

青岛地区常见鱼类过敏原的鉴定及其交叉反应研究

吴玟静, 李振兴, 金科, 郑礼娜, 王邦平, 林洪*

(中国海洋大学食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 选择青岛地区喜食的阿拉斯加狭鳕、蓝点马鲛、大黄鱼、真鲷、鲑、大菱鲆、鲤等7种鱼为研究对象, 利用鱼类过敏患者血清, 通过 SDS-PAGE 及免疫印迹方法对每种鱼的过敏原蛋白进行鉴定。利用兔抗鲑鱼小清蛋白多克隆抗体, 通过间接 ELISA 和抑制性 ELISA 等对7种鱼的小清蛋白之间的交叉反应进行探讨。结果表明, 青岛地区居民鱼类过敏原主要为 48~57、33~41、28 及 17 ku 的蛋白, 和传统公认的小清蛋白为主要过敏原的共识不同。而针对小清蛋白的交叉反应研究也表明, 不同鱼类蛋白之间存在强烈的交叉反应。因此, 虽然鱼类过敏原可能不同, 但如果对以上7种鱼中的一种鱼过敏, 最好不要食用其他任何一种鱼。

关键词: 鱼; 过敏原; 鉴定; 交叉反应

中图分类号: S 917

文献标志码: A

随着人们对健康生活的追求, 水产品以其丰富的营养受到越来越多人们的青睐。我国水产品消费总量自 2000 年以来保持稳步增长, 2009 年我国水产品消费达到 1341.71 万 t, 同比增长 4.90%, 人均消费量为 10.05 kg, 是 1985 年人均消费量的 3.4 倍^[1], 但是鱼类也被认为是八大易引发食物过敏症状的食物种类之一。流行病学的调查数据显示, 在美国有 4% 左右的成年人受到食物过敏的影响, 其中, 鱼类过敏占到了 10% 以上^[2-3]。特别是近年来, 鱼类作为一种重要的食品原料应用于调理食品中, 不明确的标注和国际贸易的发展使得鱼类过敏的风险大大增加, 对鱼类过敏原的鉴定及其过敏机制的探讨变得愈发重要。有研究报道, 不同品种鱼的过敏原之间存在严重的交叉反应^[4-5], 但大部分研究主要针对欧美等国外消费的产品, 由于地域差异, 我国对鱼类的主要消费品种同欧美地区存在着较大差异。目前针对我国消费量较大的鱼类过敏原的交叉反应还鲜有报道。本研究通过采集青岛地区鱼类过敏患者血清, 通过蛋白质电泳、免疫印迹、酶联免疫吸附实验等方法对青岛地区常见的阿拉斯

加狭鳕 (*Theragra chatcogramma*)、蓝点马鲛 (*Scomberomrus niphonius*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、鲑 (*Salmo salar*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 及鲤 (*Cyprinus carpio*) 等 7 种鱼分别进行过敏原鉴定分析, 并探讨它们之间的交叉反应, 为提高食品中鱼类过敏原的检测水平, 改进过敏疾病的诊断方法提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

实验材料 阿拉斯加狭鳕(俗称鳕)、蓝点马鲛(俗称鲛)、大黄鱼、真鲷(俗称加吉鱼)、鲑(俗称三文鱼)、大菱鲆、鲤(购于青岛本地水产品市场, 活品或冰鲜品);

PVDF 膜(0.45 μm, Solarbio 公司); 化学发光底物(Pierce ECL 蛋白印迹底物, Thermo Scientific 公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 青岛福林生物化学公司); 二硫苏糖醇(DTT, Solarbio 公司); 十二烷基硫酸钠(SDS, 山东爱博科技贸易公司); 兔抗鲑鱼小清蛋白多克隆抗体(由本实验室自行制备、

收稿日期:2011-04-15 修回日期:2011-06-23

资助项目:国家自然科学基金项目(30800859);现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-50)

通讯作者:林洪, E-mail:linhong@ouc.edu.cn

亲和层析纯化);HRP-羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);鱼过敏患者血清(青岛市过敏疾病防治中心);HRP-羊抗人 IgE(Sigma 公司);其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

实验仪器 组织捣碎机(DS-1,上海标本模型厂);离心机(BR4i, Jouan 公司);电泳仪(DYY-12,北京六一仪器厂);半干式碳板转印仪(DYCP-40C,北京六一仪器厂);酶标仪(Mutiskan MK3, Thermo Labsystems 公司);天能凝胶成像仪(Tanon 4200,上海天能科技有限公司);电泳仪(Model 491 Prep Cell, Bio-rad 公司)。紫外可见分光光度计(TU1810,北京普析仪器有限公司);恒温振荡培养箱(ZHWY-2102,上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 鱼肉过敏原提取方法的确定

将阿拉斯加狭鳕肉等量分为 3 组(A、B、C 组),每组 100 g, A、B 组鱼肉分别加入 200 g 提取液 T-G(0.1 mol/L Tris/0.5 mol/L Gly 缓冲液, pH 8.7, 1 mmol/L DTT), C 组鱼肉加入 200 g 提取液 K-D(1 mol/L KCl, 0.05% DTT), 进行匀浆, A、C 组 4 °C 振荡提取 14 h, 结束后 4 000 r/min 离心 30 min 后取上清, 沉淀用原方法继续提取 4 h, 离心, 合并上清进行透析, B 组 45 °C 振荡提取 14 h, 4 000 r/min 离心 30 min 后取上清, 在沸水浴中搅拌煮沸 30 min, 4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清进行透析。采用 BRADFORD 法^[6]测定蛋白质浓度, SDS-PAGE 法确定抽提物的蛋白组分, ELISA 法确定抽提物的免疫活性, 最终确定鱼肉蛋白质的抽提方法, 其他 6 种鱼均按照确定的方法提取蛋白。

1.3 鱼肉过敏原抽提液的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用 LAEMMLI^[7]建立的不连续电泳体系, 对 3 组阿拉斯加狭鳕蛋白提取液总蛋白组分进行比较。分离胶浓度为 15% (W/V), 浓缩胶浓度为 5% (W/V), 蛋白样品稀释至 1 mg/mL, 用样品缓冲液处理。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后采集图像。

1.4 间接酶联免疫法检测鱼肉过敏原抽提液的免疫活性(Indirect ELISA)

参考文献[8]的方法并略作改进, 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6)将 3 组阿拉斯加狭鳕蛋白提取液稀释至 10 μg/mL, 100 μL/

孔于 4 °C 过夜, 含 0.1% Tween-20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次, 每次 5 min, 将孔内剩余液体拍干, 下面的洗涤方法相同, 加入含 1% BSA 的 PBST, 300 μL/孔, 37 °C 封闭 1.5 h, 洗涤, 加入用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 稀释液)稀释 20 000 倍的兔抗鲑鱼小清蛋白多克隆抗体, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1.5 h, 洗涤, 再加入 HRP-羊抗兔 IgG(1:5 000), 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤。加入四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 100 μL/孔, 37 °C 避光显色 20 min 后用 2 mol/L H₂SO₄ (50 μL/孔)终止反应, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值 OD₄₅₀。对比 3 组提取方法制得的阿拉斯加狭鳕过敏原的免疫活性。

1.5 免疫印迹法检测鱼过敏原抽提液对人血清特异性 IgE 的结合能力(Western-blotting)

SDS-PAGE: 同上述方法; 免疫印迹: 电泳结束后, 采用半干式碳板转印仪, 1 mA/cm² 恒流转印 3 h, 将凝胶上的蛋白条带转印到 PVDF 膜上, 对待测样品进行免疫检测。首先, 将膜置于 5% 脱脂奶/PBST(封闭液)中室温下封闭 2 h, 然后用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 以下洗涤方法相同。过敏患者血清(特异性 IgE)用 50% 封闭液稀释 80 倍, 于室温下预孵育 1 h 后, 室温下孵育膜过夜, 洗涤, 加入用 PBS 稀释 1 000 倍的 HRP-羊抗人 IgE, 室温下孵育 1 h, 充分洗涤后将 PVDF 膜用 ECL 蛋白印迹底物孵育 1 min 后, 在天能凝胶成像仪(Tanon 4200)中曝光 15 min 成像。

1.6 免疫印迹法检测各种鱼过敏原抽提液与蓝点马鲛过敏原特异性 IgG 的结合能力

SDS-PAGE 及电转移、封闭步骤同“1.5”, 一抗为兔抗鲑鱼小清蛋白多克隆抗体(1:2 000), 室温下孵育 1 h, 二抗为 HRP-羊抗兔 IgG(1:5 000), 室温下孵育 1 h, 加入 ECL 蛋白印迹底物后用凝胶成像仪中曝光 30 min 成像。

1.7 抑制性 ELISA 法检测各种鱼与蓝点马鲛过敏原之间的交叉反应(ELISA inhibition)

在 96 孔板中加入 1 μg/mL 过敏原抽提液, 100 μL/孔, 4 °C 包被过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 将孔内剩余液体拍干, 以下洗涤方法相同; 加入 1% BSA/PBST, 300 μL/孔, 37 °C 封闭 1.5 h, 洗涤; 阴性组加入兔抗鲑鱼小清蛋白多克隆抗体(一抗)、抑制组一抗中分别加入 7 种鱼的过敏原蛋白(100 μg/mL), 37 °C 预孵育 1 h 后 100 μL/

孔加入 96 孔板, 37 °C 孵育 1.5 h, 洗涤; 加入 HRP-羊抗兔 IgG, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤。加入 TMB 底物溶液, 100 μL/孔, 37 °C 避光显色 20 min 后用 2 mol/L H₂SO₄ (50 μL/孔) 终止反应, 用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 阴性组记做 A₀, 抑制组记做 A。计算抑制率: 抑制率 (%) = (1 - A₀/A) × 100^[9]。

2 结果与讨论

2.1 鱼肉过敏原提取方法的确定

3 种提取方法提取获得的阿拉斯加狭鳕过敏原蛋白提取液浓度及免疫活性结果如表 1 所示, 各组阿拉斯加狭鳕蛋白组分 SDS-PAGE 结果见图 1。C 组鱼肉总蛋白浓度最高, 反应过敏原免疫活性的间接 ELISA 结果表明该组免疫活性较高, 但 SDS-PAGE 分析显示小清蛋白 (~12 ku) 损失也最大, 小清蛋白含量低, 这可能是由于小清蛋白等为酸性蛋白质, 易溶解于稀碱性溶液中, 而 K-D 提取液为中性溶液, T-G 提取液为碱性溶液, 所以 C 组提取液对小清蛋白等酸性蛋白的提取效果较 A 组更高; A、B 两组总蛋白浓度相当, 虽然 B 提取法抽提到的小清蛋白最多, 但除 17、36 ku 左右的蛋白外, 其他不耐热蛋白损失较大, 且免疫活性最低; 而 A 组蛋白组分保留最好, 不同分子量的蛋白均得以较完整的保留, 且具有最高的免疫活性, 故最终确定用 A 组提取方法, 即用提取液 T-G 4 °C 提取作为提取鱼肉过敏原的最佳方法。其他 6 种鱼肉蛋白均用该法提取得到。

表 1 3 种提取方法获得的鳕鱼蛋白提取液浓度及免疫活性间接 ELISA 结果

Tab. 1 Protein concentration of Alaska pollock extracted by different procedures and their immune activity result indicated by indirect ELISA

	ELISA 分组 group		
	A	B	C
蛋白质浓度/(mg/mL) protein concentration	7.74	7.58	10.39
OD ₄₅₀	1.513 ± 0.023	0.694 ± 0.063	1.181 ± 0.037

注: A. 提取液 T-G, 4 °C 提取; B. 提取液 T-G, 45 ~ 100 °C 提取; C. 提取液 K-D, 4 °C 提取。

Notes: A. Extracted by T-G at 4 °C; B. Extracted by T-G at 45 °C for 14 h and then 100 °C for 30 min; C. Extracted by K-D at 4 °C.

2.2 免疫印迹鉴定鱼过敏原蛋白 (Western-blotting)

利用 SDS-PAGE 对 7 种鱼的蛋白组分进行

分析, 电泳图显示, 7 种鱼的蛋白提取液所含的蛋白组分分子量从 9 ku 到 160 ku 不等, 且在 97、50 ~ 60、33 ~ 41、25 ~ 28 ku 处存在分子量极为相近的蛋白条带, 但 22 ku 以下的蛋白组分差异性较大, 小清蛋白 (~12 ku) 的分子量及其亚基组成各不相同 (图 2)。

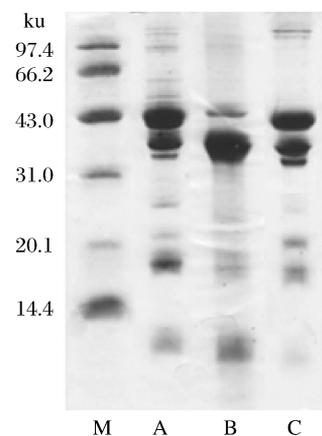


图 1 3 种提取方法得到的阿拉斯加狭鳕蛋白 SDS-PAGE

M. 蛋白分子量标准; A. 提取液 T-G, 4 °C 提取; B. 提取液 T-G, 45 ~ 100 °C 提取; C. 提取液 K-D, 4 °C 提取。

Fig. 1 SDS-PAGE of Alaska pollock protein extracted by 3 methods

M. Protein marker; A. Extracted by T-G at 4 °C; B. Extracted by T-G at 45 °C for 14 h and then 100 °C for 30 min; C. Extracted by K-D at 4 °C.

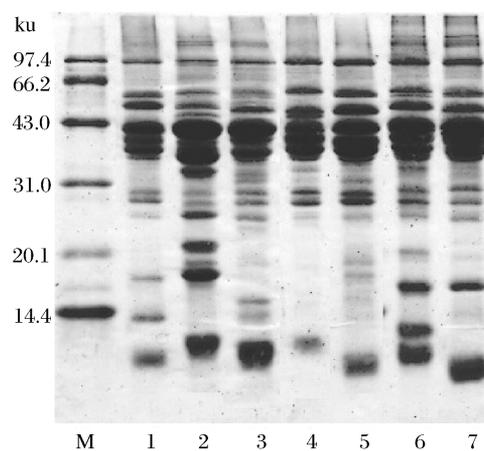


图 2 7 种鱼蛋白提取液的 SDS-PAGE 分析

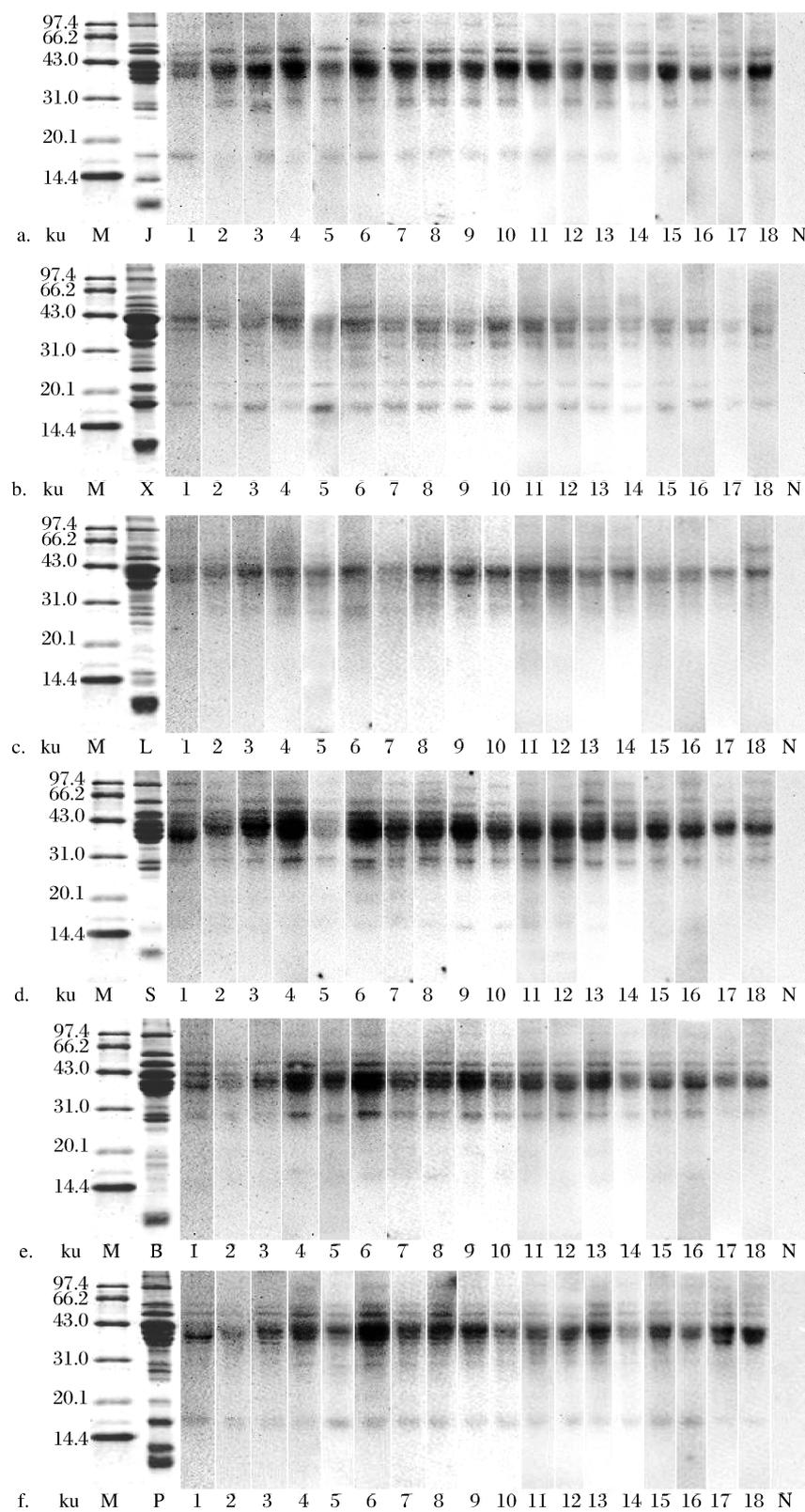
M. 蛋白分子量标准; 1. 真鲷; 2. 阿拉斯加狭鳕; 3. 鲤; 4. 鲑; 5. 蓝点马鲛; 6. 大菱鲆; 7. 大黄鱼。

Fig. 2 SDS-PAGE of extracts from 7 species of fish

M. Protein marker; 1. Red Snapper; 2. Alaska pollock; 3. Carp; 4. Salmon; 5. Spanish mackerel; 6. Turbot; 7. Large yellow croaker.

将凝胶上的蛋白条带电转移至 PVDF 膜上后,分别利用 18 份鱼过敏患者血清对 7 种鱼过敏原蛋白进行免疫印迹分析,通过每种蛋白对人血

清特异性 IgE 的结合程度鉴定每种鱼的过敏原蛋白(图 3)。



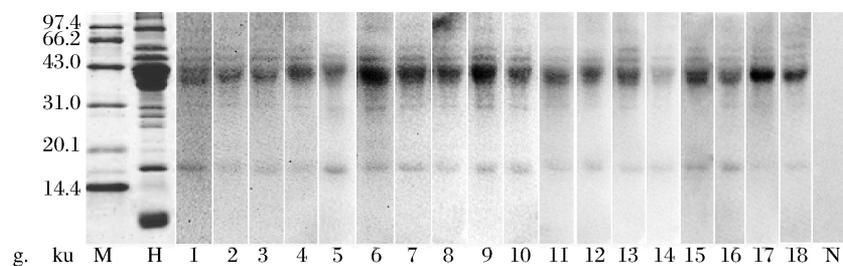


图3 7种鱼过敏原与过敏患者血清特异性IgE免疫印迹分析

(a)真鲷、(b)阿拉斯加狭鳕、(c)鲤、(d)鲑、(e)蓝点马鲛、(f)大菱鲆、(g)大黄鱼的免疫印迹结果。M. 蛋白分子量标准;J、X、L、S、B、P、H分别为以上7种鱼 SDS-PAGE; 1~18. 18份阳性血清; N. 阴性血清。

Fig. 3 Western-blot of human sera specific-IgE reactivity to allergens from 7 fishes

Western-blotting of (a) Red Snapper, (b) Alaska pollock, (c) Carp, (d) Salmon, (e) Spanish mackerel, (f) Turbot, (g) Large yellow croaker respectively; M. Protein marker; J, X, L, S, B, P, H. SDS-PAGE of the 7 fish above. 1 - 18. Sera from 18 fish-allergic patients; N. Normal serum.

对于青岛地区鱼类过敏患者而言,真鲷主要过敏原为 35~42、51、28~29 及 18 ku 的蛋白,少数患者血清对 94 及 57 ku 的蛋白有较轻的阳性反应;阿拉斯加狭鳕主要过敏原为 41、36、33、22 及 18 ku 的蛋白,其次为 51 ku 蛋白;鲤主要过敏原为 41 及 36 ku 的蛋白,28~29 ku 处有极微弱的阳性反应。此外,18#血清对 50 ku 蛋白反应强烈;鲑几乎每条蛋白都可与特异性 IgE 相结合,包括 94、60、48、41、39、37、33、29 及 15 ku 的蛋白,其中,37~41 及 29 ku 的蛋白反应最为强烈;蓝点马鲛主要过敏原为 36、39、41、49、28 及 58 ku 的蛋白,少数患者血清对 15 及 94 ku 蛋白也有微弱反应;大菱鲆主要过敏原为 41、39、37、51、60、17 及 29 ku 的蛋白;大黄鱼主要过敏原为 41、37、17、50、58 及 30 ku 蛋白,与杨睿等^[10]的研究结果较为接近。总的来说,对于青岛地区居民而言,与过敏原特异性 IgE 结合能力较强的是分子量为 48~60、33~42、29 及 17 ku 左右的蛋白,而非国际上普遍认为的鱼类主要过敏原小清蛋白^[11-12]。41 ku 的蛋白作为一种鱼类主要过敏原,近年来屡见报道。GALLAND 等^[13]报道,鳕 41 ku 蛋白是其很重要的过敏原之一。DAS DORES 等^[14]分析认为 41 及 36 ku 的蛋白分别为糖基化及未糖基化的乙醛磷酸脱氢酶 (APDH)。NAKAMURA 等^[15]对红点樱花钩吻鲑 (*Oncorhynchus masou ishikawae*) 的过敏原鉴定表明,41 ku 蛋白是该鱼主要过敏原,通过双向电泳分离发现 41 ku 处包括两个等电点不同的蛋白,经液相色谱/质谱/质谱测序,分析其为果糖二磷酸醛缩酶 A 及少量快肌原肌球蛋白。此外,他们还发现,26 ku 蛋白也

是该鱼过敏原之一,测序结果表明其为磷酸丙糖异构酶 (TPI)。而小清蛋白并未出现清晰条带,这与本文结果相似。DAS DORES 等^[16]认为鳕 (*Gadus morhua*) 中 20~24、38、50~51 ku 蛋白分别为小清蛋白 (11.5 ku) 的二聚体、三聚体及四聚体。而本实验中,阿拉斯加狭鳕、真鲷、大菱鲆及大黄花鱼的 17 ku 蛋白对特异性 IgE 结合也较强,据 FAESTE 等^[17]对鳕等 23 种鱼蛋白提取液的免疫印迹分析发现,该条带几乎在所有的鱼中都存在,且可与鳕鱼小清蛋白多抗结合,可能为小清蛋白的另一种聚合物或与抗小清蛋白 IgG 存在交叉反应。KONDO 等^[18]发现 94 ku 的蛋白在金枪鱼及鲭等多种鱼之间也存在着交叉反应,通过氨基酸测序初步判断其为转铁蛋白。本研究发现,7 种鱼之间的多条蛋白均能引发其强烈的交叉反应,每一份鱼过敏患者血清对所有 7 种鱼都存在着不同程度的阳性反应。值得注意的是,图 1 显示,在煮沸 30 min 后,除 17、36 ku 蛋白及小清蛋白外的很多蛋白已被除去,但小清蛋白浓度确明显升高。而在高离子浓度 (1 mol/L KCl 溶液) 下,94、58、51 及 18 ku 蛋白浓度也微乎其微。说明在实际食用时,鱼肉蛋白组分在烹饪过程中产生变化,有些过敏原被破坏或分解,从而未能引发患者的过敏反应。

2.3 免疫印迹法检测蓝点马鲛过敏原-小清蛋白与其他鱼过敏原的交叉反应

小清蛋白存在于许多种鱼的白色肌肉组织中,是引起鱼类交叉反应的最主要的过敏原之一^[18]。故选择小清蛋白作为研究鱼类交叉反应的主要研究对象。利用兔抗鳕鱼小清蛋白多克隆

抗体作为一抗的免疫印迹结果如图 4 所示,由于兔抗是采取纯化后的鲛鱼小清蛋白制成,故对每种鱼的小清蛋白(12 ku 左右)表现出极高的特异性,而与 41 ku 蛋白基本无反应,说明 APDH 与小清蛋白 Ca^{2+} 结合区域同源性极低,与小清蛋白之间不存在交叉反应^[13]。

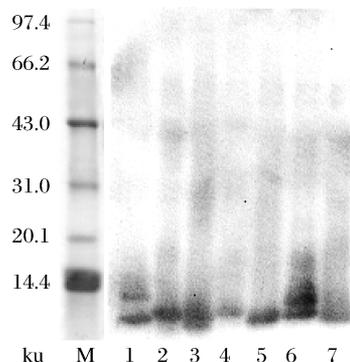


图 4 7 种鱼过敏原兔抗鲛鱼小清蛋白免疫印迹

M. 蛋白分子量标准; 1. 真鲷; 2. 阿拉斯加狭鳕; 3. 鲤; 4. 鲑; 5. 蓝点马鲛; 6. 大菱鲆; 7. 大黄鱼。

Fig. 4 Rabbit anti-spanish mackerel parvalbumin Western-blotting

M. Protein marker; 1. Red Snapper; 2. Alaska pollock; 3. Carp; 4. Salmon; 5. Spanish mackerel; 6. Turbot; 7. Large yellow croaker.

对于可能为小清蛋白聚合体的 24、38、51 ku 处,出现了极微弱的阳性反应条带。考虑到 IgE 免疫印迹结果,特异性 IgE 可与这三条带结合但未与小清蛋白产生阳性反应,而 IgG 免疫印迹中,小清蛋白多克隆抗体对这三条带也未出现较强的阳性反应,可见小清蛋白与其交叉反应并不大,因此认为尚不能肯定其确实为小清蛋白的聚合体,但也可能由于聚合形式使钙结合区域与抗体之间发生了空间位阻,影响了特异性结合。同时,利用阴性兔血清及兔抗虾原肌球蛋白多克隆抗体按照相同方法做免疫印迹,结果均无阳性条带出现(结果未展示)。说明 7 种鱼小清蛋白之间交叉反应性强,小清与其他鱼肉蛋白及虾原肌球蛋白之间几乎不存在交叉反应。

2.4 鱼过敏原的免疫活性及交叉反应性分析

IgG 间接 ELISA 对 7 种鱼过敏原蛋白的交叉反应性的结果如图 5 所示,蓝点马鲛与大菱鲆 OD_{450} 值最高,鲤最低,其他几种鱼的 OD_{450} 值相当。抑制性 ELISA 结果(图 6)与间接 ELISA 结果保持一致,即与蓝点马鲛小清蛋白交叉反应较强的为大

菱鲆,鲤反应最弱。说明这 7 种鱼小清蛋白之间存在着强交叉反应,尤以蓝点马鲛与大菱鲆之间最为强烈。由 SDS-PAGE 可知,大菱鲆的小清蛋白有两种形态,分别为 12 及 10 ku,总小清蛋白含量略高于其他鱼,可能由于此原因其阳性反应最为强烈。而鲤是这 7 种鱼中唯一一个淡水鱼品种,与其他海产鱼类小清蛋白之间同源性相对较低,从而导致其与蓝点马鲛之间交叉反应最弱。

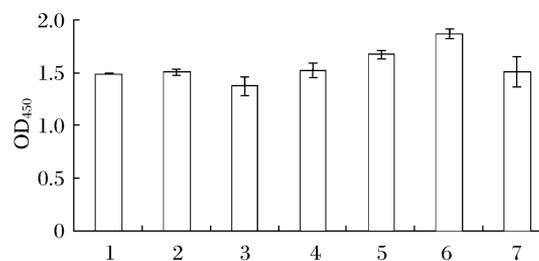


图 5 兔抗鲛鱼间接 ELISA

1. 真鲷; 2. 阿拉斯加狭鳕; 3. 鲤; 4. 鲑; 5. 蓝点马鲛; 6. 大菱鲆; 7. 大黄鱼。

Fig. 5 Indirect rabbit anti-spanish mackerel ELISA

1. Red Snapper; 2. Alaska pollock; 3. Carp; 4. Salmon; 5. Spanish mackerel; 6. Turbot; 7. Large yellow croaker.

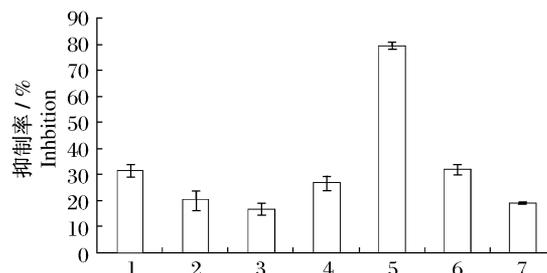


图 6 7 种鱼之间交叉反应抑制性 ELISA 分析

1. 真鲷; 2. 阿拉斯加狭鳕; 3. 鲤; 4. 鲑; 5. 蓝点马鲛; 6. 大菱鲆; 7. 大黄鱼。

Fig. 6 Analysis of cross-reactivity among 7 species of fish by IgG ELISA inhibition

1. Red Snapper; 2. Alaska pollock; 3. Carp; 4. Salmon; 5. Spanish mackerel; 6. Turbot; 7. Large yellow croaker.

虽然有研究报道个别鱼类过敏患者只对特定的某种鱼产生过敏反应^[20],但通常绝大多数鱼类过敏患者同时会对很多品种的鱼过敏,本实验结果显示,实验所涉及的 7 种鱼所含的多种蛋白都存在着较强的交叉反应,鱼类过敏患者对鱼类的过敏反应是普遍的。

3 结论

经鉴定,青岛地区常见的鱼类品种,如真鲷、阿

拉斯加狭鳕、鲤、鲑、蓝点马鲛、大菱鲆及大黄鱼等的过敏原蛋白为 48~57、33~41、28 及 17 ku 左右的蛋白,而并非小清蛋白。IgE 结合能力研究表明,7 种鱼过敏原蛋白之间存在着严重的交叉反应,如 41、36 ku 的蛋白,小清蛋白之间交叉反应也很严重。此外,本研究还发现不同的抽提方法会使鱼抽提物蛋白组分产生较大变化,这可能是目前报道的鱼类过敏原存在很大差异的原因之一。在实际生活中,由于消费者食用的鱼均已经过加工,患者自述的鱼类过敏也可能是对加工后的过敏原产生的过敏反应,故对鱼类过敏原的确认还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘锐,李冉,陈洁. 我国水产品消费特征及增长潜力[J]. 农业展望,2011(3):53-58.
- [2] SAMPSON H A. Update on food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004, 113: 805-820.
- [3] CHU K H, TANG C Y, WU A, *et al.* Seafood allergy: lessons from clinical symptoms immunological mechanisms and molecular biology [J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 2005, 97: 205-235.
- [4] VAN DO T, ELSAYED S, FLORVAAG E, *et al.* Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, 116(6): 1314-1320.
- [5] BEALE J E, JEEBHAY M F, LOPATA A L. Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax* [J]. Molecular Immunology, 2009, 46: 2985-2993.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [7] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [8] 李小燕,李振兴,林洪,等. 菲律宾蛤仔过敏原可视化抗体微阵列玻片的检测方法[J]. 水产学报, 2010, 34(3): 422-427.
- [9] XU X, SUI J X, CAO L M, *et al.* Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid screening of anisakid larvae in seafood [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90: 877-881.
- [10] 杨睿,吴海强,刘志刚. 大黄鱼过敏原的提取、分离及免疫学特性鉴定[J]. 卫生研究, 2009, 38(1): 60-62.
- [11] VAN DO T, HORDVIK I, ENDRESEN C, *et al.* Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish allergen M [J]. Molecular Immunology, 2005, 42: 345-353.
- [12] UNTERSMAAYR E, SZALAI K, RIEMER A B, *et al.* Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen [J]. Molecular Immunology, 2006, 43: 1454-1461.
- [13] GALLAND A V, DORY D, PONS L, *et al.* Purification of a 41 ku cod-allergenic protein [J]. Journal of Chromatography B, 1998, 706: 63-71.
- [14] DAS DORES S, CHOPIN C, ROMANO A, *et al.* IgE-binding and cross-reactivity of a new 41kua allergen of codfish [J]. Allergy, 2002b, 57(72): 79-83.
- [15] NAKAMURA R, SATOH R, NAKAJIMA Y, *et al.* Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 55: 300-308.
- [16] DAS DORES S, CHOPIN C, VILLAUME C, *et al.* A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (*Gad m1*) encoded by a gene distinct from that of *Gad c1* [J]. Allergy, 2002, 57(72): 79-83.
- [17] FAESTE C K, PLASSEN C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods [J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 329: 45-55.
- [18] KONDO Y, KOMATSUBARA R, NAKAJIMA Y, *et al.* Parvalbumin is not responsible for cross-reactivity between tuna and marlin: A case report [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 118(6): 1382-1383.
- [19] HANSEN T K, BINDSLEV-JENSEN C, SKOV P S, *et al.* Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species [J]. Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 1997, 78: 187-194.
- [20] KELSO J M, JONES R T, YUNGINGER J W. Monospecific allergy to swordfish [J]. Annals of Allergy, Asthma and Immunology, 1996, 77: 227-228.

Study on the identification of allergens from 7 fishes commonly consumed in Qingdao and their cross-reactivity

WU Wen-jing, LI Zhen-xing, JIN Ke, ZHENG Li-na, WANG Bang-ping, LIN Hong*

(Food Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Qingdao is a coastal city of China where the problem of fish allergy is increasingly prominent. There have been no data providing a comprehensive picture of the major fish allergens to local people so far. Based on the above situation, the aim of this research was to study on the cross-reactivity of different fish allergens, to provide primary basis of safe eating guide for local fish allergic individuals. To determine the allergens of 7 commonly edible fishes: Alaska pollock (*Theragra chatcogramma*), red snapper (*Pagrosomus major*), salmon (*Salmo salar*), spanish mackerel (*Scomberomrus niphonius*), turbot (*Scophthatmus maximus*), large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and carp (*Cyprinus carpio*), SDS-PAGE was applied to observe the protein components of fish extracts. Sera from 18 fish allergic patients were used in Western-blot. Cross-reactivity was investigated by IgG Western-blot, IgG ELISA and ELISA inhibition used rabbit anti-spanish mackerel parvalbumin polyclonal antibody. Results showed that the major fish allergens were 48 – 57, 33 – 41 ku, 28 ku and 17 ku proteins to Qingdao residents, which was distinct from the common consensus that parvalbumin was the major allergen in fish. Meanwhile, the study on the cross-reactivity of fish parvalbumin also indicated there was a quite strong cross-reactivity between different species of fish proteins. Therefore, despite the allergens might be different from each other, it was suggested that the subjects not eat other 6 fishes if allergic to one of them.

Key words: fish; allergen; identification; cross-reactivity

Corresponding author: LIN Hong. E-mail: linhong@ouc.edu.cn