高温热处理对鲭鱼异尖线虫基因和蛋白质的影响

杜文琪[1]，谭 毅[2]，董冬丽[1]，吴希阳[1]，唐书泽[*1]

（1. 暨南大学 理工学院，广东 广州 510632；2. 中华人民共和国宁波海关，浙江 宁波 315012）

摘要：为探讨热处理后鲭鱼中异尖线虫幼虫能否被检测、幼虫残留体蛋白质是否被破坏及其对于消费者的致敏风险。选用高温灭菌和油炸两种高温加工方法处理异尖线虫体蛋白质，利用聚合酶链式反应和实时荧光定量聚合酶链式反应检测其基因变化，采用圆二色谱及十二烷基磺酸钠–聚丙烯酰胺凝胶电泳观察异尖线虫全虫体蛋白质变化情况，借用蛋白免疫印迹技术测定热处理过敏蛋白抗原性变化。结果表明，高温热处理后，异尖线虫幼虫 DNA 和蛋白质被破坏，抗原性降低。高温灭菌处理 60 min 过敏蛋白抗原性下降 98.2%。实时荧光定量 PCR 用于检测热加工食品中异尖线虫幼虫残留非常有效。油炸处理对异尖线虫体蛋白质的破坏作用比高温灭菌方法更为显著。实时荧光定量 PCR 能够快速检测出鲭鱼体内异尖线虫幼虫残留，高温灭菌和油炸热加工方法都能有效破坏残留的异尖线虫体蛋白质，从而降低过敏风险。

关键词：海产食品安全；鲭鱼；异尖线虫；过敏蛋白；热加工

中图分类号：TS 207.7　**文章编号：**1673–1689(2021)12–0044–08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673–1689.2021.12.006

Effects of High Temperature Treatment on Gene and Protein of *Anisakis* in Mackerel

DU Wenqi[1]，*TAN Yi*[2]，*DONG Dongli*[1]，*WU Xiyang*[1]，*TANG Shuze*[*1]

(1. College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Ningbo Customs District P.R.China, Ningbo 315012, China)

Abstract: The effects of high temperature treatment on changes of *Anisakis* larvae body and their residual proteins for allergic risk assessment of the contaminated *Anisakis* larvae in mackerel were investigated. Two high temperature processing methods, high temperature sterilization and deep frying, were used to treat *Anisakis* proteins within mackerel. The changes of *Anisakis* larvae genes were observed by conventional polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR (Q-PCR). The changes of *Anisakis* holoprotein were recorded by circular dichroism (CD) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The changes of immunogenicity of allergens were determined by Western blot analysis. The results showed that DNA and protein of *Anisakis* larvae were destroyed, and antigenicity decreased after heat treatment with 98.2% reduction of antigenicity of *Anisakis* proteins after 60 min of high temperature sterilization. Q-PCR could effectively detect *Anisakis* larvae residues in thermal processed foods. The effect of deep-frying on destroying the protein of *Anisakis* was more significant than that of high

收稿日期：2021–04–30

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFC1602504)；广州市民生科技攻关计划项目(201903010007)。

***通信作者：**唐书泽(1957—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事肉类食品安全研究。E–mail：tangsz@jnu.edu.cn

temperature sterilization. Q-PCR could quickly detect *Anisakis* larvae residues in mackerel. Both high-temperature sterilization and deep frying could effectively destroy *Anisakis* larvae residues, reducing the risk of allergenicity.

Keywords: seafood safety, mackerel, *Anisakis*, allergenic protein, thermal treatment

近年来,中国沿海地区鲭鱼罐头出口南美国家遭遇多次退货,理由是鲭鱼罐头中检出异尖线虫幼虫残留,并作出了“鱼罐头因存在寄生虫对消费者健康产生风险”的判定。随后,秘鲁国家竞争防卫和知识产权保护中心在 24 个城市内开展了 332 次抽查行动,超过 230 万个关联鱼罐头下架,导致我国相关企业产生巨大经济损失[1]。

在目前公认的 9 种异尖线虫中[2],简单异尖线虫(*Anisakis simplex sensu stricto*)、派氏异尖线虫(*Anisakis pegreffii*)和抹香鲸异尖线虫(*Anisakis physeteris*)是被欧洲食品安全局(EFSA)认可的与临床过敏反应相关的渔业产品关联寄生虫[3]。大多为消费者食用含第三阶段幼虫的生鱼后发生感染,并伴随过敏反应。血清学检测结果显示,活体异尖线虫在病人体内分泌代谢产物会致使人产生过敏反应,少数过敏反应由异尖线虫虫体过敏蛋白引发[4-7]。

迄今为止,冷冻和加热是灭活异尖线虫幼虫最有效的方法。文献指出,将产品中心部分加热至60 ℃以上超过 1 min,可确保杀灭异尖线虫幼虫[8-9]。然而,异尖线虫致敏患者血清测试的免疫印迹研究证明,热处理后异尖线虫的一些致敏蛋白并没有完全失活[10-11]。一些学者研究发现,接触非活性异尖线虫物质会导致过敏患者出现过敏症状,这表明异尖线虫幼虫过敏原对通常烹饪过程中的热处理有抵抗力,经过罐头加工处理的异尖线虫的幼虫也可能是过敏原来源之一,这似乎与寄生虫过敏原存在耐热性和抗胃蛋白酶的性质有关[12];有学者在罐头产品中分离出的异尖线虫幼虫中证实了两种具有热稳定性的过敏原,Ani s 1 和 Ani s 4[13]。日本也有病例显示,经过轻度热加工后,异尖线虫幼虫残留的过敏蛋白仍有致病能力[14-15]。

海鱼经现代加工技术(罐头加工工艺)处理后,其产品(如鱼肉罐头)中一般很难用肉眼观察到异尖线虫虫体的存在,无法确定其中是否有虫体残留。因此,快速检测加工食品中异尖线虫幼虫残留对于鱼类产品致敏风险排查尤为重要。海鱼罐头等食品经高温灭菌处理后,残存的异尖线虫幼虫虫体过敏蛋白能否被破坏并降低致敏风险已成为进出口部门关注的热点。

作者以最容易被异尖线虫寄生的鲭鱼为对象,选取常用的两种热加工方法(高温灭菌和油炸),研究 PCR 和 q-PCR 能否快速检出鲭鱼罐头食品中异尖线虫幼虫残留以及高温热加工技术能否有效破坏异尖线虫幼虫体蛋白质并降低过敏风险,为海鱼食品风险隐患排查和安全出口提供科学依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

异尖线虫、鲭鱼:宁波佳必可食品有限公司提供;兔多克隆抗体:江苏省寄生虫病防治研究所提供;羊抗兔 IgG-HRP:广州创伟生物科技有限公司产品;DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver5.0):宝日医生物技术有限公司产品;Taq PCR Master Mix 预混液:广州瑞真生物技术有限公司产品;改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒:生工生物工程(上海)有限公司产品;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司产品。

1.2 仪器与设备

ABI StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪:美国应用生物系统公司产品;Tanon 2500 凝胶图像分析系统、Tanon 5200 蛋白免疫印迹自动曝光仪:广州誉维生物科技仪器有限公司产品;AG 22331 Hamburg 梯度 PCR 仪:德国 Eppendorf 公司产品;JY-SPCT 型水平电泳槽:北京君意东方电泳设备有限公司产品;Infinite M200 PRO 光栅型多功能微孔板检测仪:瑞士帝肯(上海)贸易有限公司产品;HF-24 高速组织研磨仪:上海贺帆仪器有限公司产品;Legend Micro 17R 冷冻高速离心机:赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品;JY92-IIN 超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;XY-280

压力蒸汽灭菌锅：合肥华泰医疗设备有限公司产品；Chirascan plus 圆二色谱仪：英国应用光物理公司产品。

1.3 方法

1.3.1 形态学分类 将收集到的异尖线虫三期幼虫按照文献[16]的方法进行形态学初步分类。

1.3.2 样品总 DNA 提取与纯度分析 取单条虫体用蒸馏水反复冲洗，取尾部三分之一后研碎提取 DNA。DNA 提取按 DNA 抽提试剂盒说明书操作，采用紫外分光光度法对基因组 DNA 含量（以 OD_{260} 表征）和 DNA 纯度（以 OD_{260}/OD_{280} 表征）进行检测。

1.3.3 内转录间隔区（ITS）序列 PCR 扩增 以异尖线虫总 DNA 为模板，用异尖线虫 ITS 序列的通用引物 SS1（5′-GTTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3′）和 NC2（5′-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3′）进行扩增，目的片段大小约 1 000 bp。扩增总体系 50 μL，其中含 25 μL 2×PCR Buffer Mix（含有 Taq DNA Polymerase、2×Taq PCR Buffer、3 mmol/L $MgCl_2$ 和 400 μmol/L dNTP mix）、1 μL 引物 SS1（10 μmol/L）、1 μL 引物 NC2（10 μmol/L）、2 μL DNA 模板，加灭菌双蒸水至 50 μL，混匀，低速离心后置于梯度 PCR 仪中。扩增条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 70 s，30 个循环；72 ℃延伸 7 min，置 4 ℃保存。将扩增产物用质量分数 1%的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

1.3.4 PCR-RFLP 分型 根据测序结果，利用 Primer Premier 5.0 软件选择 2 个限制性内切酶 *Hinf* Ⅰ和 *Taq* Ⅰ，对通用引物扩增的 PCR 产物进行酶切。酶切按以下条件进行：反应体系 20 μL，其中含 10 μL PCR 产物、3 μL 10×Buffer（含牛血清白蛋白）、2 μL *Taq* Ⅰ或 *Hinf* Ⅰ，加灭菌双蒸水至 20 μL。*Taq* Ⅰ于 65 ℃水浴 1 h，*Hinf* Ⅰ于 37 ℃水浴 4 h。反应结束后取 7 μL 酶切产物用质量分数 2%的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

1.3.5 引物设计及特异性检测 根据 GenBank 中公布的异尖线虫核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS2（基因座 AY826724），用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物，将设计好的引物序列在 NCBI 网站进行序列特异性比对，并对引物之间的二聚体、发夹结构、错配等情况进行分析。引物序列为 DUF：5′-GAATTACGGTGAACTGTCTTC-3′，DUR：5′-GTATAGTAGATTCGGTGTTGAC-3′，扩增产物大小为 156 bp，作为热处理后检测异尖线虫 DNA 的引物之一。以上引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.3.6 异尖线虫虫体高温热处理 1）高温灭菌处理 将同类型异尖线虫虫体夹在两块鱼片中间模拟异尖线虫在鱼内的环境，将其放入罐头内模拟鱼罐头产品高温灭菌环境，在 121 ℃的高温灭菌锅内处理 20、30、40、60、80、100、120、140、160、180 min。

2）油炸处理 将同类型异尖线虫虫体夹在两块鱼片中间模拟异尖线虫在鱼内的环境，待油温升高至 180 ℃将其放入油中分别炸 90 s、3 min、5 min。

1.3.7 热处理后异尖线虫 DNA 提取 参照方法 1.3.2。

1.3.8 热处理后异尖线虫蛋白质提取 在提取异尖线虫粗蛋白常规方法[17]基础上略微更改：取 0.5 g 异尖线虫放入 3 mL PBS 中均质，冰浴超声 5 min（功率 90 W），之后在 4 ℃下以 10 000 *g* 离心 40 min 后收集上清液。为避免蛋白质降解，向粗提取物中添加蛋白酶抑制剂混合物，并放入-80 ℃冰箱中冻存。

1.3.9 目标基因扩增 普通 PCR 扩增体系及条件如 1.3.3 方法所示。采用实时荧光定量 PCR 技术，将不同条件处理后的异尖线虫 DNA 作模板，反应体系：引物（10 μmol/L）各 0.4 μL、ROX Reference Dye Ⅱ（荧光定量 PCR 参比染料）0.4 μL、TB Green Ex Taq Ⅱ（核苷酸胶体染料）10 μL、模板 2.0 μL，加灭菌双蒸水补至 20 μL。反应条件：循环前 95 ℃高温 30 s，95 ℃变性 5 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环。

1.3.10 圆二色谱仪测定蛋白质二级结构 将 0.2 mg/mL 异尖线虫蛋白质溶液在圆二色谱仪上进行测定。测试条件：样品池厚 0.1 cm，扫描范围 195~260 nm，扫描速度 200 nm/min，带宽 2 nm，并用 CNDD 软件计算各构象单元含量。

1.3.11 SDS-PAGE 分析 采用不连续凝胶垂直板电泳法对异尖线虫蛋白质组分进行分析。浓缩胶为5%，分离胶为 10%（均为体积分数）。样品（1.8 mg/mL）和上样缓冲液混合后于 100 ℃金属浴中加热 10 min，快速离心后直接上样，浓缩胶电泳电压采用 80 V，蛋白质转至分离胶后采用 120 V，待溴酚蓝指示剂接近底部时停止电泳，用考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h，用蒸馏水反复冲洗后，再用脱色液过夜脱色。

1.3.12 蛋白免疫印迹鉴定 按照上述方法电泳结

束后,小心剥离分离胶,用转印缓冲液浸泡后放置在转印装置上,300 mA 条件下 2 h 电转移至 PVDF 膜上。已转印的 PVDF 膜用质量分数 5%的脱脂奶粉封闭,室温摇床过夜,加入一抗(兔多克隆抗体,稀释倍数 2 500)4 ℃孵育 12 h,取出膜后在摇床用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入用 TBST 稀释的二抗(羊抗兔 IgE-HRP,稀释倍数 2 000)室温孵育 2 h,采用同样方法洗膜,最后采用 BeyoECL 显色液避光显色,鉴定纯化的过敏蛋白活性。

2 结果与分析

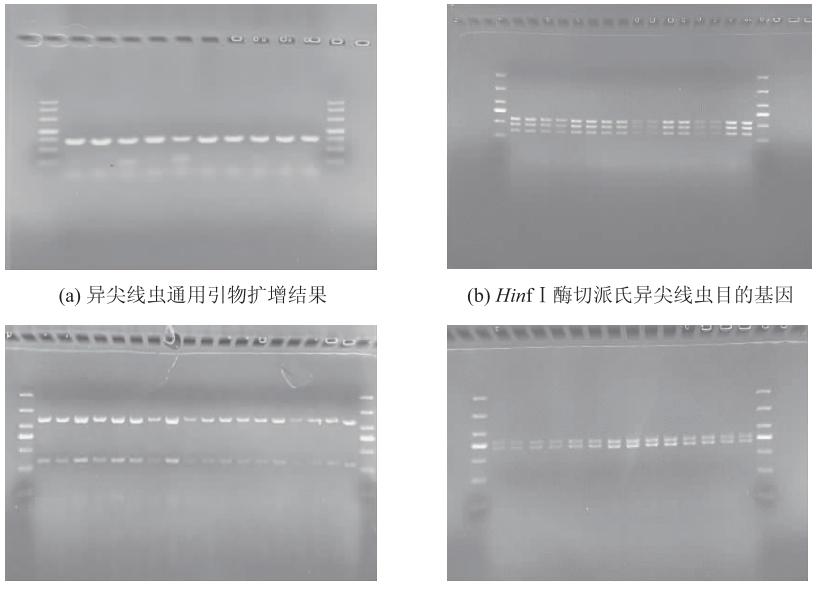
2.1 异尖线虫鉴定与检测

以提取的 DNA 为模板,用异尖线虫通用引物扩增后,出现特异性条带,目的条带大小约为 1 000 bp,电泳结果见图 1(a)。

限制性内切酶 *Hinf* Ⅰ将派氏异尖线虫目的基因(1 000 bp)酶切成约 240、290 和 340 bp 3 个片段,将简单异尖线虫目的基因酶切成约 230、620 bp 2 个片段[18](见图 1(b)和图 1(c));限制性内切酶 *Taq* Ⅰ将简单异尖线虫和派氏异尖线虫目的基因均酶切成 400、430 bp 2 个片段(见图 1(d))。综上分析,所收集的异尖线虫均为简单异尖线虫和派氏异尖线虫。

2.2 热处理后异尖线虫基因检测

用自主设计的引物 DUR/DUF 以及常规检测异尖线虫的引物 SS1/NC2 对热处理后异尖线虫基因进行检测(见图 2、图 3)。图 2(a)的泳道 S1 为涡虫 DNA 阴性对照,扩增不出条带。高温灭菌对异尖线虫 DNA 的降解效果见图 2。琼脂糖凝胶电泳显示,由于 DNA 降解具有随机性,处理 20 min 后,1 000 bp 的目的条带大部分被降解,仍有小部分呈现肉眼可见的微弱条带;40 min 后所有重复样本均已完全扩增不出目的条带;156 bp 的目的条带在处理 20、40 min 后均能被扩增出来,且条带亮度和未处理组相比没有显著变化。随着热处理时间不断增加,特异性条带亮度逐渐变弱,处理 180 min 后仍有肉眼可见的微弱条带。实时荧光定量 PCR 结果显示(见图 4(a)),随着高温灭菌处理时间不断增加,Ct 值逐渐变大,处理 60 min 后 SS1/NC2 引物扩增片段的 Ct 值在 28 上下浮动,处理 120 min 后 DUF/DUR 引物扩增片段的 Ct 值在 22 上下浮动,继续增加处理时间不会继续变化,Ct 值有效范围为 15~35,因此在高温灭菌处理中,利用上述两对引物均能检测出异尖线虫 DNA。



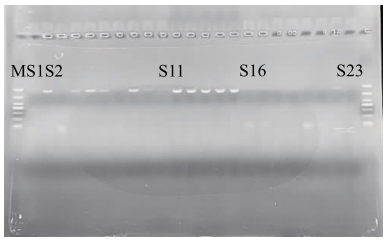
(a) 异尖线虫通用引物扩增结果　(b) *Hinf* Ⅰ酶切派氏异尖线虫目的基因

(c) *Hinf* Ⅰ酶切简单异尖线虫目的基因　(d) *Taq* Ⅰ酶切简单异尖线虫和派氏异尖线虫目的基因

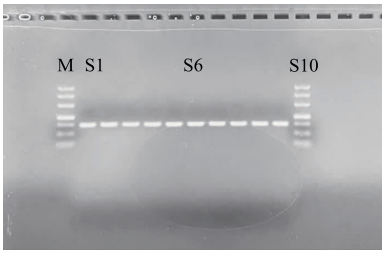
图 1　异尖线虫通用引物扩增及分型结果

Fig. 1　PCR products amplified by universal primers and genotyping of *Anisakis* larvae

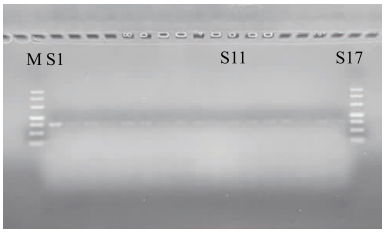
琼脂糖凝胶电泳显示在油炸处理 90 s 时,所有样本中 1 000 bp 的目的条带都无法被扩增出,156 bp 的目的条带亮度没有显著变化(见图 3);油炸 5 min 后 156 bp 的目的条带基本被降解,特异性条带



(a) 引物SS1/NC2 扩增结果



(b) 引物DUR/DUF扩增结果(处理1)



(c) 引物DUR/DUF扩增结果(处理2)

(a)中 S2~S10 处理 20 min,S11~S15 未处理,S16~S23 处理 40 min;(b)中 S1~S5 处理 20 min,S6~S10 处理 40 min;(c)中 S1~S10 处理 160 min,S11~S17 处理 180 min;M 为 DNA Marker。

图 2 高温灭菌处理对异尖线虫基因的降解作用

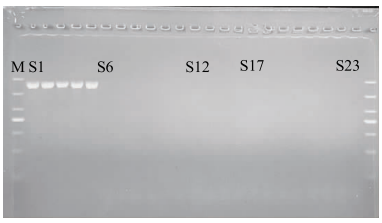
Fig. 2 Degradation of *Anisakis* gene treated by high temperature sterilization

亮度极弱。实时荧光定量 PCR 结果显示（见图 4(b)),随着油炸时间不断增加,Ct 值逐渐变大,油炸 5 min 后 SS1/NC2 引物扩增片段的 Ct 值在 33 上下浮动，油炸 3 min 后 DUF/DUR 引物扩增片段的 Ct 值在 24 上下浮动，继续增加处理时间不会使 Ct 值发生显著变化,所有目的片段均可被检测出来。

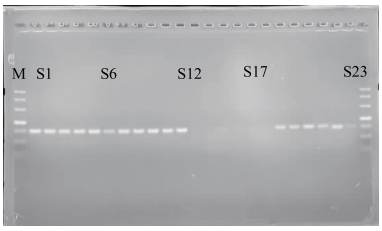
综上可知,对于检验热加工食品中异尖线虫幼虫是否残留，实时荧光定量 PCR 比普通 PCR 更为灵敏,且宜用小分子 DNA 片段的引物。

2.3 圆二色谱分析

表 1 为异尖线虫二级结构各构象含量,结果表明热处理会使异尖线虫蛋白质二级结构发生明显变化。在高温灭菌条件下(121 ℃),随着处理时间的增加,α-螺旋的含量呈先升后降的趋势，处理 60 min



(a) 引物SS1/NC2扩增结果

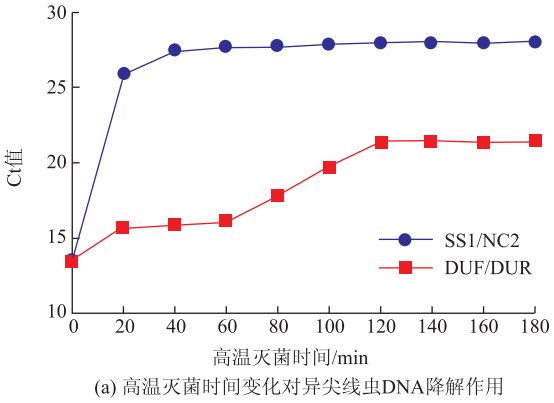


(b) 引物DUF/DUR扩增结果

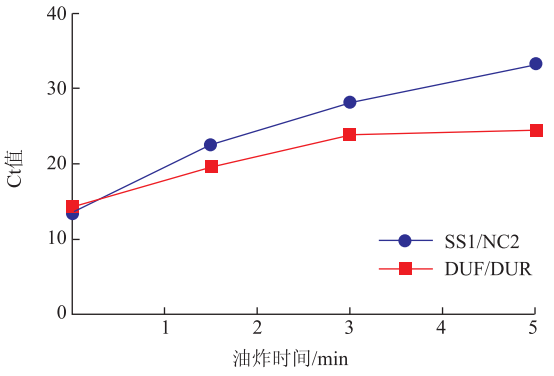
(a)中 S1-S5 未处理,S6-S11 处理 90 s,S12-S17 处理 3 min,S18-S23 处理 5 min;(b)中 S1-S5 未处理,S6-S11 处理 90 s,S12-S17 处理 5 min,S18-S23 处理 3 min;M 为 DNA Marker。

图 3 油炸处理对异尖线虫基因的降解作用

Fig. 3 Degradation of *Anisakis* gene treated by deep frying



(a) 高温灭菌时间变化对异尖线虫DNA降解作用



(b) 油炸时间变化对异尖线虫DNA降解作用

图 4 热处理对异尖线虫基因的降解作用

Fig. 4 Degradation of *Anisakis* gene by thermal treatment

时 α–螺旋含量最低,为 23.15%;β–折叠和 β–转角的含量均存在先降后升的变化趋势,处理 60 min 时的 β–折叠和 β–转角含量最高,分别为 33.05%和 16.65%。油炸条件下(185 ℃),α–螺旋的含量与未处理组相比显著降低,但两个处理组间的变化相差不大,β–折叠和 β–转角的含量均显著增加。两种热处理方式相比,油炸对蛋白质的破坏效果更强。

数据表明,热处理主要使 α–螺旋变性形成 β–折叠或无规则卷曲,也可能在 β–折叠和无规则卷曲之间建立相互转换。蛋白质分子相邻肽键间的氢键被破坏,维持 α–螺旋的氢键断裂,发生解螺旋,α–螺旋结构的含量减少;一部分 α–螺旋结构展开,蛋白质结构由有序趋向于无序,无规则卷曲结构的含量增加;另一部分 α–螺旋结构在分子间相互作用下转换为 β–折叠结构,β–折叠结构存在于蛋白质内部折叠区域,通常造成 β–折叠结构含量的增加,从而改变了蛋白质的二级结构,使蛋白质结构变得疏松不紧密[19],这与前人的研究结果[20]一致。蛋白质二级结构中无规则卷曲含量的增加,可能与等电点和由蛋白质降解引起的疏水性变化有关[21]。

表 1　不同加热条件下异尖线虫全虫蛋白质二级结构含量

Table 1　Secondary structure contents of *Anisakis* by different thermal treatment

处理方式	处理条件	α–螺旋/%	β–折叠/%	β–转角/%	无规则卷曲/%	总数/%
未处理	–	78.20±0.85^{b}	3.25±0.71^{b}	10.65±0.71^{b}	8.00±0.14^{c}	100.10±0.85^{a}
高温灭菌(121 ℃)	20 min	85.40±1.97^{c}	2.25±0.35^{ab}	10.40±0.57^{b}	1.55±0.21^{b}	99.60±0.85^{a}
	30 min	90.50±1.41^{d}	0.90±0.14^{a}	8.40±0.28^{a}	0.50±0.14^{a}	100.30±0.85^{a}
	60 min	23.15±0.64^{a}	33.05±0.78^{d}	16.65±0.92^{c}	27.30±0.42^{d}	100.15±0.35^{a}
油炸(185 ℃)	90 s	25.50±1.13^{a}	28.60±1.27^{c}	19.25±0.35^{d}	26.90±0.29^{d}	100.25±0.21^{a}
	180 s	26.10±0.85^{a}	26.90±0.85^{c}	18.85±0.21^{d}	28.50±0.42^{e}	100.35±0.21^{a}

注:同一列的不同上标字母表示差异显著(P<0.05)。

2.4　SDS–PAGE 结果

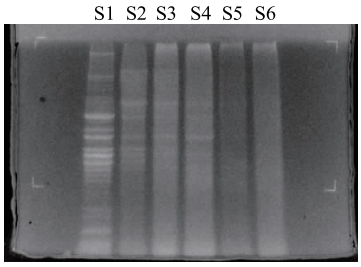
异尖线虫体蛋白质变化结果见图 5。泳道 S1 为阳性对照,未处理的异尖线虫粗提液中可辨条带有 14 条,分布在相对分子质量 10 000~235 000 之间,其中主条带有 6 条,主要分布在相对分子质量 30 000~53 000 之间。

在高温灭菌条件下(121 ℃)处理 20 min 的全蛋白质条带亮度减弱十分显著,随着处理时间增加,全蛋白质条带亮度减弱越来越明显,热处理 40 min 后只剩下相对分子质量 41 000 附近蛋白质有微弱可见条带,热处理 60 min 后无肉眼可见条带。油炸条件下(185 ℃),异尖线虫全蛋白质条带灰度减弱更为明显,油炸 90 s 后大量全蛋白质条带消失,相对分子质量 41 000 附近有微弱可见蛋白质条带,油炸 3 min 后无肉眼可见条带,异尖线虫的全蛋白质条带基本完全消失。可见油炸的加工方式能够对异尖线虫蛋白质产生破坏影响。结合对异尖线虫全蛋白质二级结构变化的检测,说明热处理条件下虫体蛋白质变性,蛋白质构象和性质发生改变,可溶性蛋白质含量随着热处理时间增加而降低,不再溶解于用来提取蛋白质的 PBS 溶液;热处理可能会导致蛋白质的肽链发生断裂,长链蛋白质断裂成短链和小肽,在电泳过程中,小肽长度超出了凝胶的检测范围,因而蛋白质条带减少。结果表明,热处理温度与处理时间与异尖线虫蛋白质破坏效果呈正相关,处理温度越高,处理时间越长,蛋白质破坏越明显,油炸对异尖线虫的破坏速度最快、效果最彻底。这与常见食物蛋白质(如虾、蟹等)在热处理条件下的变化趋势一致[22-24]。

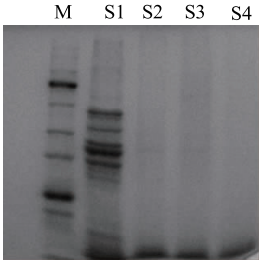
2.5　高温灭菌对异尖线虫过敏蛋白影响的蛋白免疫印迹鉴定

图 6(a)为异尖线虫虫体全蛋白质的免疫印迹结果。经过蛋白免疫印迹鉴定后,异尖线虫虫体粗蛋白质中有一条过敏条带(相对分子质量约为 41 000),可与兔多克隆抗体呈阳性反应。高温灭菌处理显著降低了异尖线虫蛋白质与 IgG 的结合能力(P<0.05),随着热处理时间增加,异尖线虫蛋白质与兔多克隆抗体的结合能力逐渐变弱,处理 60 min 后存在微弱阳性条带。灰度分析结果表明,处理 60 min 后灰度值为未处理的 1.8%。这可能是由于加热后改变了异尖线虫蛋白质分子内、分子间的共价键或非共价键的相互作用,从而改变了蛋白质的二、三级结构,使抗原性构象表位受到破坏或者遮蔽,降低了异尖线虫蛋白质的致敏性;也可能是热处理

影响了异尖线虫蛋白质溶解度,使过敏蛋白变为非水溶性蛋白质,从而降低了其致敏性。



(a) 高温灭菌对异尖线虫蛋白质组分影响



(b) 油炸对异尖线虫蛋白质组分影响

(a)中 S1 为未处理,S2 处理 20 min,S3 处理 30 min,S4 处理 40 min,S5、S6 处理 60 min;(b)中 M 为蛋白质 Marker,S1 为未处理,S2 处理 90 s,S3 处理 3 min,S4 处理 5 min。

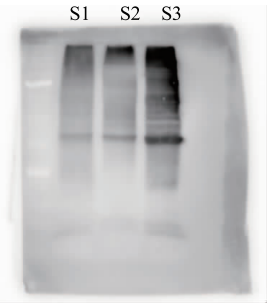
图 5 热处理对异尖线虫蛋白质组分影响的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 Effects of thermal treatment on *Anisakis* protein composition observed by SDS-PAGE

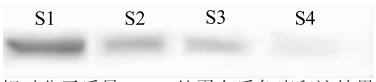
3 结 语

在我国海洋鱼类感染的寄生线虫中,异尖线虫为主要病原之一。在我国黄海、渤海海域及辽宁、舟山、青岛等主要地区均发现了异尖线虫感染现象,且海域中鱼类的感染率相当高[25-29],开展异尖线虫相关研究具有必要性。但目前国内外学者对常见海鱼加工处理后异尖线虫幼虫残留检测及虫体蛋白质过敏原的降解研究很少。

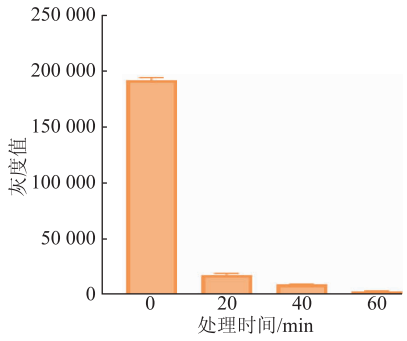
热加工对异尖线虫的基因和蛋白质均有显著破坏效果,与加热温度和时间呈正相关。在 DNA 检测方面, 实时荧光定量 PCR 比普通 PCR 更灵敏,DNA 在所有热加工条件下均能被检测出来, 因此,实时荧光定量PCR 检测体系可有效应用于海产鱼类食品异尖线虫安全隐患排查及风险防控。在蛋白



(a) 异尖线虫全蛋白质免疫印迹结果



(b) 相对分子质量41 000处蛋白质免疫印迹结果



(c) 残留过敏蛋白灰度分析

(a)中 S1 处理 40 min,S2 处理 20 min,S3 为未处理;(b)中S1 为未处理,S2 处理 20 min,S3 处理 40 min,S4 处理 60 min。

图 6 高温灭菌对异尖线虫蛋白质的降解作用

Fig. 6 Degradation of *Anisakis* protein treated by high temperature sterilization

质方面,油炸比高温灭菌处理对异尖线虫蛋白质破坏更为显著。异尖线虫蛋白质破坏效果受处理温度和时间的影响,较高温度下短时间处理即可破坏全虫体蛋白质。虽然某些异尖线虫过敏蛋白具有一定的热稳定性,但高温长时间处理能够有效破坏此类蛋白质。在海鱼罐头生产工艺中,一般高温灭菌处理时间为 80~100 min,足以完全破坏异尖线虫的过敏蛋白,致敏风险很低。在家常鱼肉烹调过程中,为了避免异尖线虫过敏蛋白的致敏风险,要注意控制鱼肉的烹调温度及时间, 建议海鱼以熟食为主,不生食(半生食)产品。

参考文献:

[1] 蔡显扬,吴志刚,江飞剑. 关于秘鲁发布鱼类罐头寄生虫问题的通报措施草案研究及应对建议[J]. 中国标准化,2018(10):20-21.

[2] MATTIUCCI S,CIPRIANI P,LEVSEN A,et al. Chapter four -molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis:an ecological

and evolutionary road map[M]. England: Academic Press Inc., 2018.
[3] EFSA Panel on Biological Hazards(BIOHAZ). Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products[J]. **EFSA Journal**,2010,8(4):1-91.
[4] AIBINU I E,SMOOKER P M,LOPATA A L. *Anisakis* nematodes in fish and shellfish-from infection to allergies[J]. **International Journal for Parasitology:Parasites and Wildlife**,2019,9:384-393.
[5] DU W Q,DONG D L,TAN Y,et al. Effects of *Anisakis* allergenic proteins on fish-borne food safety risks[J]. **Modern Concepts & Developments in Agronomy**,2021,8(4):833-842.
[6] MONEO I,CARBALLEDA-SANGIAO N,GONZALEZ-MUNOZ M. New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp.[J]. **Current Allergy and Asthma Reports**,2017,17(5):1-11.
[7] IVANOVIC J,BALTIC M Z,BOSKOVIC M,et al. *Anisakis* infection and allergy in humans[J]. **Procedia Food Science**,2015,5:101-104.
[8] FRANSSEN F,GERARD C,COZMA-PETRUT A,et al. Inactivation of parasite transmission stages:efficacy of treatments on food of animal origin[J]. **Trends in Food Science &Technology**,2019,83:114-128.
[9] SANCHEZ-ALONSO I,CARBALLEDA-SANGIAO N,GONZALEZ-MUNOZ M,et al. Pathogenic potential of *Anisakis* L3 after freezing in domestic freezers[J]. **Food Control**,2018,84:61-69.
[10] AUDICANA L,AUDICANA M T,DECORRES L F,et al. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans[J]. **The Veterinary Record**,1997,140(9):235.
[11] MONEO I,CABALLREO M L,GONZALEZ-MUNOZ M,et al. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*[J]. **Parasitology Research**,2005,96(5):285-289.
[12] MARGARITA T,OLIVARES F,DELASHERAS C ,et al. Antigenicity of *Anisakis simplex s. s.* L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2015,95(5):922-927.
[13] KLAPPER R,CARBALLEDA-SANGIAO N,KUHN T,et al. Anisakid infection levels in fresh and canned cod liver:significant reduction through liver surface layer removal[J]. **Food Control**,2018,92:17-24.
[14] SHIGEHIRA Y,INOMATA N,NAKAGAWARA R,et al. A case of an allergic reaction due to *Anisakis simplex* after the ingestion of salted fish guts made of Sagittated calamari:allergen analysis with recombinant and purified *Anisakis simplex* allergens[J]. **Allergy**,2008,59(1):55-60.
[15] IIJIMA S,MORIYAMA T,ICHIKKAWA H,et al. A case of an allergic reaction due to *Anisakis simplex* possibly after the ingestion of squid—successful detection of four *A. simplex* allergens,Ani s 1,Ani s 2,Ani s 12 and troponin C-like protein[J]. **Allergy**,2012,61(8):1104-1110.
[16] 罗朝科. 海鱼与异尖线虫病[J]. 畜牧与兽医,2003,35(12):40-43.
[17] KOCHANOWSKI M,GONZALEZ-MUNOZ M,GOMEZ-MORALES M Á,et al. Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*,*Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG-ELISA[J]. **Experimental Parasitology**,2019,197:9-15.
[18] UMEHARA A,KAWAKAMI Y,ARAKI J,et al. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*,*Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes[J]. **Parasitology International**,2008,57(1):49-53.
[19] JOOD S,SCHOFIELD J D,TSIAMI A A,et al. Effect of glutenin subfractions on bread-making quality of wheat [J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2001,36(5):573-584.
[20] 于小番,袁亚明,叶宇,等. 不同热处理方式下虾肉品质和蛋白质结构变化的差异[J]. 现代食品科技,2021,37(5):160-168.
[21] MUNE MUNE M A,SOGI D S,MINKA S R. Response surface methodology for investigating structure-function relationship of grain legume proteins[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**,2018,42(2):1-9.
[22] 董晓颖,高美须,潘家荣,等. 不同处理方法对虾过敏蛋白分子量及抗原性的影响[J]. 核农学报,2010,24(3):548-554.
[23] 李小燕. 四种加工方式对琵琶虾主要过敏原免疫原性的影响[J]. 食品安全导刊,2017,36:111.
[24] 程华峰. 不同加工处理方式对中华绒螯蟹主要过敏原的影响[D]. 安徽:合肥工业大学,2020.
[25] 李健,郭佳妮,周君波,等. 黄海海域鲐鱼感染异尖线虫三期幼虫初步调查[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(1):56-61.
[26] 史梅青,明珠,张莉,等. 中国渤海鱼类寄生异尖属线虫幼虫的分子鉴定和遗传多样性分析(线虫纲,蛔总科)[J]. 动物分类学报,2013,38(4):687-694.
[27] 耿英芝,李飞,王伟杰,等. 辽宁省海鱼异尖线虫感染调查及分子鉴定[J]. 中国食品卫生杂志,2019,31(1):10-13.
[28] 李孝军,沈鸯鸯,白颉,等. 舟山口岸进出境海鱼异尖线虫幼虫感染调查[J]. 畜牧与兽医,2016,48(5):119-122.
[29] 张洪梅,叶兵,林思夏,等. 青岛市崂山区部分海鱼异尖线虫感染状况及居民知晓率调查[J]. 中国初级卫生保健,2020,34(10):81-82.