

# 蟹类过敏原组分及其抗原表位的研究进展

李韶深 李婵 李会强(审校)

基金项目:天津市卫生局科技基金项目(2011KY34)

作者单位:300202 天津市,天津中医药研究院附属医院检验科(李韶深)

300070 天津市,天津医科大学医学检验学院(李婵 李会强)

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.015

近年来,在食品安全研究中,对食物过敏性疾病的研究呈逐年上升趋势,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所调查数据显示,在 15~24 岁年龄段的健康人群中,约有 6% 的人曾患有食品过敏疾病<sup>[1]</sup>。虾、蟹等甲壳类动物及其制品是联合国粮农组织提出的 8 大类过敏食物中的重要一类<sup>[2~4]</sup>。因此,国内外针对蟹类过敏原的研究也在不断发展,国内对蟹类过敏的研究主要处在蛋白水平,赵绮华等<sup>[5]</sup>报道了梭子蟹主要过敏原为相对分子质量  $48.7 \times 10^3$  和  $74.4 \times 10^3$  的蛋白质;Li 等<sup>[6,7]</sup>先后研究了虾类产品在不同加工过程中过敏原免疫活性的变化;喻海琼等<sup>[8]</sup>从刀额新对虾中分离得到相对分子质量为  $36 \times 10^3$  和  $68 \times 10^3$  的过敏蛋白。而国外早在上世纪 90 年代,就确定了甲壳类动物的主要过敏原为  $36 \times 10^3$  的原肌球蛋白(tropomyosin, TM)<sup>[9]</sup>。并且对过敏位点进行研究,如发现了褐对虾 TM 中的 8 个 IgE 结合位点,长度分别为 5~14 个氨基酸<sup>[10,11]</sup>,这将对食物过敏的研究深入到抗原表位的分子水平。因此本文主要对近年来关于蟹类过敏原组分和抗原表位的研究成果作一综述。

## 1 食物过敏

食物过敏是指因机体对某种食物中一种或多种蛋白(过敏原)敏感而导致疾病,是免疫应答异常的结果。食物过敏患者的临床表现涉及呼吸系统、胃肠道系统、中枢神经系统、皮肤、肌肉和骨骼等,其临床症状各异,如:荨麻疹、血管性水肿、喉痉挛和哮喘等,严重的食物过敏甚至可导致过敏性休克<sup>[12]</sup>。超敏反应即变态反应是一种病理性免疫应答,是已致敏的机体再次受到相同抗原刺激后发生的一种异常或病理性的免疫应答。根据发生机制及临床特点可将超敏反应分为 I 型、II 型、III 型和 IV 型四种类型。食物过敏反应属于 I 型超敏反应,由 IgE 抗体介导,肥大细胞和嗜碱性粒细胞是 I 型超敏反应关键的效应细胞。正常人血清中 IgE 水平很低,而过敏患者血清 IgE 水平很高,通过检测血清总 IgE 水平可以帮助临床判断患者是否为过敏体质,而检测过敏原特异性 IgE 则可以帮助临床判断患者是否对此种食物敏感(或过敏)。因此,检测血清特异性 IgE 是确定受试者是否对特定食物过敏的重

要指标之一。

## 2 过敏原蛋白水平的研究

蟹过敏检测方法的构建需要建立在对蟹中主要过敏原的提取、鉴定的基础上。如何提取、鉴定蟹的主要过敏成分,并将这些过敏成分有效地运用,以建立简单有效的血清中特异性 IgE 测定方式是食物过敏领域研究的一个重要方向。

对于过敏原蛋白水平的研究方法已经固定,基本是按照提取、鉴定活性、纯化步骤进行。蟹类甲壳动物过敏原研究的方法与此相同。首先,采用丙酮抽提方法提取总蛋白溶液,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析提取液中蛋白组分;其次,以过敏患者血清(特异性 IgE)为识别探针,采用免疫印迹方法,鉴定与血清特异性 IgE 结合的蛋白组分(过敏原);最后,根据已确定的蛋白理化特性,采用选择沉淀、层析技术分离获得相应组分。

近些年,文献<sup>[13~18]</sup>报告分离的蟹类蛋白总数在 15~20 条左右,不同蟹种主要过敏蛋白的数量和相对分子质量也不同见表 1。

表 1 不同种类蟹的主要过敏蛋白相对分子质量

种类	过敏原 相对分子质量	备注
雪蟹	$34 \times 10^3$	第一个被鉴定出的
梭子蟹	$74.4 \times 10^3$ 、 $48.7 \times 10^3$	这两个条带的阳性 反应率为 100%
铁蟹	$76 \times 10^3$	该条带阳性反应率为 100%
大闸蟹	蟹肉: $11 \times 10^3$ 蟹黄: $21 \times 10^3$	这个发现解释了为什么有些人只 对蟹黄过敏,而对蟹肉不致敏。
锯缘青蟹 1	$38 \times 10^3$	-
锯缘青蟹 2	精氨酸激酶	证实了其是主要的过敏蛋白

目前,蟹类过敏原研究的热点主要集中在 TM 和精氨酸激酶(arginine kinase, AK)两个方面。TM 的相对分子质量在  $35 \times 10^3$ ~ $38 \times 10^3$  左右,由两个多肽链组成,含一个  $\alpha$ -螺旋和一个卷曲螺旋结构,此种蛋白质家族具有高度保守性,并含多

种亚型。

梁银龙研究<sup>[19]</sup>显示中华绒螯蟹的主要过敏原为 TM, 而 Abdel 等<sup>[20]</sup>也报告用质谱仪检测 TM 作为雪蟹加工场所空气中过敏原的检测指标。吴凯威等<sup>[21]</sup>在梭子蟹 TM 基因的克隆, 表达的相关实验中揭示梭子蟹 TM 与美洲螯龙虾 TM 的同源性达 97%, 与中国龙虾和刀额新对虾同源性为 92%, Boquete 等<sup>[22]</sup>报告海产品中的 TM 与螨中的 TM 有很强的相关性。

AK 是一种磷酸化的胍基化合物, 主要存在于无脊椎动物体内, 其作用是催化精氨酸与 ATP 之间的可逆性反应。在无脊椎动物能量产生较多时, AK 将这些能量储存于磷酸精氨酸的高能磷酸键中, 在细胞活动爆发需要能量时, AK 又将磷酸精氨酸分解产生 ATP<sup>[23]</sup>。Abdel<sup>[24]</sup>应用 SDS-PAGE 技术和质谱仪对雪蟹蛋白进行分析, 识别了 5 个蛋白(包括肌浆钙结合蛋白相对分子质量  $20 \times 10^3$ , AK  $40 \times 10^3$ , 肌钙蛋白  $23 \times 10^3$ ,  $\alpha$ -肌动蛋白  $42 \times 10^3$ , 平滑肌内质网 ATP 酶  $113 \times 10^3$ )。该研究显示, 43% 的患者在相对分子质量  $40 \times 10^3$  有很强的反应, 因此确定该蛋白为蟹类次要过敏蛋白, 即 AK。而 Shen 等<sup>[25]</sup>认为锯缘青蟹 AK 是其特异的变应原。随着新仪器的出现, 方法学的改善, 使过敏原蛋白的研究有了长足的进步。Abdel 等<sup>[26]</sup>用同位素质谱仪通过检测过敏原的一级结构和信号肽, 可以同时检测出蟹类加工场所空气中的 TM 和 AK, 而且利用串联质谱仪和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术准确测量了 TM 的相对分子质量为  $38 \times 10^3$ 。

### 3 过敏原抗原表位水平的研究

近年来, 人们已将过敏原的研究从蛋白水平开始深入到抗原表位水平。抗原表位(抗原决定基)是抗原分子中决定抗原特异性的特殊基团, 直接参与结合抗体的部分, 同时也是免疫细胞识别的基本单位。对于蛋白抗原而言, 抗原表位一般由 5-7 个氨基酸组成。因此, 食物过敏原中特殊的氨基酸序列(抗原表位)才是引起食物过敏反应的“元凶”。同时, 由于抗原表位的结构相对于蛋白质更加简单, 分子量更小, 仅为一小段多肽, 更具针对性。同一分子有的存在多表位, 不同的表位对抗原性的贡献不同, 有优势表位和非优势表位之分。抗原的交叉反应性依据表位的定义又可分为两类, 一类叫共同反应性, 即不同蛋白质分子上有共同的表位而为同一抗体识别; 另一类叫交互反应性, 即交叉反应抗原与免疫原表位只有结构相似性而并非完全相同。这种交互反应一般较弱, 但也可以很强, 后者叫异质特异性。目前发现许多抗原-抗体系统中存在异质特异性, 说明抗原抗体识别的特异性是有一定限度的。将过敏原表位作为过敏原研究的重点是必然的趋势<sup>[27]</sup>。

目前, 在利用传统的重组肽库和合成多肽的方法, 已经成功预测并收录入库了 8 种甲壳类食物的抗原表位, 具体序列如表 2 所示。

表 2 已确定收录入库的甲壳类食物抗原表位

编号	序列	位置	长度(氨基酸)
表位 1	IRATQKKMQQVENE	43-56	14
表位 2	ALNRRRIQLPEEDLERS	87-102	16
表位 3	DEERM	137-141	5
表位 4	LENQLKEA	144-151	8
表位 5	ESKIVELEEEEL	187-197	11
表位 6	LQKEVDRLLEDE	249-259	11
表位 7	KYKSITDE	266-273	8
表位 8	ELDQTFSE	273-280	8

### 4 重组过敏原

目前, 由于我国对于蟹类过敏的研究还较少, 关于蟹类过敏原组分的基础数据还较缺乏, 现医院内蟹类过敏原的诊断还主要依赖于进口检测试剂盒, 或者沿用传统的试验方法。而且国产的过敏原只是天然提取, 未经脱脂后的粗浸液, 其成分较为复杂, 包括主要、次要致敏组分和其他非特异性蛋白成分, 并未进行标准化, 不仅临床效果较差, 甚者会发生严重的不良反应。因此, 人们开始考虑将主要过敏原以及抗原表位进行克隆表达, 以获得高纯度的抗原, 用以制备体内或体外诊断试剂盒, 提高检测的准确性。

随着医学研究水平的不断发展, 基因的克隆和表达等分子生物学技术已日渐成熟。国外也有报道<sup>[28]</sup>, 利用传统的重组肽库和合成多肽的方法确定抗原表位, 同时也开始利用免疫信息学的方法确定抗原表位, 这些确定的抗原表位已得到证实并收录入库。在此基础上, 将确认的抗原表位进行克隆表达, 获得的过敏组分可以作为高质量的抗原, 用以诊断和治疗食物过敏。目前, 国内的梁银龙等<sup>[29]</sup>就成功地克隆表达了锯缘青蟹、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹三种蟹的主要过敏原(TM 序列)。

### 5 蟹 TM 的克隆表达

目前, 国内关于食物过敏原的克隆表达报道较少, 上述中的梁银龙等<sup>[29]</sup>是根据 GenBank 报道的甲壳类动物 TM 序列设计合成引物, 同时根据需要设计相应的酶切位点, 分别 PCR 克隆得到锯缘青蟹、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹的 TM 基因序列, 测序所克隆的基因序列, 这三个基因的序列长度均为 855 bp, 编码 284 个氨基酸残基, 证实克隆所得的产物与 GenBank 所登录的三种蟹的 TM 序列一致; 为构建谷胱甘肽转移酶融合蛋白的要求选择表达载体 pGEX-4T-3; 之后将克隆的锯缘青蟹的 TM 基因与 pGEX-4T-3 载体连接并转化 JM 109 感受态细胞, 氨苄青霉素培养基培养; 后经 IPTG 诱导, 优化诱导条件, 最后得到相对分子质量约为  $61 \times 10^3$  的融合表达蛋白, 并通过免疫印迹证实了该蛋白的过敏原性。

### 6 小结

可以看到, 对蟹过敏原的研究已经从最初的蛋白水平的

分离纯化, 逐渐发展到利用生物信息技术预测抗原表位, 并将这些抗原表位克隆和表达, 为基因重组抗原、单克隆抗体的制备, 提供更加高效和特异的已知抗原, 同时也为食品领域检测食物中过敏原提供已知的特异性抗体。总之, 对蟹类过敏原进行更加细致的抗原表位预测, 并克隆表达将是食物过敏原检测领域研究的重要趋势。

## 7 参考文献

- 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查. 中国食品卫生杂志, 2005, 17: 119-121.
- Emmett SE, Angus FJ, Fry JS, 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. *Allergy*, 1999, 54: 380-385.
- Moneret-Vautrin DA. Epidemiologie de l'allergie alimentaire et prevalence relative des trophallergenes. *Cahiers Nutrition Dietetique*, 2001, 36: 247-252.
- Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. 2001, 56: 1172-1179.
- 赵绮华, 赖荷, 陈丽金, 等. 梭子蟹过敏原致敏组分的分析研究. 广西医学, 2005, 27: 980-981.
- Li ZX, Lin H, Cao LM, et al. Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7: 251-256.
- Li ZX, Lin H, Cao LM, et al. The influence of gamma irradiation on the allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*). *J Food Eng*, 2007, 79: 945-949.
- 喻海琼, 刘志刚, 张帆, 等. 刀额新对虾变应原的分离、鉴定与纯化. 中国公共卫生, 2006, 22: 1199-1201.
- Leung PS, Chen YC, Gershwin ME, et al. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102: 847-852.
- Ayuso R, Reese G, Leong Kee S, et al. Molecular basis of a rthropod cross reactivity: IgE binding cross reactive epitopes of shrimp, house dustmite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129: 38-48.
- Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 127: 27-37.
- 顾瑞金, 主编. 变态反应学. 第 1 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000, 106-109.
- Leung PS, Chen YC, Gershwin ME, et al. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102: 847-852.
- 赵绮华, 赖荷, 陈丽金, 等. 梭子蟹过敏原致敏组分的分析研究. 广东医药杂志, 2005, 27: 980-981.
- 张明琦, 支玉香, 吕淑霞, 等. 铁蟹过敏原的分离、鉴定和快速纯化. 核农学报, 2009, 23: 839-842.
- 吴序栋, 邓利平, 刘志刚. 大闸蟹过敏原的分离、鉴定与纯化. 食品科技, 2009, 34: 294-296.
- 刘光明, 梁银龙, 翁凌, 等. 锯缘青蟹主要过敏原的纯化与鉴定. 水生生物学报, 2010, 34: 108-113.
- 沈苑, 饶世涛, 曹敏杰, 等. 虾蟹类食物过敏者血清的筛选与鉴定. 食品科技, 2010, 35: 312-317.
- 梁银龙. 蟹类过敏原的研究, 硕士学位论文, 集美大学.
- Abdel Rahman AM, Lopata AL, Randell EW, et al. Absolute quantification method and validation of airborne snow crab allergen tropomyosin using tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2010, 681: 49-55.
- 吴凯威, 刘志刚. 红星梭子蟹变应原原肌球蛋白基因的克隆、表达及其免疫学鉴定. 水生生物学报, 2009, 33: 296-303.
- Boquete M, Iraola V, Morales M, et al. Seafood hypersensitivity in mite sensitized individuals: is tropomyosin the only responsible allergen? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011, 106: 223-229.
- 阮韦伟, 沈苑, 曹敏杰, 等. 锯缘青蟹精氨酸激酶基因的克隆与表达. 集美大学学报(自然科学版), 2011, 16: 346-351.
- Abdel Rahman AM, Kamath SD, Lopata AL, et al. Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine kinase using tandem mass spectrometry. *J Proteomics*, 2011, 74: 231-241.
- Shen Y, Cao MJ, Cai QF, et al. Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen. *J Sci Food Agric*, 2011, 91: 1326-1335.
- Abdel Rahman AM, Gagné S, Helleur RJ. Simultaneous determination of two major snow crab aeroallergens in processing plants by use of isotopic dilution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 821-831.
- 李海侠. 蛋白质抗原表位研究进展. 微生物学免疫学进展. 2007, 35: 54-58.
- Reese G, Ayuso R, Carle T, et al. IgE-binding epitopes of shrimp tropomyosin, the major allergen Pen a 1. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118: 300-301.
- 梁银龙, 曹敏杰, 郭川, 等. 蟹类原肌球蛋白基因的克隆与表达. 水产学报, 2009, 33: 24-29.

(收稿日期: 2012-04-05)

(本文编辑: 李霖)