

文章编号:1000-8551(2019)07-1349-07

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对花生过敏原 Ara h 2 蛋白构象及致敏活性的影响

罗春萍^{1,*} 胡纯秋²(¹台州科技职业学院,浙江 台州 318020; ²安徽医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,安徽 合肥 230032)

摘要:为探讨辐照处理对花生 Ara h 2 蛋白结构与致敏活性的影响,采用不同剂量 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理分离纯化所得到的花生过敏原 Ara h 2 蛋白,结合紫外扫描光谱、圆二色谱(CD)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评估辐照处理后 Ara h 2 蛋白的结构变化,并用免疫印迹法和间接酶联免疫吸附法检测辐照处理后 Ara h 2 的抗原性变化。结果表明, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理可以显著改变花生 Ara h 2 蛋白的构象,使其降解、发生交联。随着辐照剂量的增大,Ara h 2 蛋白与抗体的结合能力呈逐渐下降趋势,且与蛋白紫外吸光度的增强和 α -螺旋含量的降低呈现良好的相关性。当辐照剂量为 10 kGy 时,可基本破坏 Ara h 2 蛋白的结构和免疫活性。 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理可以有效降低花生过敏原 Ara h 2 蛋白的致敏性,这为花生脱敏技术的研究提供了新思路。

关键词: $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照;花生过敏;Ara h 2;构象;抗原性

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.07.1349

花生是一种营养丰富且深受人们喜爱的食物,也是世界公认的八大过敏原食物之一^[1]。近年来的流行病学研究表明,花生过敏影响了 1%~2% 的世界人口,各国花生过敏人数呈现明显上升趋势,花生过敏反应的危害性和长期性已严重影响了花生过敏人群的生活质量^[2-4]。Ara h 2 蛋白是花生致敏性最强的组分之一,由分子量为 16.7 kDa 和 18 kDa 的 2 个亚型蛋白组成,约占花生蛋白总量的 5.9%~9.3%^[5-6]。过敏反应的物质基础是表位,表位可分为线性表位和构象性表位,线性表位由 5~7 个连续氨基酸组成,构象性表位可由分布于肽链不同部位或不同肽链的 15~22 个氨基酸构成,与蛋白质的空间构象密切相关^[7]。在 Ara h 2 的空间折叠结构中,5 个 α -螺旋结构构成基本骨架,并以 4 个保守的二硫键连接 α -螺旋结构以稳定构象,对过敏原构象性表位的结构稳定性发挥重要作用^[8]。此外,Ara h 2.01 含有 10 个过敏原线性表位,Ara h 2.02 比 Ara h 2.01 多一个 DPYSPS 的线性表位,它们能与花生过敏患者血清中的相应抗体结合,引发致敏反应^[8-9]。

辐照技术作为一项常用的食品非热加工技术,被广泛地应用于食品保藏、品质改善、消毒灭菌等方面^[10]。近年来,利用辐照对过敏食品进行脱敏的技术也受到了广泛关注^[11]。研究发现,辐照能引起蛋白质氨基酸序列的断裂、交联和分子构象的改变,导致过敏原表位的破坏,进而影响过敏原与相应抗体的结合能力,改变过敏原的致敏性,有可能成为降低或消除食物过敏反应的重要技术^[12-14]。王烁等^[15]用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照处理花生溶液,发现 1.0 kGy 以下的小剂量辐照处理对花生溶液中的致敏蛋白影响不大;当辐照剂量在 1.0 kGy 以上时,花生各蛋白含量普遍减少,说明辐照处理能降低花生的致敏性与辐照剂量关系密切。许舒婷等^[16]曾用电子束辐照处理花生过敏原液和脱脂花生粉,发现辐照能较大程度地降低液体状态下的花生过敏原致敏性,但对花生粉中的过敏原影响较小。目前,辐照去除或减少花生过敏原的研究和应用尚处于发展阶段^[11],辐照过程中花生过敏原结构与表位的变化规律和机理有待深入研究。因此,本研究选取花生过敏原中过敏原表位和三维结构均较明确的

收稿日期:2018-06-26 接受日期:2018-10-04

基金项目:台州市科技计划项目(1701ny13),安徽医科大学博士基金(XJ201015)

作者简介:罗春萍,女,讲师,主要从事花生过敏研究。E-mail:went_fly@163.com

* 通讯作者:同第一作者。

Ara h 2 为试验对象,评估⁶⁰Co-γ 辐照处理后 Ara h 2 蛋白的结构与抗原性变化,探讨花生过敏原辐照变化的规律与机理,以期辐照在花生脱敏中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜花生,购自南昌市青山湖农贸市场;

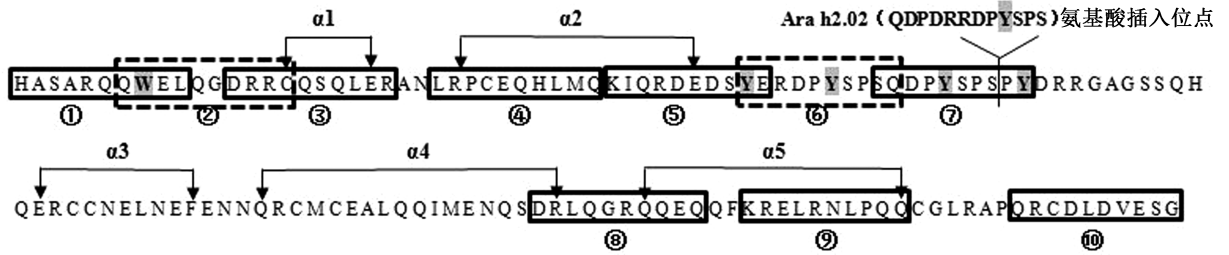


图 1 Ara h 2 的过敏原线性表位与 α-螺旋结构的氨基酸序列

Fig.1 Sequence of linear epitopes and α-helix of Ara h 2

1.2 主要仪器与设备

MA99-1 自动核酸蛋白分离层析仪,上海青浦沪西仪器厂;⁶⁰Co-γ 辐照源,江西省农业科学院原子能应用研究所;Mini-protean 3 蛋白垂直电泳槽、PowerPac 3000 电泳仪、Trans-Blot SD Cell 电转仪、Mode 1860 酶联免疫检测仪,美国 Bio-Rad 公司;UV-VS 2501PC 紫外分光光度计,日本岛津公司;J-810 圆二色谱仪,日本 JASCO 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 花生过敏原 Ara h 2 的分离纯化 参照胡纯秋^[17]的方法。新鲜花生仁研磨成粉末,用丙酮脱脂,50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.2)浸提得花生蛋白溶液。将花生蛋白溶液过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱分离,50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.2)为淋洗液,得到花生过敏原 Ara h 2 溶液,再将 Ara h 2 溶液用 Amicon Ultra-15 超滤离心管(截留分子量 3.0 kDa)浓缩,-20℃ 保存备用。采用 SDS-PAGE 电泳对 Ara h 2 溶液的纯度及分子量进行分析检测,并用 Bradford 法测定 Ara h 2 溶液的浓度。

1.3.2 花生过敏原 Ara h 2 蛋白浓度的测定 采用 Bradford 法^[18]测定 Ara h 2 蛋白浓度,并以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标准曲线,检测波长为 595 nm。

1.3.3 辐照处理 辐照处理在江西省农业科学院原子能应用研究所进行,将纯化的 Ara h 2 溶液用 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.2)稀释成 0.2

mg·mL⁻¹,每管 40 mL 分装密封于离心管中,然后采用⁶⁰Co-γ 辐照装置于室温(25℃ 左右)下进行辐照处理,辐照剂量分别为 0、1、3、5、10、15、20、25 kGy,剂量率为 8.65 Gy·min⁻¹。每个剂量设 3 次重复,辐照后所有样品立即储存于-20℃ 备用,检测也均重复 3 次。

1.3.4 辐照处理对 Ara h 2 蛋白结构的影响 取适量 0.2 mg·mL⁻¹ Ara h 2 蛋白溶液,于室温(25℃ 左右)条件下,采用紫外分光光度计分析 Ara h 2 蛋白的结构。波长扫描范围为 190~400 nm,间隔 1 nm,扫描速度为 100 nm·min⁻¹。

1.3.5 辐照处理对 Ara h 2 蛋白二级结构的影响 取适量 0.2 mg·mL⁻¹ Ara h 2 蛋白溶液,于室温(25℃ 左右)、氮气吹扫条件下,采用圆二色谱仪测定 Ara h 2 蛋白的二级结构。远紫外波长扫描范围为 190~250 nm,间隔 1 nm,扫描速度为 100 nm·min⁻¹,光径为 1 mm。每个样品圆二检测 3 次,结果取平均值。测定结果用氨基酸残基摩尔椭圆率(mean residue ellipticity, MRE, [θ])表示,单位为 deg·cm²·dmol⁻¹,按照下列公式计算^[19]:

$$[\theta] = \theta_{\lambda} \times (M / \text{氨基酸残基数}) / (C \times L) \quad (1)$$

式中,θ_λ 为 CD 观察值,mdeg;M 为蛋白质分子量;C 为蛋白浓度,mg·mL⁻¹;L 为光径,mm。

1.3.6 辐照处理对 Ara h 2 分子量的影响 将辐照处理前后的 Ara h 2 溶液与 2× 上样缓冲液等体积混合制成电泳样品,100℃ 煮沸离心后上样。SDS-PAGE 电泳

采用不连续体系,使用 15%分离胶和 5%浓缩胶;恒流电泳:浓缩胶 6 mA 恒流 20 min,分离胶 12 mA 恒流。采用考马斯亮蓝 R-250 染色并用数码相机拍照,备用。

1.3.7 辐照处理对 Ara h 2 抗原性的影响 1) 免疫印迹法。辐照处理前后的 Ara h 2 蛋白溶液经 SDS-PAGE 电泳分离后用 Bio-Rad 电转仪转至 PVDF 膜上,电转条件:室温条件下 50 mA 恒流电转 2 h。转印后的 PVDF 膜用 1% TBST 溶液(含 1%吐温-20 的 TBS 溶液)室温振荡封闭 1 h,TBS(含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、150 mmol·L⁻¹ NaCl,pH 值 7.5)洗涤 3 次后加入兔抗 Ara h 2 血清(1:5 000 TBS 稀释),4℃反应过夜。次日取出 PVDF 膜,TBS 洗涤 3 次后加 HRP 酶标羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 TBS 稀释),室温振荡反应 2 h。反应结束后,TBS 洗涤 PVDF 膜 3 次,加入 4-氯-1-萘酚显色液(含 20 mL TBS、12 mg 4-氯-1-萘酚、4 mL 乙醇、12 μL 30% H₂O₂)室温避光显色。待出现明显条带后,蒸馏水终止反应,并用滤纸吸干,数码相机拍照并保存结果。以普通兔血清代替兔抗 Ara h 2 血清作为阴性对照,以排除假阳性反应。

2) 间接 ELISA 法。将辐照处理前后的 Ara h 2 溶液用包被液(含 15 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃、35 mmol·L⁻¹ NaHCO₃,pH 值 9.6)稀释成 1.25 μg·mL⁻¹,在同一酶标板上每孔包被 100 μL,每个样品包被 3 个孔,4℃包被过夜。次日取出酶标板,用 PBST(含 1%吐温-20 的 100 mmol·L⁻¹ pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液),每孔 250 μL 洗涤 3 次后,加入 5%脱脂乳封闭液(PBS 稀释),每孔 250 μL,37℃恒温封闭 1 h。PBST 洗涤后加入兔抗 Ara h 2 血清(1:10 000 PBS 稀释),每孔 100 μL,37℃恒温反应 1 h。洗涤后加入 HRP 酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 PBS 稀释),每孔 100 μL,37℃恒温反应 1 h。反应结束后,PBST 再洗涤 3 次,加入 OPD 显色液[含 0.5 mg·mL⁻¹ OPD、0.03% H₂O₂、100 mmol·L⁻¹ 柠檬酸盐缓冲液(pH 值 5.5)],每孔 100 μL,37℃恒温避光显色 15 min,2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液(每孔 50 μL)终止反应,用酶标仪测定各孔在 490 nm 处的 OD 值,并计算不同剂量辐照处理后的 IgG 结合能力:

$$\text{IgG 结合能力} = B/B_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中, B_0 为 0 kGy 辐照处理样品 OD₄₉₀ 值;B 为辐照处理样品 OD₄₉₀ 值。

1.3.8 数据分析 采用 Microsoft Excel 2010 对所得数据进行作图分析,并采用 SPSS 18.0 软件检验组间差异显著性, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 辐照处理对 Ara h 2 蛋白结构的影响

由图 2 可知,未辐照(0 kGy)组 Ara h 2 蛋白有 2 个吸收峰,分别在 210 nm 和 275 nm 处,其中 210 nm 处的吸收峰主要是由 Ara h 2 肽键上 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的,与 Ara h 2 肽键 C=O 含量有关。Ara h 2 分子中含有 1 个色氨酸(Trp)和 4~5 个酪氨酸(Tyr)(图 1)^[8-9],色氨酸和酪氨酸芳香环的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁是引起 Ara h 2 蛋白 275 nm 处吸收峰的主要原因^[20]。辐照处理后,210 nm 和 275 nm 处的吸收峰均出现显著增色效应,且辐照剂量越大,强度越强。210 nm 处峰位向高波数微小位移(红移),275 nm 峰位略向低波数位移(蓝移),表明辐照处理可使 Ara h 2 蛋白肽链伸展,蛋白质分子内部的酪氨酸和色氨酸残基暴露,显示为 275 nm 处的吸收峰增强,且随着辐照剂量的增加,酪氨酸和色氨酸残基暴露的越多,对 Ara h 2 蛋白的影响也越大;同时暴露出来的酪氨酸和色氨酸具有疏水性,使蛋白分子之间疏水作用增强, $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁能量增大,导致峰位向低波数微小位移,可见辐照处理使 Ara h 2 发生了构象改变。此外,210 nm 处吸收峰的增强说明了 Ara h 2 蛋白羰基含量的增加,辐照过程中产生的羟基自由基易作用于侧链带有 -NH 和 -NH₂ 的氨基酸^[21],使其发生脱氨反应产生羰基,而羰基碳原子与羟基自由基相连则使该吸收峰轻微红移。

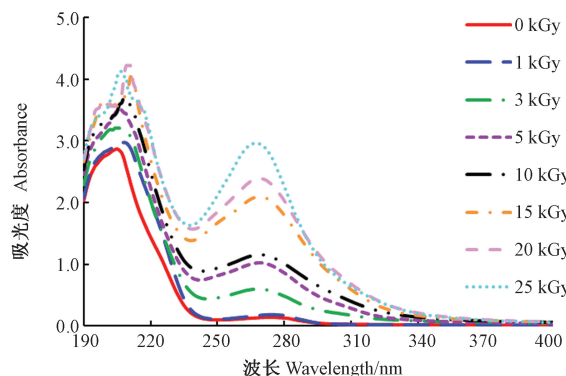


图 2 不同剂量辐照处理下 Ara h 2 蛋白的紫外光谱图
Fig.2 UV absorption spectra of Ara h 2 protein under different doses of irradiation treatment

2.2 辐照处理对 Ara h 2 蛋白二级结构的影响

圆二色光谱(circular dichroism, CD)是研究溶液中蛋白质构象变化的一种简单、快速、准确的方法^[22]。

190~250 nm 的远紫外光谱区,圆二色性主要由肽键的 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁引起,能够反映蛋白质或多肽链二级结构的信息^[23]。由图 3 可知,CD 显示了天然 Ara h 2 蛋白在 195 nm 处有一个正峰,208 nm 和 222 nm 各有一个负峰,这是 α -螺旋结构的 3 个特征峰^[24],即 Ara h 2 具有典型的 α -螺旋结构,这与 Mueller 等^[9]的研究结果相符。随着辐照剂量的增加,208、222 nm 处负峰均减弱,并略向低波数移动,可见 α -螺旋结构含量的减少。这是因为辐照产生的自由基作用于 Ara h 2 蛋白,引起肽键 C=O 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁,破坏维持 α -螺旋结构的氢键和二硫键,使规则二级结构中肽键排列的方向改变,从而引起 Ara h 2 蛋白二级结构的变化。当辐照剂量达到 10、15 kGy 时,195 nm 正峰和 208、222 nm 负峰均相当薄弱,直至 20、25 kGy 辐照处理后,Ara h 2 蛋白的 CD 光谱峰接近消失, α -螺旋结构几乎消失,表明 10、15、20、25 kGy 辐照处理对 Ara h 2 蛋白二级结构产生了极大的破坏。

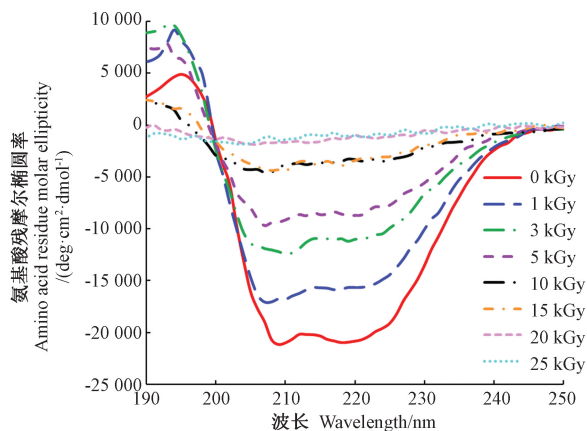


图 3 不同剂量辐照处理下 Ara h 2 蛋白的圆二色谱图

Fig.3 Circular dichroism spectra of Ara h 2 protein under different doses of irradiation treatment

由图 4 可知,Ara h 2 蛋白经辐照引起的 α -螺旋结构 208 nm 特征峰的强度减弱,与 UV 275 nm 的峰强度增强呈现良好的相关性,相关系数为 0.921,表明 α -螺旋含量的减少与酪氨酸、色氨酸残基的暴露呈正相关。综上,在辐照过程中 Ara h 2 蛋白的结构变化呈现一定的规律性。

2.3 辐照处理对 Ara h 2 蛋白分子量的影响

由图 5 可知,天然 Ara h 2 蛋白的分子量为 16、18 kDa,这与 Marsh 等^[25]的报道一致。辐照处理后花生 Ara h 2 蛋白条带发生了显著变化,16 kDa 和 18 kDa 蛋白条带颜色随着辐照剂量的增加而变浅,且在 10 kGy 时条带消失,同时 Ara h 2 蛋白产生了一些高分子

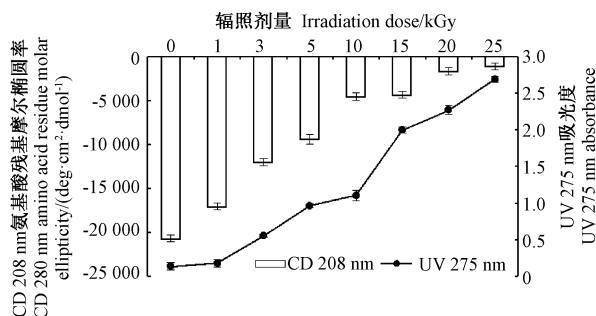
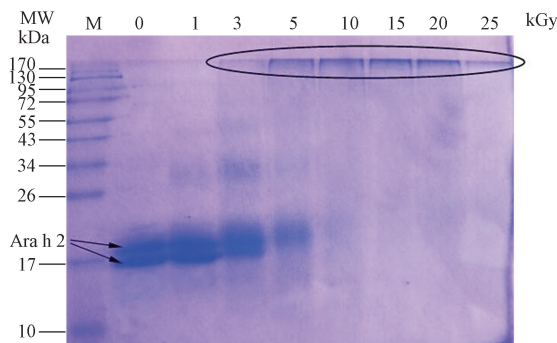


图 4 不同剂量辐照处理下 Ara h 2 蛋白的圆二色谱与紫外光谱的相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between circular dichroism spectra and UV absorption spectra of Ara h 2 protein under different doses of irradiation

量的化合物,多数聚合物堆积在分离胶的顶部,甚至存在于浓缩胶中,无法进入到分离胶,且 1、3 kGy 处理出现了部分 34 kDa 的聚合物。综上所述,辐照产生的能量能打断肽链,产生蛋白亚基,而这些亚基片断可能重新交联产生了分子量较大的聚合物,即辐照处理使 Ara h 2 蛋白发生了降解和交联。



注:M:预染标准蛋白。下同。

Note: M; Pre-stained marker. The same as following.

图 5 不同剂量辐照处理下 Ara h 2 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE patterns of Ara h 2 protein under different irradiation doses

2.4 辐照处理对 Ara h 2 抗原性的影响

图 6 中泳道 2 只出现 16 kDa 和 18 kDa 2 个印迹条带,而阴性兔血清的免疫印迹图谱上无任何条带(结果未列出),说明 Ara h 2 抗体能特异性地识别 Ara h 2 蛋白及其表位,与花生中的其他过敏原均无反应。辐照 Ara h 2 蛋白免疫印迹图与电泳图的一个明显变化是,看不到分离胶顶部的印迹条带,其原因可能是辐照破坏了 Ara h 2 蛋白的表位,从而在膜上无法与抗体反应,也可能是形成的聚合物分子量过大,无法从

电泳凝胶转印至膜上。总体来说,免疫印迹条带的消失说明辐照处理可以破坏 Ara h 2 蛋白与兔抗 Ara h 2 蛋白多克隆抗体 (IgG) 结合的活性。

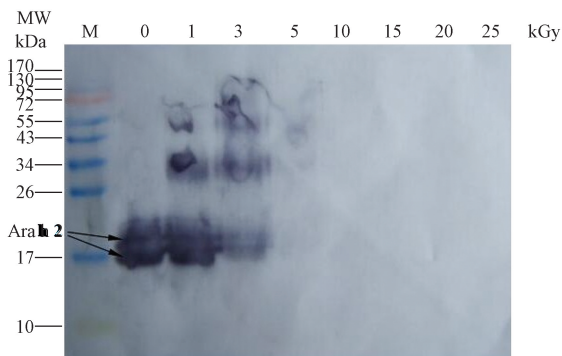


图6 不同剂量辐照处理下 Ara h 2 蛋白的免疫印迹图

Fig.6 Western blotting of Ara h 2 protein under different irradiation doses

为进一步检测辐照处理对 Ara h 2 蛋白免疫活性的影响,采用间接 ELISA 方法定量测定辐照处理后 Ara h 2 蛋白与 Ara h 2 抗体的结合能力 (图 7)。结果表明,随着辐照剂量的增大,Ara h 2 蛋白与抗体的结合能力降低,当辐照剂量为 5 kGy 时,Ara h 2 蛋白的 IgG 结合能力降低了 66%;辐照剂量为 10~25 kGy 时,Ara h 2 蛋白的 IgG 结合能力均降至 10% 以下,这与免疫印迹得到的结果一致,说明辐照处理破坏了 Ara h 2 蛋白的表位,使其失去与抗体结合的能力;辐照剂量为 5 kGy 时可较大程度破坏 Ara h 2 蛋白表位,10~25 kGy 辐照处理后 Ara h 2 蛋白基本丧失免疫活性。此外,辐照剂量增大引起的 Ara h 2 的抗原性减弱与 CD 208 nm 峰强度的降低有良好的相关性,相关系数为 0.842。同时,比较 Ara h 2 的抗原性减弱与 UV 275 nm 的峰强度增强的趋势,得出两者相关系数为 0.961,相关度更高,说明辐照处理使 Ara h 2 蛋白的有序结构转为无序,引起过敏原表位无法与 Ara h 2 抗体结合,失去免疫活性。

3 讨论

3.1 辐照处理对 Ara h 2 蛋白构象的影响

在液体状态下 ^{60}Co 辐照产生的 γ 射线激活水分子产生水合电子、羟基和氨基自由基作用于氨基酸、多肽等生物分子,使它们发生脱氨、脱羧、氧化反应,引起蛋白质降解、交联和分子构象的改变,是辐照引起蛋白质结构变化的主要原因^[26-27]。辐照处理后 Ara h 2 蛋白

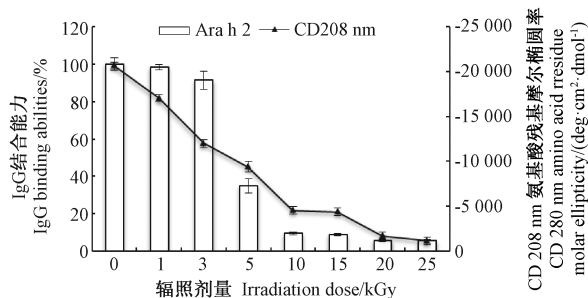


图7 不同辐照剂量下 Ara h 2 的 IgG 结合能力与 Ara h 2 α -螺旋含量变化

Fig.7 Changes of IgG binding abilities and α -helix content of Ara h 2 protein under different irradiation doses

在 210、275 nm 处的紫外吸收强度的显著变化及 208、222 nm 处圆二色光谱的改变,表明蛋白质肽键、色氨酸、酪氨酸残基都是辐照自由基对蛋白质进行攻击的位置,这种攻击导致了 Ara h 2 蛋白发生聚合作用和片段化,显示为辐照强度增强的条件下,分子量为 16 kDa 和 18 kDa 的条带几乎消失,并出现大分子聚合物。

胡欣欣^[28]发现在较多羟基自由基存在的条件下,酪氨酸易被氧化为二聚酪氨酸,使蛋白分子发生集聚。Ara h 2 蛋白分子具有较多的酪氨酸,其水溶液经辐照处理后产生的羟基使 Ara h 2 蛋白出现降解和交联现象,且辐照强度增强时 Ara h 2 蛋白在 275 nm 处的特征峰显著增强,故可推测 Ara h 2 蛋白在辐照过程中形成聚合物的主要原因可能是形成了二聚酪氨酸。

3.2 辐照处理对 Ara h 2 蛋白致敏活性的影响

蛋白质引起致敏的前提是其具有抗原性。本研究结果表明,随着辐照剂量的增大,Ara h 2 蛋白与抗体的结合能力降低,说明辐照能破坏 Ara h 2 蛋白的抗原性,降低蛋白质的致敏性,类似的结果也出现在 Ara h 6 和其他花生过敏原蛋白中^[16,29]。此外,Byun 等^[30]、Meng 等^[31]也证实辐照能破坏虾原肌球蛋白、鸡蛋卵白蛋白、牛奶 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的过敏原表位,导致致敏性的消减。

过敏原表位是蛋白质具有抗原性的关键性因素,是抗原与抗体特异性识别的基本单位。Ara h 2 蛋白具有 10~11 个线性过敏原表位,Barre 等^[8]和 Mueller 等^[9]发现色氨酸和酪氨酸均位于 Ara h 2 蛋白分子的过敏原表位上, α -螺旋结构对 Ara h 2 蛋白表位功能的发挥起着重要的作用。通过紫外光谱和圆二色光谱分析发现,辐照处理引起了 Ara h 2 蛋白色氨酸、酪氨酸残基和 α -螺旋含量的变化,这些变化均与 Ara h 2

蛋白与抗体结合能力的降低呈现高度的相关性,说明辐照处理导致了 Ara h 2 蛋白变性、交联和构象的改变,破坏了其过敏原表位,导致蛋白抗原性降低,破坏蛋白质本身的致敏性。

3.3 辐照剂量对 Ara h 2 构象及致敏活性的影响

本研究中,当辐照剂量达到 10 kGy 时,溶液中 Ara h 2 蛋白的结构基本已被破坏,几乎丧失了与抗体结合的能力,而继续增加辐照剂量,其结构与抗原性的改变均不显著,即辐照剂量为 10 kGy 时就能达到有效破坏 Ara h 2 蛋白结构和致敏活性的目的。同样,Ara h 6 蛋白在辐照剂量达到 10 kGy 时其在溶液中与抗体结合的能力也基本消失^[29]。许舒婷等^[16]发现电子束辐照可以降低混合花生蛋白提取液的致敏性,Ara h 2 蛋白条带在辐照剂量达到 15 kGy 时完全消失,其他蛋白条带也均明显变浅,而在剂量达到 20 kGy 时,脱脂花生粉末的致敏性才开始降低。因此,下一步研究的重点应是综合考虑花生过敏原的存在状态等因素,在控制辐照剂量的同时最大限度地降低花生过敏原的致敏性。

4 结论

⁶⁰Co- γ 辐照处理可显著改变溶液中花生过敏原 Ara h 2 蛋白的结构和抗原性,使其在 275 nm 处的紫外吸光度增强, α -螺旋含量降低,并形成蛋白交联。随着辐照剂量的增加,Ara h 2 蛋白与抗体的结合能力降低,且辐照处理后 Ara h 2 蛋白的结构变化与其抗原性变化是高度相关的,说明辐照处理改变了蛋白质的特定氨基酸或肽键的组成,导致 Ara h 2 蛋白变性,破坏了蛋白质与抗体的结合能力,降低了蛋白质的致敏性。此外,辐照剂量为 10 kGy 时可基本破坏溶液中 Ara h 2 蛋白的免疫活性。综上,辐照处理能降低花生过敏原的致敏性,可作为花生过敏原脱敏的新方法,但要达到良好的辐照脱敏效果并开展实际应用,仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 41-58

[2] Zhou Y, Wang J S, Yang X J, Lin D H, Gao Y F, Su Y J, Yang S, Zhang Y J, Zheng J J. Peanut allergy, allergen Composition, and methods of reducing allergenicity: A review [J]. *International Journal of Food Science*, 2013, 2013:1-8

[3] Peters R L, Koplin J J, Gurrin L C, Dharmage S C, Wake M, Ponsonby A L, Tang M L K, Lowe A J, Matheson M, Dwyer T, Allen K J. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: Health Nuts age 4-year follow-up [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 140(1):145-153

[4] Kotz D, Simpson C R, Sheikh A. Incidence, prevalence, and trends of general practitioner-recorded diagnosis of peanut allergy in England, 2001 to 2005 [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011, 127(3): 623-630

[5] Zhuang Y H, Dreskin S C. Redefining the major peanut allergens [J]. *Immunologic Research*, 2013, 55(1/3):125-134

[6] Koppelman S J, Vlooswijk R A, Knippels L M, Hessing M, Knol E F, van Reijssen F C, Bruijnzeel-Koomen C A. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world [J]. *Allergy*, 2001, 56(2): 132-137

[7] 李欣, 陈红兵. 食物过敏原构象性表位鉴别的研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(17):279-283

[8] Barre A, Borges J P, Culierrier R, Rougé P. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes[J]. *Immunology Letters*, 2005, 100(2): 153-158

[9] Mueller G A, Gosavi R A, Pomés A, Wünschmann S, Moon A F, London R E, Pedersen L C. Ara h 2: Crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity[J]. *Allergy*, 2011, 66(7): 878-885

[10] 徐晨, 白婵, 耿胜荣, 熊光权, 张同, 钼晓艳, 饶丹华, 廖涛. ⁶⁰Co- γ 射线辐照对草鱼贮藏品质的影响[J]. *核农学报*, 2018, 32(6): 1116-1124

[11] 顾可飞, 高美须, 李春红, 潘家荣. 辐照降低食物致敏性的研究进展[J]. *核农学报*, 2006, 20(6): 524-526

[12] Vaz A F M, Souza M P, Vieira L D, Aguiar, J S, Silva, T G, Medeiros, P L. High doses of gamma radiation suppress allergic effect induced by food lectin[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2013, 85(4):218-226

[13] Goma A, Boye J. Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods[J]. *Food Research International*, 2015, 74(10):275-283

[14] 李新, 熊光权, 廖涛, 钼晓艳, 耿胜荣, 程薇. 小龙虾虾肉辐照后理化指标与蛋白质性质分析[J]. *核农学报*, 2016, 30(10): 1941-1949

[15] 王烁, 张春红, 李淑荣. 辐照处理对花生致敏蛋白的影响[J]. *花生学报*, 2009, 38(2):1-5

[16] 许舒婷, 高美须, 支玉香, 潘家荣, 李淑荣, 王志东, 刘超超, 赵杰, 兰丽平, 徐迎阳. 电子束辐照对花生过敏原免疫原性及生化性质影响的研究[J]. *核农学报*, 2012, 26(7):1006-1011

[17] 胡纯秋. 花生过敏原 Ara h 2 的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2010: 15-29

[18] 刘珂, 熊丽娅, 高金燕, 陈红兵, 佟平. 加工对鸡蛋中四种主要过敏原结构的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(23): 51-61

[19] 丁晓岚, 高红旗. 圆二色光谱技术应用和实验方法[J]. *实验技术与管理*, 2008, 25(10): 48-52

- [20] 王田虎. 药物与生物分子相互作用的光谱特性分析与研究[D]. 南京:南京航空航天大学, 2011: 8-17
- [21] 李艳青. 蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2013: 7-24
- [22] 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
- [23] 白雨鑫, 李欣, 赵丽霞, 陈红兵, 高金燕. 食物过敏原结构变化的光谱学研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 284-289
- [24] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 王新省. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 388-394
- [25] Marsh J, Rigby N, Wellner K, Reese G, Knulst A, Akkerdaas J, van Ree R, Radauer C, Lovegrove A, Sancho A, Mills C, Vieths S, Hoffmann-Sommergruber K, Shewry P R. Purification and characterisation of a panel of peanut allergens suitable for use in allergy diagnosis[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52(Sup 2): 272-285
- [26] Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. Effect of processing on Conformational changes of food proteins related to allergenicity[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 49: 24-34
- [27] 王梁燕, 洪奇华, 孙志明, 华跃进. 电子束辐照技术在生命科学中的应用[J]. 核农学报, 2018, 32(2): 283-290
- [28] 胡欣欣. γ 射线照射对蛋白质结构和功能影响的研究[D]. 济南:山东大学, 2015: 10-29
- [29] Luo C P, Hu C Q, Gao J Y, Li X, Wu Z H, Yang A S, Chen H B. A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3): 1141-1147
- [30] Byun M W, Lee J W, Yook H S, Jo C, Kim H Y. Application of gamma irradiation for inhibition of food allergy [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002, 63(3/6): 369-370
- [31] Meng X Y, Li X, Wang X K, Gao J Y, Yang H, Chen H B. Potential allergenicity response to structural modification of irradiated bovine α -lactalbumin[J]. *Food & Function*, 2016, 7(7): 3102-3110

Effects of ^{60}Co - γ Irradiation on the Conformation and Antigenicity of Peanut Allergen Ara h 2

LUO Chunping^{1,*} HU Chunqiu²

(¹Taizhou Vocational College of Science & Technology, Taizhou, Zhejiang 318020;

² Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032)

Abstract: In order to investigate the effect of irradiation on the changes of structural and antigenic properties of Ara h 2, the separated peanut allergen Ara h 2 was irradiated by ^{60}Co - γ rays at different doses. The structures were characterized by ultraviolet absorption spectrum, circular dichroism (CD), and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), respectively. The antigenicity of the irradiated Ara h 2 was evaluated by Western blotting and indirect ELISA. Results showed that the conformation of Ara h 2 was significantly changed after ^{60}Co - γ irradiation treatment, which caused denaturation and aggregation of Ara h 2. The IgG binding capacity of Ara h 2 was reduced with the increasing irradiation doses, which correlated well with the rise of UV absorption intensity and a loss of α -helix content. Moreover, the structure and antigenicity of Ara h 2 were almost completely destroyed when the irradiation dose was up to 10 kGy. It indicated that ^{60}Co - γ irradiation can effectively reduce the allergenicity of Ara h 2, which may provide a new method on peanut desensitization technology.

Keywords: ^{60}Co - γ irradiation, peanut allergy, Ara h 2, conformation, antigenicity