

牛乳 β -乳球蛋白热稳定与免疫原性关系的光谱学研究

吴序栋^{1,2}, 朱倩倩³, 成小娟³, 徐宏³, 刘志刚², 吴晖^{1*}

1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510642

2. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060

3. 深圳大学化学与化工学院, 广东 深圳 518060

摘要 利用圆二色性光谱和荧光光谱对牛乳 β -乳球蛋白的热变性过程进行光谱学分析, 得到其热变性过程的光谱学特征; 结合生物信息学方法, 进一步分析了热变性过程中牛乳 β -乳球蛋白构象变化的特点, 探讨了热变性使牛乳 β -乳球蛋白蛋白构象变化导致其免疫原性发生变化的关系, 建立了一种研究过敏原蛋白热变性免疫原性关系的光谱实验方法, 为探讨热变性改变食物中主要过敏原的免疫原性提供了理论依据。

关键词 β -乳球蛋白; 免疫原性; 热变性; 光谱学; 生物信息学

中图分类号: TQ936.2 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)08-2205-05

引言

牛乳是国际公认的八大类主要食物过敏原之一^[1], 也是欧盟及美国相关的食品标签法中明确规定在食品标签中必须标示的食品过敏原成分^[2]。牛乳过敏严重影响了部分人群的生活质量, 特别是严重危害婴幼儿的健康^[3]。婴幼儿牛乳过敏的发生率约为2%~6%, 成年人约为0.1%~0.5%^[4]。牛乳过敏主要是IgE介导的变态反应, 也有非IgE介导的^[5]。如何降低牛乳致敏性是乳制品生产中一个重要的研究课题。

研究发现牛乳中的酪蛋白、 α -乳白蛋白及 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, 以下简称为 β -LG)是主要的过敏原^[1]。 β -LG是牛乳中的主要蛋白成分, 是水溶性球状蛋白, 在牛乳乳清中占蛋白总量的50%, 分子量为36 kDa左右, 由162个氨基酸残基组成, 具有多方面的营养作用^[6,7]。目前有一些关于加热对牛乳 β -LG免疫原性影响的报道, 但结果不尽相同^[8], 因此, 有必要研究探讨加热导致牛乳 β -LG结构变化引起其免疫原性变化的机理。

光谱学方法已广泛用于蛋白质高级结构的研究, 本研究以牛乳 β -LG为研究对象, 利用差示扫描量热法(DSC)获得牛乳 β -LG热变性的有关热、动力学信息, 进一步通过圆二色光谱(CD)、荧光光谱(RF)和生物信息方法研究加热使蛋白发生变性过程中牛乳主要过敏原蛋白 β -LG构象的变化,

通过酶联接免疫吸附剂测定实验(ELISA)检测蛋白的免疫原性, 探讨牛乳 β -LG通过蛋白热变性的方法使蛋白发生构象变化与其免疫原性间变化之间的关系, 建立利用现代光谱学方法研究食品过敏原蛋白构效变化的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

J-815型的圆二色光谱仪(日本Jasco公司), F-4500荧光分光光度计(日本日立公司), DSC-2C型示差扫描量热计(美国PE公司), 紫外MK3型酶标仪(美国Thermoelectron公司)、洗板机。牛乳 β -LG、牛血清白蛋白(BSA)、生物素标记羊抗人IgE抗体(KPL公司)、HRP标记的链霉亲和素(Vector公司)、吐温-20(Sigma公司), 牛乳过敏患者阳性血清均采自深圳市儿童医院(经Unit CAP检测, 2级以上)。其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质结构及抗原表位分析

通过PDB数据库, 获得牛乳 β -LG的晶体结构数据, PDB数据库编号为2Q2M^[9]。通过UCSF-Chimera软件^[10], 计算牛乳 β -LG蛋白二级结构及蛋白发光基团在蛋白上的发布情况, 结合已报道的牛乳 β -LG抗原表位信息^[11]进行分析。

收稿日期: 2010-06-03, 修订日期: 2010-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871752, 30570421), 广东省科技重点专项(2003A3080502)和广东省工业科技计划项目(2009B011300010)资助

作者简介: 吴序栋, 1977年生, 深圳大学医学院讲师 e-mail: wxl@szu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: fehwu@scut.edu.cn

1.2.2 β -LG 的热处理实验

用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解牛乳 β -LG, 分别在 20, 70, 80, 90, 100, 110 和 120 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温 10 min。

1.2.3 DSC 实验

用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的 PBS 溶解牛乳 β -LG, 用 DSC 记录样品的热效应曲线。实验扫描温度范围为 $0 \sim 200^{\circ}\text{C}$, 升温速度为 $5 \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$, 以 99.999% 氮气为载气, 流速 $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2.4 圆二色光谱实验

取不同处理的样品, 用 PBS ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0) 稀释浓度为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 检测样品在远紫外区 ($190 \sim 250 \text{ nm}$) 的 CD 光谱。每个样品重复扫描三次; 利用网上 CONTIN 程序分析获得的图谱数据, 对样品二级结构的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲百分比含量进行模拟计算^[12,13]。

1.2.5 荧光光谱实验

取不同温度处理的样品, 将样品浓度用 PBS ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0) 稀释为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 扫描样品的荧光光谱。分别以波长 280 和 295 nm 的激发光激发, 样品发射光谱的检测范围为 $300 \sim 500 \text{ nm}$ 。

1.2.6 ELISA 实验

按文献[14]方法, 采用常规的间接 ELISA 法进行检测, 取样品 ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 加入到孔板中, 每孔加入样品溶液为 $100 \mu\text{L}$, 于 4°C 下包被过夜, 次日后用 PBST 洗板; 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ BSA-PBS (2%) 溶液进行封闭, 37°C 振荡 2 h, 洗板; 将牛乳过敏患者血清按 1:10 的比例, 用 BSA-PBST (1% BSA-PBS, 1:2 000 Tween) 进行稀释, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 振荡 2 h, 用 PBST 洗板; 生物素标记羊抗人 IgE 抗体按比例 1:2 000 用 BSA-PBST 进行稀释, 每孔分别加

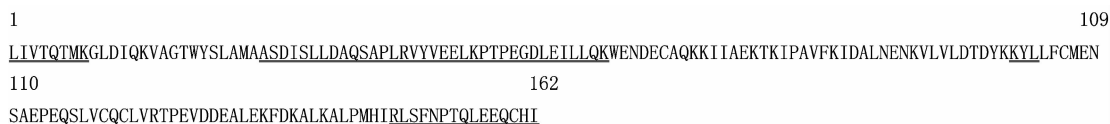
入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 振荡 2 h, 用 PBST 洗板; HRP 标记的链霉亲和素按 1:1 000 用 StrTav-HRP buffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) 进行稀释, 每孔分别加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 振荡 1.5 h, 用 PBST 洗板; 每孔加入 TMB 和 H_2O_2 底物液, 37°C 反应 10 min; 每孔分别加入浓度为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 $50 \mu\text{L}$ 终止反应, 测定每孔在 450 nm 的吸光值。

2 结果与讨论

ELISA 实验测得分别加热到 20, 70, 80, 90 和 100°C 时, 牛乳 β -LG 在 450 nm 的光密度值变化不大, 当加热温度超过 110°C 时光密度值明显降低。光密度值在 120 与 110°C 相近为 0.215, 相对于加热温度为 20°C 时的光密度值 0.510, 降低了 57.8%。结果表明当加热温度超过 110°C 时, 牛乳 β -LG 与 IgE 的结合能力有所减弱, 导致牛乳 β -LG 的免疫原性有所降低。

2.1 牛乳 β -LG 的蛋白结构及抗原表位

通过已报道牛乳 β -LG 的晶体结构数据, 获得其蛋白相关的三级结构信息 (三级结构图未给出), 通过相应的生物信息学软件计算出牛乳 β -LG 相关结构信息 (见图 1), 由结果可知牛乳 β -LG 的两个色氨酸 (Trp) 分布在蛋白的不同部分, 第 61 位属 β 折叠, 第 19 位属无规则卷曲; 第 61 位位于蛋白表面, 第 19 位处于一定程度的疏水环境。四个酪氨酸 (Tyr) 散布在蛋白的不同部分, 第 20 位、第 42 位, 第 102 位属 β 折叠结构, 第 99 位属无规则卷曲, 都位于蛋白表面。根据已报道的表位信息可知人的主要 IgE 表位在肽链的 1—8, 25—40, 41—60, 102—104, 149—162。由图 1 可知, 1—8 主要为 α 螺旋, 25—40 部分是 α 螺旋, 41—60 位部分是 β 折叠; 有两个 Tyr 在主要的抗原表位中。



□: α -helix, ■: β -sheet, —: epitope

Fig. 1 Structure and epitopes information of milk β -LG

2.2 牛乳 β -LG 的热稳定性

牛乳 β -LG 的 DSC 实验结果如表 1 所示。由表 1 可知, 牛乳 β -LG 变性峰的峰值为 113.2°C 。

Table 1 DSC information of milk β -LG

	$T_1/^{\circ}\text{C}$	$T_m/^{\circ}\text{C}$	$T_2/^{\circ}\text{C}$
β -LG	83.7	113.2	141.0

$T_1/^{\circ}\text{C}$: Initiating denaturation temperature; $T_m/^{\circ}\text{C}$: Peak value of denaturation; $T_2/^{\circ}\text{C}$: Termination denaturation temperature

2.3 圆二色谱

蛋白质二级结构中, 肽键排列是高度有序的, 肽键排列

的方向性也决定了肽键能级发生跃迁分裂的情况。因此, 蛋白质的二级结构特征不同, 所产生的圆二色谱带位置、吸收强度也不相同。根据所测得蛋白质的远紫外圆二色谱, 能反映出蛋白质二级结构的信息^[15]: 一般而言, 蛋白 β -折叠的圆二色谱在 216 nm 处有一负圆二色谱带, 在 $185 \sim 200 \text{ nm}$ 处有一正圆二色谱带; 蛋白 β -转角的圆二色谱在 206 nm 附近处有一正圆二色谱带; 蛋白 α -螺旋的圆二色谱在 192 nm 附近处有一圆二色谱带, 并在 222 和 208 nm 处会出现两个负的特征肩峰谱带, 其圆二色谱 θ 值在 222 nm 附近处的绝对值越大, 则显示蛋白二级结构中含更多的 α -螺旋结构。牛乳 β -LG 热变性过程中的 CD 光谱如图 2 所示。

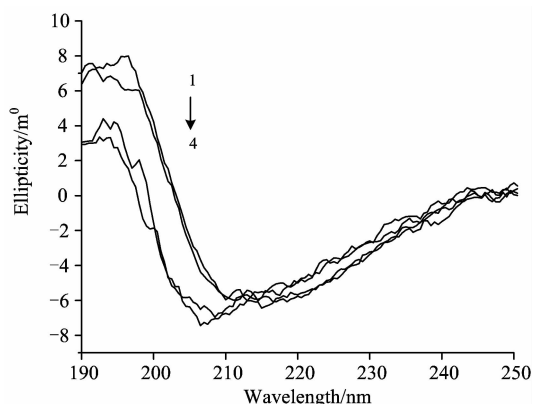


Fig. 2 Far-UV CD spectra of milk β -LG

1—4: β -LG at 20 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ respectively

由图 2 所示(70, 80 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 的数据略), 20, 70, 80, 90 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 的 CD 光谱曲线没有发生显著变化; 110 和 120 $^{\circ}\text{C}$ 的 CD 光谱曲线基本相似, 正峰的峰值与 20 $^{\circ}\text{C}$ 的 CD 光谱曲线相比有明显降低。光谱特征说明, 温度低于 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, 牛乳 β -LG 蛋白二级结构稳定, 没有发生明显的变化, 几乎不随温度发生变化, 当温度达到 110 $^{\circ}\text{C}$ 时, 牛乳 β -LG 蛋白二级结构发生显著的变化。利用 CONTIN 软件进行计算, 分析获得牛乳 β -LG 蛋白中各种二级结构的百分比含量如表 2 所示。由表 2 所示, 牛乳 β -LG 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 到 100 $^{\circ}\text{C}$ 的加热范围内其蛋白的二级结构变化不明显, 加热到 110 $^{\circ}\text{C}$ 时蛋白中 α -螺旋结构和 β -螺旋结构的含量显著减少, 而 β -转角和无规则卷曲的含量则相应增加。蛋白质分子的 β -折叠结构和 α -螺旋结构通常是包藏在多肽链内部^[16,17], 表明当加热温度低于 110 $^{\circ}\text{C}$ 时, 蛋白分子的球形结构还基本保持完整; 只有当加热温度高于 110 $^{\circ}\text{C}$ 时, 蛋白质子伸展比较充分。

Table 2 Secondary structures of milk β -LG treated at different temperature

Secondary structure	20~100 $^{\circ}\text{C}$	110~120 $^{\circ}\text{C}$
α -helix	7.6%	2.6%
β -sheet	37.0%	7.6%
β -turn	1.0%	25.0%
Random coil	54.4%	64.8%

2.3 荧光光谱

蛋白质中氨基酸能发射荧光的为 Trp, Tyr 和苯丙氨酸(Phe), 荧光强度由强到弱依次为 Trp, Tyr 和 Phe。蛋白质的荧光通常在 280 nm 或更长的波长被激发, 而 Phe 的最大激发波长为 257 nm, 所以 Phe 在绝大多数实验条件下不被激发。在 270~290 nm 激发时, 荧光来自于 Trp 和 Tyr; 当激发波长大于 290 nm 时, 可认为荧光仅仅来自于 Trp 残基, 因此可以用不同的激发波长观察蛋白质的荧光光谱。分别在 295 和 280 nm 的激发波长下, 不同温度处理的牛乳 β -LG 的荧光光谱如图 3 所示。

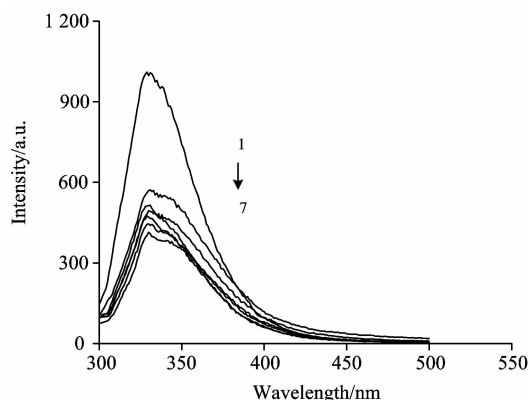


Fig. 3 Fluorescence spectra of milk β -LG excited at 295 nm

1—7: β -LG at 20 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$, 80 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$ respectively

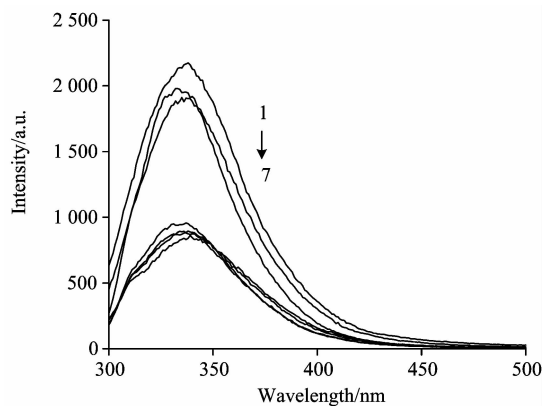


Fig. 4 Fluorescence spectra of milk β -LG excited at 280 nm

1—7: β -LG at 120 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$, 80 $^{\circ}\text{C}$, 90 $^{\circ}\text{C}$, 100 $^{\circ}\text{C}$ respectively

由图 3 所示, 在 110 $^{\circ}\text{C}$ 以下加热时随温度提高, 牛乳 β -LG 荧光逐渐减弱, 当温度超过 110 $^{\circ}\text{C}$ 时荧光强度比 100 $^{\circ}\text{C}$ 有所增强, 110 $^{\circ}\text{C}$ 时的荧光强度超过 80 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ 时的荧光强度超过 70 $^{\circ}\text{C}$ 。由图 4 可知, 在 110 $^{\circ}\text{C}$ 以下加热时随温度提高, 牛乳 β -LG 荧光逐渐减弱, 当加热温度超过 110 $^{\circ}\text{C}$ 时荧光强度比 100 $^{\circ}\text{C}$ 有所增强, 110 $^{\circ}\text{C}$ 时的荧光强度超过 70 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ 时的荧光强度甚至超过 20 $^{\circ}\text{C}$ 。根据蛋白三级结构的数据, 牛乳 β -LG 第 19 位 Trp 处于一定程度的疏水环境, 因此避免其与溶剂分子的相互碰撞, 导致其荧光强度增强。当蛋白在 110 $^{\circ}\text{C}$ 以下加热, 作为维系牛乳 β -LG 蛋白高级结构的疏水键和氢键被破坏, 使牛乳 β -LG 蛋白的结构趋于松散, 使原处于疏水环境中的 Trp 残基暴露于溶剂中, Trp 残基由强疏水环境向弱疏水环境移动, 而使荧光减弱。同时, 温度达到 110 $^{\circ}\text{C}$, 可能是高温导致二硫键介导的聚合反应形成聚合物^[18], 使含有荧光生色团的氨基酸被隐藏起来导致荧光增强。根据蛋白三级结构的数据, 牛乳 β -LG 的四个 Tyr 都位于蛋白的表面, 当加热温度超过 110 $^{\circ}\text{C}$, 聚合反应使该荧光生色团被隐藏起来, 导致在 280 nm 激发波长下 120 $^{\circ}\text{C}$ 时的蛋白荧光强度甚至超过 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

结合 DSC, CD 和 RF 数据可推测牛乳 β -LG 在低于 110 °C 加热时, 加热使蛋白分子膨胀, 水分子进入蛋白的疏水环境使荧光增强, 牛乳 β -LG 内部的构象展开, 但二级结构没有发生明显变化, 加热超过 110 °C, 蛋白的 α -螺旋结构和 β -折叠结构明显减少, 根据牛乳 β -LG 的蛋白质结构数据和主要抗原表位信息可知, 1—8 位和 25—40 位抗原表位为 α -螺旋结构, 41—60 位部分抗原表位为 β -折叠结构, 高温处理下牛乳 β -LG 的 α -螺旋和 β -折叠结构相应减少, 也可能导致含有这些结构特征的牛乳 β -LG 蛋白抗原表位构象发生了变化, 导致蛋白与 IgE 的结合活力减弱。同时牛乳 β -LG 每个单体含有五个半胱氨酸(Cys)残基, 其中四个残基在链内形成 2 个二硫键, 还有一个残基为自由巯基, 牛乳 β -LG 当低于 110 °C 加热时, 内部构象展开, 巯基和二硫键之间发生交换^[19], 当加热温度超过 110 °C, 二硫键介导的聚合反应形成聚合物, 使过敏原表位被隐藏起来, 也导致蛋白与 IgE 的结

合活力减弱。ELISA 实验的结果与上述的推测也相吻合。

上述的结果表明, 牛乳 β -LG 是个热稳定性较强的蛋白, 在 110 °C 以下加热对其免疫原性影响不大, 当加热温度超过 110 °C, 由于蛋白二级结构发生明显变化和二硫键介导的聚合反应形成聚合物使其免疫原性降低。

3 结 论

通过对牛乳 β -LG 加热过程的 DSC 和 CD 光谱和荧光光谱实验研究, 得到牛乳 β -LG 加热过程中的光谱学特征, 并通过 ELISA 实验对其免疫原性进行了检测, 通过现代的生物信息学方法对牛乳 β -LG 的光谱学特征进行了解释。通过本论文的研究, 初步构建起一种研究食品中主要过敏原蛋白热变性的光谱学实验方法, 为研究热变性降低食物的过敏原性进行了有益探索。

References

- [1] Wal J M. Allergy, 2001, 56: 35.
- [2] Mills E N, Valovirta E, Madsen C, et al. Allergy, 2004, 59(12): 1262.
- [3] Brownlow S, Morais J H, Cooper R, et al. Structure, 1997, (5): 481.
- [4] Pourpak Z, Motsafae A, Hasan Z, et al. Immunoassay Immunochem, 2004, 25(4): 385.
- [5] Wal J M. Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 2004, 93: 2.
- [6] QIN Yi-de, ZOU Si-xiang(秦宜德, 邹思湘). Journal of Biology(生物学杂志), 2003, 20(2): 5.
- [7] Farrell H M, Jimenez F R, Bleck G T, et al. Journal of Dairy Science, 2004, (87): 1641.
- [8] El-Agamy E I. Small Rumi Res., 2007, 68(1): 64.
- [9] Vijayalakshmi L, Krishna R, Sankaranarayanan R, et al. Proteins, 2007, (71): 241.
- [10] Pettersen E F, Goddard T D, Huang C C, et al. Computer Chemistry, 2004, 25(13): 1605.
- [11] Selo I, Clement G, Bernard H, et al. Clin. Exp. Allergy, 1999, 29(8): 1055.
- [12] Provencher S W, Glockner J. Biochemistry, 1981, 20(1): 33.
- [13] Whitmore L, Wallace B A. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): 668.
- [14] JI Kun-mei, LI Meng, WU Xu-li, et al(吉坤美, 李 盟, 吴序栋, 等). Food Research and Development(食品研究与开发), 2009, 30(8): 323.
- [15] Kelly S M, Price N C. Current Protein and Peptide Science, 2000, 1(4): 349.
- [16] Hopp T P. Journal of Immunological Methods, 1986, 88: 1.
- [17] Hopp T P, Woods K R. Proceedings of the National Academy Science, 1982, 78(6): 3824.
- [18] LI Lan-hui, SUN Feng-mei, HUANG Juan, et al(李兰会, 孙丰梅, 黄 娟, 等). China Dairy Industry(中国乳球工业), 2005, 30(6): 22.
- [19] Dannenberg F. J. Food Chem., 1988, 53(1): 258.

Spectroscopic Studies on the Relationship Between Heat Treatment Process and Immunogenicity of β -Lactoglobulin in Milk

WU Xu-li^{1,2}, ZHU Qian-qian³, CHENG Xiao-juan³, XU Hong³, LIU Zhi-gang², WU Hui^{1*}

1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510642, China

2. Allergy and Immunology Institute, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

Abstract The thermal denaturation of β -lactoglobulin of milk was investigated by using DSC, circular dichroism spectra, and fluorescence spectra systematically. And its corresponding immunogenicity was tested with ELISA experiments. In addition, bioinformatics methods were also used to explain the spectral characteristics and its corresponding immunogenic change, analyze the conformational changes of the protein during thermal denaturation, and discuss the relationship between conformational change of β -lactoglobulin caused by heat and immunogenic change. Results from this study should be useful to the establishment of a spectral method examining the extent of thermal denaturation of the food allergen, and be helpful to the understanding of the mechanism of immunogenic change of food allergen treated by heat.

Keywords β -lactoglobulin; Immunogenicity; Spectroscopic; Heat treatment; Bioinformatics

(Received Jun. 3, 2010; accepted Nov. 20, 2010)

* Corresponding author