

丛艳君 薛文通 著



主要食物过敏原 致敏机理的研究

Allergenicity of the Major Food
Allergen

主要食物过敏原致敏 机理的研究

丛艳君 薛文通 著

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

主要食物过敏原致敏机理的研究/丛艳君,薛文通著.

—北京:中国轻工业出版社,2015.3

ISBN 978-7-5184-0237-3

I. ①主… II. ①丛… ②薛… III. ①食物过敏-研究 IV. ①R593.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第300980号

主要食物过敏原致敏机理的研究

著 薛文通 丛艳君

责任编辑:李建华 责任终审:张乃东 封面设计:锋尚设计
版式设计:宋振全 责任校对:燕杰 责任监印:张可

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印刷:北京君升印刷有限公司

经销:各地新华书店

版次:2015年3月第1版第1次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:13

字数:297千字

书号:ISBN 978-7-5184-0237-3 定价:40.00元

邮购电话:010-65241695 传真:65128352

发行电话:010-85119835 85119793 传真:85113293

网址:<http://www.chlip.com.cn>

Email:club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

130499K1X101ZBW

前 言

食物过敏是一个世界性公共卫生问题。调查显示,世界上约4%的人口对食物过敏。目前已确定的过敏性食物多达180种以上,联合国粮农组织报告称,90%以上食物过敏原存在于牛乳、鸡蛋、鱼、甲壳类水产品、花生、大豆、坚果类及小麦等8大类食物中。为保护易感者的健康,部分国家和地区对食物过敏原的标签标注进行了严格规定,并列入立法范围。随着全球化进程的推进,食品的生产、流通和消费方式呈现出国际化趋势,食物过敏成为各国共同关注的问题。因此,开展食物过敏原致敏机理及脱敏方法的研究具有重要的意义。食物过敏原的研究在我国尚属于新兴领域,是多学科、多领域不断交叉、融合的产物,涉及食品科学与工程、免疫学、生物学、化学等学科和领域。

本书是我们在参阅、吸收了国内外大量相关领域的最新研究资料和多年科研成果的基础上整理而成的,共分为五章,第一章综述了食物过敏及过敏原的研究进展,主要介绍了食物过敏的定义、作用机理、临床症状,影响食物过敏的因素,食物过敏原的共同特征,抗原决定簇的特征,食物过敏原常用的检测方法及脱敏方法;第二章、第三章分别以花生、大豆为例介绍了植物食物过敏原的致敏机理,以中国过敏患者血清为探针,识别花生、大豆主要过敏原,探究了品种、提取溶液体系差异导致国内外过敏原含量差异的原因,通过固相合成肽技术建立多肽谱图,用酶联免疫法识别抗原决定簇并进行氨基酸序列定位,探索了花生、大豆的脱敏方法;第四章以牛乳为例研究了动物食物过敏原的致敏机理,通过免疫印迹实验识别牛乳及其制品的主要过敏原,通过固相合成肽技术和酶联免疫法鉴别过敏原B细胞作用表位并定位,探索了牛乳替代资源即低过敏乳品资源的低致敏性机理,建立了体外细胞识别牛乳过敏原致敏性的方法;第五章主要以鲈鱼为例介绍水产食物过敏原的致敏机理,通过二维电泳结合免疫印迹抑制实验识别鲈鱼新的过敏原,并对其进行分离纯化鉴定,研究了超高压和糖基化协同作用对加州鲈鱼过敏活性的影响。

别人书稿的前言或后记中常常写道,由于时间有限、编写匆忙,错误难免,这是事实。我认为本书的缺点和欠妥之处不会只是少数的一两处,不妥不是由时间紧迫引起的,因为已潜心研究食物过敏原项目10多年了,所有的错误只能是水平所致,敬请老师、读者及同行批评指正。

写一篇总结论文、著一本学术书籍的夙愿今日终于实现,喜悦之情难以言表,感激之情亦油然而生,诚挚感谢北京工商大学学术出版委员会的大力支持,感谢国家自然科学基金委青年基金、北京市自然科学基金面上项目、北京市科技新星计划项目的支持。同时,衷心感谢给予我们帮助和支持的朋友、老师、同行们。

此外,刘晓毅和刘楚怡两位博士在项目研究过程中做了大量的工作,在此一并致谢。

丛艳君

北京工商大学

2014年12月于北京

目 录

第一章 食物过敏原机理研究概况	1
第一节 食物过敏性概述	1
第二节 食物过敏原概述	3
第三节 抗原决定簇	5
第四节 食物过敏原的检测方法	7
第五节 食品脱敏方法	11
第二章 花生过敏原致敏机理的研究	15
第一节 花生致敏蛋白的识别和鉴定	15
第二节 Ara h1 抗原决定簇的研究	24
第三节 加工方式对花生致敏性的影响	34
第四节 降低烘烤花生致敏性的蛋白酶筛选研究	41
第五节 碱性蛋白酶水解花生蛋白降低致敏性最佳条件的研究	48
第六节 结论与建议	54
第三章 大豆过敏原致敏机理的研究	56
第一节 大豆及其制品中致敏蛋白的识别	58
第二节 处理方式及糖链对大豆致敏蛋白致敏性的影响	68
第三节 大豆蛋白脱敏方法的建立	79
第四节 脱敏大豆蛋白的功能特性研究	92
第五节 结论与建议	101
第四章 牛乳过敏原致敏机理的研究	104
第一节 牛乳过敏原的识别及特性研究	104
第二节 α_{s1} -酪蛋白和 β -乳球蛋白抗原决定簇的研究	113
第三节 牛乳及其替代品体外激发人嗜碱性粒细胞的组胺释放能力的评价	130
第四节 结论与展望	133
第五章 加州鲈鱼致敏机理及其致敏性调控研究	135
第一节 六种淡水鱼致敏蛋白的识别	136
第二节 加州鲈鱼相对分子质量 17000 主要致敏蛋白的一级结构分析	146
第三节 模拟胃肠消化对加州鲈鱼致敏性的影响	156
第四节 酶解技术对加州鲈鱼致敏性的调控	165
第五节 超高压及糖基化技术对加州鲈鱼致敏性的调控	178
第六节 结论与建议	189
参考文献	191

第一章 食物过敏原机理研究概况

第一节 食物过敏性概述

一、食物与超敏反应

免疫学是系统研究机体识别自身和清除异己成分的科学。免疫是机体的一种保护性反应,但在某些情况下,它可能对机体产生有害的结果。当再次接触到相同的抗原时,机体所表现的外在反应与首次不同:或是反应性降低,或是反应性增强,后者称为超敏反应(hypersensitivity)^[1]。

超敏反应是一种特异性的免疫病理反应。这种致病性免疫反应的发病机制与一般保护性免疫反应的机制基本相同,两者的根本区别在于反应给机体带来的后果,而这又取决于不同个体的遗传素质^[2]。引起超敏反应的抗原称为变应原(allergen),又称为过敏原。变应原的种类很多,可以是完全抗原(如花粉、微生物、异种动物血清等),也可以是半抗原(如化学制剂、药物等),或变性的自身抗原等。

1963年,Cell和Coombs根据超敏反应中抗体和细胞是否参与、抗体的类型、抗原与抗体或细胞反应的方式以及有无补体参与而将超敏反应分为四型^[3](表1-1),变态反应(allergy)或过敏反应(anaphylaxis)常指I型速发型超敏反应,不宜与超敏反应一词混用。美国著名的过敏专家大卫·雷尼科斯说:“过敏其实是一种免疫反应过度。过敏体质的免疫系统犹如一队神经过敏的哨兵,在不安静的边境上巡逻,一旦发现‘敌人’,便立即产生过激反应,调派大量免疫球蛋白E抗体来驱赶敌人。”这种抗体黏附在肥大细胞上,促进肥大细胞释放出组胺等多种刺激性化学物质,进而引起典型的过敏反应,导致毛细血管扩张、通透性增加等一系列变化,出现局限性炎症,包括细胞和组织的损伤,甚至出现累及全身的休克状态^[4]。一般而言,过敏体质的人,胃肠道功能比较差,肠壁的通透性比较高,极易将一些异体蛋白质或其他类型可能导致过敏的抗原物质直接吸收进入体内,从而刺激人体的免疫系统产生抗体,这个阶段在医学上称为致敏阶段。当此人再次进食致敏食品时就会发生过敏,即所谓食物超敏反应。

表1-1 超敏反应的分类比较

型别	介导物质	主要相关疾病
I型 (速发型超敏反应)	IgE/肥大细胞和嗜碱性粒细胞介导的血管和平滑肌反应	支气管哮喘、荨麻疹、过敏性鼻炎、过敏性休克等
II型 (细胞毒性)	一是补体介导的细胞毒反应(complement mediated cytotoxicity, CMC),即特异性抗体(IgM或IgG)与靶细胞表面的抗原结合;二是抗体介导的细胞功能异常,由于不结合补体,因而不破坏靶细胞,亦无炎症反应	新生儿溶血症、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜等

续表

型别	介导物质	主要相关疾病
Ⅲ型 (免疫复合物型)	免疫复合物(抗原和抗体结合的产物)/补体介导的组织炎症	血清病、皮肤血管炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等
Ⅳ型 (迟发型)	特异性致敏T细胞所介导的单个核细胞浸润为主的炎症和组织坏死	接触性皮炎、移植排斥反应、结核病等

二、食物过敏的定义

食品过敏又称食物超敏反应、食物变态反应(food allergy),是指食物进入人体后,机体对之产生异常免疫应答,导致机体生理功能的紊乱或组织损伤,进而引发一系列临床症状,如皮炎、哮喘、腹痛和腹泻等多种症状,严重的可导致休克^[5]。90%以上的食物过敏由蛋、鱼、贝类、乳、花生、大豆、坚果和小麦等8类高致敏性食物引起。食物过敏原主要来自食物中的致敏蛋白质、食品添加剂和含有过敏原的转基因食品。

食物不良反应(adverse reaction to food)是指由食物成分或食品添加剂引起的一切不良反应,可涉及免疫反应和非免疫反应机制,前者为食物过敏(food allergy,FA),即食物超敏反应(food hypersensitivity,FH)或食物变态反应;食物不耐受(food intolerance,FI)属于后者,是非免疫机制产生的食物不良反应。

三、食物过敏性反应的分类与机理

食物的过敏性反应通常可以分为对食物的敏感性和对食物的不耐性^[6]。食物的敏感性的产生机理是某些人的免疫系统对某些特殊食物中的特殊成分产生不正常的生理反应。食物的敏感性进一步可以分为:即发型超级敏感性和迟发型超级敏感性。对于即发型超级敏感性,在敏感人群和个体食用了食物后的数分钟到1h以内即能出现异常症状,这种病理症状有时候可能会非常严重。目前已经知道有170多种食物能造成敏感人群出现即发型超级敏感性症状。可以延伸地认为:任何含有蛋白质的食物对于某些敏感性来说都可能是潜在的超级敏感性激发源。对于迟发型超级敏感性来说,在敏感人群和个体食用了食物后,至少1h甚至数天后才能出现异常生理症状,虽然这些症状没有即发型超级敏感性反应那么严重,但是能造成出现迟发型超级敏感性的食物的摄入量要比即发型超级敏感性低得多!对于食物的不耐性,可以认为是指除了由上述免疫系统造成的病理反应外,其他任何由食物敏感性造成的异常病理反应都可以称为食物的不耐性。食物的不耐性造成的反应有三种:食物代谢紊乱、中毒反应和某些特殊反应。与超级敏感性相比,一般来说,食物不耐性造成的症状比较轻微,不那么严重。

诱发即发型超级敏感性反应的物质是人体内的免疫球蛋白IgE抗体。虽然所有人体内都能产生低含量的免疫球蛋白IgE抗体,但是某些人群在摄入食物中某些蛋白质(可以看作是抗原)后,体内的许多组织包括肠胃能产生特殊的免疫球蛋白IgE抗体,这些IgE抗体能结合人体内各种组织和血液中的嗜碱白细胞,进而诱发大量其他诱因物质(例如组胺类化合物)释放出来。这样一来,那些敏感性人群只摄取非常少量的某些食物中蛋白质,就可能激发起敏感性反应^[7]。

四、IgE 介导的常见食物过敏反应临床症状

IgE 介导的变态反应诱发的临床症状轻重不一,可以从轻微的不适到可危及生命的休克。一般根据过敏在临床上表现的器官不同分为消化系统食物过敏反应、非消化系统食物过敏反应及两者混合的过敏反应^[8]。

消化系统食物过敏反应约占全部食物过敏反应的 30%。全消化系统的各个部位均可出现过敏反应,主要表现为,唇及舌部的血管神经性水肿、口腔变态反应综合征;非消化系统食物过敏反应约占全部食物过敏反应的 50%,主要表现在皮肤过敏方面,约占此类过敏反应的 80%,包括荨麻疹、慢性湿疹、瘙痒症、过敏性紫癜、血管神经性水肿等;在神经系统方面主要表现为偏头痛或过敏性全头痛;在呼吸道方面表现为支气管哮喘,有研究指出,食物是诱发过敏性哮喘的重要原因之一。消化系统及非消化系统混合食物过敏反应约占全部食物过敏反应的 20%,较常见的过敏反应有腹型荨麻疹和腹型及关节型过敏性紫癜。

五、影响食物过敏的因素

食物过敏症状表现的严重程度不仅与食物中变应原性的强弱有关,也与宿主的易感性有关,后者更重要。

1. 食物品种

决定食物过敏的首要因素是食物本身。致敏食物是引起食物过敏的直接诱因,或称激发因素,各种食品的致敏性是不相同的。

2. 食物食量

对于某种食物敏感的人,即使进食量很少也可引起发病。而另一方面,食物过敏与进食的量有密切关系,食物抗原只在积累到一定阈值时方引起发病,症状的轻重与食量的多少往往成正比。

3. 遗传因素

遗传因素在过敏性疾病中起主要作用。父母中一方有过敏性疾病,其子女食物过敏患病率为 30%~40%;若父母双方均患有过敏性疾病,其子女患病率则高达 60%~80%^[9]。同一种食物在不同患者间可以出现不同的过敏症状,症状轻重也相差悬殊,最严重的食物过敏甚至可以引起休克以致死亡,而绝大多数食物过敏则症状相对较轻。

4. 患者的个人体质

同一患者对同一食物在不同时间可以表现出不同程度的过敏反应。患者当时的健康水平、精神状态、睡眠情况等均可对过敏反应的轻重和缓急产生一定的影响。食物过敏患者如在怀孕期间摄食含有可致敏食物的膳食,其新生儿发生食物过敏的危险性增加。早产儿、足月小婴儿由于免疫屏障发育不完善,更易发生食物过敏^[10]。

第二节 食物过敏原概述

能够引起食物过敏的物质叫过敏原,食物过敏原有如下几个特点:

- ① 任何食物均可诱发过敏反应,每种食物中仅部分成分具有变应原性。
- ② 食物过敏原性具有可变性。加热可使大多数食物的变应原性降低,但有一些食物烹

调加热后变应原性不变,甚至反而增加。常规巴斯德法消毒不仅不能使一些牛乳蛋白降解,如 β -乳球蛋白等的变应原性还会增加。一般情况下,胃的酸度增加和消化酶的存在,可减少食物的变应原性。有的患者还会对食物的一些中间代谢产物过敏出现症状。

③不同的蛋白质可有共同的抗原决定簇,使食物过敏原间存在交叉反应性。例如,至少有50%牛乳过敏者也对山羊乳过敏,对鸡蛋过敏者可能对其他鸟类的蛋过敏,对大豆过敏者也可能对豆科植物的其他成员如扁豆、花生、苜蓿等过敏。

Baldo等^[11]发现,不同种的谷物之间,例如同属于禾本科(Poaceae)家族的水稻、玉米、小麦、大麦、黑麦草之间,可以有交叉免疫反应,且其程度与它们在分类学上的亲缘关系的远近相一致。目前,治疗小麦或玉米过敏症的重要方法之一,便是用日本小米或意大利小米代替饮食中的小麦、玉米。因此,现在迫切需要我们zhi不同种谷物间的交叉过敏原性及各自的免疫原性的产生机制作深入的了解^[12]。

对人类健康构成威胁的食物过敏原主要有食物中的致敏蛋白质、食物加工贮存中使用的食品添加剂和含有过敏原的转基因食品。目前,我国已要求将这些相关的指标在产品标识中明确化。

一、食物过敏原——蛋白质

食物中90%的过敏原是蛋白质,大多数为水溶性糖蛋白,相对分子质量在10000~80000,具有紧凑的三维结构,配位键、二硫键以及糖基化,这些结构特点决定了这些蛋白质能耐受食品加工、加热和烹调,并能抵抗肠道消化酶,它们能穿过黏膜表面而被吸收^[13]。配位键能减少多肽骨架的移动性,增加热稳定性和抗蛋白水解性;有的蛋白质如Bet v1含有较多的二硫键,链间和链内的二硫键都有助于维持其三维结构折叠,使其在加热或化学变性的情况下结构变化不大,而且即使有所变化也往往是可逆的;N-糖基化对蛋白质结构有重要的稳定作用,典型的例子就是N-糖基化增加了豌豆7S球蛋白的稳定性以及抗化学变性能力^[14]。每种食物蛋白质可能含有几种不同的过敏原。食物中变应原性的强弱,一般来说,与其对某种食物特异IgE结合的能力及其在食物蛋白质中的浓度有关。

1. 植物性食物过敏蛋白

植物性过敏原可被分类为种子贮藏蛋白质、结构蛋白质和防御蛋白质^[15]。在植物性食物过敏案例中,以大豆及核果类食物过敏报道最多,因此,对其食物过敏原研究工作也较深入。1993年,Ogawa等^[16]分离出大米中的主要过敏蛋白质Glym BOOK,随后还对该过敏原一级氨基酸序列抗体结合部位进行鉴定,此前他们已研究发现大豆中三种主要过敏蛋白质为Glym Bd30K、Glym Bd28K和p-7S伴大豆球蛋白。特别是那些人类以主食消费的谷物食物如水稻、小麦、玉米等,在人群中发现也具有过敏现象,因而引起科学界的关注。1978年Shibasaki等报道了水稻蛋白质具有过敏作用,1987年Matsuda等运用HL PC、E LISA、SDS-PAGE及亲和层析法分离纯化出一种存在于水稻种子胚乳中的过敏原,进一步研究发现该过敏原分子中Pro和Cys含量比谷蛋白和球蛋白要高,且这种过敏蛋白质在100℃持续60min后仍然可保持60%过敏反应活性^[17]。通过进一步分离得到六种过敏蛋白质,相对分子质量分别为14000、15500、16000、26000、33000和56000,并且发现相对分子质量为14000~16000的过敏蛋白质具有二淀粉酶抑制活性,相对分子质量为33000的过敏原蛋白质

具有葡萄糖氧化酶的活性^[18]。

2. 动物性食物过敏蛋白

牛乳过敏是小儿最常见食物过敏之一,牛乳中的主要致敏成分是酪蛋白、 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β LG)、 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α LA)等;鸡蛋蛋清中的主要致敏成分为卵清蛋白和卵类黏蛋白等。一般来说,食物中变应原性的强弱与其对某种食物特异IgE结合的能力及其在食物蛋白质中的浓度有关。引起过敏的海产种类主要是虾、贝类和一些鱼类,Masaru等^[19]研究得知,被日本及欧美国家食用的主要牡蛎品种(*Crassostrea gigas*)过敏原为一种富含Cly、Ala、Leu而缺少Pro、Try的原肌球蛋白,其相对分子质量为86000。

二、食品添加剂

抗氧化剂、增稠剂、防腐剂、着色剂、香料、乳化剂、稳定剂和保湿剂等食品添加剂被广泛用于各类食品中,一小部分人大量食用含有这些添加剂的食物时会发生过敏反应或其他不良反应,如慢性荨麻疹和血管性水肿、支气管哮喘和严重过敏反应等^[20]。

三、转基因食品

转基因生物中有些含有来自过敏性物种和人类不曾食用过的生物物种基因,由于基因重组能够使宿主植物产生新的蛋白质,这些新蛋白质有可能对人体产生包括过敏性在内的毒性效应。Nordlee等^[21]就曾发现,一种转基因大豆由于转入了一种巴西坚果的基因可以使人产生过敏反应,该品种大豆在被释放到大田种植之前已被禁止,防止其对公众健康造成威胁。另据报道,转基因Bt玉米是利用遗传工程技术在玉米基因中插入Bt蛋白(一种苏云金杆菌杀虫毒素)基因,Bt蛋白一般对人体无毒,但对害虫有毒,由于有些Bt蛋白耐热和不能消化,有可能成为食物过敏原^[22]。

因此,任何新的转基因食品商业化之前,都需要对其进行包括过敏性在内的安全性评估。其中,过敏原筛选的验收项目包括生化检验、比较转基因食品中所含有被转移基因及其蛋白质序列与已知的多种过敏原是否相似、体外该蛋白质的稳定性、蛋白质水平评估和临床试验。这些检验可以使研究人员对转基因食品中所含转基因成分的过敏性作出准确评价。如果发现了过敏原或者和过敏原相似的物质,那么编码该物质的基因通常会被去除或者接受进一步的严格试验,以证明其安全性。现代生物技术提供了识别和选择可编码特殊蛋白质基因的技术,这种技术已被用于减少稻谷中的过敏原。如日本采用基因重组技术培育成“低过敏水稻”。从2000年起,我国已开展转基因食品潜在致敏性评估的研究,并着手建立相应的评估方法、评估程序和管理法规。

第三节 抗原决定簇

过敏原分子与免疫系统的免疫细胞或抗体相互作用的那部分被称为抗原决定簇(Antigen Determinant, AD)。一个抗原分子具有一种或多种不同的抗原决定簇,每种决定簇只有一种抗原特异性,只被一种淋巴细胞及其克隆所识别,从而启动免疫应答,这种决定簇称为功能性决定簇。存在于抗原分子内部的决定簇,称为隐蔽决定簇,它无触发免疫应答的功

能,但如果通过理化因素处理使之暴露,即可成为新的有功能性的抗原决定簇(图 1-1)。

过敏原含有两类抗原决定簇,即 T 细胞抗原决定簇和 B 细胞抗原决定簇^[23,24],如图 1-2 所示。能与 T 细胞反应的称为 T 细胞抗原决定簇,而与抗体或产生抗体的 B 细胞发生反应的称为 B 细胞抗原决定簇。抗原决定簇既可能有一定的空间构象,也可能是线性的。构象决定簇依赖于蛋白质的高级结构,可能由蛋白质表面的几个相邻的氨基酸序列所组成,而线性决定簇仅仅是个别氨基酸序列所组成。一般认为 T 细胞抗原决定簇是线性决定簇,而 B 细胞抗原决定簇是构象决定簇,但是也有例外。一个抗原决定簇如果是由一系列共价相连的氨基酸序列组成时,称为连续抗原决定簇,如果是由两个邻近的不连续的氨基酸序列组成的,称为不连续抗原决定簇。连续抗原决定簇最少的氨基酸残基数为 6,不连续抗原决定簇最少的氨基酸残基数为 16。T 细胞抗原决定簇一般为小肽段(12~18 个氨基酸),在过敏原蛋白质上以线性序列存在。

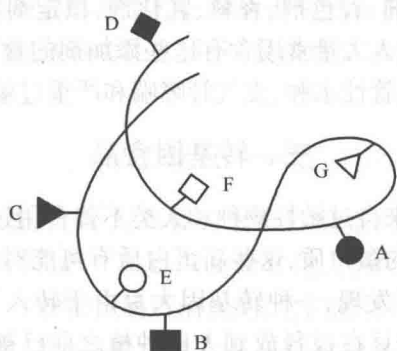


图 1-1 过敏原功能性决定簇(A、B、C、D)和隐蔽性决定簇(E、F、G)

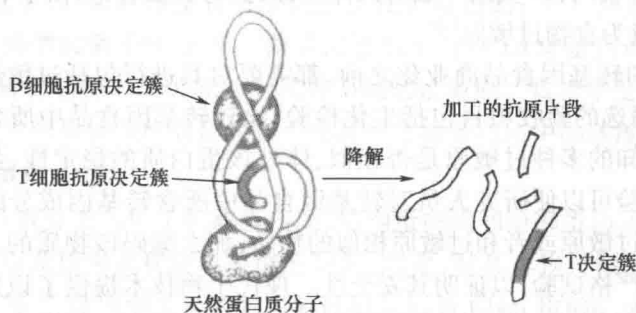


图1-2 抗原分子的 T 细胞抗原决定簇与 B 细胞抗原决定簇

一个抗原决定簇的特异性由组成它的所有残基共同决定,但其中有些残基在与抗体结合时比其他残基起更大作用,这些残基被称为免疫显性基团(immunodominant group)。抗原的功能价(结合价,antigenic valence)是指能与抗体结合的决定簇的总数。有些决定簇只能和抗体分子中一个结合点结合,是单价抗原。大多数天然抗原带有多个决定簇,是多价抗原。例如,牛血清清蛋白有 18 个决定簇,卵白蛋白分子表面有 10 个抗原决定簇。

第四节 食物过敏原的检测方法

判断一种食品中的蛋白质是不是过敏原有许多种方法。按体内外来分,体内实验包括皮肤实验(skin prick test, SPT)和双盲对照食物激发实验体系(double-blinded, placebo-controlled food challenges, DBPCFC);体外实验包括组胺释放实验(histamine releasing test, HRT)和常用的IgE检测。

一、体内实验

1. 皮肤实验

I型变态反应的皮肤实验(SPT)是使微量无害的可疑变应原(过敏原)进入皮肤,如皮下肥大细胞表面结合有相应的IgE抗体,该变应原则与之结合,经过一系列的变化使肥大细胞脱颗粒,释放组胺等化学介质,从而使局部血管扩张、通透性增加,出现风团和红晕反应。临床根据该反应的出现,确定特异IgE抗体的存在,进而确定过敏原。SPT合理性在于小量过敏原经皮诱导产生典型的皮肤反应如水疱和红斑,在一定浓度范围内,测量红斑或水疱面积来定量过敏原生物学活性^[25],结果可用终点滴度(即产生阴性反应的最大浓度)或标准组胺相当活性(10mg/mL histamine equivalent prick, 10HEP)表示。

SPT虽然简便易行,但往往需要多达数十点针刺,对实验者造成创伤和极大痛苦,此外,患者必须符合并在严格控制条件下进行实验,如:皮肤完整、未使用对皮肤反应有极大影响的药物,实验物质必须保证除了过敏原特性外而不具传染性及毒性。皮试结果有时与病史并不完全一致,皮试阳性可能不出现症状,相反,一些阴性结果却出现过敏症状,因此SPT要与血清学实验结合分析,以免不必要的食物限制^[26]。

2. 食物激发试验

可采用开放式(Open food challenge, OFC)、单盲(Single-blind placebo-controlled food challenge, SBPCFC)或双盲(DBPCFC)实验法进行。1976年,May率先采用双盲实验法用于诊断食物过敏反应,发现双盲实验法阳性儿童的皮肤实验阳性只有29%。Bock等^[27]对500例儿科病例进行双盲实验法实验认为本实验高度安全。欧洲变态反应和临床免疫学会评定双盲实验法为唯一的判断食物过敏原的结论性实验,并被认为是食物过敏反应诊断的标准方法^[28]。

双盲食物激发实验应在排除性饮食后7~14d,且禁食1夜后进行。食物抗原一般从10mg开始给予,如未出现有关症状,则每隔15~60min将剂量加倍,直到增至8~10g。若仍无症状出现,则可排除该食物过敏。

二、体外实验

利用体外实验检测和评价食品过敏原生物活性,比体内实验更安全和符合伦理。目前,研究和实践中主要应用组胺释放实验和IgE测定两类方法。

1. 组胺释放实验^[29,30]

组胺释放实验(HRT)过敏原激发致敏的靶细胞,引起细胞释放组胺,组胺含量可应用荧光测定法、放射免疫法等方法测定,与适宜参照进行比较,确定组胺释放率阳性标准,从

而进行过敏原活性测定及鉴定的一类方法。通常用抗 IgE 抗体作阳性参照,以样品介质(如 BBS)为阴性参照,以排除实验过程中组胺的非特异性释放。此外,某些待测过敏原或提取物本身含有组胺,并且待检过敏原或其共存物可能具有靶细胞毒性,引起组胺非特异释放,因此,必须设样品对照及非致敏靶细胞对照。

2. IgE 检测

过敏原与 IgE 结合是过敏原发挥生物活性的中心环节,因此测定过敏原特异性 IgE 在过敏症诊断及过敏原评价中具有重要地位^[31]。

(1) RAST 抑制实验和 EAST 抑制实验 自从 IgE 成功纯化及抗 IgE 抗体的制备后,放射过敏原吸附实验(radio allergeo sorbent test, RAST) 得以设计应用^[32]。之后改进的酶标记过敏原吸附抑制实验技术(enzyme linked allergosorbent assays, EAST) 及荧光和化学发光标记的检测技术也均已建立^[33]。这些方法均是检测特异性 IgE 与过敏原相互作用的免疫分析方法。特异性 IgE 抗体与食品过敏原的结合在固相载体表面进行并被检测,是体外食品过敏诊断的一种已标准化的方法,得到广泛使用。这些方法是目前国际上变态反应临床及科研人员使用最广泛、最灵敏的方法,也是评价过敏原总致敏活性的关键技术^[34]。RAST 和 EAST 抑制实验的一个主要不足是对人血清的依赖性,血清是很难保证一致的,因此这两种方法也难以标准化。尽管它们可以很好地检测食品过敏原,但是人 IgE 抗体特异性的不确定性大大限制了这些方法在更宽领域的应用。

(2) IEF-PAGE 和 SDS-PAGE 免疫印迹实验 通过等电聚焦电泳(IEF-PAGE) 和 SDS-PAGE 电泳(双向电泳也包括在内) 结合免疫印迹分析可以进行单个食品过敏原的分离鉴定。SDS-PAGE 免疫印迹目前可以用于几乎所有的食品过敏原的分析。双向电泳常用于检测相对分子质量相近但等电点、氨基酸序列不同的同源性蛋白分子。与 RAST 和 EAST 类似,免疫印迹方法同样可以通过 IgE 抑制实验来消除不同来源的不同食品过敏原之间的交叉反应。

免疫印迹法(Immunoblotting test, IBT) 也称酶联免疫电转移印斑法(enzyme linked immunoelectrotransfer blot, EITB), 因与 Southern 早先建立的检测核酸的印迹方法 Southern blot 相类似, 也被称为 Western blot。免疫印迹法分三个阶段进行, 见图 1-3。第一阶段为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 抗原等蛋白样品经 SDS 处理后带阴电荷, 在聚丙烯酰胺凝胶中从阴极向阳极泳动, 蛋白质相对分子质量越小, 泳动速度就越快。此阶段分离效果肉眼不可见(只有在染色后才显出电泳区带)。第二阶段为电转移: 将在凝胶中已经分离的蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜上, 选用低电压(100V) 和大电流(1~2A), 通电 45min 转移即可完成。此阶段分离的蛋白质条带肉眼仍不可见。第三阶段为酶免疫定位: 将印有蛋白质条带的硝酸纤维素膜(相当于包被了抗原的固相载体) 依次与特异性抗体和酶标第二抗体作用后, 加入能形成不溶性显色物的酶反应底物, 使区带染色。常用的 HRP 底物为 3,3'-二氨基联苯胺(呈棕色) 和 4-氯-1-萘酚(呈蓝紫色)。阳性反应的条带清晰可辨, 并可据 SDS-PAGE 时加入的相对分子质量标准, 确定各组分的相对分子质量。本法综合了 SDS-PAGE 的高分辨力与酶联免疫吸附实验法(ELISA) 的高特异性和敏感性, 是一个有效的分析手段, 不仅广泛应用于分析抗原组分及其免疫活性, 并可用于疾病的诊断。在艾滋病病毒感染中此法作为确诊试验。抗原经电泳转移在硝酸纤维素膜上后, 将膜切成小条, 配合酶标抗体及显色底物制成的试剂盒, 可方便地在实验室中供检测用。根据出现

显色线条的位置可判断有无针对病毒的特异性抗体。

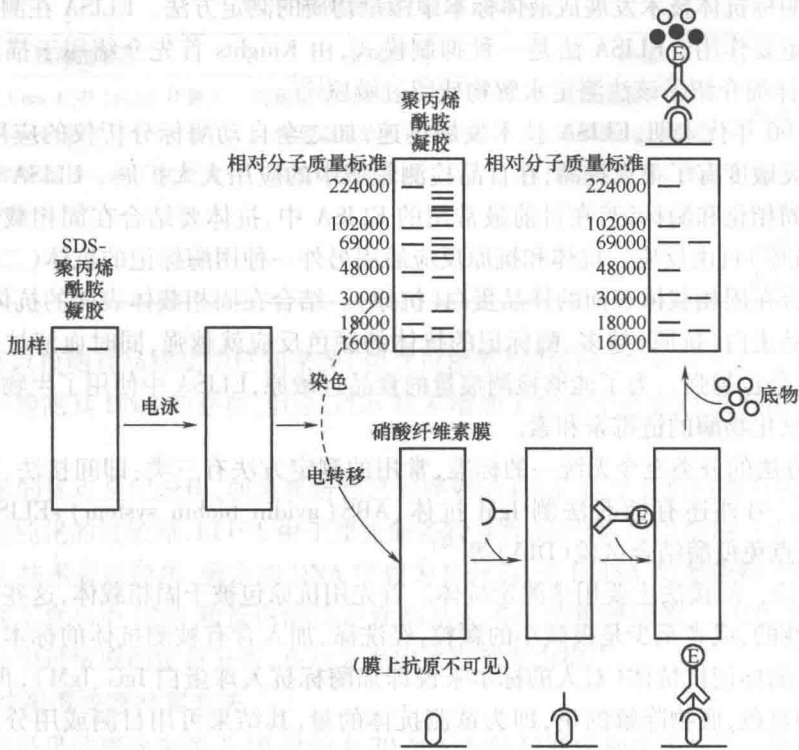


图 1-3 免疫印迹法原理示意图

(3) 双免疫扩散实验(Ouchterlony) 这是一种比较两种或两种以上食品过敏原的定性检测分析方法。将抗体和各种不同的样品蛋白同时放进孔中,令其相互向对方自由扩散,在达到平衡时会形成一条沉淀线。双免疫扩散实验可以区分一致的、不一致的和部分一致的蛋白样品。Malmheden 等^[35]利用双免疫扩散实验检测分析了意大利面食和荞麦食品中的麦麸蛋白。该方法的不足是不能进行定量分析,灵敏度较低,而且比较费时(24~48h)。

(4) 点免疫印迹实验 最近报道了点免疫印迹实验在各种食品中检测花生过敏原中的应用^[36]。将样品滴在预先用花生蛋白抗体包埋的一张聚酯底物上,再用酶标记的抗体 e(二抗)进行免疫检测,即可检测到已经结合的花生蛋白。这种方法灵敏度很高而且使用成本较低。

(5) 火箭免疫电泳实验 该分析方法是通过含有抗体的凝胶进行检测分析的。样品中的蛋白根据各自的电泳移动速率进行移动,直到按照抗体/抗原的比例常数在凝胶上形成“火箭”状的沉淀。火箭状沉淀区的颜色的深浅与样品中蛋白的丰度直接相关。所形成的沉淀既可以用考马斯亮蓝染色也可以用免疫染色(后者的灵敏度更高)。RIE 应用于食品过敏原检测的报道较为少见。Malmheden 等^[35]用 RIE 检测了各种食品中鸡蛋、牛乳、榛实和花生蛋白的存在,但是没有指出数据的回收率和重现性。RIE 的不足就是实际操作过程中制胶和染色的操作复杂。

(6) 酶联免疫吸附实验 1971 年,Engvall 和 Perlmann 发表了酶联免疫吸附剂实验

(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA) 用于 IgG 定量测定的文章,使得 1966 年开始用于抗原定位的酶标抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法。ELISA 在测定残存抗原量方面具有重要作用。ELISA 法是一种抑制模式,由 Knights 首先介绍用于描述水解物特性, Sampson 详细介绍了该法测定水解物残留过敏原^[37]。

20 世纪 90 年代末期,ELISA 技术发展迅速,加之全自动酶标分析仪的应用,使 ELISA 的特异性和灵敏度有了很大提高,在食品检测领域中的应用大大扩展。ELISA 的特点是抗原或抗体的固相化和酶标记,在目前最常用的 ELISA 中,抗体要结合在固相载体的表面与样品蛋白(抗原)自由反应。抗体和抗原反应后用另外一种用酶标记的抗体(二抗)来检测已经反应结合在固相载体表面的样品蛋白(抗原)。结合在固相载体表面的抗体一定时,与之结合的样品蛋白(抗原)越多,酶标记的抗体的颜色反应就越强,同时血清抗体的浓度越高,ELISA 显色也越强。为了能够检测痕量的食品过敏原,ELISA 中使用了生物素标记的二抗和含有过氧化物酶的链霉亲和素。

ELISA 方法的分类至今无统一的标准,常用的测定方法有三类:即间接法、双抗体夹心法和竞争法。另外还有捕获法测 IgM 抗体、ABS(avidin biotin system)-ELISA 法、PCR-ELISA 法、斑点免疫酶结合试验(DIA)等^[38]。

① 间接法:间接法主要用来测定抗体。首先用抗原包被于固相载体,这些包被的抗原必须是可溶性的,或者至少是极微小的颗粒,经洗涤,加入含有被测抗体的标本,再经孵育、洗涤后,加入酶标记抗抗体(对人的标本来说即加酶标抗人球蛋白 IgG、IgM),再经孵育、洗涤后,加底物显色,底物降解的量,即为欲测抗体的量,其结果可用目测或用分光光度计定量测定。

② 双抗体夹心法:本法首先也是用特异性抗体包被于固相载体,经洗涤后加入含有抗原的待测样品,如待检样品中有相应抗原存在,即可与包被于固相载体上的特异性抗体结合,经保温孵育、洗涤后,即可加入酶标记特异性抗体,再经孵育、洗涤后,加底物显色进行测定,底物降解的量即为欲测抗原的量。这种方法欲测的抗原必须有两个可以与抗体结合的部位,因为其一端要包被于固相载体上的抗体作用,而另一端则要与酶标记特异性抗体作用。因此,不能用于相对分子质量小于 5000 的半抗原之类的抗原测定。

③ 竞争法:本法首先将特异性抗体吸附于固相载体表面,经洗涤后分成两组:一组加酶标记抗原和被测抗原的混合液,而另一组只加酶标记抗原,再经孵育、洗涤后加底物显色。这两组底物降解量之差,即为我们所要测定的未知抗原的量。

在食品安全方面 ELISA 技术已广泛应用于兽药残留、农药残留、疫情、有害微生物、动植物毒素等的快速检测分析,并取得了较好的效果。随着人们对食品过敏认识的深入和重视程度的加强,现在发展了很多种 ELISA 方法用于食品过敏原总蛋白提取物和特殊食品过敏原的检测和定量分析^[39]。ELISA 已经成为一种系列化、微量化、商品化的食品安全快速检测方法,是目前应用最广泛的生物检测技术之一。

3. PCR 法

PCR 分析技术一般用来对各种食品中经基因修饰的成分(如转基因大豆和转基因玉米)的检测和定量分析。而直到现在,只有两种 PCR 方法是专门针对食品过敏原(榛实和小麦)的检测(表 1-2)。两种方法均具有很高的灵敏度,都可以达

到 0.001%。

表 1-2

PCR 检测食品过敏原 cDNA

方法	检测过敏原	交叉反应	样品	检测限度
PCR 扩增	榛实 (Cora 1 中 182bp 片断) (Holzhauser, 2000)	与所研究的 30 种水果、坚果、 豆和其他成分无交叉反应	巧克力块、牛乳什 锦早餐、花生糊等	榛实 0.001g/100g
PCR 扩增	小麦醇溶蛋白 (ω -麦胶蛋 白) (Esther, 1998)	与燕麦无交叉反应	燕麦, 稻谷, 燕麦 产品等	小麦面粉: 0.001 ~ 0.01g/100g 麦胶蛋白: 0.04 ~ 4mg/100g

ELISA 可以检测食品样品中已知来源(包含过敏原)的蛋白,而 PCR 可以在相关蛋白不存在的情况下检测其 DNA 的存在,但是,PCR 技术增加了食品中存在过敏原假阳性测定结果的几率。

PCR 技术的优点是比较快,如果要研究已知序列的 DNA,这个分析过程只需要 7~10d。对于一个已经纯化的过敏原,ELISA 由于要先制备特异性的抗体,所以要用一个月甚至更长的时间。PCR 技术是以简单、确定的 DNA 序列为基础的,而 ELISA 却要依赖于质量稳定的动物抗体。加工食品中 DNA 和蛋白的稳定性都是要考虑的重要因素。总之,PCR 技术适合于复杂食品中过敏原的定量分析,在这方面应该得到大力推广。

4. 过敏原指纹图谱快速检测方法

指纹图谱最早的概念来源于 19 世纪末 20 世纪初的犯罪学和法医学^[40],是最新科技成果与最古老的医学科学传统相结合的结果。鉴于指纹图谱的实用性和科学性,食品与中药诸多方面的相似性,吴海强等^[41]首次提出将指纹图谱的原理和技术应用到食品安全相关的研究中去,特别是应用到食品过敏原的快速检测、分析。以常见过敏食品为研究对象,提取其过敏原总蛋白,初步研究了食品过敏原总蛋白 2-DE 指纹图谱在食品过敏原快速检测中应用的可行性,肯定了该方法在不同检测仪器和试验耗材之间良好的重现性和稳定性,并在此基础上进一步研究了以 2-DE 指纹图谱为基础进行特异性过敏原蛋白点 MALDI-TOFMS 指纹图谱研究的可行性,显示了较好的分析结果,为指纹图谱技术在食品过敏原快速检测、分析中的应用提供了坚实的理论基础和实验基础。

第五节 食品脱敏方法

根据去除食物过敏原原理的不同,食品脱敏技术可大致分为物理法、化学法、生物学法、酶法等四类,其中最常用的是物理化学法和酶法。

一、物理法

1. 超滤

Brenna 等研究表明,桃子果肉中的过敏原可以通过超滤完全去除,而存在于桃子表皮中的主要过敏原 Pru p3 (prunus persica 3) 由于先前经过化学脱皮而去除,因此最后经过超滤可以制得一种低致敏性的桃子汁^[42],但感官特性有关的分子由于超滤而除去,今后需要

解决制品中由于糖类等的存在而形成的混浊度和口感等问题^[43]。

2. 热处理

对于过敏原为蛋白质的食品,高温处理会破坏蛋白质空间构象,进而会一定程度地降低食品的致敏性。由于过敏反应中 B 细胞的抗原决定部位取决于其构象和抗原的三级结构,而 T 细胞的抗原决定部位则是线性的,因此热变性主要改变 B 细胞的过敏反应模式。Svenning 报道,对牛乳进行热处理,可使牛乳中过敏原 α -LA 和 β -LG 的免疫原性分别降低到生乳的 12.72% 和 18.74%^[44]。

3. 辐照处理

辐照对过敏原免疫原性的影响有以下几种:

① 破坏 B 细胞抗原表位的一级结构。

② 破坏 T 细胞抗原表位的一级结构。

③ 与免疫反应相关的蛋白质一级结构或空间构象虽未发生明显改变,但由于交联等作用使其抗原表位被掩盖。

当出现上述任何一种情况时,过敏原抗原决定簇遭到“破坏”,免疫原性丧失^[45],过敏原丧失致敏性。此外,辐照使蛋白质本身分子结构或构象发生畸变,孤立子波所传输能量和信息减少或中断,使机体接收的生物信息不足以激发自身的免疫应答,致敏性丧失,但这仅是一种猜测,还有待于进一步研究。

二、化学法

糖基化作用就是将糖类以共价键与蛋白质分子上的 α -氨基或 ϵ -氨基相连接而形成糖基化蛋白的化学反应。这种方法也被广泛用来降低乳蛋白的抗原性,提高乳蛋白质的功能特性。据罗永康报道^[46],在温和的条件下,聚乙烯乙二醇及其衍生物易与蛋白质分子产生胶联并发生糖基化反应,导致过敏原失去过敏原性。

由于过敏蛋白大多为盐溶蛋白,也可利用它和非过敏蛋白的溶解性差异达到把过敏蛋白去除的目的。例如,用盐溶液萃取经酸浸泡的大米,大部分过敏蛋白会溶解于盐溶液中^[47]。此外,Ryo Nakamura 利用超声波处理浸泡过的大米,结果显示去除了 90% 的过敏蛋白,而其他蛋白没有明显损失^[48]。

三、生物学方法

1. 发酵法

用嗜温、嗜热的乳酸菌对消毒的牛乳进行发酵,ELISA 实验检测发现: α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白致敏性降低 99%,但是在皮肤实验中,其致敏性则不太受影响^[49]。Jedrychowski 等研究表明,牛乳经乳酸菌发酵后乳清蛋白的过敏性比原来降低了 99%,但 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的过敏性并没有消除,只是减弱了。

2. 育种法

美国科学家应用生物技术培育出低致敏性的大豆品种,该新型大豆在发芽率、生长性、结果率、蛋白含量率、含油率等方面与普通大豆相同^[50]。日本京都大学也采用自然杂交法和伽马射线照射法,通过诱发植株突变和优选的方法培育出低变应原大豆^[51]。