

研究报告

引起天津地区居民口虾蛄过敏的主要致敏蛋白的研究

陈凯¹, 吴丹¹, 单立新¹, 任杰²

(1. 天津市北辰医院检验科, 天津 300400; 2. 天津医科大学检验学院, 天津 300070)

摘要:目的 研究引起天津地区居民口虾蛄过敏的主要致敏蛋白。方法 通过皮肤点刺试验收集天津地区116例口虾蛄过敏病人的血清作为特异性探针,与口虾蛄蛋白粗提物进行Western blot试验,鉴定出主要的口虾蛄致敏原。选取5例具有代表性的病人血清为研究对象,以扇贝提取物为抑制剂,进行免疫印迹抑制试验。进而分析以扇贝为代表的软体动物和口虾蛄之间的交叉反应。结果 Western blot试验结果显示,病人血清与不同分子量的蛋白之间有反应,且反应率有差异。与35 kDa的原肌球蛋白的反应率高达64.5% (40/62),与67和>90 kDa的蛋白也有较高的反应率,分别达到41.9% (26/62)和54.8% (34/62)。免疫印迹抑制试验结果显示,原肌球蛋白是扇贝和口虾蛄类的主要交叉反应蛋白,而分子量较大的蛋白几乎不存在交叉反应。结论 除原肌球蛋白外,数种大分子量口虾蛄蛋白均可引起天津地区成人对口虾蛄类过敏,且与扇贝的交叉反应率低。这表明一些高分子量的蛋白在口虾蛄类致敏中扮演重要角色。

关键词:免疫印迹试验; 食物致敏原; 口虾蛄; 交叉反应; 扇贝; 致敏蛋白; 食品安全

中图分类号: R392.8 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0410-04

Study of the major allergens of edible mantis shrimp among residents of Tianjin

CHEN Kai, WU Dan, SHAN Li-xin, REN Jie

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China)

Abstract: Objective To study the major allergens of edible mantis shrimp among residents of Tianjin. **Methods** Serums of 116 patients of edible mantis shrimp allergy were collected by skin prick test, and the main allergens were identified from the crude shrimp extract by immunoblotting technique with serums as the probe. Five typical serums were chosen from 62 positive samples. The cross-reactivity between edible mantis shrimp and scallop allergens were tested by immunoblotting inhibition experiments. **Results** The western blot showed that the serum of allergy patients had different binding sites. The reaction rate of 35 kDa tropomyosin was 64.5% (40/62), and that of 67 kDa and >90 kDa were 41.9% (26/62) and 54.8% (34/62) respectively. Immunoblotting inhibition showed that the main cross-reaction protein was tropomyosin. The larger molecular weight protein showed less cross-reactivity. **Conclusion** In addition to tropomyosin, several large molecular weight proteins of edible mantis shrimp could cause allergy among adults in Tianjin and cross-reactivity with scallop was low. This suggested that some of the high-molecular-weight proteins might play an important role in edible mantis shrimp allergy.

Key words: Western blot; food allergens; edible mantis shrimp; cross-react; scallop; allergenic proteins; food safety

在联合国粮农组织提出的八大类引起过敏的食物之中,虾、蟹及其制品是重要的一类^[1],近年来国内外有关对口虾蛄过敏的报道屡见不鲜。由于天津地区海产品丰富,虾、蟹类是大多数居民餐桌上较为常见的海鲜类食品,因此天津地区口虾

蛄引起的成人过敏反应有逐年递增的趋势。口虾蛄蛋白分布复杂,原肌球蛋白是报道最多的虾类致敏蛋白,其与扇贝为代表的软体类生物存在较为广泛的交叉反应^[2-3],对虾过敏者有85%对该蛋白的刺激出现免疫应答反应。除此之外,国外已经检测出口虾蛄中能引起人类过敏反应的其他蛋白,包括精氨酸激酶、肌钙结合蛋白和肌凝蛋白轻链^[4-7]。本研究对引起天津市成人人口虾蛄过敏的主要致敏蛋白进行分析研究,以期寻找出主要的特异性致敏原,进而服务于临床检测以及病人的脱敏治疗。

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 天津市北辰区科学技术委员会与卫生局联合资助项目 (BCWS2012-06)

作者简介: 陈凯 男 主管技师 研究方向为免疫学

E-mail: chenkaaid@sohu.com

通讯作者: 单立新 男 副主任技师 研究方向为临床免疫学

E-mail: danlixin16@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及血清来源

口虾蛄、扇贝均购自天津市农贸市场;血清标本来自天津长征医院。阳性血清 116 例,选自因食物过敏就诊的病人,以口虾蛄提取物进行皮肤点刺试验后呈阳性反应(男性 56 例,女性 60 例;年龄 12~73 周岁,平均年龄 38 周岁)。阴性血清 5 例,选自无过敏史的健康体检人群。

1.1.2 主要仪器与试剂

垂直板型电泳、凝胶成像系统、湿转槽、NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计、Avanti J-26XP 离心机。

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、SDS、四甲基乙二胺(TEMED)、Tween-20(均购自美国 Sigma),蛋白分子量标准(SM0671,加拿大 MBI Fermentas),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore),羊抗人 IgE-AP(美国 SouthernBiotech)。

1.2 方法

1.2.1 制备蛋白粗提液

制备口虾蛄蛋白粗提液:根据文献[8]改进,新鲜口虾蛄去头去壳,使用组织匀浆机制成组织匀浆。用预冷的丙酮脱脂 3 次后彻底烘干,制备成蛋白干粉,然后溶于 2 倍体积的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)缓冲液,4℃搅拌过夜,8 500 r/min 离心 30 min,收集上清,即为口虾蛄蛋白粗提液。测定粗提液浓度为 14 mg/ml,-20℃保存备用。

制备扇贝蛋白粗提液:新鲜扇贝去壳后,制作步骤与口虾蛄蛋白粗提液相同。测定扇贝粗提液浓度为 10.3 mg/ml,-20℃保存,作为免疫抑制试验的抑制剂备用。

1.2.2 口虾蛄蛋白粗提液组分分析

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术,配制 5% 的浓缩胶,10% 的分离胶,每孔上样 15 μl,65 V 恒压堆积 30 min,135 V 恒压分离蛋白 1 h,电泳结束后用考马斯亮蓝染色 1 h,摇床上脱色过夜,期间换脱色液数次。

1.2.3 免疫印迹试验(Western blot)

将粗提的口虾蛄蛋白作为致敏原,以 116 例对口虾蛄过敏的病人血清为探针,进行 Western blot 试验,鉴定口虾蛄粗提液中的主要致敏蛋白成分。具体过程如下:使用 Bio-Rad 转印槽,事先将 6 块粗滤纸和 1 块 PVDF 膜(大小与凝胶一致)在转移缓冲液(48 mmol/L Tris-HCl,39 mmol/L 甘氨酸,0.037% SDS)中浸泡 3~5 min,依次将海绵、3 块滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 块滤纸、海绵放置在转印槽的夹板中,

100 V 恒压 70 min,将电泳好的凝胶蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂牛奶 4℃封闭过夜。将封闭好的膜清洗 3 次,依次加入一抗(分 2 种,116 例阳性血清的混合血清,5 例阴性血清的混合血清),室温反应 3 h,清洗 3 次后加入二抗(碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgE,1:4 000 稀释),室温反应 1 h,加入底物 pNPP 显色。

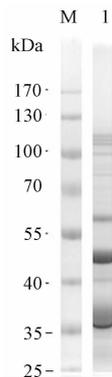
1.2.4 免疫印迹抑制试验

将提取的扇贝蛋白粗提液作为抑制剂,进行免疫印迹抑制试验,观察扇贝中可以影响口虾蛄致敏原检测的蛋白成分,筛选出区别于以扇贝为代表的软体类生物蛋白的口虾蛄致敏蛋白。具体过程如下:首先从 Western blot 试验 62 例阳性结果的病人血清中选取 5 例具有代表性的(与不同分子量的口虾蛄蛋白反应,5 例病人血清的反应条带基本涵盖了口虾蛄蛋白的所有条带)血清为抑制试验的研究对象,将提取的扇贝蛋白粗提液与这 5 例病人的血清(各取 100 μl)混合,室温孵育 3 h,从而去除对口虾蛄过敏的病人血清中可以扇贝粗提蛋白反应的 IgE。将孵育好的病人血清作为一抗,与转印的 PVDF 膜反应 3 h,清洗 3 遍后与二抗(碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgE)反应 1 h,清洗 3 遍,加底物 pNPP 显色。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 电泳结果

口虾蛄蛋白 SDS-PAGE 电泳结果(见图 1)显示,口虾蛄中主要存在 12 种蛋白组分,相对分子量分别为 125、116、110、100、90、88、73、69、65、50、45、35 kDa,各种蛋白之间的相对含量不同。其中 70 kDa 以上的蛋白种类较多,分子量较为集中,但每种蛋白的相对含量较少。同时,45 和 35 kDa 左右处的蛋白种类较为单一,且含量较高。



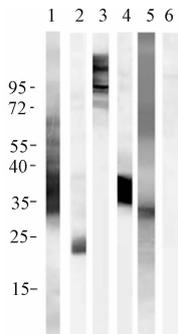
注:M 表示蛋白 marker;1 表示口虾蛄粗提液样品

图 1 口虾蛄蛋白粗提液 SDS-PAGE 结果

Figure 1 SDS-PAGE of the shrimp extract

2.2 Western blot 试验结果

口虾蛄蛋白粗提液的免疫印迹反应结果表明,62例血清呈明显阳性结果,54例血清反应较弱(条带较不清晰)。62例中有40例在35 kDa处出现阳性反应条带,根据相关文献^[9]报道35 kDa处的蛋白为原肌球蛋白,本试验中其反应率达到64.5% (40/62)。病人血清与分子量为67和>90 kDa的蛋白反应的条带较为明显,有较高的反应率,分别为41.9% (26/62)和54.8% (34/62)。17.7% (11/62)血清中特异性IgE主要与17 kDa左右的蛋白反应。图2为选取的5例代表性病人血清Western blot图谱,1号血清的Western blot条带集中在30~70 kDa处,与35 kDa处的原肌球蛋白反应较为强烈;2号和4号血清均在单一条带处发生反应,分别在20和35 kDa处,反应成分单一,在其他分子量处未见明显的反应条带;3号血清主要与大于72 kDa的蛋白反应;5号血清在30 kDa处有明显的条带,在大于55 kDa处条带较多,彼此之间区分不明显。



注:1~5表示病人血清的印迹图谱;6表示阴性血清对照

图2 口虾蛄蛋白粗提液免疫印迹图谱

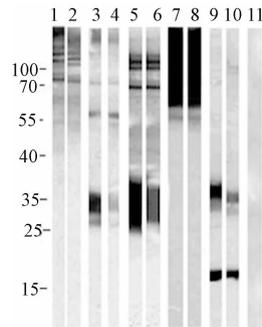
Figure 2 Shrimp immunoblot of some index sera showing the large array of shrimp allergens recognized by allergic patients

2.3 免疫印迹抑制试验结果

根据文献^[10]报道以扇贝为代表的软体类生物蛋白与口虾蛄致敏蛋白有交叉反应。本研究使用扇贝蛋白粗提液作为抑制剂,与选取的对口虾蛄过敏效价较高的5例阳性血清预孵育后,做免疫印迹试验,结果见图3。从病人血清和扇贝蛋白粗提液预孵育后的抑制结果中,观察到35 kDa左右处的蛋白出现明显的抑制现象,>70 kDa的蛋白没有出现明显的抑制现象。

3 讨论

口虾蛄的Western blot结果显示,分别有26例和34例病人血清与口虾蛄蛋白中分子量为67 kDa左右,以及>90 kDa的蛋白反应的条带较为明显,且从口虾蛄印迹图谱统计,可以推测天津地区64.5%左右



注:1、3、5、7、9表示未抑制免疫印迹结果;2、4、6、8、10表示对应的抑制免疫印迹结果;11表示阴性对照

图3 口虾蛄免疫印迹抑制试验图谱

Figure 3 Some examples of shrimp immunoblot inhibition experiments using scallop as inhibitorscallop

的临床上出现明显对口虾蛄过敏症状的病人血清与原肌球蛋白发生反应;作为口虾蛄致敏原的主要致敏蛋白—原肌球蛋白与很多不同的物种具有同源性,如扇贝等软体动物^[11],病人可能同时存在对这些物种的过敏反应,因此出现了对口虾蛄过敏的病人血清和原肌球蛋白反应率较高的假象。

为了验证口虾蛄与软体类生物是否拥有共同抗原,并观察两者的交叉反应主要出现在哪些分子量的蛋白处,本研究以扇贝粗提蛋白作为抑制剂进行免疫印迹抑制试验。结果显示,从Western blot试验的62例阳性血清中选取的5例代表性血清中,3、5、9号血清与扇贝蛋白粗提液预孵育后,35 kDa处的蛋白出现明显的抑制反应,而>70 kDa的蛋白抑制现象并不明显。1和7号血清主要与口虾蛄蛋白中分子量较大的蛋白反应,因此未发生明显的抑制反应。免疫印迹抑制试验结果表明,扇贝和口虾蛄的交叉反应主要发生于小分子量的蛋白处,尤其是35 kDa的原肌球蛋白,而大分子量的蛋白(>70 kDa)的交叉反应率较低,反应强度也较弱。结合扇贝抑制试验的结果,可以推测除原肌球蛋白外,数种大分子量的口虾蛄蛋白均可以导致天津地区成人对口虾蛄的过敏反应,且大分子蛋白与软体类生物的交叉反应率低,特异性较好。

综上所述,口虾蛄蛋白中大分子蛋白成分的致敏特异性较好,若作为临床检测使用,可较大幅度提高检测特异性。由于致敏蛋白的分布较分散,因此致敏蛋白纯化及特定蛋白的相关致敏机制有待日后的进一步研究。

参考文献

- [1] Mills E N, Breiteneder H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins [J]. Biotechnol Adv, 2005, 23 (6):

- 409-414.
- [2] Leung P S, CHU K H, Chow W K, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1994, 94 (5) :882-890.
- [3] Reese G, Ayuso R, Lehrer S B. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 119(4) :247-258.
- [4] García-Orozco K D, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, et al. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 144(1) :23-28.
- [5] Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Panaeus monodon* [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008, 146(2) :91-98.
- [6] Ayuso R, Grishina G, Ibáñez M D, et al. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124 (1) : 114-120.
- [7] Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(4) :795-802.
- [8] 李婵, 李韶深, 任杰, 等. 天津地区梭子蟹中过敏原组分分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(5) :421-424.
- [9] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(4) :339-348.
- [10] CHU K H, WONG S H, Leung P S. Tropomyosin is the major mollusk allergen; reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity [J]. *Mar Biotechnol*, 2000, 2(5) : 499-509.
- [11] YU C J, LIN Y F, CHIANG B L, et al. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2 [J]. *J Immunol*, 2003, 170(1) :445-453.

研究报告

2006—2011年西安市食品及食物中毒中 金黄色葡萄球菌毒素基因分布及分型研究

彭雁, 吴守芝, 栾阳, 王增国, 李芳, 刘晓岑

(西安市疾病预防控制中心, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 了解 2006—2011 年西安市污染食品及食物中毒中金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分离株肠毒素 (SEs)、杀白细胞素 (PVL)、表皮剥落毒素 (ETs)、毒性休克综合征毒素-1 (TSST-1) 等毒素基因的分布状况, 并比较两种分离株在基因分布及分型上的差异。方法 采用多重 PCR 法检测 61 株 *S. aureus* (包括 40 株食品分离株和 21 株食物中毒分离株) *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*pvl*、*eta*、*etb*、*tsst-1* 基因, 其中 *sea*、*seb*、*sec*、*sed* 基因引物加入同一反应体系, 剩余 4 对基因引物加入另一反应体系。结果 40 株食品分离株中 17 株检出毒素基因 (42.50%); 21 株食物中毒分离株中 18 株检出毒素基因 (85.71%), 食物中毒分离株毒素基因的检出率明显高于食品分离株 ($P < 0.01$)。食品分离株中主要流行的毒素基因为 *sea* (25%)、*eta* (12.5%), 未检测到携带 *etb*、*tsst-1* 基因的菌株; 同时得到 8 种毒素基因型, 主要流行的基因型为 *sea* (10.00%)、*sea + eta* (7.50%)。食物中毒分离株中主要流行的毒素基因为 *sea* (76.19%)、*sec* (28.57%), 未检测到携带 *pvl* 基因的菌株; 同时得到 6 种毒素基因型, 主要流行的基因型为 *sea* (42.86%)、*sea + sec + tsst-1* (14.29%)。结论 *S. aureus* 食品分离株和食物中毒分离株在毒素基因的分布及分型上存在较大差异。

关键词:金黄色葡萄球菌; 毒力基因; 多重 PCR; 基因分型; 食物中毒

中图分类号: R155.31; R378; TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0413-04

Distribution of toxin genes and genotyping in *Staphylococcus aureus* isolated from food and food poisoning from 2006 to 2011

PENG Yan, WU Shou-zhi, LUAN Yang, WANG Zeng-guo, LI Fang, LIU Xiao-cen
(Xi'an Center for Disease Control and Prevention, Shaanxi Xi'an 710054, China)

Abstract: Objective To obtain an overview of epidemic characteristics of Staphylococcal enterotoxins (SEs), Pantone-Valentine leukocidin (PVL), exfoliative toxins (ETs), and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) genes of

收稿日期: 2013-05-28

作者简介: 彭雁 女 主管检验技师 研究方向为微生物检验 E-mail: xapengyan@163.com

通讯作者: 吴守芝 女 主任检验技师 研究方向为微生物检验 E-mail: shouzhwu6538@163.com