

文章编号:1000-0615(2006)02-0281-04

研究简报·

## 不同虾类的过敏原及其过敏性

李振兴<sup>1</sup>, 林洪<sup>1</sup>, 李明华<sup>2</sup>, 曹立民<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学水生生物制品安全性实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛市过敏疾病防治中心, 山东 青岛 266003)

关键词: 过敏; 虾类; 过敏性; 食品安全

中图分类号: S917

文献标识码: A

### Allergen and allergenicity of shrimp varieties

LI Zhen-xing<sup>1</sup>, LIN Hong<sup>1</sup>, LI Ming-hua<sup>2</sup>, CAO Li-min<sup>1</sup>

(1. Aquatic Products Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Allergic Disease Prevention Center of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The consumption of seafood is widespread in China. The increase in the rate of seafood allergies, as well as their persistence and severity, become an important food safety issue. To improve seafood allergy patients' life quality, it is important to find a kind of seafood which has little or even none allergens. Different kinds of seafood live in different circumstances, it may have different allergens. This study compared the difference among varieties of shrimp. In the experiments, three kinds of shrimp were selected and the protein profiles were analyzed using SDS-PAGE. Then Immunoblotting and EAST inhibition were used to determine the allergenicity of them. The results show that main allergens of the three kinds of shrimp have molecules - 36 kD, similar allergenicity, and critical cross-reactivity.

**Key words:** allergy; shrimps; allergenicity; food safety

近年来食品安全问题受到越来越多人的重视,食物过敏这一食源性疾病已引起广大消费者、生产者和研究者的普遍关注。根据流行病学调查<sup>[1]</sup>,在欧洲约有2%~2.5%的人受到食物过敏疾病的困扰,婴幼儿的发病率更高,达到4%~6%,儿童约为2%~3%,成年人食物过敏者比例相对较低,但仍有1%~2%。在联合国粮农组织提出的八大类容易引起过敏的食物中,虾蟹等甲壳类动物及其制品是其中重要的一类<sup>[2-4]</sup>。我国虽然还没有类似的调查,但有关食用虾蟹等引起过敏的报道屡见不鲜<sup>[5,6]</sup>。因此研究我国的虾类过敏原对于保障人们生命安全、提高生活质量有着积极的意义。而且近年来国外,例如美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲食品安全局(EFSA)都针对食品中

的过敏原成分制定了相应的法规<sup>[7,8]</sup>,本研究对我国虾类制品打破国际贸易壁垒有着一定的指导意义。本研究以我国养殖量比较大并且属于不同亚目的凡纳滨对虾(十足目游泳亚目)、口虾蛄(十足目)和克氏螯虾(十足目爬行亚目)为研究对象,比较了它们之间主要过敏原的特点,分析了它们之间存在的交叉反应,以更好的了解虾类的过敏原及其过敏性,提高水产食品的安全水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从青岛市市立医院变态反应科收集12例对虾类过敏的患者血清,等量混合组成标准阳性血清池,患者均为成

收稿日期:2005-03-18

资助项目:国家自然科学基金(30471320)

作者简介:李振兴(1978-),男,山东菏泽人,博士研究生,从事食品安全方面研究。E-mail: superlxz@sina.com.cn

通讯作者:林洪, E-mail: linhong@ouc.edu.cn, Tel: 0532-82032272

年人,年龄在 18 岁~46 岁之间,其中男性 5 人,女性 7 人,将血清分离后分装,放在 -80 的超低温冰箱中冻存。阴性血清从青岛市立医院其他科室的不过敏病人的获得,分离血清并分装后于 -80 冻存。

凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*)、克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*)、口虾蛄 (*Squilla oratoria*) 均购于青岛市南山水产市场,为活品。HRP 标记的羊抗人 IgE 抗体购自美国 Sigma 公司,货号 A9667,其他试剂均为分析纯。

## 1.2 虾过敏原的抽提

抽提方法参照文献[9]的方法并略有修改,首先制作虾肉的丙酮粉,取 5 g 丙酮粉,加入 40 mL 1 mol L<sup>-1</sup> KCl,在 4 的条件下抽提 24 h,9 000 ×g 离心 15 min,取上清,将沉淀物重新溶解在 20 mL 1 mol L<sup>-1</sup>的 KCl 溶液中,在 4 条件下抽提 4 h,然后 9 000 ×g 离心 15 min,取上清,将两次的上清液混合后,用 0.01 mol L<sup>-1</sup>,pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)透析 72 h,每 12 h 换一次透析液。然后将此抽提物进行冷冻干燥,储藏于 -20 的冰箱中备用。蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法<sup>[10]</sup>。

## 1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用 Laemmli<sup>[11]</sup>建立的不连续电泳体系,其中分离胶浓度为 12% (w/v),堆积胶浓度为 5% (w/v)。蛋白质样品稀释为 1 mg · mL<sup>-1</sup>并经样品缓冲液处理,加样量为 15 μL,电泳完毕,考马斯亮蓝 R-250 染色,GIS 凝胶成像系统(上海天能公司)进行拍照、分析。

## 1.4 免疫印迹(immunoblotting)

SDS-PAGE 按 Laemmli<sup>[11]</sup>的方法进行,电泳结束后,用半干转印仪将蛋白转印到硝酸纤维膜上,转印后,将膜按泳道切成细条。蛋白质标准用氨基黑 10B 染色,待测样品进行免疫检测。首先将硝酸纤维膜细条置于封闭液 BPBST(含 0.5% BSA(牛血清白蛋白)和 0.5% Tween20(吐温 20)的 PBS(磷酸盐缓冲液))封闭,然后加入过敏患者的阳性血清,用 PBST(含 0.5% Tween20 的磷酸盐缓冲液 pH7.4)充分洗涤后加入 HRP 标记的羊抗人 IgE,充分孵育后用 DAB(二氨基联苯胺)显色。

## 1.5 免疫印迹抑制实验(immunoblot-inhibition)

取部分阳性血清用等量的凡纳滨对虾抽提液在室温下孵育 1 h,其他过程同免疫印迹。

## 1.6 酶联免疫吸附抑制实验(enzymeallergosorbent inhibition test)

将蛋白的抽提物用碳酸盐缓冲液(50 mmol L<sup>-1</sup>,pH 9.6)稀释为总蛋白浓度约为 10 μg · mL<sup>-1</sup>制成包被液。然后用封闭液 BPBST 封闭。将血清用封闭液稀释 2 倍,同样的,用封闭液将抑制抽提液稀释为 6 个梯度浓度,以卵清蛋白作为非特异性抑制的阴性对照。将 300 μL 的稀释血清与抑制抽提液预先混合并孵育 1 h。在预包被酶标板的每个微孔中加入 50 μL 这种混合液,孵育。洗涤后,依次加辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgE 抗体(1 2 000),

TMB(四甲基联苯胺)底物溶液并在 37 水浴条件下孵育 15 min,用 2 mol L<sup>-1</sup>硫酸中止反应,用酶标仪(Multiscan labsystem)在 450 nm 的条件下测吸光度。

## 2 结果

### 2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

所选 3 种虾的蛋白质抽提物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 1 所示。选择的蛋白质分子量标准为低分子量蛋白标准,分子量介于 14.4 kD 至 97.4 kD。在克氏螯虾的抽提物中,有两条带大于 97.4 kD,而凡纳滨对虾和口虾蛄则中没有发现大于 97.4 kD 的条带。在 14.4~20.1 kD 之间所有虾抽提物均未发现有明显的条带。在 25 kD 左右口虾蛄有一较为明显的条带,凡纳滨对虾和克氏螯虾则没有;在 36 kD 附近,所有虾类抽提物均有明显的蛋白质条带,特别是在用硫酸铵沉淀纯化的条带更是明显。国外相关报道表明虾类主要的过敏原其分子量在 36 kD 左右,因此该条带可能就是虾类中普遍存在的过敏原。此外在 75 kD 附近,凡纳滨对虾和口虾蛄均有蛋白质条带出现,其中口虾蛄最为明显。在 85 kD 附近 3 种虾的抽提物均有蛋白条带出现。

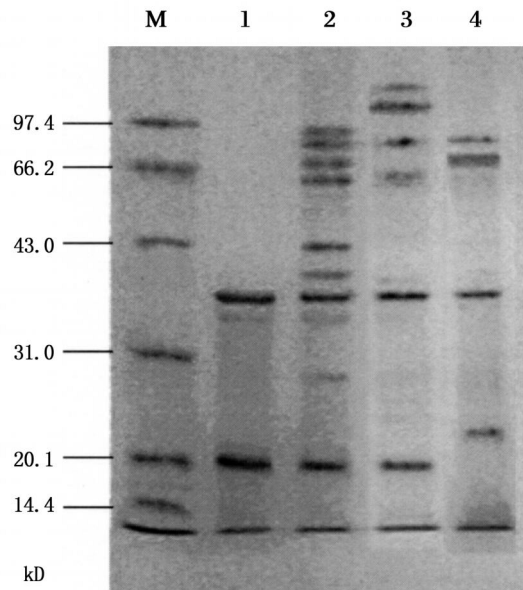


图 1 不同虾类提取物的 SDS-PAGE/考马斯亮蓝染色图谱

Fig.1 SDS-PAGE/ Coomassie blue-staining of protein extracts from different shrimp varieties

1. 经过硫酸铵沉淀纯化的凡纳滨对虾; 2. 凡纳滨对虾; 3. 克氏螯虾; 4. 口虾蛄; M. 蛋白质分子量标准

1. *P. vannamei* purified by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2. *P. vannamei*; 3. *P. clarkii*; 4. *S. oratoria*, M. molecular weight proteins

### 2.2 免疫印迹(immunoblotting)

利用获得的对虾类产品过敏的患者血清,通过聚丙烯

酰胺凝胶电泳/免疫印迹的方法检测 3 种虾——凡纳滨对虾、克氏螯虾和口虾蛄的过敏原情况。检测出的不同品种虾过敏原的条带如图 2 所示,相对分子量在 36 kD 附近的过敏原可与虾类过敏患者的血清产生反应,在条带上可以清楚的看到(条带 1~3),而凡纳滨对虾(条带 4)的过敏原抽提物和阴性血清没有反应,没有出现明显的条带。克氏螯虾和口虾蛄的过敏原抽提物和阴性血清的作用结果与凡纳滨对虾相同(结果没有列出)。

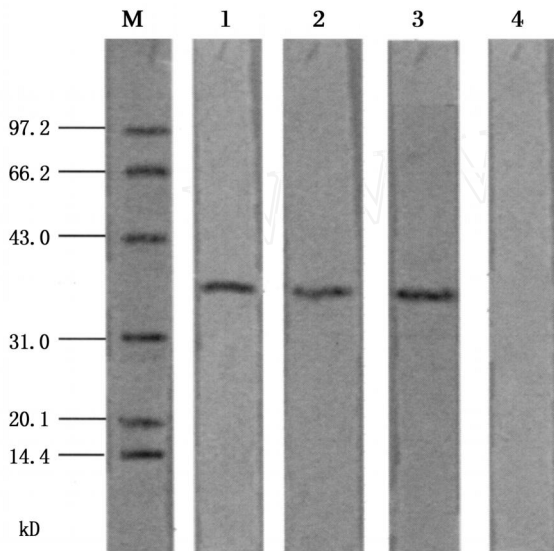


图 2 不同种类虾的免疫印迹图谱

Fig.2 SDS-PAGE immunoblotting of different shrimp varieties

1. 凡纳滨对虾; 2. 克氏螯虾; 3. 口虾蛄; 1~3 为用对虾类过敏患者血清检测的结果; 4. 用阴性血清检测的凡纳滨对虾; M. 蛋白质分子量标准

1. *P. vannamei*; 2. *P. clarkii*; 3. *S. oratoria*; 1 - 3 were detected with pooled serum from shrimp-sensitive patients; 4. *P. vannamei* (detection with control serum); M. molecular weight proteins

2.3 免疫印迹抑制试验(immunoblot-inhibition)

为了进一步了解虾类过敏原的过敏活性,利用免疫印迹抑制试验对不同品种虾过敏原的交互作用进行探讨。图 3 表示用凡纳滨对虾抽提物对血清进行预孵育之后,再用来检测凡纳滨对虾、克氏原螯虾和口虾蛄的过敏原抽提物。从图中可以看出这三种虾的过敏原条带几乎全部被抑制。用 OVA 进行预孵育时没有发现有抑制的现象,用阴性血清检测时,没有检测出特异性的条带。这说明了不同种类的虾,其过敏原有很强的交叉反应。

2.4 酶联免疫吸附抑制实验(enzymeallergosorbent inhibition test)

为了评价各品种虾之间的交互作用,利用过敏患者的血清进行了酶联免疫抑制试验。用不同浓度的凡纳滨对虾抽提物对血清进行预孵育后的检测结果如图 4 所示(其

他种类的虾抽提物作为抑制剂的检测结果相同)。可以看出虾类过敏原对各种虾过敏原的过敏原性有相似的抑制能力,这说明了不同虾过敏原抽提物的过敏原性有很大的相似性,相互之间存在很强的交叉反应。利用统计学分析表明各种虾的过敏原抽提物对 3 种虾的过敏原抽提物过敏原性的抑制效果在  $\alpha = 0.05$  条件下差异不显著。

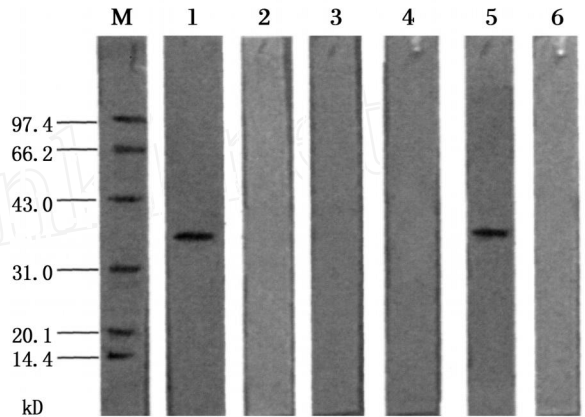


图 3 不同种类虾的免疫印迹抑制实验图谱

Fig.3 Immunoblot-inhibition of allergenicity to SDS-PAGE separated shrimp extracts (inhibitors 100  $\mu\text{g}$  protein)

1. 凡纳滨对虾(未加抑制剂) 2. 凡纳滨对虾; 3. 克氏螯虾; 4. 口虾蛄(凡纳滨对虾为抑制剂); 5. 凡纳滨对虾(OVA 为抑制剂); 6. 凡纳滨对虾(阴性血清); M. 蛋白质分子量标准

1. *P. vannamei* (no inhibitor); 2. *P. vannamei*; 3. *P. clarkii*; 4. *S. oratoria* (extracts from *P. vannamei* as inhibitor); 5. *P. vannamei* (OVA as inhibitor); 6. *P. vannamei* (control serum/ no inhibitor); M. molecular weight proteins)

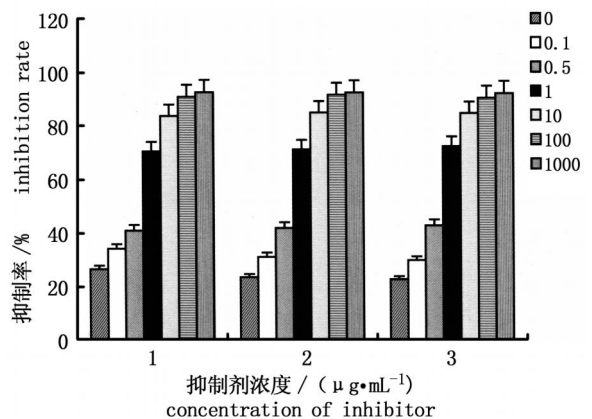


图 4 以凡纳滨对虾抽提物为抑制剂的 EAST-inhibition 实验

Fig.4 EAST-inhibition test of allergenicity to shrimp varieties (inhibitor: *P. vannamei*)

1. 凡纳滨对虾; 2. 克氏螯虾; 3. 口虾蛄[图例代表抑制剂浓度( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10, 100, 1 000]

1. *P. vannamei*; 2. *P. clarkii*; 3. *S. oratoria*. [Concentration of inhibitor ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10, 100, 1 000]

### 3 讨论

不同品种的虾,蛋白质的组成存在一定的差异。聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果显示所选择的3种虾的过敏原抽提物所含的蛋白质有所差异,其中口虾蛄和其他两种虾的差异较大,这说明十足目和口足目之间蛋白质的组成有相当的变化。在相对分子质量36 kD附近,这3种虾均出现了明显的条带,这也是国外报道的最可能引起过敏的虾类主要过敏原。免疫印迹的结果显示,虾类过敏患者的血清能够和相对分子量为36 kD的蛋白质发生反应,而阴性血清则没有发现有类似的反应。进一步的免疫印迹抑制实验证实虾类过敏原抽提物均能够抑制虾类过敏患者血清与过敏原抽提物的反应,这说明这3种虾的过敏原具有一致性,并且存在极强的交叉反应。国外的研究者也从 *Penaeus indicus*<sup>[12,13]</sup>, *Penaeus aztecus*<sup>[14]</sup>, *Metapenaeus ensis*<sup>[15]</sup>和 *Parapenaeus fissures*<sup>[16]</sup>等4种虾中分别纯化出相对分子量为36 kD的原肌球蛋白并证实了其为虾的主要过敏原,超过84%的虾类过敏患者血清能与其发生作用。但是所研究的虾类过敏原都是来自十足目的水生生物,而对于其它经济品种很少有研究。本研究发现,即使属于不同的目(十足目和口足目),虾的主要过敏原也没有明显的变化。这也和原肌球蛋白在肌原纤维中最稳定<sup>[17]</sup>的特征相吻合。

酶联免疫抑制试验结果显示不同种类的虾过敏原抽提物相互之间存在极强的交叉反应,并且说明了不同种类的虾过敏原,其过敏活性的差异不显著,曾经有人报道不同种类的虾,其过敏原的过敏活性存在差异<sup>[18]</sup>,但一直没有进一步的报道。本研究没有发现过敏活性之间的差异,这也从另一方面证实了免疫印迹的结果,这与 Martínez等<sup>[19]</sup>在研究中得出的原肌球蛋白是无脊椎动物的主要过敏原并且相互之间存在严重的交叉反应的结论相吻合。

本研究的结果表明凡纳滨对虾、克氏螯虾和口虾蛄虽然分属于不同的亚目,其蛋白质抽提物之间也存在一些差异,但主要过敏原的相对分子质量均在36 kD附近,相互之间过敏活性并没有明显的差异,存在极强的交叉反应。

### 参考文献:

- [ 1 ] Kanny G, Moneret-Vautrin D A, Flabbee J, *et al.* Population study of food allergy in France [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(1): 133 - 140.
- [ 2 ] Emmett S E, Angus F J, Fry J S, *et al.* Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members [J]. *Allergy*, 1999, 54(4): 380 - 385.
- [ 3 ] Moneret-Vautrin D A. Epidemiologie de l'allergie alimentaire et prevalence relative des trophallergenes [J]. *Cahiers Nutrition Dietetique*, 2001, 36(4): 247 - 252.
- [ 4 ] Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, *et al.* Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy [J]. *Allergy*, 2001, 56(12): 1172 - 1179.
- [ 5 ] 许岩,许红.食用虾爬子引起过敏性休克1例[J].*沈阳医学院学报*, 2000, 2(2): 108.
- [ 6 ] 安爱芝,孙月芹.食坑虾引起过敏性休克1例[J].*医学理论与实践*, 2003, 16(8): 877.
- [ 7 ] Rene C. Allergens: the European approach [J]. *J Food Sci*, 2004, 69(4): 343 - 346.
- [ 8 ] Vierk K, Falci K, Wolyniak C, *et al.* Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(6): 1022 - 1026.
- [ 9 ] Yu C J, Lin Y F, Chiang B L, *et al.* Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m2 [J]. *J Immunol*, 2003, 170: 445 - 453.
- [ 10 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [ 11 ] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680 - 685.
- [ 12 ] Naqpal S, Rajappa L, Metcalfe D D, *et al.* Isolation and characterization of heat-stable allergen from shrimp (*Penaeus indicus*) [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 83: 26 - 36.
- [ 13 ] Shanti K N, Martin B M, Nagpal S, *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes [J]. *J Immunol*, 1993, 151: 5354 - 5363.
- [ 14 ] Daul C B, Slattery M, Reese G, *et al.* Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1994, 105: 49.
- [ 15 ] Leung P S C, 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: 882 - 890.
- [ 16 ] Lin R Y, Shen H D, Han S H. Identification and characterization of a 30 kD major allergen from *Parapenaeus fissures* [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1993, 92: 837 - 845.
- [ 17 ] 郭晓风,邹胜群(译).水产利用化学[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [ 18 ] Morgan J E O, Neil C E, Daul C B, *et al.* Species specific shrimp allergens: RAST and RAST-inhibition studies [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 83: 1112 - 1117.
- [ 19 ] Martínez A, Martínez J, Palacios R, *et al.* Important of tropomyosin in the allergy to household arthropods, crossreactivity with other invertebrate extracts [J]. *Allergy Immunopathology* 1997, 25: 118 - 126.