

heat stress, and mortality from coronary and cerebral thrombosis [J].  
Am J Med, 1986, 81(5):795-800.

[16] Kuiper P J, Livne A, Meyerstein N. Changes in lipid composition and osmotic fragility of erythrocytes of hamster induced by heat exposure [J]. Biochim Biophys Acta, 1971, 248(2):300-305.

[17] Francis K T. Effect of water and electrolyte replacement during exercise in the heat on biochemical indices of stress and performance [J]. Aviat Space Environ Med, 1979, 50(2):115-119.

[18] LIN H, Decuyper E, Buyse J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens [J]. Comp Biochem Physiol A Mol

Integr Physiol, 2006, 144(1):11-17.

[19] Quinteiro-Filho W M, Rodrigues M V, Ribeiro A, et al. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation [J]. J Anim Sci, 2012, 90(6):1986-1994.

[20] SUN Y J, WANG Q, PEI G X, et al. Changes of serum MDA and SOD levels in ischemia-reperfusion injuries of the limbs in rats preconditioned with heat stress [J]. Journal of First Military Medical University, 2002, 22(6):506-508.

### 论著

## 中国对虾肉中与虾过敏患者血清特异性 IgE 结合的组分分析

单立新<sup>1</sup>, 任杰<sup>2</sup>, 李会强<sup>2</sup>, 陈凯<sup>1</sup>, 李绍琛<sup>3</sup>, 高越<sup>1</sup>

(1. 天津市北辰医院检验科, 天津 300400; 2. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300070; 3. 天津市中医药研究院附属医院检验科, 天津 300202)

**摘要:**目的 分析与血清特异性 IgE 结合的虾肉中的蛋白成分。方法 常规制备虾肉蛋白提取液, 用 SDS-PAGE 技术分析提取液中的蛋白组分, 以虾过敏患者血清 (sIgE) 作为探针, 经免疫印记技术分析、鉴定与患者特异性 IgE 结合的蛋白成分。结果 虾肉蛋白提取液显示 12 种可辨认蛋白条带, 其中 65、50 和 36 kD 相对含量较高; 不同过敏患者血清中与蛋白结合的强度和所识别的蛋白组分存在一定差别, 但所识别的蛋白主要集中在分子量 > 70 kD 的区域。结论 与阳性血清的反应强度与蛋白相对含量无关, 提取有效组分有望提高血清特异性 IgE 检测的敏感度。

**关键词:**免疫印迹; 食物过敏; 虾; 特异性 IgE; 致敏蛋白; 食品安全; 食物致敏原

中图分类号: R155.3; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)06-0494-04

### Serum specific IgE analysis on shrimp allergy patients

SHAN Li-xin, REN Jie, LI Hui-qiang, CHEN Kai, LI Shao-chen, GAO Yue  
(Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China)

**Abstract: Objective** To analyze the protein components in shrimp which could bind with serum specific IgE (sIgE) of allergy patients. **Methods** The shrimp protein extracts were prepared by routine method, and protein components were separated by SDS-PAGE. Using serum of shrimp allergy patients as probe, the protein components which could bind with sIgE were identified by immunoblotting technique. **Results** The SDS-PAGE of shrimp protein extracts showed 12 identifiable bands, and the protein content of 65, 50 and 36 kD were relatively higher than the others. Although the serum of allergy patients showed different affinity and binding sites in the immunoblotting assay, the identified protein was mainly in the region of molecular weight greater than 70 kD. **Conclusion** When reacted with positive serum, the reaction intensity and protein content were unrelated. The sensitivity of detection for serum sIgE might be improved by extracting active protein components of shrimp.

**Key words:** Western blot; food allergy; shrimp; specific IgE; allergenic proteins; food safety; food allergens

目前, 食物过敏已成为日常饮食中的常见问题, 引起了众多学者的高度重视。在 1999 年国际

收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 天津市北辰区科技发展计划项目 (BCWS2012-05)

作者简介: 单立新 男 副主任技师 研究方向为医学检验诊断学 E-mail: shanlixin16@163.com

通讯作者: 李会强 男 教授 研究方向为新型免疫诊断试剂的研发与应用 E-mail: lihuiqiang1965@163.com

食品法典委员会报告中,虾、蟹等甲壳类食品被认为是 8 种主要致敏食物之一<sup>[1]</sup>。流行病学的研究资料显示,成年人食物过敏的患病率为 1%~2%,其中虾过敏比例约为 39%<sup>[2-3]</sup>。在临床医学领域,食物过敏性疾病的诊断主要通过病史、皮内点刺试验和血清特异性 IgE (specific IgE, sIgE),特别是血清 sIgE 是确定过敏原的重要方法<sup>[4]</sup>。血清 sIgE 基于抗原抗体特异性结合的原理,即用蛋白提取液作为已知抗原,实现对未知抗体的检测。由于食物蛋白组分复杂,浓度比相差很大。因此,分析鉴别食物中成分,是制备标准化已知抗原的前提条件。本研究将以明确诊断的对虾过敏患者的血清(sIgE)为“探针”(识别抗体),采用免疫印记技术,分析提取液中与 sIgE 结合的组分,从而为建立虾致敏原提取工艺,提高虾类 sIgE 检测的准确性提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要仪器与试剂

垂直板型电泳、凝胶成像系统、半干式转膜仪(均购自美国 BIO-RAD 公司),紫外分光光度计。

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、十二烷基磺酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、Tween-20(均购自美国 Sigma 公司),蛋白分子量标准(SM0671)(MBI Fermentas 公司),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司),兔抗人 IgE-AP、标记抗体(美国 Southern Biotech 公司)。

#### 1.1.2 阳性患者血清和阴性对照血清

血清标本均来自天津市中医药研究院附属医院(进行虾过敏检测的常规标本)sIgE 检测方法为德国 Mediwiss 公司生产的 Allergy Screen 过敏原检测系统(免疫印记法)。阳性患者血清:来自临床诊断为对虾过敏的患者(有典型过敏病史、血清 sIgE 检测阳性和皮刺试验阳性,出现皮肤搔痒、急性荨麻疹、血管性水肿、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等典型食物过敏症状)。阴性对照血清:来自健康体检者(无过敏家族史、无食物过敏史、血清总 IgE 水平检测为正常范围)。血清分离分装后 -20℃ 保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 虾肉蛋白提取液的制备

取新鲜虾,收集虾肉,按 1:5 的体积比加入 -20℃ 预冷丙酮,脱脂弃去丙酮,干燥。按每克干粉加 8 ml 0.01 mol/L、pH 7.4 PBS 溶液,充分溶解,1 200 r/m,离心半径  $r = 13.5$  cm,低温离心,收集上清即为虾肉蛋白提取液。分装后于 -20℃ 保存。

#### 1.2.2 蛋白提取液中蛋白组分分析

采用 SDS-PAGE 技术,浓缩胶为 5%,分离胶为 12%;样品蛋白浓度为 14 mg/ml,分析样品和上样缓冲液 1:2 混合,煮沸 5 min,上样 10  $\mu$ l;电泳条件:全程恒压,65 V 电压堆积 40 min,135 V 电压分离至待溴酚蓝指示到达底部,电泳完毕。电泳胶片用考马斯亮蓝染色 100 min,脱色液充分脱色后成像。

#### 1.2.3 与血清 sIgE 结合的蛋白组分分析

采用免疫印记技术。半干式转膜方式具体条件为 80 V 电压转 30 min,随后 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭过夜,风干后备用。将上述 PVDF 膜剪成 3 mm 宽的窄条状,置印记反应槽内,并用 PBS 溶液浸湿后除去缓冲液,再加入 500  $\mu$ l 用 TBST 稀释 10 倍的 3 种血清[10 例阳性患者的混合血清、7 例阳性患者的单例血清(由于标本量留取不足,仅做了 7 例)、10 例阴性对照的混合血清],室温摇床孵育 1.5 h 后加入 500  $\mu$ l 用 TBST 稀释 250 倍的碱性磷酸酶标记的兔抗人 IgE 抗体继续孵育 1 h,除去标记抗体并洗膜 5 次后加入碱性磷酸酶显色底物避光显色 15 min,将膜取出用蒸馏水洗净,吹干后观察显色条带。

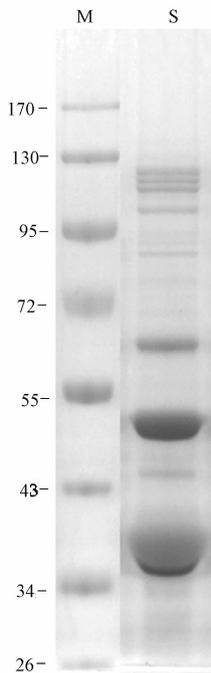
## 2 结果

### 2.1 虾肉蛋白提取液蛋白组分分析

提取液含十几种蛋白,相对分子质量为 120、115、110、100、90、88、73、70、65、50、45 和 36 kD,其中 65、50 和 36 kD 的蛋白相对浓度较高,条带较明显,如图 1 所示。

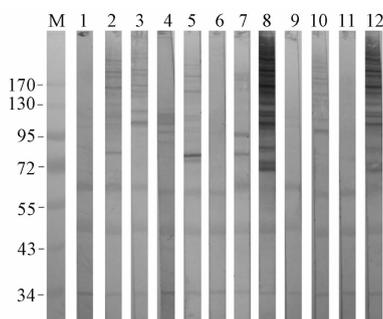
### 2.2 能与血清 sIgE 结合的蛋白组分分析

如凝胶中蛋白组分与血清 sIgE 结合,形成抗原-sIgE 复合物,再结合酶标记兔抗人 IgE 抗体,加底物后显色,酶免疫印记结果如图 2 所示,无论正常血清、阳性混合血清、阳性单例血清,于 34 kD 附近均显示反应条带;8 号阳性单例血清和 12 号阳性单例血清显示多条颜色较深反应条带,其中 8 号血清最为明显(条带数量超过 12 条);其余阳性单例血清(3~7 号,9~11 号)、阳性混合血清(2 号)只显示较少反应条带。如 5 号血清显示 4 条反应条带,其中以 72~95 kD 之间的条带最明显;7 号血清只显示 2 条反应条带(位于 72~95 kD 之间);6 号和 11 号血清未显示明显条带。同时,结合蛋白电泳图谱进一步分析可以看出,与阳性血清显示强结合的组分(条带明显)与该组分在提取液中的相对浓度不一致,说明蛋白的致敏性与蛋白含量不相关;且印记反应条带数量多于蛋白条带数量,说明有些微量蛋白同样是重要致敏原(与患者 IgE 显示较强结合)。



注: M为marker; S为虾肉蛋白提取液

图1 虾肉蛋白提取液 SDS-PAGE 分析结果  
Figure 1 Extraction of shrimp protein liquid  
SDS-PAGE analysis results



注: M: 低分子量marker; 1: 阴性对照印迹图谱; 2: 混合阳性血清印迹图谱; 3~11: 单例阳性

图2 3种血清与组分分析结果

Figure 2 Three kinds of serum and component analysis results

### 3 讨论

分析、鉴别食物致敏原是食品安全检测的基础,而从临床医学角度,制备标准化过敏原是建立血清sIgE检测的前提。由于食物中蛋白成分的复杂性、过敏性疾病的群体差异性以及各地区饮食和烹饪习惯的不同,人们很难制备一种标准化的已知抗原适用于所有地区过敏人群血清sIgE检测的要求。关于虾引起食物过敏的报道起源于上世纪80年代,较为明确的致敏原包括原肌球蛋白<sup>[5]</sup>、精氨酸激酶等<sup>[6]</sup>,同时也包括尚未确定的多种蛋白组分<sup>[7-10]</sup>。

本文选择天津地区经常食用的对虾作为研究对象,按照经典的虾蛋白提取液制备程序,经SDS-PAGE分析得到电泳图谱显示,蛋白提取液至少含

有12种可辨认蛋白区带,其中65、50和36 kD的蛋白相对浓度较高,此结果与王晓雯研究小组<sup>[11]</sup>的报道相一致。在此基础上,我们收集30例天津地区明确诊断的虾过敏患者的阳性血清,并以健康人群血清作为阴性对照,分析蛋白提取液中与阳性血清的反应情况。分析免疫印记图谱结果提示:①过敏患者血清中特异性IgE所识别的蛋白组分存在一定差别,但能被阳性血清结合的组分并非分布在蛋白含量较高的区域(<70 kD,如65、50和36 kD位置的蛋白未与阳性血清产生较强结合),而主要集中在含量不占优势的大分子量(70 kD以上)区域。②因所选30例阳性血清血清特异性IgE的效价不同,条带颜色深浅不同,如图2中的8号血清和12号血清均显示较深反应条带,说明患者对过敏原非常敏感。③虽然在34 kD位置(原肌球蛋白)显示反应条带,但未发现原肌球蛋白与阳性血清呈现较强的结合,此结果与Tsabouri S<sup>[12]</sup>报道的结果一致。此外,我们也发现部分阳性病例(6和11号)未出现明显反应条带,考虑可能是IgG4亚类抗体所致临床表现,采用兔抗人IgE二抗不能检出。纵观本研究结果,我们初步认为不能直接采用原始蛋白提取液作为已知抗原用于血清sIgE检测,而是应该对此进行加工,提取与阳性血清强结合而含量相对较低的蛋白组分,去除(或降低)含量相对较高而与阳性血清弱结合的蛋白组分。另外,免疫印记结果也表明患者之间,待检血清所识别的蛋白种类也存在明显差异,此种差异同样表现在其它食物过敏的研究报道中<sup>[13-14]</sup>。针对血清sIgE检测,我们需要深入解析过敏原抗原表位,寻找那些带有共性的与群体sIgE有高结合频率的抗原表位进行制备重组抗原,才能从根本上提高血清sIgE检测的特异性和敏感度,从而提高食物过敏性疾病的诊断水平。

### 参考文献

- [1] Taylor S L. Molluscan shellfish allergy[J]. Adv Food Nutr Res, 2008, 54:139-177.
- [2] Lao-araya M, Trakultivakorn M. Prevalence of food allergy among preschool children in northern Thailand[J]. Pediatr Int, 2012, 54(2):238-243.
- [3] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 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):119-121.
- [4] Jeebhay M F, Robins T G, Lehrer S B, et al. Occupational seafood allergy: a review[J]. Occup Environ Med, 2001, 58(9):553-562.
- [5] Mohamed F J, Thomas G R, Mary E M, et al. Occupational allergy and asthma among salt water fish processing workers[J]. Am J Ind Med, 2008, 51(12):899-910.
- [6] Goetz D W, Whisman B A. Occupational asthma in a seafood restaurant worker: cross-reactivity of shrimp and scallops[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000, 85(6):461-466.