE 会大量升高,因此本试验通过亲和层析技术纯化花生过敏患者血清中的抗 Ara h1 的 IgG 和 IgE。其 IgE 的效价为 5 120, IgG 效价为 2 560,而血清中抗 Ara h1 抗体的效价普遍低于 100,试验结果较为理想。此研究结果为人血清中特异 IgG 和 IgE 的分离纯化提供了较为可靠便捷的方法,为 Ara h1 与其对应抗体之间的相互作用的研究提供材料,对后续研究具有一定科学意义。

### 参考文献

- [1] Nicolaou N, Poorafshar M, Murray C, et al. Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(1):191-197.
- [2] 刘颖慧. 食物过敏的诊治及研究进展[J]. *中国临床医生*, 2003, 31(9):14-16.
- [3] Viquez O M, Konan K N, Dodo H W. Genomic organization of peanut allergen gene, Ara h3[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 41(12):1235-1240.
- [4] Zopf Y, Baenkler H W, Silbermann A, et al. The differential diagnosis of food intolerance[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2009, 106(21):359-370.
- [5] Chung S Y, Butts C L, Maleki S J, et al. Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing and roasting[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(15):4273-4277.
- [6] Al-Muhsen S, Clarke A E, Kagan R S. Peanut allergy: an view[J]. *CMAJ*, 2003, 168(10):1279-1285.
- [7] Maleki S J, Kopper R A, Shin D S, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h1 may protect IgE-binding epitopes from degradation[J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 164(11):5844-5849.
- [8] 吴光辉, 王庆, 巩华. 用 Protein A 亲和层析法快速分离纯化鲫鱼血清 IgM 方法的建立和应用[J]. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(3):233-237.
- [9] Robotham J M, Teuber S S, Sathe S K, et al. Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r1[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(1):143-149.
- [10] Muhsen S A, Clarke A E, Kagan R S. Peanut allergy: an overview[J]. *CMAJ*, 2003, 168(10):1279-1285.
- [11] Leung Y M D, Sampson H A, Yunginger J W, et al. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(11):986-993.