

花生球蛋白鼠源多克隆抗体的制备及免疫学特性鉴定

尚阿晨, 席俊, 刘德果, 李英英, 吴泉

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为建立花生球蛋白致敏原的免疫学快速检测方法,采用碱溶酸沉法提取花生球蛋白,经 SDS-PAGE 检测蛋白纯度后,免疫 5 只 6~8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠制备花生球蛋白鼠源多克隆抗体(多抗)血清,并进行免疫学特性鉴定。结果表明:免疫结束后得到的 5 个多抗血清效价均在 1:51 200 以上,均具有一定的敏感性,其中 2 号小鼠的多抗血清敏感性较好,半数抑制浓度为 320 ng/mL;制备的多抗血清特异性较强,2 号小鼠的多抗血清与伴花生球蛋白、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、牛血清白蛋白、麦胚蛋白、乳清蛋白的交叉反应率均较低,在 0.5% 以下;Western blot 鉴定结果表明成功制备出了花生球蛋白鼠源多克隆抗体。综上,获得了效价高、敏感性强、特异性优良的花生球蛋白鼠源多克隆抗体,为其单克隆抗体的制备及免疫学快速检测方法研究奠定了基础。

关键词:花生球蛋白;多抗;免疫学特性

中图分类号:TS201.6;TS214.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)02-0075-04

Preparation of murine polyclonal antibody against arachin and identification of its immunological characteristics

SHANG Achen, XI Jun, LIU Deguo, LI Yingying, WU Xiao

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to establish a rapid immunological detection method for the arachin allergens, the arachin was extracted by alkali solution and acid precipitation method, and its purity was determined by SDS-PAGE, and 5 Balb/c female mice aged 6 to 8 weeks were immunized to prepare the arachin mouse-derived polyclonal antiserum, the polyclonal antiserum immunological characteristics were identified. The results showed that the titers of the polyclonal antiserum obtained after the end of immunization were all above 1:51 200, and all of them had certain sensitivities, among which the polyclonal antiserum from 2# mouse had the best sensitivities, with a half-inhibitory concentration of 320 ng/mL. The polyclonal antiserum from 2# mouse was not sensitive to conarachin, glycinin, β -conglycinin, bovine serum albumin, gluten protein, and skimmed milk powder, and the cross-reaction rate was low (all below 0.5%), indicating that the specificity of the polyclonal antiserum prepared was relatively strong. Western blot experiment results indicated the successful preparation of arachin mouse-derived polyclonal antiserum. In conclusion, a arachin mouse-derived polyclonal antibody with high titer, strong sensitivity and excellent specificity is obtained, which provide the material foundation for the preparation of monoclonal antibodies and the research of rapid immunological detection methods.

Key words: arachin; polyclonal antibody; immunological characteristics

收稿日期:2021-10-13;修回日期:2022-09-26

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172310);河南工业大学青年骨干教师(21420043);河南工业大学创新基金支持计划专项资助(2020zkcj19)

作者简介:尚阿晨(1997),女,硕士研究生,研究方向为食品安全(E-mail)1270849633@qq.com。

通信作者:席俊,教授,博士(E-mail)xijunhnu@163.com。

花生既是重要的植物蛋白来源之一^[1],也是八大过敏食物中最主要的一个,25%的食物过敏致死病例都是由花生引起的^[2]。国际免疫联合会过敏原命名小组委员会(IUIS)收录的花生过敏原为 Ara h1~h17^[3-4],其中 Ara h1~h3 和 Ara h6 为主要的花生过敏原^[5]。Ara h3 的分子质量为 57 kDa

左右,属于球蛋白家族中的 11S 贮藏蛋白,又称花生球蛋白^[6],倾向于以 360 kDa 的六聚体形式存在于花生中。Ara h3 有一个酸性亚基和一个碱性亚基,其单体是两者通过二硫键链接形成的。Ara h3 中被鉴定出 4 个 IgE 结合表位,其中有 1 个表位被确定为免疫优势表位^[7]。Ara h4 与 Ara h3 来源于同一基因,其含有 35.9 kDa 的酸性亚基,等电点为 5.5,现在被命名为 Ara h3.02^[8]。超过 50% 的花生过敏患者血清可以识别 Ara h3/h4^[9-10]。目前,针对花生球蛋白的结构及功能方面的研究较多,而基于免疫学方面的分析建立该蛋白快速检测方法的研究有限。本文从脱脂花生蛋白粉中提取花生球蛋白,纯化后免疫 Balb/c 雌性小鼠制备花生球蛋白鼠源多抗血清,并进行免疫学特性检测,以期获得效价高、敏感性强、特异性优良的花生球蛋白鼠源多克隆抗体,为其单克隆抗体的制备及免疫学快速检测方法的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脱脂花生蛋白粉,河南金诚生物科技有限公司; Balb/c 雌性小鼠(6~8 周龄),河南省实验动物中心;牛血清白蛋白、羊抗鼠酶标二抗,北京索莱宝科技有限公司;完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂, Sigma 公司;大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、脱脂奶粉、伴花生球蛋白、乳清蛋白、麦胚蛋白,本实验室提供。

Multiskan FC 酶标仪、Nanodrop 2000/2000C 分光光度计,美国 Thermo 公司;D500-D 数显均质乳化器,德国 Wiggins 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 花生球蛋白的制备

参考杜寅^[11]的方法采用碱溶酸沉法提取花生球蛋白。以料液比 1:12 向脱脂花生蛋白粉中加入 0.01 mol/L pH 7.9 的磷酸盐缓冲液(PBS),高速匀浆 10 min,调节 pH 到 7.9,50 °C 水浴振荡 70 min,用纱布过滤,滤液以 4 000 r/min 离心 10 min,得到总蛋白质浸提液。在磁力搅拌下缓慢地向浸提液中加入固体硫酸铵粉末,使饱和度达到 40%。静置 3 h,以 8 500 r/min 离心 20 min,取沉淀,用双蒸水在 4 °C 下透析 24 h,真空冷冻干燥后得到花生球蛋白。

参考文献[12]的方法,采用 SDS-PAGE 鉴定花生球蛋白的纯度。

1.2.2 花生球蛋白鼠源多抗血清的制备

参考 Kim 等^[13]的方法采用颈背部皮下多点注射法免疫 5 只 Balb/c 雌性小鼠,编号分别为 1、2、3、4、5 号,免疫剂量为 50 μ g/只。花生球蛋白用无菌

的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 稀释,将佐剂与蛋白溶液按体积比 1:1 混合后经数显均质乳化器均质乳化,然后注射到小鼠体内,免疫程序及方案见表 1。末次免疫 7 d 后,断尾取血,37 °C 恒温箱放置 2 h,4 °C 冰箱过夜,使血清充分析出,得到花生球蛋白鼠源多抗血清(多抗血清),-20 °C 分装保存,待测。

表 1 免疫程序及方案

免疫次数	免疫剂量/ μ L	佐剂种类	免疫间隔(周)
1	200	完全弗氏佐剂	3
2	200	不完全弗氏佐剂	2
3	200	不完全弗氏佐剂	2
4	200	不完全弗氏佐剂	2

1.2.3 效价测定

参考王耀^[14]的方法,采用间接 ELISA 法测定多抗血清效价。用 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液(CBS)将花生球蛋白稀释为 10 μ g/mL 的溶液,按 100 μ L/孔加到酶标板中,4 °C 放置过夜;第 2 天弃掉孔内液体,用含体积分数为 0.05% Tween-20 的 PBS(PBST)洗板后拍干,洗板 4 次,每次 5 min;按 200 μ L/孔加入封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST),37 °C 孵育 1 h,洗板,拍干;按 100 μ L/孔加入用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 按 1:100~1:51 200 稀释的多抗血清,同时以免疫前血清和 PBS 分别作为阴性和空白对照,37 °C 孵育 1 h,洗板,拍干;加入经 PBS 稀释 5 000 倍的羊抗鼠酶标二抗,37 °C 孵育 1 h,洗板,拍干;按 100 μ L/孔加入显色液,避光显色 5 min;加入 2 mol/L H₂SO₄ (50 μ L/孔)终止反应;酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A),将 $A_{\text{检测孔}}/A_{\text{阴性孔}} \geq 2.1$ 判定为阳性。

1.2.4 敏感性测定

参考皮江一等^[15]的方法,采用间接竞争 ELISA 法测定多抗血清敏感性。将 1.2.3 效价测定过程中加入多抗血清改为加入 100 μ L 花生球蛋白溶液(溶剂为 0.01 mol/L pH 7.4 PBS,质量浓度为 31.25~8 000 ng/mL)和 100 μ L 多抗血清的混合液,其中多抗血清的稀释倍数为效价测定中吸光度为 1.0 左右的稀释倍数。按 1.2.3 方法测定吸光度,计算抑制率(B/B_0 ,B 为不同质量浓度花生球蛋白与多抗血清的混合液的吸光度, B_0 为花生球蛋白质量浓度为 0 时与多抗血清的混合液的吸光度),然后以抑制率为纵坐标,花生球蛋白质量浓度(C)的对数为横坐标绘制竞争抑制曲线,并进行线性拟合,计算得到半数抑制浓度(IC₅₀),即抑制率为 0.5 时对应的花生球蛋白的质量浓度。

1.2.5 特异性测定

参考姚利利等^[16]的方法检测所制备的花生球蛋白鼠源多抗血清与伴花生球蛋白、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、牛血清白蛋白、麦胚蛋白、乳清蛋白的交叉反应(与敏感性测定方法类似,将花生球蛋白溶液替换为上述几种蛋白溶液),计算交叉反应率(R_c)($R_c = \text{花生球蛋白 } IC_{50} / \text{其他蛋白 } IC_{50} \times 100\%$)。

1.2.6 Western blot 鉴定

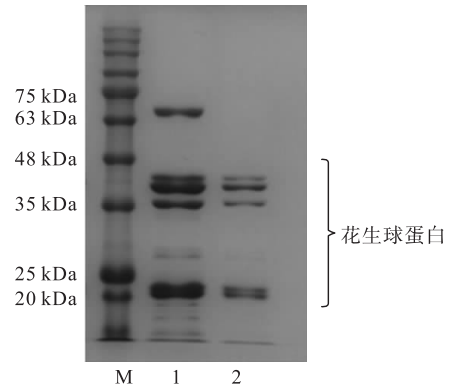
参考贺梦雪^[17]的方法,花生球蛋白经 SDS-PAGE 后,110 mA 电转 90 min 到 PVDF 膜后;加入封闭液封闭 1 h, PBST 洗膜;加入用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 按 1:10 000 稀释的多抗血清,4℃下浸泡过夜, PBST 洗膜;加入用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 按 1:5 000 稀释的羊抗鼠酶标二抗,室温孵育 1 h, PBST 洗膜;最后加 ECL 工作液显影、定影。

2 结果与分析

2.1 花生球蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

花生球蛋白的 SDS-PAGE 图谱见图 1。由图 1 可知,与脱脂花生蛋白粉相比,花生球蛋白中蛋白质条带显著减少。经过 BandScan 软件对电泳条带灰度值进行分析,花生球蛋白纯度达 80% 以上,符合

动物免疫试验的要求。



注:M. Marker;1. 脱脂花生蛋白粉;2. 花生球蛋白

图 1 花生球蛋白 SDS-PAGE 图谱

2.2 多抗血清的免疫学特性鉴定

2.2.1 效价

小鼠之间的个体差异、免疫能力差异等使多抗血清的效价各不相同,按 1.2.3 方法测定多抗血清的效价,结果如表 2 所示。由表 2 可知,5 个多抗血清的 $A_{\text{检测孔}}/A_{\text{阴性孔}}$ 均大于 2.1,说明 5 个多抗血清的效价均能够达到 1:51 200 以上,其中 2 号多抗血清的 $A_{\text{检测孔}}/A_{\text{阴性孔}}$ 在稀释 51 200 倍时最大,表明 2 号小鼠的免疫效果较好。

表 2 第 4 次免疫后多抗血清效价

编号	不同稀释倍数多抗血清的 A										阴性 A	空白 A
	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200		
1	3.074	3.015	2.405	2.161	2.040	1.843	1.371	1.050	0.759	0.502	0.161	0.064
2	3.260	2.833	2.677	2.539	2.271	1.822	1.684	1.496	1.240	0.935	0.194	0.060
3	3.051	2.854	2.305	1.906	1.798	1.482	1.161	0.864	0.682	0.509	0.211	0.074
4	3.087	2.896	2.229	1.814	1.809	1.508	1.077	0.788	0.557	0.424	0.155	0.069
5	3.483	3.249	2.870	2.762	2.400	2.065	1.615	1.065	0.804	0.649	0.198	0.072

2.2.2 敏感性

按 1.2.4 方法测定 5 个多抗血清的敏感性(根据表 2 结果,多抗血清稀释倍数为 25 600),结果见图 2。

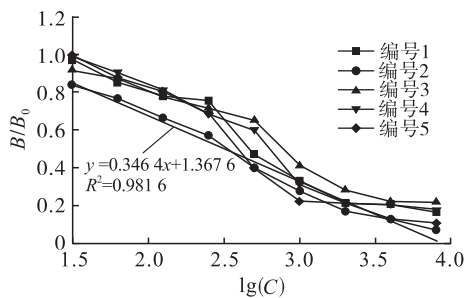


图 2 多抗血清竞争抑制曲线

由图 2 可知,不同质量浓度下花生球蛋白对多抗血清均显示出一定的抑制效果,当抑制率为 0.5

时,2 号小鼠的多抗血清对应花生球蛋白质量浓度最小, IC_{50} 为 320 ng/mL,敏感性最好。

2.2.3 特异性

选取免疫效果最好的 2 号鼠源多抗血清,按 1.2.5 方法分析其特异性,结果见表 3。

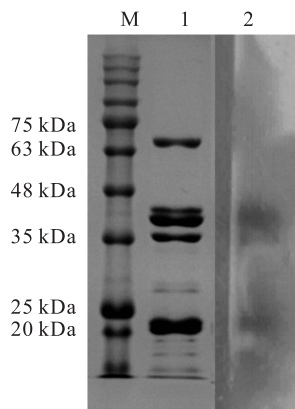
表 3 多抗血清与其他竞争物的交叉反应

蛋白种类	$IC_{50} / (\text{ng/mL})$	交叉反应率/%
花生球蛋白	320	100
伴花生球蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5
大豆球蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5
β -伴大豆球蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5
牛血清白蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5
麦胚蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5
乳清蛋白	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.5

由表3可看出,伴花生球蛋白、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、牛血清白蛋白、麦胚蛋白、乳清蛋白为竞争抗原与鼠源多抗血清反应,对应的 IC_{50} 均大于 1×10^5 ng/mL,交叉反应率均在0.5%以下,表明制备的多抗血清对这些蛋白均不敏感,不与其他蛋白发生反应,特异性较好。

2.2.4 免疫印迹

使用2号鼠源多抗血清按1.2.6方法进行免疫印迹试验,结果如图3所示。由图3可以看出,花生球蛋白亚基均产生了可以被清晰识别的条带,即该多抗血清与花生球蛋白发生抗原-抗体反应,表明成功制备出了特异性良好的花生球蛋白鼠源多克隆抗体。



注:M: Marker;1: 脱脂花生蛋白粉;2: 免疫印迹

图3 花生球蛋白与多抗血清结合 Western blot 图谱

3 结论

本试验以碱溶酸沉法提取的花生球蛋白(经SDS-PAGE鉴定其纯度达80%以上)对5只Balb/c雌性小鼠进行免疫,制备花生球蛋白鼠源多抗血清,并测定其免疫学特性。结果显示:制备的多抗血清的效价均在1:51 200以上,且特异性较好;免疫印迹试验表明花生球蛋白亚基产生了可以被清晰识别的条带,说明成功制备出了花生球蛋白鼠源多克隆抗体。本试验通过免疫小鼠获得了效价较高且免疫学特性优良的花生球蛋白鼠源多克隆抗体,为花生球蛋白单克隆抗体的制备及免疫学检测提供了支持。

参考文献:

- [1] 赵贵兴,陈霞,刘昊飞,等. 花生的功能成分、营养价值及其开发利用研究[J]. 安徽农学通报:下半月刊,2011,17(12):39-42.
- [2] RADLOVIC N, LEKOVIC Z, RADLOVIC V, et al. Food allergy in children[J]. Srp Ark Celok Lek, 2016, 144(1/2): 99-103.
- [3] IQBAL A, SHAH F, HAMAYUN M, et al. Allergens of *Arachis hypogaea* and the effect of processing on their detection by ELISA[J/OL]. Food Nutr Res, 2016, 60: 28945 [2021-10-13]. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.28945>.
- [4] 董慧,梁秉绍,黄艳梅,等. 花生主要变应原Ara h2的克隆及原核表达[J]. 现代生物医学进展,2017,17(4): 624-627.
- [5] 隗啸南,高金燕,李欣,等. 花生过敏原蛋白分离纯化方法研究进展[J]. 食品科学,2011,32(17):371-375.
- [6] 周红菲. 热加工后花生主要过敏原结构及其线性过敏原表位变化[D]. 南昌:南昌大学,2020.
- [7] RABJOHN P, HELM E M, STANLEY J S, et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3[J]. J Clin Invest, 1999, 103(4): 535-542.
- [8] WEN H W, BOREJSZA-WYSOCKI W, DECORY T R, et al. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products[J]. Compr Rev Food Sci F, 2007, 6(2): 47-58.
- [9] KAN I H, GALLO M. Cloning and characterization of a novel peanut allergen Ara h3 isoform displaying potentially decreased allergenicity[J]. Plant Sci, 2007, 172(2): 345-353.
- [10] BECKER W M, KLEBER-JANKE T, LEPP U. Peanut allergy: are clinical symptoms associated with IgE-reactivity to certain (recombinant) peanut allergens? [M]. Berlin: Springer, 2002: 159-165.
- [11] 杜寅. 花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [12] 封小龙. 花生蛋白组分制备、改性及应用研究[D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [13] KIM D J, PARK C W, KIM D W, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against recombinant tethered follicle-stimulating hormone from Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. Gen Comp Endocr, 2016, 233:8-15.
- [14] 王耀. 大豆致敏蛋白glycinin和 β -conglycinin免疫学快速检测技术研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [15] 皮江一,席俊,贺梦雪,等. β -伴大豆球蛋白多克隆抗体的制备及纯化前后免疫学特性鉴定[J]. 粮食与油脂,2018,31(4):51-53.
- [16] 姚利利,席俊,陈慧彬,等. 大豆球蛋白鼠源多克隆抗血清的制备及其免疫学特性鉴定[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2020(1):13-18.
- [17] 贺梦雪. 加工对 β -conglycinin抗原性的影响及Gly m Bd 60K破坏表位的定位[D]. 郑州:河南工业大学,2018.