

中国典型水果过敏原蛋白研究进展

张培澳^{1,2}, 高吉慧^{1,2}, 纪瑞阳², 车会莲², 薛文通², 杨 栋^{1,2*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 植物源功能食品北京市重点实验室, 北京 100083;
2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 随着我国人民生活水平不断提高, 水果消费量也在逐年增加, 水果过敏问题因此日益凸显。水果是十大食物过敏来源之一, 水果过敏与自身遗传、环境和水果种类等多种因素相关, 常和花粉、乳胶发生交叉过敏反应。水果过敏常见的症状有口腔过敏综合征和全身过敏反应。水果过敏发生的主要原因是由于水果中某些蛋白质使患者的免疫系统发生紊乱, 属于 I 型速发型过敏反应。本文首先阐述了水果过敏的发生机制、临床数据和症状、以及过敏原命名方式。其次以我国常见的引发过敏反应的特色水果为例, 涵盖热带水果、蔷薇科水果和亚热带水果, 总结过敏相关蛋白家族最新研究进展, 并综述了现阶段常用的水果过敏原蛋白分子鉴定及检测技术, 以期为进一步探索免疫诊断、治疗和选育低致敏性水果品种提供参考。

关键词: 水果过敏; 过敏原; 过敏蛋白家族; 鉴定检测

Research progress on the typical allergenic proteins from fruits in China

ZHANG Pei-Ao^{1,2}, GAO Ji-Hui^{1,2}, JI Rui-Yang², CHE Hui-Lian², XUE Wen-Tong², YANG Dong^{1,2*}

(1. *Beijing Key Laboratory of Functional Food from Plant Resources, College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China*; 2. *College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China*)

ABSTRACT: As the rising of people's living standard, the consumption of fruits is also increasing and fruit allergy has become more prominent. Fruit is also one of the ten major food allergic sources in China. The occurrence of fruit allergy involves many factors, including human heredity, environment, type of fruit and its variety. Fruit allergy is often cross-reactive with pollen and latex allergy. Its common symptoms include two classes: reactions limited to the oral cavity and the systemic anaphylaxis. The main cause of fruit allergy is that certain proteins in fruit cause the patient's immune system to be disturbed, which belongs to the type-I hypersensitivity. This review firstly introduced the immunological mechanism of fruit allergy, its prevalence and symptoms, the nomenclature of allergens in China and foreign countries. Then, this review discussed the typical fruits that cause allergy, including tropical fruits, Rosaceae fruits and subtropic fruits, and summarized the latest progress of related fruit allergic protein families. Finally, it summarized the currently used molecular identification and detection techniques targeting fruit allergens, so as to provide references for further exploration of immunodiagnosis, treatment and breeding of low-allergenic fruit varieties.

KEY WORDS: fruit allergy; allergen; allergic protein family; identification and detection

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605000)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605000)

*通信作者: 杨栋, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品生物化学。E-mail: dyang@cau.edu.cn

*Corresponding author: YANG Dong, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, No.17 East Tsinghua Rd., Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: dyang@cau.edu.cn

0 引言

水果滋味可口,营养丰富,广受人们喜爱,同时也是十大过敏食物之一。水果过敏指机体接触水果中某些蛋白成分时所发生的生理功能紊乱和(或)组织损伤性的病理性免疫反应。水果过敏的发生受多种因素共同作用,主要取决于遗传、环境和水果种类等因素,涉及过敏原、过敏性抗体(主要是 IgE)、细胞、受体和细胞成分 5 个环节^[1]。据统计,在欧洲儿童中水果过敏发生比率最高可达 11.5%,约为成人的 3 倍^[2]。欧盟呼吸道健康委员会在欧洲的调查结果显示,最容易引发过敏的水果是桃(5.4%),苹果(4.2%),猕猴桃(3.6%),其次为香蕉(2.5%)和甜瓜(1.6%)^[3]。水果过敏的临床表现形式多样,且不同水果种类引起的症状也存在差异,常见有轻度的口腔反应和全身系统性反应。前者症状主要出现在口腔周围,较为轻微并通常伴随着皮肤瘙痒、红肿等;后者可在全身多个器官出现症状,例如全身性荨麻疹、腹痛呕吐、过敏性哮喘等,严重时甚至会引起过敏性休克^[4]。

近年来,随着水果消费种类和数量不断增加,水果过敏问题日益凸显^[5]。在我国,致敏水果种类分布比较广泛,常见的有菠萝、芒果、荔枝等热带水果以及桃、苹果等蔷薇科水果、亚热带水果杨梅也导致过过敏病例的产生^[6]。据调查,欧洲大约有 2%~5%的人口对蔷薇科水果过敏,而我国对水果过敏相关的统计尚未全面系统化,相关文献多以病例报告为主^[7]。因此,系统性研究我国水果过敏对食品安全具有十分重要的意义。

本文首先介绍了水果过敏及水果过敏原的相关知识,其次重点总结了我国常见 6 种致敏水果中主要过敏原蛋白的研究现状,并对现阶段常用的检测鉴定水果过敏原蛋白的分子学技术进行了综述,期望对进一步探索免疫诊断、治疗和选育低致敏性水果品种提供参考。

1 水果过敏和水果过敏原

1.1 水果过敏反应发生机制

按免疫系统分类,过敏有 4 种类型的过敏症状。I 型过敏症状主要基于人体免疫球蛋白 IgE (免疫球蛋白 E)受体,II 型是基于 IgG (免疫球蛋白 G)或 IgM (免疫球蛋白 M)受体的细胞毒性过敏症状,III 型过敏症状的抗原一般为病原微生物等具有生物活性的化合物,关键抗体是 IgG。最后,导致 IV 型迟发型变态反应的关键是免疫系统淋巴结的 T 细胞,该细胞释放淋巴因子引起结构性损伤^[5]。水果过敏是由于人体免疫球蛋白 IgE 受体的人体免疫系统对源自水果中某些蛋白质过敏原过度反应所引起的对人体的病理损害,属于 I 型过敏反应^[8]。I 型过敏症状也称为速发型超敏反应,因此水果过敏通常会迅速产生反应^[9]。

1.2 水果过敏流行病学调查和临床症状

据统计,食物过敏的患病率在成人中约为 5%,儿童中约为 8%^[10]。水果过敏常见的症状有轻微的口腔反应和严重的全身过敏反应。前者是指口腔过敏综合症,症状是口唇、口腔粘膜、舌甚至咽喉部位出现粘膜水肿、痒、烧灼感或刺痛。后者是在全身各脏器出现过敏反应,症状包括哮喘、呕吐、荨麻疹等,甚至出现过敏性休克^[11]。文昭明等^[12]对诊断为蒿属花粉症伴植物类食物过敏的患者病例进行研究后发现,和国外患者食用果蔬导致的过敏症状相比,国内患者主要是全身性反应,仅出现口腔过敏症状的病例罕见。不同品种的水果导致人们产生的过敏症状存在差异,并且也与人的生活习惯与环境有很大的关联。在我国,桃过敏症状通常和蒿属花粉过敏症状相伴^[13];芒果过敏患者还会出现接触性皮炎症状或者出现口腔过敏综合症^[14-15];对荔枝过敏的患者容易出现过敏性哮喘、过敏性紫癜等症^[16-17];苹果过敏患者可出现全身急性荨麻疹、喉头水肿、胸闷气喘、口唇发绀等症^[18-19];菠萝过敏患者往往出现恶心呕吐、皮肤潮红等症^[20];杨梅过敏病例报道还相对较少。

1.3 水果过敏与花粉等过敏的交叉反应

对某些水果产生过敏的患者还有交叉过敏反应的症状,包括对相同科属内的水果和不同科属内的果实发生过敏的症状,或者对乳胶、花粉等其他过敏原发生过敏反应^[21]。过敏原中可以结合免疫细胞或抗体的结构称为表位,构成交叉过敏反应的原理是它们携带的过敏原含有相同的表位。花粉、乳胶的特异性 IgE 可识别水果过敏原蛋白的过敏原表位,进而引发过敏反应,例如花粉-食物过敏综合征(pollen-food allergy syndrome, PFAS)与乳胶-水果综合征(latex-fruit syndrome, LFS)。花粉-食物过敏综合征通常发生在花粉过敏个体,由与花粉具有交叉过敏的新鲜水果、蔬菜或坚果导致,包括桦树、蒿和牧草等花粉^[22-23]。而乳胶-水果综合征常发生在猕猴桃、香蕉、芒果、菠萝等热带水果,且有研究发现患有乳胶-水果综合症的受试者首先对乳胶过敏,然后由于交叉反应而发展为食物过敏^[24-25]。

1.4 过敏原的命名

过敏原指可以刺激人体产生过敏症状的化学物质,包括一些蛋白质和小分子化学物质。过敏原的名称一般由 4 个英文字母和一个阿拉伯数字构成,这 4 个字母中,前 3 个字母来自过敏原拉丁属名,第 4 个英文字母是物种名英文首字母,中间用空格进行间隔,空格之后再写阿拉伯数字,阿拉伯数字表示发现该过敏原的时间先后顺序。同工型过敏原和同种型或变型过敏原名称用同样的英文字母,但是阿拉伯数字具有不同的标记形式^[26]。同工型过敏原功能相似但结构不同,例如桦树花粉过敏原 Bet v 1 包括 31 个同工型过敏原,共 40 多个序列,这些序列之间的同源性的 73%到 98%^[27],需要以这样的方法命名 Bet v 1 同工型过敏原:如 Bet v 1.01, Bet v

1.02 到 Bet v 1.31。同种型或变型指的是同一个过敏原的不同变种,这类过敏原的序列一致性一般超过 90%,区分的方法是在通用名称之外添加 2 个数字,例如 42 个 Bet v 1 的亚型包括 Bet v 1.0101, Bet v 1.0102, Bet v 1.0103 等^[9]。

2 常见水果过敏原蛋白研究现状

过敏原蛋白家族的分类是基于基因编码序列和过敏原的空间结构信息,按照相似的空间结构和结构域进行归类。目前过敏原数据主要来源于国际免疫学会联合会(international union of immunological societies, IUIS)官方网站上的过敏原目录、Allfam 数据库查询(<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam>)以及 Allergome 数据库查询(<http://www.allergome.org/>)。以现在公布的水果过敏原信息为基础,对它们进行蛋白聚类分析,发现其主要集中在以下 7 大类,即类甜蛋白(thaumatin like protein, TLPs), Betv 1 同源蛋白,脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTPs),抑制蛋白(profilin),几丁质酶(chitinase),半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)和 β -1,3 葡聚糖酶(β -1,3-glucanases)。这 7 大类中除抑制蛋白外,其他均归类为病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PR)。

病程相关蛋白是植物在受到外界逆境、病原菌刺激后产生的一种或几种上调蛋白。PR 蛋白在水果过敏中占据重要地位,许多交叉过敏现象的发生都与这类蛋白相关。有研究发现,植物病程相关蛋白在不同的生长条件下的表达量存在显著差别,并且同一家族中不同蛋白质的表达量也不同^[28]。因此,研究 PR 家族成员的结构、理化性质和免疫活性,既有利于掌握过敏的交叉反应性,也能分析不同过敏原在致敏频率上的差别^[29]。

下面将以我国常见的 6 种致敏水果为例,介绍国内关于水果过敏原蛋白家族、结构、理化性质等研究现状。

2.1 热带水果

近些年来,中国的热带水果进口量与国内的产量逐渐增大,这导致因热带水果发生过敏反应的患者人数不断增加。2019 年,一份对 2329 例儿童过敏性疾病的过敏原分析报告显示热带水果中芒果和菠萝过敏原阳性率均为 0.6%^[30]。这一比例因气候环境和地域的不同也会有差别,例如,在地处热带的中国海南地区哮喘患儿中热带水果食入性过敏原 IgE 阳性率高达 9%^[31]。目前已知的热带水果过敏原除了有 PR-10、PR-14、PR-5 和抑制蛋白这 4 类,其他则以蛋白酶居多。主要热带水果过敏原已知的蛋白家族聚类见表 1^[5]。

2.1.1 芒果

芒果可引起人体 2 种过敏反应,一种是由 IgE 介导的 I 型速发型过敏,另外一种为 IV 型迟发型过敏反应。近年来,关于芒果过敏的报道逐渐增多,国内外对芒果过敏原蛋白的研究也越来越多。FUNES 等^[32]为研究漆树科食物过敏原,选择了 10 名对漆树科食物过敏的患者进行皮肤实验,结果

发现各有 7 名、5 名和 3 名患者对芒果皮、芒果果肉和芒果种子反应阳性。2007 年,张红云等^[33]通过克隆表达了芒果果实中的 profilin 泛变应原,得到了氨基酸序列同源性高达 88%的 2 个芒果 profilin 过敏原,将其命名为 Man i 3.01 和 Man i 3.02,并且利用 Western-blot 免疫印迹技术检测发现得到的这 2 个芒果 profilin 过敏原均具有良好免疫活性。2018 年,张帅等^[34]发现芒果中几丁质酶的蛋白质序列与柑橘、龙眼、胡杨和核桃中几丁质酶的蛋白质序列有较高的同源性,存在交叉反应的基础,并且通过初步分析发现芒果属几丁质酶的二级结构中的 β -转角和无规则卷曲是容易形成 B 细胞抗原表位的区域,其可能区域为 38~46、64、67、75~76、89、97~101、115、122、124~126、128~129、133~138、144~150、152、176、178~181、222~225。2020 年,谢涵冰^[5]发现芒果中含有一个潜在的过敏原,分子量范围在 25~35 kDa,根据质谱分析和现有的科学研究结果,认为该蛋白可以被归类到几丁质酶蛋白家族。我国对芒果基因组、转录组和蛋白组的科学研究也正在取得进展,例如对“Zill(吉禄)”芒果果实的果皮、果肉在发育阶段和成熟阶段进行转录组的测序^[35],对我国优质的芒果栽培种“红象牙”进行蛋白编码基因预测,并得到了详细的芒果基因图谱,大小为 393 M^[36],这些资料将有助于芒果过敏原编码基因的发现和鉴定。目前,国内在临床上暂未出现针对芒果过敏的体内外检测产品^[5]。

2.1.2 荔枝

荔枝树栽培主要分布在我国西南部、南部和东南部,其中广东和福建的南部栽培最盛。荔枝过敏患者可能会出现荨麻疹、过敏性哮喘、过敏性皮炎、呼吸困难等症状^[17,37-38]。2006 年,张红云等^[39-40]通过 RT-PCR 与 3'-RACE 技术克隆了荔枝 profilin 全长基因,并且纯化表达了荔枝 profilin,进而研究其免疫学活性和交叉反应性。研究结果显示荔枝 profilin 是荔枝果实中重要的次要过敏原,并和桦树花粉 profilin 含有相同的抗原表位,进一步证实其是引起荔枝与其他食物或花粉等产生交叉过敏反应的因素之一。

2.1.3 菠萝

菠萝,别名凤梨,是多年生草本植物。1990—2008 年四川省第四人民医院共收治菠萝过敏症患者 37 例,患者症状主要为消化道不适、皮肤问题等^[20]。2011 年,罗新萍等^[41]对菠萝过敏原 profilin 进行克隆表达及免疫学鉴定检测。克隆表达得到了菠萝过敏原 profilin,其基因开放阅读框含有 396 个碱基(含终止密码子),可编码 131 个氨基酸,相对分子质量约为 14.2 kDa,等电点是 4.71,并且利用免疫印迹技术发现其为菠萝的主要过敏原。这些研究为菠萝过敏的预防、临床诊断和治疗奠定了基础。

2.2 蔷薇科水果

表 2 总结了蔷薇科主要水果的过敏原蛋白家族^[42]。蔷薇科水果的过敏原主要集中在 4 类蛋白家族,即 PR-10、PR-14 (nsLTPs, 非特异脂质转移蛋白)、抑制蛋白(profilin)和 PR-5 (TLP, 类甜蛋白)。

表 1 主要热带水果过敏原蛋白家族
Table 1 Main allergen protein families in tropical fruits

过敏水果	PR-10Bet v1 同源蛋白	PR-14 脂质 转移蛋白	抑制蛋白	PR-3 几丁质酶	PR-5 类甜蛋白	抗坏血酸过 氧化酶	半胱氨酸蛋白酶	PR-2β-1,3 葡聚糖酶	甘油-3- 磷酸脱氢酶	暂未分类
芒果	Man i 2 (14 kDa)		Mani 3						Mani 1	
菠萝			Ana c 1 (15 kDa)				Ana c 2 (22.8 kDa)			
鳄梨				Pers a 1 (32kDa)						
香蕉			Mus a 1 (15 kDa)	Mus a 2 (33 kDa)	Mus a 4 (20 kDa)	Mus a 6 (27 kDa)		Mus aglucanase		Mus a 3 (9 kDa)
荔枝			Lit c 1 (15 kDa)							
杨梅				Morru						
覆盆子	Rub i 1 (17 kDa)	Rub i 3 (11 kDa)								

表 2 主要蔷薇科水果过敏原蛋白家族
Table 2 Main fruit allergen protein families of Rosaceae

过敏水果	Bet V1 同源蛋白	类甜蛋白	脂质转移蛋白	抑制蛋白	半胱氨酸蛋白酶	Cupin 蛋白家族	暂未分类
美味猕猴桃	Act d 8 (17 kDa) Act d 11 (17 kDa)	Act d 2 (24 kDa)	Act d 10 (10 kDa)	Act d 9 (14 kDa)	Act d 1 (30 kDa)	Act d 12 (50 kDa)	Act d 5 (40 kDa)
中华猕猴桃	Act c 8 (17 kDa)	Act c TLP	Act c 10 (10 kDa)		Act c actinidin		Act c 5 (28 kDa)
软枣猕猴桃							Act a kiwellin
苹果	Mal d 1 (17.5 kDa)	Mal d 2 (23 kDa)	Mal d 3 (9 kDa)	Mal d 4			
桃	Pru p 1 (18 kDa)	Pru p 2 (25~28 kDa)	Pru p 3 (10 kDa)	Pru p 4 (14 kDa)			
杏	Pruar 1		Pruar 3 (9 kDa)				
甜樱桃	Pru av 1 (9 kDa)	Pru av 2 (23 kDa)	Pru av 3 (10 kDa)	Pru av 4 (15 kDa)			
草莓	Fra a 1 (18 kDa)		Fra a 3 (9 kDa)	Fra a 4 (14 kDa)			
梨	Pyr c 1 (19 kDa)		Pyr c 3 (10 kDa)	Pyr c 4 (15 kDa)			

2.2.1 苹 果

苹果的主要过敏原有 4 种, Mal d 4 蛋白是苹果主要过敏原之一。2005 年, GAO 等^[43-46]克隆了苹果 4 类过敏原基因家族中的 28 种过敏基因, 并将其定位在国际普遍参照的 8 条分子标记连锁图谱上。其中, Mal d 1 的 17 个基因成员定位于 3 条连锁群上, 有 7 个成员均含 1 个内含子。在 14 个苹果品种上对这 7 个成员进行位点多样性分析, 发现 Mal d 1.01 和 Mal d 1.02 保守性高, Mal d 1.04, Mal d 1.05 和 Mal d 1.06 保守性低。2011 年, 夏宏林等^[47]以苹果过敏原 Mal d 4 蛋白的氨基酸序列为基础, 采用生物信息软件 HNN 进行二级结构预测, 并运用相关软件进行 B/T 细胞抗原表位预测, 采用 Clustal X1.83、Swiss-Model 软件进行同源序列比对和空间构象模拟, 结果发现该蛋白二级结构主要为无规则卷曲, 其优势抗原表位可能为 53~61、85~93。苹果过敏原 Mal d 4 蛋白与芒果、桃、草莓和甜樱桃的前纤维蛋白氨基酸序列同源性达 88%以上, 且空间构象相似, 之间可能存在交叉反应。2016 年, 研究者发现中国北方地区桦树花粉季节, 对此花粉过敏的患者有 16.7%以上, 而这些患者大多数同时对大豆和苹果的主要过敏原过敏^[48]。

2.2.2 桃

我国桃的年产量为 700~800 万 t, 位居世界首位。由于桃的消费量逐年增大, 已成为我国最常见过敏水果之一。目前 GeneBank 已收录桃果实的 13 个过敏原编码基因序列, 包括 4 个病程相关蛋白第 10 家族(pathogenesis-related protein, PR-10)基因, 4 个类甜蛋白(thaumatin like protein, TLP)基因, 3 个脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTP)基因和 2 个抑制蛋白(profilin)基因。

ZUBINI 等^[49]发现在桃的生长发育时期, 其 PR-10 家族成员 Pru p 1.01 和 Pru p 1.06 D 的表达水平普遍较高。2010 年, 陈琳^[50]将与苹果同源的 4 类 18 个桃过敏基因进行定位, 发现得到的 8 个 Pru p 1 中有 4 个是新发现的, 且 8 个基因都定位在同一区段。同时, 他们还应用 RT-PCR 的方法检测桃 4 类过敏原基因家族中的 18 个成员在桃果皮、果肉、花药和叶片等不同组织的表达情况, 发现其在不同组织间的表达水平呈现多样性, 且多数过敏原基因在果皮的表达比果肉高。2017 年, 高岭^[29]研究发现不同类型的桃(油桃)品种会导致不同程度的过敏反应, 通过双单抗夹心 ELISA 方法, 对我国 100 多个主要桃种进行了果实 Pru p 3 成分的测定, 结果显示 Pru p 3 主要积累在果皮, 并且发现大多数桃子品种 Pru p 3 含量都伴随桃子成熟在升高等变化特点。2018 年, 邓珊等^[51]发现桃过敏原 Pru p 3 蛋白的主要 T 细胞抗原表位为 23~38 和 67~82, 且 67~82 可能参与蒿花粉-桃交叉反应。另外, 杨朝崑^[8]发现我国南方以一桃过敏为主, 北方则以蒿草花粉过敏伴发桃过敏为主。

2.3 亚热带水果-杨梅

杨梅在我国湖南、广东、广西、贵州等地区都有分布。2012 年, 我国报道了成人在食用杨梅后出现严重的过敏症状, 甚至出现了休克现象^[6]。2015 年, 周湘^[9]对杨梅果实中的蛋白进行粗提, 并用 ELISA 实验法鉴定其活性, 确认粗提物具有活性后, 再进一步对单一过敏蛋白进行分离纯化、免疫特性的鉴定分析。之后进行肽指纹鉴定图谱和氨基酸同源序列比对, 结果发现杨梅粗蛋白具有比较高的免疫活性, 其主要条带分子量大小约为 28 kDa, 且属于几丁质酶第三家族。

3 水果过敏原蛋白常用的鉴定检测技术

3.1 过敏原鉴定

对过敏原蛋白分子的大小测定、结构分析、理化属性、结合位点以及致敏性的鉴定是水果过敏原蛋白的主要鉴定内容^[52], 经典的鉴定方法是先分离提取致敏水果中的过敏原蛋白分子并进行电泳, 再利用患者血清经 Western-blot 免疫印迹技术确定其分子量区间与免疫活性, 之后利用质谱检测和其他生物化学实验进一步确定其分子量大小、特异性 IgE 结合位点、结构特征和理化性质等^[8,52]。

近 10 年来分子生物学的发展使过敏原的组分和性质的鉴定更全面, 水果过敏原数据库的内容不断被完善和丰富。目前的蛋白质谱检测技术可以获得未知蛋白质的结构和物理特征, 从而获得未知蛋白质的一些主要参数^[9]。另外, 通过对过敏原的氨基酸序列、线性表位和空间表位有一定程度的掌握, 可以人工合成得到重组过敏原, 其免疫活性与天然蛋白分子的活性基本相同^[53]。

3.2 过敏原检测

现阶段食物过敏原检测方法主要是基于蛋白质水平的检测和基于核酸水平的检测^[54]。

基于蛋白质检测的方法是应用抗体与抗原发生特异性结合的免疫学原理, 通过此类方法可检测具有抗原性的蛋白。检测方法包括酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、Western-blot 免疫印迹杂交法和免疫层析技术等。免疫学检测的显著优势是高度特异性, 在干扰背景存在下抗原与抗体也能准确识别, 达到检测目的。酶联免疫吸附法是最为常用的检测水果过敏原方法之一, 有操作方便、时间短、灵敏度高等特点。周湘^[9]用杨梅过敏患者血清与杨梅粗提蛋白进行 ELISA 实验, 结果表明杨梅粗提蛋白中含有致敏蛋白, 能够产生免疫反应。Western-blot 免疫印迹杂交法同时利用凝胶电泳和免疫方面的化学分析方法, 其优点为高通量、特异性强和灵敏度高。Funes 等通过 Western-blot 实验检测到芒果肉中 5 个明显条带, 对应分子量分别为 9、41、43、79 和 80 kDa^[32]。

免疫层析法在水果过敏原检测中不如前文介绍的2种方法常见。

基于核酸检测的方法为经典的PCR法和各具特色的PCR衍生技术。PCR技术提出后,通过不断改进和优化,衍生出实时定量荧光PCR(quantitative real-time fluorescence PCR, qPCR)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)。这类方法的灵敏度比较高,而且可实现多种过敏原同时检测。不过,此类方法为间接检测过敏原,在蛋白质与核酸有效分离的情况下会出现假阴性结果。实时定量荧光PCR特异性强,灵敏度高,可以实现高效定量检测,在水果过敏原检测上得到广泛的应用。杨朝崴^[8]通过实时定量荧光PCR方法,检测桃果实不同发育阶段下过敏基因成员的表达水平。

由于上述方法存在一定的缺陷,质谱法在过敏原检测中越来越受到人们的重视^[55]。它主要通过检测酶解产物特异性肽,从而获得蛋白质成分、结构和序列信息,进一步得到已知的氨基酸序列^[56]。该方法对蛋白质的三维结构没有要求,因此可同时检测变性与非变性的过敏原。近些年,质谱法在水果过敏原检测中比较常见。

4 结束语与展望

随着社会与经济的快速发展,过敏现象逐渐影响着食品安全和人民健康,水果过敏属于其中的一种。为了降低水果过敏的发生,国内的研究目前在基于水果过敏患者血清与水果过敏原蛋白的免疫学反应上,通过多种鉴定检测技术对致敏水果蛋白进行纯化和鉴定以得到主要过敏原蛋白,并结合水果基因组和蛋白数据库确定其蛋白家族类型以及编码基因,为水果过敏的诊断与治疗、低致敏性水果品种的选育奠定基础。因此,进一步对我国典型水果过敏原开展基础研究具有重大意义。

参考文献

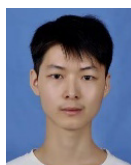
- [1] 许以平. 变应性疾病发病机制研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2008, 9: 641–643.
- [2] XU YP. Study progress on pathogenesis of allergic disease [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2008, 9: 641–643.
- [3] ZUIDMEER L, GOLDHAHN K, RONA RJ, *et al.* The prevalence of plant food allergies: A systematic review [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(5): 1210–1218.
- [4] BURNEY P, SUMMERS C, CHINN S, *et al.* Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European community respiratory health survey: A Euro Preval analysis [J]. Allergy, 2010, 65(9): 1182–1188.
- [5] ORTOLANI C, ISPANO M, PASTORELLO EA, *et al.* The oral allergy syndrome [J]. Ann Allergy, 1988, 61(6 Pt 2): 47–52.
- [6] 谢涵冰. 芒果过敏原分子鉴定的初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [7] XIE HB. Preliminary study on molecular identification of mango allergens [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [8] WANG HY, GAO ZS, YANG ZW, *et al.* Anaphylaxis and generalized urticaria from eating Chinese bayberry fruit [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13(10): 851–854.
- [9] 白青云. 某些食物的过敏性问题[J]. 中国食物与营养, 2005, (7): 54–55.
- [10] BAI QY. Allergic to certain foods [J]. Food Nutr China, 2005, (7): 54–55.
- [11] 杨朝崴. 桃过敏原表达鉴定和免疫分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [12] YANG CW. Expression and immunological characterization of peach allergens [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [13] 周湘. 杨梅主要过敏原分离纯化以及免疫活性鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [14] ZHOU X. Isolation, purification and identification of major allergens of Chinese bayberry [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [15] JIN TC, WANG C, ZHANG CY, *et al.* Crystal structure of cocosin, a potential food allergen from coconut (*Cocos nucifera*) [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(34): 7560–7568.
- [16] 黄海燕, 王兴军. 芒果导致全身过敏反应 1 例报道[J]. 中国急救医学, 2012, 32(2): 191–192.
- [17] HUANG HY, WANG XJ. A case report of mango induced systemic allergic reaction [J]. Chin J Crit Care Med, 2012, 32(2): 191–192.
- [18] 文昭明, 叶世泰. 兼具蒿属花粉症和植物类食物过敏患者 50 例临床分析[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(9): 626–629.
- [19] WEN ZM, YE ST. A report of 50 patients with *Artemisia pollenosis* and plant food allergy [J]. Natl Med J China, 2002, 82(9): 626–629.
- [20] GAO ZS, YANG ZW, WU SD, *et al.* Peach allergy in China: Adominant role for mugwort pollen lipid transfer protein as a primary sensitizer [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(1): 224–226.
- [21] 颜秀美, 钱玉菱, 刘晓坤. 158 例芒果皮炎临床分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2002, 8(5): 87–87.
- [22] YAN XM, QIAN YX, LIU XQ. Clinical analysis of 158 cases of mango dermatitis [J]. Strait J Prev Med, 2002, 8(5): 87–87.
- [23] 陈燕, 于春水, 张浩, 等. 芒果皮炎 39 例临床分析[J]. 川北医学院学报, 2011, 26(4): 314–315.
- [24] CHEN Y, YU CS, ZHANG H, *et al.* Clinical analysis of 39 cases of *Mango dermatitis* [J]. J North Sichuan Med Coll, 2011, 26(4): 314–315.
- [25] 徐红波, 郭霞信, 刘瑛. 食荔枝致过敏性紫癜一例[J]. 华北国防医药, 2005, 17(2): 89.
- [26] XU HB, GUO XX, LIU Y. A case of allergic purpura caused by eating Litchi [J]. Med J Nat Defending Forces North China, 2005, (2): 89.
- [27] 王彤, 李明霞. 荔枝过敏 1 例[J]. 临床军医杂志, 2004, 32(3): 89.
- [28] WANG T, LI MX. A case of litchi allergy [J]. Clin J Med Off, 2004, 32(3): 89.
- [29] 田军巧, 姚会武, 蔺玉茹. 进食苹果致过敏反应 1 例[J]. 河北职工医学院学报, 2002, 2: 30.
- [30] TIAN JQ, YAO HW, LIN YR. A case of allergic reaction caused by eating apple [J]. J Hebei Med Coll Continuing Edu, 2002, 2: 30.
- [31] 庞国义, 靳青会, 任彤萍, 等. 食用苹果致过敏性休克 1 例[J]. 临床军医杂志, 2013, 41(10): 995.
- [32] PANG GY, JIN QH, REN TP, *et al.* A case of anaphylactic shock caused by eating apple [J]. Clin J Med Off, 2013, 41(10): 995.
- [33] 彭香. 菠萝致过敏反应 37 例临床分析[J]. 华西医学, 2009, 24(8): 2149.
- [34] PENG X. Clinical analysis of 37 cases of allergic reation caused by

- pineapple [J]. West China Med J, 2009, 24(8): 2149.
- [21] MORALES M, LOPEZ MA, MOYA R, *et al.* Cross-reactivity among non-specific lipid-transfer proteins from food and pollen allergenic sources [J]. Food Chem, 2014, 165(15): 397–402.
- [22] 姜楠楠, 关凯, 向莉. 儿童花粉症并发自报食物过敏的临床特征[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2020, 14(6): 552–559.
- JIANG NN, GUAN K, XIANG L. Clinical characteristics of self-reported food allergy in children with pollenosis [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2020, 14(6): 552–559.
- [23] EGGER M, MUTSCHLECHNER S, WOPFNER N, *et al.* Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: An update from the molecular point of view [J]. Allergy, 2010, 61(4): 461–476.
- [24] 魏继福, 何韶衡. 乳胶过敏原研究进展[J]. 江苏医药, 2008, (1): 81–82.
- WEI JF, HE SH. Research progress of latex allergens [J]. Jiangsu Med J, 2008, (1): 81–82.
- [25] LI DD, HE SH. Plant allergic proteins and their biological functions [J]. Acta Biochimica Et Biophys Sin, 2003, 35(9): 789–792.
- [26] CHAPMAN MD, POMÉS, ANNA, *et al.* Nomenclature and structural biology of allergens [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(2): 414–420.
- [27] KING TP, HOFFMAN D, LOWENSTEIN H, *et al.* Allergen nomenclature [J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96: 5–14.
- [28] MIDOROHORIUTI T, GOLDBLUM RM, KUROSUKY A, *et al.* Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen [J]. J Immunol, 2000, 164(4): 2188.
- [29] 高岭. 中国桃核心种质果实 Pru p 3 过敏原含量比较分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- GAO L. Comparison of the allergen Pru p 3 (lipid transfer protein) in fruits among Chinese peach core accessions [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [30] 殷皓, 俞蕾, 张晓峰, 等. 2329 例儿童过敏性疾病变应原检测结果分析[J]. 医学综述, 2019, (13): 2511–2514.
- YIN H, YU L, ZHANG MF, *et al.* Investigation on allergen in children with allergic disease [J]. Med Recapitulate, 2019, (13): 2511–2514.
- [31] 王灵, 陈实, 廖锋, 等. 海口市儿童哮喘变应原流行病学调查研究[J]. 海南医学, 2016, 27(4): 665–667.
- WANG L, CHEN S, LIAO F, *et al.* Prevalence of common allergens among asthmatic children in Haikou [J]. Hainan Med J, 2016, 27(4): 665–667.
- [32] FUNES E, MILLAN JM, PAGAN A, *et al.* Allergy to anarcadiaceae. identification of allergens [J]. Alergol Immunol Clin, 1999, 14(2): 82–89.
- [33] 张红云, 宋娟娟, 刘志刚, 等. 芒果果实中泛变应原 profilin 的克隆、表达及免疫学活性鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(2): 111–115.
- ZHANG ZY, SONG JJ, LIU ZG, *et al.* Cloning, expression and immunological characterization of pan-allergen profilin in mango fruit (*Mangifera indica* L.) [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2007, 27(2): 111–115.
- [34] 张帅, 刘泽标, 吴宗敏, 等. 芒果过敏原几丁质酶的序列和 B 细胞抗原表位的分析[J]. 贵州师范大学学报, 2018, 36(4): 40–44.
- ZHANG S, LIU ZB, WU ZM, *et al.* The sequence analysis of allergen chitinase and B cell epitope in mango fruit [J]. J Guizhou Norm Univ, 2018, 36(4): 40–44.
- [35] WU HX, JIA HM, MA XW, *et al.* Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits [J]. J Proteomic, 2014, 105: 19–30.
- [36] LI W, ZHU XG, ZHANG QJ, *et al.* SMRT sequencing generates the chromosome-scale reference genome of tropical fruit mango, *Mangifera indica* [J]. BioRxiv, 2020, DOI:10.1101/2020.02.22.960880.
- [37] 高锦团, 王巧玲. 荔枝诱发的过敏性哮喘 23 例分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, (S2): 81–83.
- GAO JT, WANG QL. Analysis of Litchi-introduced allergic asthma among 23 cases [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, (S2): 81–83.
- [38] 王静, 王宗琦. 进食荔枝致过敏性荨麻疹及反复抽搐 1 例[J]. 中国中西医结合儿科学, 2006, (2): 92.
- WANG J, WANG ZQ. A case of allergic urticaria and repeated convulsions caused by eating Litchi [J]. Chin Pediatr Integr Tradit West Med, 2006, (2): 92.
- [39] 张红云, 宋娟娟, 刘志刚, 等. 荔枝果实中泛变应原 profilin 基因的克隆及序列分析[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(6): 620–623.
- ZHANG HY, SONG JJ, LIU ZG, *et al.* Cloning and sequence analysis of panallergen profilin genes in Litchi chinensis sonn [J]. J Trop Med, 2006, 6(6): 620–623.
- [40] 张红云, 宋娟娟, 刘志刚, 等. 荔枝果实中 profilin 的表达纯化及其与桦树花粉 Bet v 2 的交叉反应性研究[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(5): 541–544.
- ZHANG HY, SONG JJ, LIU ZG, *et al.* Expression and purification of profilin from lychee fruit and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v2 [J]. Immunol J, 2007, 23(5): 541–544.
- [41] 罗新萍, 张艳妹, 刘志刚. 菠萝过敏原 profilin 的克隆、表达及免疫学鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, (5): 470–471.
- LUO XP, ZHANG YM, LIU ZG. Cloning, expression and immunological identification of pineapple allergen profilin [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, (5): 470–471.
- [42] 杨朝崑, 陈琳, 乔丽雅, 等. 水果过敏及其过敏原基因组学研究进展[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 281.
- YANG CW, CHEN LIN, QIAO LY, *et al.* Fruit allergy and genomic research on their allergens [J]. J Fruit Sci, 2010, 27(2): 218.
- [43] GAO ZS, WEG W, SCHAART JG, *et al.* Genomic cloning and linkage mapping of Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*) [J]. Theoretical Appl Genetics, 2005, 111(1): 171–183.
- [44] GAO ZS, WEG W, SCHAART JG, *et al.* Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin) [J]. Theoretical Appl Genetics, 2005, 111(6): 1087–1097.
- [45] GAO ZS, WEG W, SCHAART JG, *et al.* Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*) [J]. Theoretical Appl Genetics, 2005, 110(3): 479–491.
- [46] GAO ZS, WEGW, MATOS CI, *et al.* Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity [J]. BMC Plant Biol, 2008, 8(1): 1–12.
- [47] 夏宏林, 何颖, 邹泽红, 等. 苹果过敏原 Mal d4 蛋白抗原表位预测及交叉反应分析[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(1): 57–61.
- XIA HL, HE Y, ZOU ZH, *et al.* Prediction of antigenic epitopes and cross-reactivity of apple allergen Mal d 4 [J]. J Chin Soc Immunol, 2012, 28(1): 57–61.
- [48] HAO GD, ZHENG YW, WANG ZX. High correlation of specific IgE

- sensitization between birch pollen, soy and apple allergens indicates pollen-food allergy syndrome among birch pollen allergic patients in northern China [J]. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)*, 2016, 5(17): 70–75.
- [49] ZUBINI P, ZAMBELLI B, MUSIANI F, *et al.* The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related [J]. *Plant Phys*, 2009, 150(3): 1235–1247.
- [50] 陈琳. 桃过敏原基因定位及其在桃不同组织的表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- CHEN L. Genomic characterization of putative allergen genes in peach and their expression in different tissues [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [51] 邓珊, 尹佳, 王瑞琦. 桃主要致敏蛋白 Pru p 3 T 细胞表位鉴定[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2018, 12(5): 498–503.
- DENG S, YIN J, WANG RQ. Identification of T-cell epitopes of major peach allergen Pru p 3 [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2018, 12(5): 498–503.
- [52] VELICKOVIC TC, GAVROVIC-JANKULOVIC M, JANKOV RM. Overview of the most commonly used methods in allergen characterization [J]. *J Serbian Chem Soc*, 2005, 70(3): 347–360.
- [53] 孙秀兰, 单晓红, 张银志, 等. 过敏原分离纯化技术的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(5): 391–395.
- SUN XL, SAN XH, ZHANG YZ, *et al.* Research progress in allergen purification [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(5): 391–395.
- [54] ST A, PT A, SMA B, *et al.* Recent advances and challenges in food-borne allergen detection [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2020, 132: 116050.
- [55] CROOTE D, QUAKE SR. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology [J]. *Npj Syst Biol Appl*, 2016, 2: 16022.
- [56] VM A, BT B, AGF C, *et al.* Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics [J]. *J Proteomics*, 2020, 215: 103636.

(责任编辑: 王 欣 郑 丽)

作者简介



张培澳, 主要研究方向为食品生物工程。
E-mail: 2018306100617@cau.edu.cn



杨 栋, 博士, 副教授, 主要研究方向
为食品生物化学。
E-mail: dyang@cau.edu.cn