

研究报告

天津地区梭子蟹中过敏原组分分析

李婵¹, 李韶深², 任杰¹, 徐丽敏², 朱愉², 李会强¹

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300070; 2. 天津中医药研究院附属医院检验科, 天津 300202)

摘要:目的 分析天津地区梭子蟹蛋白提取液中主要过敏原组分特征。方法 常规方法制备蟹蛋白粗提液,经 SDS-PAGE 技术分析蛋白组分;分别以蟹过敏患者混合血清(sIgE)和单例血清(sIgE)为探针,应用 Western-blot 技术鉴别提取液中主要过敏原组分,同时观察不同患者过敏原组分的异质性。结果 蟹提取蛋白液 SDS-PAGE 结果显示,共有 9 条蛋白带,其中以 70 和 74kD 组分含量较高;Western-blot 结果显示,除 21、38kD 外,其余多种蛋白组分均能与混合阳性血清反应,同时证实不同蟹过敏患者之间过敏原组分具有明显异质性。结论 天津地区蟹主要的过敏原是 36、48、94kD 三种蛋白,但不同的个体间主要过敏蛋白存在差异性。

关键词:三疣梭子蟹; 过敏蛋白; 蟹过敏症; 食品安全

中图分类号:R392.8 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)05-0421-04

Analysis of allergen components from swimming crab *Portunus trituberculatus* in Tianjin region

Li Chan, Li Shaoshen, Ren Jie, Xu Limin, Zhu Yu, Li Huiqiang

(College of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To analyze the characteristics of major allergen components from protein extracts of swimming crab *Portunus trituberculatus* in Tianjin region. **Methods** Crude protein extracts were prepared from the crab and separated by SDS-PAGE, then transferred to PVDF membrane and incubated with patients' specific IgE (sIgE) serum mixture and individual patient's sIgE serum, respectively. After incubated with the second antibody, the reactivity was detected among different patients. **Results** SDS-PAGE showed 9 protein bands in the extracts, of which 70 and 74kD were at high level. Western blot showed that patients' sIgE serum mixture could react with the majority of proteins in the extracts except 21 and 38kD proteins. The allergens in different patients were heterogeneous. **Conclusion** Three major allergens (36, 48 and 94kD protein) were identified in the extracts of swimming crab *Portunus trituberculatus* from Tianjin, but there was also individual difference.

Key words: Three trituberculatus; allergenic proteins; crab allergy cases; food safety

食物过敏已成为当今世界性的重大卫生学问题,并被视为影响健康的主要因素^[1]。据统计在美国大约 3.5%~4% 的成人和 6%~8% 的儿童存在食物过敏的问题^[2]。食物过敏的临床表现通常有腹痛、腹泻、呕吐、皮疹、鼻炎、头痛、血管性水肿和哮喘等威胁生命的过敏反应。蛋、奶等八大类食物引起的食物过敏超过 90%,其中甲壳类海产品为一类重要食物过敏原^[3-4]。梭子蟹,又称三疣梭子蟹,是最常食用的蟹类之一。虽然,国内外学者对于蟹类主要过敏原组分进行了一定研究,但因食物过敏反应存在明显的地域性问题,且未见关于蟹过敏患者之间过敏原异质性方面的研究,因此,本研究针

对天津地区蟹过敏患者,分离患者血清并以之(特异性 IgE)作为探针,分析并鉴别梭子蟹蛋白提取液中主要过敏原组分,为建立适合本地区蟹类过敏性疾病的诊断试剂和脱敏治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

垂直板型电泳仪(Mini P-4,北京凯元信瑞仪器公司);干转膜仪(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(ChampGel 北京赛智公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。

1.1.2 试剂

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 Sigma 公司;蛋白分子量标准(SM0671),购自 MBI Fermentas 公司;鼠抗人 IgE-AP,购自美国 DPC

收稿日期:2012-04-30

基金项目:天津市卫生局科技基金项目(2011KY34)

作者简介:李婵 女 硕士生 研究方向为食物过敏原鉴别与应用

通信作者:李会强 男 教授 研究方向为临床免疫学检验

E-mail:lhq@tmu.edu.cn

公司。

1.1.3 样品

新鲜梭子蟹购自天津三义庄菜市场。

1.1.4 血清来源

血清标本来自天津市中研院附属医院。阳性血清:来源临床诊断为蟹过敏患者。临床诊断依据包括:患者病史、点刺试验和血清特异性 IgE。患者出现皮肤瘙痒、急性荨麻疹、血管性水肿、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等典型的食物过敏症状。阴性血清:选自健康体检人群,入选对象无过敏家族史,无食物过敏史,血清总 IgE 水平为正常范围。

1.2 方法

1.2.1 制备蛋白粗提液

参照文献[5]的方法。取鲜活梭子蟹,去壳,挑取纯净蟹身体及腿部的肌肉组织,在生物安全柜中,使用高压灭菌后的研钵在冰浴的环境中研磨,尽量研磨成匀浆,按体积比 1:15 的比例加入冷丙酮(-20℃保存),置 4℃冰箱脱脂,期间磁力搅拌大约 2 h,每次可搅 30 min,24 h 后滤去丙酮,通风干燥,称量干燥后的,按每克样品加入 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 15 ml,置 4℃冰箱,期间搅拌大约 2 h,24 h 后,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清,分装 -20℃保存,备用。

1.2.2 蛋白成分分析

采用 SDS-PAGE 技术,用不连续系统进行垂直板电泳,对蟹蛋白粗提液组分进行分析,浓缩胶为 5%,分离胶为 10%,样品浓度为 3.5 mg/ml,和上样缓冲液以 3:2 混合,煮沸 5 min,每孔上样 15 μl,65 V 电压堆积 30 min,135 V 电压分离,待溴酚蓝指示到达底部,电泳完毕,考马斯亮蓝染色 1.5 h,脱色液充分洗脱。

1.2.3 过敏原组分分析

采用 Western-blot。SDS-PAGE 电泳后,干转膜仪 15 V 电压下 30 min,干转到 PVDF 膜上,之后 5% 的脱脂奶封闭过夜;将已封闭的膜依次加入一抗(分为 3 种,15 例阳性血清的混合血清,25 例阴性血清的混合血清,36 份单例阳性血清,1 例阴性血清),血清均 TBST 稀释 10 倍,室温摇床孵育 3.5 h,二抗(鼠抗人 IgE-AP),TBST 稀释 250 倍,室温摇床孵育 1 h,操作期间保证每次用 1 × TBST 将膜漂洗干净。最后,加入 AP 底物显色。

2 结果

2.1 蛋白提取液成分分析

蛋白提取液经 SDS-PAGE 蛋白电泳后图谱如图 1 所示,蟹蛋白粗提液中清晰可见的蛋白条带主要

有 9 条,包括:94、74、70、48、43、40、38、36 和 21 kD,其中 70 和 74kD 蛋白浓度较高。

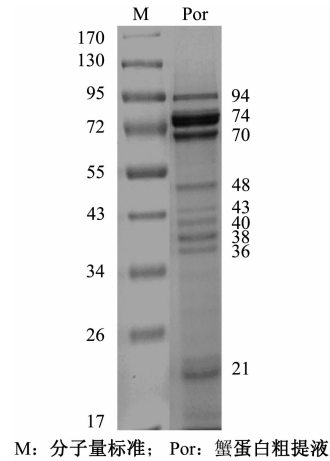
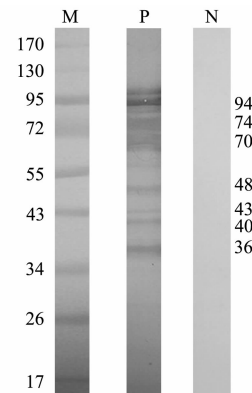


图 1 蟹粗提液蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Figure 1 The crab crude liquid protein by SDS-PAGE results

2.2 过敏原组分分析(混合血清)

蛋白提取液经 Western-blot 分析,分别使用混合的阳性和阴性血清作为探针,结果如图 2 所示,以阳性混合血清为探针的印迹中,94、74、70、48、43、40 和 36 kD 处均出现了阳性反应条带,但蛋白浓度较高的 74 和 70 kD 的蛋白与血清反应并不是最强的,而 94 kD 的蛋白与混合血清反应最强;同时,以阴性混合血清为探针的印迹中,未出现阳性反应条带。



M: 分子量标准 P: 阳性混合血清印迹 N: 阴性混合血清印迹

图 2 蟹粗提液蛋白 Western-blot 结果(混合血清)

Figure 2 Crab crude extract protein by Western - blot analysis results(mixture serum)

2.3 过敏原组分分析(单例血清)

蛋白提取液经 Western-blot 分析,分别使用随机选取的单例阳性血清和单例阴性血清作为探针,结果如图 3 所示,1 号、2 号血清以 36 kD 处蛋白反应为主,两种反应条带的模式有所区别;3 号血清无特别突出的反应条带;4 号血清以 94 kD 处蛋白反应条带最强;5 号血清最强的反应条带为 48 kD 处的

蛋白;6号血清不仅有70和74 kD处的反应条带,在94 kD~110 kD之间还出现多条反应条带;7号的阴性单例对照血清未出现反应条带。

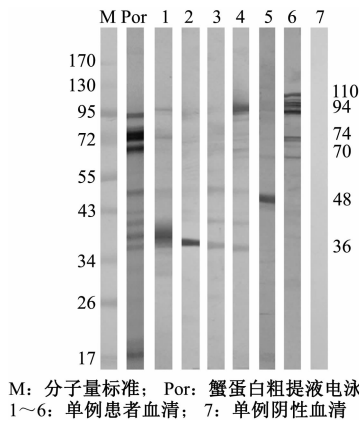


图3 蟹粗提液蛋白 Western-blot 结果(单例血清)

Figure 3 Crab crude extract protein by Western-blot analysis results(single serum)

3 讨论

过敏性食物中蛋白成分复杂,给食物中过敏原的鉴别和建立 sIgE 检测方法增添较多困难。本文目的就是分析梭子蟹中诱导 sIgE 产生的蛋白组分(过敏原),为最终建立高质量 sIgE 检测试剂奠定基础。纵观国内外食物过敏原研究文献,免疫印迹(Western-blot)技术是食物过敏原鉴别的常规方法而被广大学者采用^[6-8]。为此,以临床确诊的蟹过敏患者的血清特异性 IgE 为探针,采用经典的免疫印迹方法鉴定梭子蟹蛋白能诱导机体产生特异性抗体的蛋白(或过敏原)。

国内外关于蟹过敏的研究报道,最早是由 Leung 等^[9]报道的雪蟹中主要的过敏原,分子量 34 kD 的蛋白,这是第一个被鉴定的过敏蛋白,命名为 chaf 1,且证明其化学本质为原肌球蛋白。此外 Gill 等^[10]还发现了 25、18.5 和 14.4 kD 为雪蟹的主要过敏蛋白;近几年来国内也逐渐开始对蟹过敏的研究,大闸蟹、花蟹、铁蟹等已均有报道。

以梭子蟹为研究对象,通过脱脂提取蟹蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分析,共有 9 条主要蛋白条带,其中浓度最高的是 70 和 74 kD 两个分子量的蛋白,而早前赵绮华等^[11]研究报道的梭子蟹粗提液 SDS-PAGE 电泳分析也是有 9 条主要的蛋白条带,但具体分子量的分析略有差别;通过将确诊为过敏患者的血清混合后,以能较好地覆盖不同过敏患者的血清中的特异性 IgE,同时,以确诊的正常人(即无过敏的人)的血清混合,作为正常对照,利用免疫印迹蟹中的鉴定主要致敏成分,结果显示共有 7 条带出

现阳性反应,其中以 94 kD 处的反应最强,而与赵绮华等^[11]所报道的 74.4 和 48.7 kD 为主要致敏组分有所区别。本次实验的阳性混合血清,是以 5 例确诊过敏患者的血清混合而成,其覆盖的人群范围有限,与赵绮华等所报道的结果有所区别,可能是由于该混合血清中以这两个蛋白为主要过敏原的介导的特异性 IgE 产生的较少而造成的,但另一方面,可能是由于不同地区的蟹种和人群不同。例如,国内就出现,沈丽燕等^[12]鉴定出的河虾的主要过敏原为 36、52 和 85 kD,而黄建芳等^[13]鉴定出的河虾主要过敏原则为 21、36 和 80 kD,这样的差异,让我们了解到,以本地区的材料及患者为基准的研究是非常必要的;我们再以单例血清为探针进行免疫印迹,结果显示,不同的个体对不同分子量蛋白的反应模式出现了明显的差异,如随机选取的这 6 例患者血清,就出现了分别以 36、48、94 和 94 kD~110 kD 中的一种蛋白为主的不同的反应模式。正如很多文献中所提到的,不同的蛋白与特异 IgE 血清反应的结合率不同,Kukreja 等^[14]用免疫印迹得到浮球菌丝引发过敏反应的几种蛋白,与特异性 IgE 血清的反应率有所不同。例如 25 kD 的蛋白有高达 87.5% 的结合率,而一些蛋白只有 50%,甚至更低的 IgE 结合率,这也从另一方面证明,我们所得到的结果,不是所有的血清都能同时与所有的过敏原反应,不同的个体之间存在着明显的差异。Ebo 等^[15]的一份病例报告中,同时利用皮肤点刺实验、ELISA、免疫印迹及免疫抑制实验证实了,一个对鲑鱼、罗非鱼过敏的患者,血清中特异性 IgE 却并没有出现与鱼类的非特异共同抗原的结合,在传统的检测试剂盒检测中出现假阴性的结果,这也指出了,食物过敏个体的异质性是存在的,且应该予以重视。同时发现,其中一例血清(6号血清)在免疫印迹中出现了与在蛋白成分分析中未清晰出现的条带的阳性反应,分析原因可能是一些蛋白成分在总蛋白中所占的比例很小,通过 SDS-PAGE 电泳未显示明显的条带,但其可以与血清中的特异性 IgE 发生较强的特异性结合,而在 Western-blot 的结果中显现出来,因此,推断这些蛋白很可能具有致敏性。结合本研究结果可以提出如下设想,过敏原检测应该分为两个阶段:初筛阶段,可以食物提取的总蛋白作为已知抗原,检测蟹蛋白特异性 IgE 抗体,确定是否对蟹过敏。其二,因个体之间特异性 IgE 的种类存在异质性,导致用于脱敏的蛋白存在差异。因此,在初筛阳性的基础上,有必要检测过敏患者血清中含特异性抗体的种类,以便制定更加合理的脱敏治疗组分。

4 小结

本研究以天津地区的蟹过敏人群为研究对象,发现本地区梭子蟹的主要过敏蛋白为36、48、94 kD,同时发现了个体间存在着明显的反应模式的差异性,为本地区患者在临床上过敏症的诊断及脱敏治疗的差异性提供了研究基础。

参考文献

[1] van Hengel A J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389:111-118.

[2] LIN Jing, BARDINA L, WAYNE G, et al. Development of a novel peptide microarray for large scale epitope mapping of food allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(2):315-322.

[3] 吕相征, 刘秀敏. 健康人群食物过敏状况的初步调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(2):119-120.

[4] ZWIETERING M. Practical considerations on food safety objectives [J]. *Food Control*, 2005, 16(9):817-823.

[5] 吴序栋, 邓利平, 刘志刚. 大闸蟹过敏原的分离、鉴定与纯化 [J]. *食品科技*, 2009, 34(6):294-296.

[6] AUSUBEL F. Short protocols in molecular biology [M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 2005.

[7] ROSALI'A AYUSO, SILVIA SA 'NCHÉZ-GARCIA, LIN Jing, et al. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with

age [J]. *J allergy clin immunol*, 2010, 125(6):1286-1293.

[8] 林德球, 程江丽, 邹泽红, 等. 欧蓍草花粉主要过敏原 Par j 1 的重组表达及鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 8(27):726-730.

[9] LEUNG P S, CHEN Y C, GERSHWIN M E, et al. Identification and molecular characteri zati on of Charybdis feriatius tropomyosin, the major crab allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102(5):847-852.

[10] GILL B V, CARTIER A, HORTH S L, et al. Identification of Snow Crab proteins that elicit IgE reactivity in Snow Crab processing workers [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 111(2):S97.

[11] 赵绮华, 王锡忠, 陈丽金, 等. 梭子蟹变应原的分离、纯化与鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(3):256-259.

[12] 沈丽燕, 朱卫娟, 吕杨, 等. 花生、河虾中主要过敏原组分的研究 [J]. *首都公共卫生*, 2008, 2(2):58-61.

[13] 黄建芳, 林婷婷, 向军俭, 等. 河虾主要过敏组分的分离、纯化、鉴定及其致敏性分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(5):444-446.

[14] KUKREJAA N, SINGHA B P, ARORA N, et al. Identification of *Epicoccum purpurascens* allergens by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry [J]. *Immunobiology*, 2008, 2(3):65-73.

[15] EBO D G, KUEHN A, BRIDTS C H, et al. Monosensitivity to pangasius and tilapia caused by allergens other than parvalbumin [J]. *Investig Allergol Clin Immunol*, 2010, 20(1):84-88.

研究报告

2009—2011 年上海市旺兹沃斯沙门菌的耐药分析及分子分型

张雯霞, 陈敏, 张曦, 陈洪友, 王刚毅, 席曼芳
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要:目的 了解上海市 2009—2011 年旺兹沃斯沙门菌的耐药及分子分型特点。方法 采用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法, 对 6 株旺兹沃斯沙门菌进行 10 种抗生素敏感性试验, 采用 CLSI 2010 年版标准判断结果; 运用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 方法对 6 株旺兹沃斯沙门菌进行分子分型分析。结果 6 株旺兹沃斯沙门菌中只有 1 株对环丙沙星中度敏感, 对甲氧苄啶和四环素耐药, 其他菌株对这 10 种抗生素均敏感; 6 株旺兹沃斯沙门菌共产生 5 种 PFGE 带型, 其中 2 株表现为同一 PFGE 型别。结论 2009—2011 年旺兹沃斯沙门菌对抗生素的敏感性较高; 部分菌株之间具有较高的同源性。

关键词:旺兹沃斯沙门菌; 药物敏感试验; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型; 食品安全

中图分类号:R378.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2012)05-0424-04

收稿日期:2012-03-24

作者简介:张雯霞 女 技师 研究方向为微生物检验 E-mail:wxzhang@scdc.sh.cn

通信作者:陈敏 男 主任技师 研究方向为病原微生物检验 E-mail:mchen@scdc.sh.cn