



黄花蒿和大籽蒿花粉提取物中过敏原组分定量标准化初步研究

马婷婷^{1†}, 赵岚^{2,3†*}, 高毕远⁴, 杨美荣⁵, 郭逸蓉², 高中山^{2,3}, 王学艳^{1*}

1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038

2. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058

3. 浙江大学医学院免疫研究所, 杭州 310058

4. 杭州艾乐吉生物科技有限公司, 杭州 310050

5. 鄂尔多斯市第二医院, 鄂尔多斯 017010

† 同等贡献

* 联系人, zhaolan663@zju.edu.cn; wangxueyan2018@163.com

2025-02-08 收稿, 2025-05-21 修回, 2025-07-08 接受, 2025-07-08 网络版发表

首都医科大学附属北京世纪坛医院“十四五”期间人才培养项目(领军人才)(2023LJRCWXY)、浙江“尖兵领雁+X”研发攻关计划(2024C03054)、中国国家铁路集团有限公司科技研究开发计划(N2022Z015)、鄂尔多斯市科技计划“揭榜挂帅”项目(JBGS-2021-006)和杭州艾乐吉生物科技有限公司(2022-R1)资助

摘要 蒿属花粉是我国秋季最重要的致敏源之一, 引起多种呼吸系统、皮肤和眼部过敏性疾病。目前我国临床使用的诊断和免疫治疗制剂来源于黄花蒿(*Artemisia annua*)和大籽蒿(*A. sieversiana*)的花粉蛋白粗提取物, 成分复杂, 特别是重要过敏原组分含量不确定, 且由于花粉种类, 提取方法, 保存条件等不同而有较大差异, 尚未制定蒿花粉提取物中主要过敏原的定量标准。本研究采集来源于不同地区和同一地区不同年份的黄花蒿花粉, 采用不同方法获得粗提取物, 并收集不同厂家提供的试验研制产品。制备高纯度的过敏原标准品, 利用特异性抗体建立蒿属花粉中3种重要过敏原组分(第一、三、四组分)的双夹心酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量方法。结果表明, 来源于我国北方不同地区的黄花蒿花粉用同样的方法提取后, 总蛋白及过敏原组分含量无显著差异, 但明显不同于源自哈萨克斯坦的黄花蒿花粉。脱脂处理对于蒿花粉中3种过敏原组分含量无显著影响。但不同种类的蒿花粉或者来源于不同厂家的同一种类花粉提取物制剂(主要来源于黄花蒿和大籽蒿)中有效过敏原含量差异较大, 第一组分在不同制剂中的含量相差4倍(2.9%~12.2%), 第三组分最大相差18倍(0.6%~11.4%), 大籽蒿花粉中第三组分含量(0.6%~1.3%)显著低于其他蒿花粉, 而第四组分过敏原仅能在三种制剂中检出, 含量较低(0.01%~0.42%)。通过检测主要过敏原含量可以达到蒿属花粉过敏原提取物标准化目的, 为诊断和免疫制剂提供定量标准。

关键词 蒿属花粉提取物, 过敏原定量, 标准化

蒿属植物(*Artemisia* spp.)是广泛分布于北半球的一种杂草, 其花粉中的某些蛋白质即过敏原能够引起多种呼吸系统、皮肤和眼部过敏性疾病^[1~4], 也能引发与水果等食物交叉过敏^[5,6], 在我国北方地区尤为严重。在10种已鉴定的蒿属植物花粉过敏原中, 第一组分类

防御蛋白, 第三组分非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid transfer protein, nsLTP), 第七组分半乳糖氧化酶是最主要的过敏原^[7~9]。近20年来, 我国蒿属花粉过敏人数不断增加, 在过敏性疾病患者中的阳性率超过26.7%^[10], 北方地区阳性率超过50%^[11], 病程发展速度

引用格式: 马婷婷, 赵岚, 高毕远, 等. 黄花蒿和大籽蒿花粉提取物中过敏原组分定量标准化初步研究. 科学通报

Ma T, Zhao L, Gao B, et al. Preliminary study on the quantitative standardization of allergen components in *Artemisia annua* and *Artemisia sieversiana* pollen extracts (in Chinese). Chin Sci Bull, doi: 10.1360/TB-2025-0143

也在加快,表现出了低龄化趋势^[7],严重影响了患者的生活质量。

目前临床上对于蒿属花粉过敏的诊断主要依赖于花粉粗提取物,通过精准量化提取物中的重要过敏原组分,可以显著提升临床制剂的一致性和可控性。课题组前期已经建立了蒿属花粉中第一、二、三组分的双夹心酶联免疫吸附定量方法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[3],对不同蒿属花粉中的过敏原进行了精准定量,结合血清免疫学实验结果提出黄花蒿(*A. annua*)最适宜应用于我国患者的临床诊疗^[3]。目前临床上可用于诊断的蒿属花粉提取物制剂逐渐增多,但并没有标准化规范流程。

本研究旨在通过比较不同来源、不同提取及处理方法下的蒿属花粉提取物,分析其总蛋白及重要过敏原组分的含量差异,建立起蒿属花粉过敏原提取物的标准化中最为关键的过敏原组分标准品制备以及定量方法,从而提高其在临床中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 花粉提取物和检测试剂

在花粉季(8月下旬~9月上旬)收集我国山西太原(111°E, 37°N),朔州(113°E, 40°N),陕西丹凤(110°E, 33°N)的黄花蒿花粉,用200目的筛子过滤后于-80°C保存。采取两种方法提取花粉总蛋白,直接提取:称取2 g花粉,加入35 mL PBS缓冲液在4°C过夜提取,10000 r/min离心15 min后收集上清液,用0.22 μm滤膜过滤,得到的蛋白提取物存于-40°C待用;脱脂提取:称取2 g花粉加入10 mL预冷的丙酮,4°C震荡提取1 h后离心去上清,再加入10 mL丙酮,重复3次后加入35 mL PBS缓冲液在4°C过夜提取,离心收集上清并过滤膜。收集不同厂商生产的蒿花粉过敏原提取物制剂,采取BCA法测定花粉提取物及检测制剂中总蛋白含量,并用12%的SDS-PAGE电泳检测。

1.2 过敏原组分标准品制备

利用课题组前期已经生产的特异性单克隆抗体^[12],以免疫亲和层析法从黄花蒿和大籽蒿(*A. sieversiana*)花粉提取物中纯化第一和第三过敏原组分。其中第一组分用A7-G4-E6抗体,第三组分用A2-B8抗体,具体纯化方法参考已发表论文^[3]。为了提高过敏原组分标准品的纯度,使用分子筛Superdex 75 HiLoad 16/

600层析柱(Cytiva, 美国)进一步纯化免疫亲和层析产物,收集洗脱液,冷冻干燥后检测。

黄花蒿第四组分过敏原Art an 4采用原核表达法生产纯化,以pET28a为载体, Rosetta DE3为表达菌株,镍柱亲和纯化,具体方法参考文献^[13]。所有过敏原组分都经过SDS-PAGE电泳检测和LC-MS/MS质谱验证。

1.3 蒿花粉第四组分过敏原特异性抗体制备

蒿属花粉第四组分的特异性单抗和多抗均由杭州华安生物制备,用重组Art an 4免疫Balb/c小鼠,每只小鼠注射0.1 mg抗原,首免后21天进行二免,抗原浓度降为0.05 mg,其后每14天加免一次,共免疫4次,取效价合格的小鼠脾细胞与SP2/0细胞融合,挑取阳性克隆,用黄花蒿花粉提取物及rArt an 4共同筛选特异性单克隆细胞株,制备腹水,检测后用ProteinG纯化得到单抗。取0.5 mg rArt an 4免疫新西兰白兔,首免后第14天进行二免,二~四免间隔时间为7天,抗原注射量减半,用蒿花粉提取物及rArt an 4检测筛选多抗。

将黄花蒿花粉提取物稀释至50 μg/mL,来自黄花蒿花粉的过敏原组分nArt an 1、nArt an 3、rArt an 4稀释至5 μg/mL,取100 μL包被于酶标板上,4°C过夜,加入100 μL脱脂奶粉,在37°C封闭1 h,接着加入0.5 μg抗体于37°C孵育1 h后,加入相应地羊抗鼠或羊抗兔二抗,37°C孵育1 h后,取100 μL TMB显色液避光显色15 min,加入2 mol/L HCl终止反应,检测样品在450和620 nm处的吸光值,记录数据。同时用Western-blot验证抗体与Art an 4的结合:蒿花粉提取物以及rArt an 4经12%的SDS-PAGE电泳后转至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉在常温下封闭1 h后,加入用封闭液稀释的单抗或多抗至终浓度为5 μg/mL,常温下孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min,然后加入相应地HRP标记的二抗,孵育1 h,洗膜后加入ECL发光液,在ChemiDoc成像系统中拍照记录。

1.4 花粉提取物中过敏原组分定量检测

蒿属花粉第一组分过敏原采取单抗-多抗双夹心法进行定量检测,以特异性单抗A7-G4-E6为包被抗体,黄花蒿第一组分nArt an 1为标准品,生物素标记的多抗PAAH为检测抗体。第三组分采取双单抗夹心法,由于第三组分过敏原氨基酸序列变异较多,因此使用黄花蒿第三组分nArt an 3作为标准品用于黄花蒿花粉提取物中nsLTP过敏原的定量,大籽蒿第三组分nArt si 3用

于大籽蒿花粉中nsLTP过敏原的定量, A2-B8为包被抗体, nArt an 3和nArt si 3为标准品, 生物素标记的单抗A9-G10为检测抗体, 建立标准曲线进行过敏原定量, 具体方法参考已发表论文^[3].

第四组分过敏原的定量采取单抗-多抗双夹心法, 以特异性单抗2E11-2为包被抗体, 取0.2 μg 包被于酶标板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入100 μL 脱脂奶粉封闭后, 加入梯度稀释的rArt an 4标准品以及待检测样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 然后加入0.2 μg 的3016多抗孵育1 h, 接着加入HRP标记的羊抗兔IgG抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 100 μL TMB显色液避光反应15 min, 50 μL HCl终止反应, 记录450和620 nm处的吸光值, 根据标准品的吸光值绘制标准曲线, 并依此计算检测样品中Art an 4的含量.

1.5 统计分析

使用SPSS对数据进行分析, 不同样品中总蛋白含量的差异用ANOVA检验分析, 过敏原组分含量的差异用Kruskal-Wallis检验比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 不同来源的蒿属花粉提取物和制剂中总蛋白含量比较

本研究从我国三个城市收集的黄花蒿花粉, 经

PBS提取后, BCA法定量显示总蛋白含量无显著差异(图1(a)), 采用电泳进行定性分析结果也表明, 不同地区的黄花蒿花粉中蛋白含量基本一致(图1(b)). 丙酮脱脂后的花粉提取物中总蛋白含量略低于未脱脂处理组, 但没有显著差异(图2(a)), 电泳显示提取物中蛋白条带基本一致(图2(b)). 收集到9种不同来源的蒿属花粉提取物制剂, 包括3种黄花蒿, 4种大籽蒿, 艾蒿和欧洲北艾(*A. vulgaris*), 其中3种大籽蒿(B、C、D)来源于同一厂家的三个不同批次, 不同花粉制剂中总蛋白含量差异显著(图3(a)), 一种黄花蒿花粉制剂(*A. annua*-C)中蛋白含量不足0.1 mg/mL, 且电泳图上仅有25 kD左右的第一组分, 10 kD处的第三组分以及62 kD处的第七组分丰度较高, 与其余花粉制剂明显不同(图3(b)). 同一厂家所生产的3个批次的大籽蒿花粉提取物总蛋白含量也有差异, 电泳定性分析结果进一步表明不同来源的蒿花粉制剂中蛋白质丰度及同一种蛋白的含量差异较大(图3(b)).

2.2 过敏原标准品制备

用免疫亲和层析结合分子筛层析法从黄花蒿花粉提取物获得了具有较高纯度的第一组分nArt an 1, 黄花蒿和大籽蒿的第三组分过敏原nArt an 3, nArt si 3, 以及重组的黄花蒿第四组分过敏原rArt an 4, 经过SDS-PAGE电泳检测及质谱鉴定(图4), 可作为标准品用于花粉提取物中过敏原的定量检测.

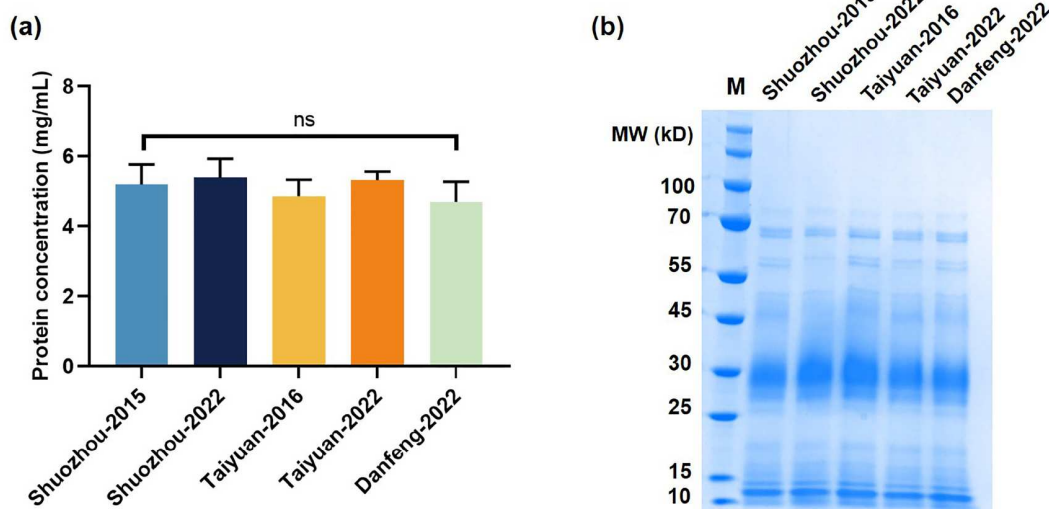


图1 不同来源的黄花蒿花粉提取物检测. (a) 总蛋白含量比较. (b) SDS-PAGE电泳检测. ns, 无显著性差异

Figure 1 Analysis of crude extract of *A. annua* pollen cultivated in different regions. (a) Comparison of the total protein content. (b) SDS-PAGE analysis. ns, the difference was not significant

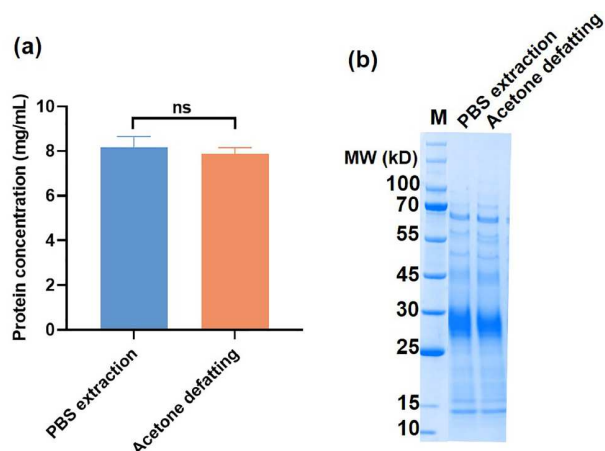


图2 不同方法提取黄花蒿花粉总蛋白检测。(a) 总蛋白含量比较。(b) SDS-PAGE检测。PBS extraction, PBS直接提取; Acetone defatting, 丙酮脱脂处理后PBS提取; ns, 无显著性差异

Figure 2 Analysis of the total proteins in *A. annua* pollen extracted using two methods. (a) Measurement of the protein content. (b) SDS-PAGE of *A. annua* pollen extracts. PBS, PBS extraction; Acetone defatting, defatted with acetone prior to PBS extraction; ns, the difference was not significant

2.3 第四组分过敏原定量检测方法

用Art an 4免疫小鼠Balb/c和新西兰白兔, 分别获得了单抗2E11-2和多抗3016, ELISA和免疫印迹结果均表明, 两个抗体都能够特异性的结合花粉提取物中的Art an 4(图5), 而与其他蛋白不结合。以单抗2E11-2为

包被抗体, 3016为检测抗体, 构建了第四组分的双夹心ELISA定量检测方法, 建立了标准曲线(图6), $R^2 > 0.99$, 定量范围为7.81~500 ng/mL, 可用于蒿花粉提取物中第四组分过敏原的定量检测。

2.4 不同来源的蒿属花粉提取物中过敏原含量的比较

根据已经建立的过敏原定量方法, 检测了不同蒿属花粉提取物中第一、三、四组分过敏原的含量。第一组分和第三组分过敏原含量较高, 而第四组分含量很低(图7(a)), 仅占花粉提取物总蛋白含量的0.5%左右。生长于我国不同地区的黄花蒿花粉提取物中三组分过敏原含量无显著差异, 同一地区不同年份之间也没有显著差异(图7(a)), 但来源于哈萨克斯坦的黄花蒿提取物中, Art an 1含量约为1.58%, Art an 3含量约为5.76%, 与我国黄花蒿花粉有显著差异^[14]。脱脂处理后第一组分过敏原含量有所降低, 但差异不显著, 第三和第四组分含量无明显变化(图7(b))。不同来源的蒿属花粉制剂中三种过敏原组分含量有显著差异, 黄花蒿中第一组分过敏原含量较高, 艾蒿中第三组分含量较高, 大籽蒿第三组分过敏原含量很低。第一组分过敏原在不同制剂中的含量相差4倍(2.9%~12.2%), 第三组分最大相差18倍(0.6%~12.4%), 而第四组分过敏原仅能在三种制剂中检出(*A. annua*-A, *A. sieversiana*-A, *A.*

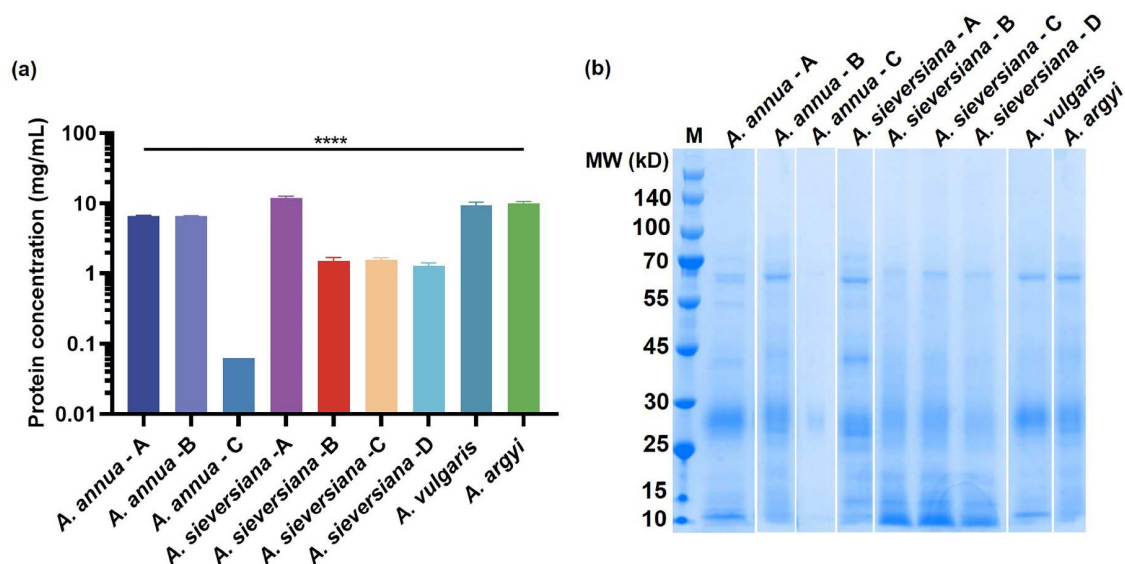


图3 不同来源的蒿属花粉提取物或者制剂中总蛋白检测。(a) 总蛋白含量比较。(b) SDS-PAGE检测。****, $P < 0.0001$

Figure 3 Analysis of the total proteins in different *Artemisia* pollen allergen diagnosis/immunotherapy products. (a) Comparison of the protein content. (b) SDS-PAGE analysis. ****, $P < 0.0001$

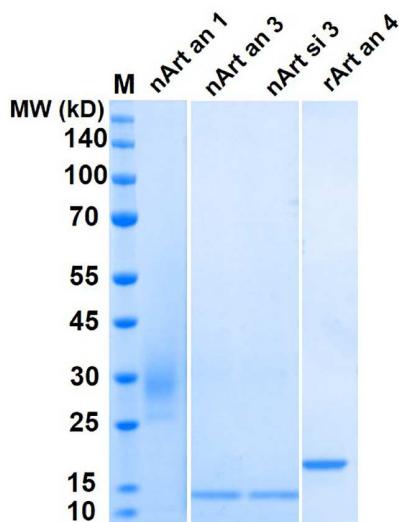


图4 蒿属花粉3种过敏原组分SDS-PAGE检测

Figure 4 SDS-PAGE analysis of three purified *Artemisia* pollen allergen components

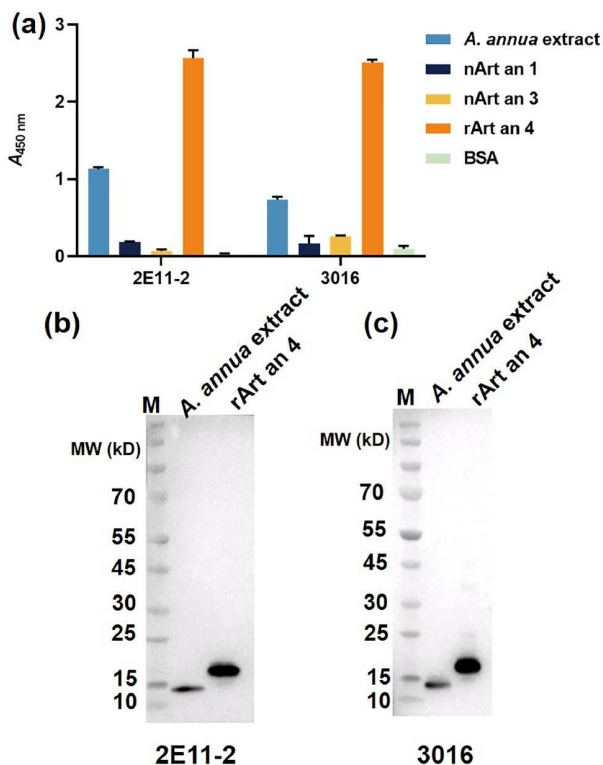


图5 蒿属花粉第四组分过敏原特异性抗体检测. (a) 特异性单克隆抗体2E11-2和多抗3016的ELISA检测. (b) 2E11-2抗体免疫印迹检测. (c) 3016多抗免疫印迹检测

Figure 5 Detection of the specific antibodies against *Artemisia* pollen allergen profiling. (a) ELISA analysis of the specific monoclonal antibody 2E11-2 and polyclonal antibody 3016. (b) Western blot analysis of monoclonal antibody 2E11-2. (c) Western blot analysis of polyclonal antibody 3016

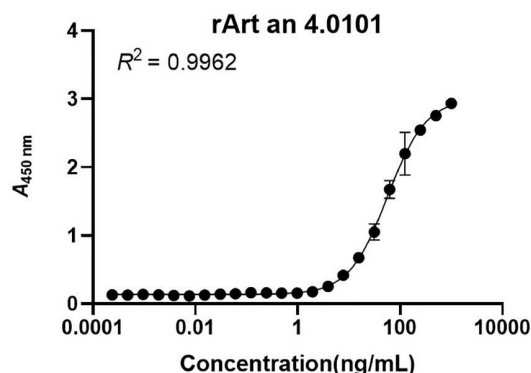


图6 蒿属花粉第四组分过敏原的双夹心ELISA定量标准曲线

Figure 6 Standard curve for quantification of *Artemisia* pollen allergen profilin by sandwich ELISA method

argyi), 其余制剂中均未能检出该组分. 不同厂商生产的黄花蒿/大籽蒿花粉提取物制剂中同一组分过敏原的含量也有较大差异, 不同黄花蒿花粉制剂中第一组分含量最大相差3倍, 第三组分最大相差1.5倍, 不同大籽蒿花粉制剂中第一组分最大相差3.7倍, 第三组分相差2倍. 批次间过敏原的含量也不尽相同, 尤其是大籽蒿的第三组分(图7(c)).

3 讨论

蒿属植物种类繁多, 我国约有187种^[15], 其中黄花蒿、艾蒿(*A. argyi*), 大籽蒿, 沙蒿(*A. desertorum*), 茵陈蒿(*A. capollaris*)等最为常见^[16]. 目前已鉴定的蒿属花粉过敏原共有10种列入世界卫生组织/国际免疫学会联盟(WHO/IUIS)过敏原目录, 其中第一组分在我国患者中的阳性率高达80%~93%, 第三组分阳性率约为52%~66%, 第七组分阳性率约为69%~83%, 这3种是最主要的过敏原^[7-9]. 此外, 第四组分抑制蛋白是一种泛过敏原, 在我国患者中的阳性率约为41%^[13], 能够引起蒿花粉与多种食物之间的交叉反应^[13], 并且有部分患者仅对该组分阳性, 已经有研究证实抑制蛋白在某些致敏原中是主要过敏原组分, 能够引起相应的临床症状^[17], 因此第四组分在蒿花粉过敏的临床诊断和免疫治疗中也有一定的应用价值.

精准诊断及特异性免疫治疗是提高过敏性疾病诊疗效率的关键, 目前临床上最常见检测的是以黄花蒿和大籽蒿提取物进行皮肤点刺, 检测制剂基本上都未标定过敏原含量. 特异性免疫治疗则先后使用大籽蒿^[18]和黄花蒿^[19]花粉提取物. 花粉粗提物中成分较多,

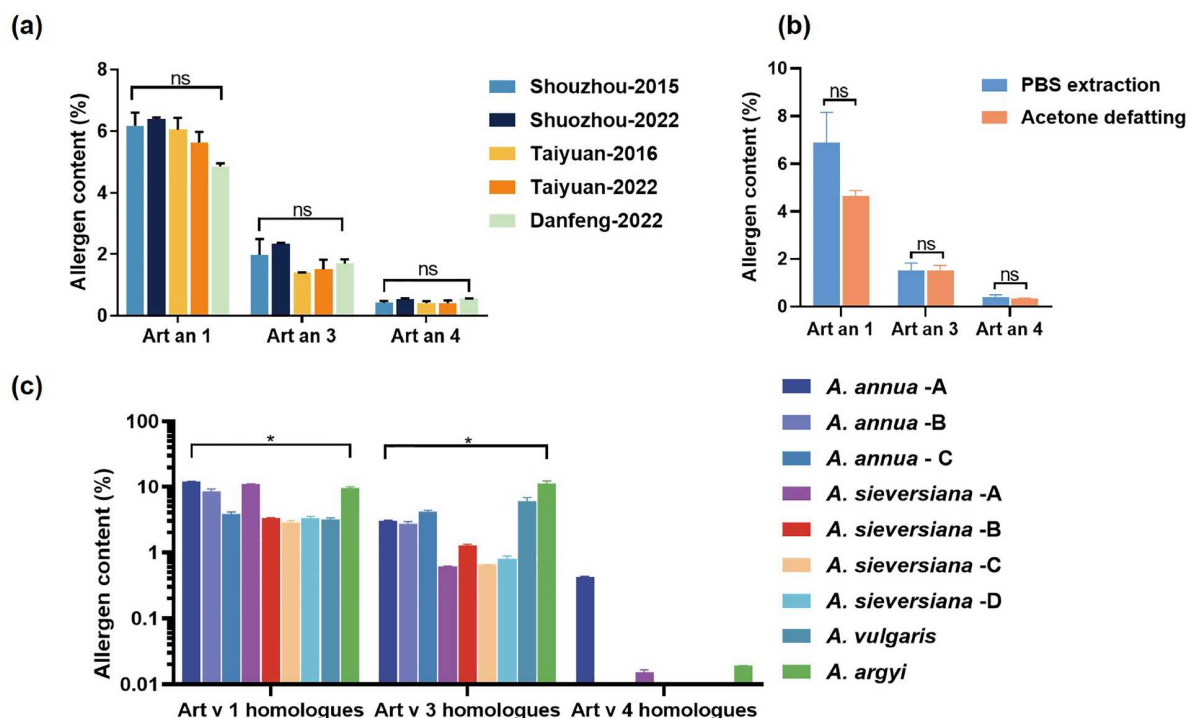


图7 三种过敏原组分含量分析。(a) 不同来源的黄花蒿提取物中过敏原含量比较。(b) 不同提取方法获得的黄花蒿粗提物中过敏原含量比较。(c) 蒿属花粉免疫制剂中过敏原组分的含量。ns, 无显著性差异; *, $P < 0.05$

Figure 7 Quantification of three individual allergen components. (a) Comparison of the allergen contents in crude extract of *A. annua* pollen cultivated from different regions. (b) Allergen contents in *A. annua* pollen extracted using two methods. (c) Allergen contents in different *Artemisia* pollen allergen diagnosis/immunotherapy products. ns, the difference was not significant. *, $P < 0.05$

且可能会由于种类、提取、保存方法等的差异, 导致不同来源或不同批次制剂中的过敏原含量具有较大的变异性^[20-24]。这种变异不仅对临床诊断的准确性产生影响, 还对特异性免疫治疗的疗效带来了不确定性。过敏原标准化是实现高效诊断和免疫治疗的核心步骤, 欧洲药品监管局和美国食品药品监督管理局已经对过敏原提取物的标准化制定了规范, 对主要过敏原进行精准定量是标准化的重要指标, 已经建立了桦树花粉主要过敏原Bet v 1和梯牧草花粉主要过敏原Phl p 5的ELISA定量检测方法^[20-27]。标准化过敏原制剂可以确保临床使用的精确性和安全性, 避免因剂量或成分差异导致的疗效波动或不良反应。

本研究建立了蒿花粉中三种过敏原组分的纯化及精准定量体系, 可用于蒿花粉提取物免疫制剂的标准化生产监测。研究表明生长于不同地区的黄花蒿花粉提取物中主要过敏原含量有显著差异, 来源于哈萨克斯坦的黄花蒿花粉中第一组分含量显著低于生长于我国的黄花蒿, 而第三组分又显著高于来源于我国的黄花蒿。已有研究表明气候等环境因素会影响过敏原的

含量^[28,29], 本研究中我国北方三个地区气候较为相似, 其主要过敏原含量并无十分显著差异, 而哈萨克斯坦靠近我国新疆, 气候与北方地区不同, 导致该地区的黄花蒿花粉与我国北方地区有较大差异。后续可比较生长于我国不同气候带的蒿花粉中的过敏原含量, 从而得到更为全面的结果。脱脂处理对蒿花粉提取物中总蛋白及主要过敏原组分的含量也没有显著影响, 去除脂溶性的非致敏性成分后更利于过敏原的保存, 但是需要在脱脂后彻底去除丙酮等化学物质, 以避免对后续过敏原制剂的检测及应用产生影响。

不同来源的花粉制剂中过敏原含量有显著差异, 这主要是由于不同厂家的提取工艺、稀释比例及储存方法不同, 过敏原制剂在生产过程中可能会加入防腐剂、稳定剂如甘油等物质^[30], 或进行一些额外的化学处理, 这可能会影响其中某些有效成分的含量^[31], 导致不同工艺方法下的同一种过敏原制剂的免疫活性具有较大差异。本研究所收集的部分免疫制剂无法检出第四组分, 可能是由于该组分在花粉提取物中含量较低, 且抑制蛋白稳定性较差^[32], 在提取和保存过程中容易

降解,使用此类制剂进行检测时,很容易造成漏检;此外第一,第三组分含量差异显著,尤其是来源于不同蒿属花粉的制剂,在临床应用时其诊疗效果可能存在较大差异,因此对过敏原提取物制剂进行标准化检测,尤其是针对其中的组分进行精确定量对于临床诊疗具有重要意义。

使用单一的标准化生产的过敏原组分进行精准诊断和特异性免疫治疗,能够加速过敏原制剂的标准化进程,减少因剂量或成分差异导致的疗效波动或不良反应,更利于高效的诊疗^[33,34]。蒿花粉过敏原组分诊断已经开始在我国应用,在提高诊断效率,减少不良反应的同时,也能够对于疾病的发展进程进行预测,进而及

时采取更有效的预防和治疗措施^[7]。根据组分诊断结果结合临床表现,对患者进行以过敏原组分为基础的个性化免疫治疗也是未来提高免疫治疗效率的有效途径。

本研究获得了黄花蒿花粉三种重要过敏原组分的标准品,并建立了高度特异、灵敏的双夹心ELISA定量方法,其中蒿属花粉过敏原第一和第四组分氨基酸序列高度一致,可以普遍适用于不同蒿属种类。而第三组分因为序列上有较大差异,需要相应种类的标准纯品用于精准定量研究。本报道的方法可以初步应用于蒿属花粉提取物和免疫制剂的检测,其他重要的过敏原组分检测体系也在开发中,将推动蒿花粉过敏原制剂的标准化向更高层次发展。

致谢 论文涉及授权专利(ZL202011210352.1),申请中专利(202311539201.4; 202311534840.1)。

参考文献

- 1 Wang X, Zhuang Y, Chen Y, et al. Prevalence of adult eczema, hay fever, and asthma, and associated risk factors: a population-based study in the northern Grassland of China. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2021, 17: 27
- 2 Sun A, Sun X, Li X, et al. Sensitization characteristics in allergic rhinitis and transport pathway for *Artemisia* pollen in northern Beijing, China. *Sci Total Environ*, 2023, 884: 163795
- 3 Zhao L, Fu W, Gao B, et al. Variation in IgE binding potencies of seven *Artemisia* species depending on content of major allergens. *Clin Transl Allergy*, 2020, 10: 50
- 4 Pablos I, Egger M, Vejvar E, et al. Similar allergenicity to different *Artemisia* species is a consequence of highly cross-reactive Art v 1-like molecules. *Medicina*, 2019, 55: 504
- 5 Luo W, Chen H, Cheng L, et al. Chinese expert consensus on allergen component resolved diagnosis. *Pediatr Allergy Immunol*, 2024, 35: e14272
- 6 Zhao L, Ma T, Wang X, et al. Food-pollen cross-reactivity and its molecular diagnosis in China. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2024, 24: 497–508
- 7 Zhao L, Chen J, Wang Y, et al. Association in molecular profiles of IgE sensitization to mugwort pollen allergens in Chinese parents and their offspring. *Pediatr Allergy Immunol*, 2023, 34: e14005
- 8 Gao Z, Fu W, Sun Y, et al. *Artemisia* pollen allergy in China: component-resolved diagnosis reveals allergic asthma patients have significant multiple allergen sensitization. *Allergy*, 2019, 74: 284–293
- 9 Fu W, Gao Z, Gao L, et al. Identification of a 62-kDa major allergen from *Artemisia* pollen as a putative galactose oxidase. *Allergy*, 2018, 73: 1041–1052
- 10 Luo W T. National multi-center study on allergen sensitization patterns and risk factors of allergic diseases based on the biobank resource sharing platform (in Chinese). Doctor Dissertation. Guangzhou: Guangdong Medical University, 2023 [罗文婷. 基于生物样本库资源共享平台开展的全中国多中心过敏性疾病过敏原致敏模式和危险因素研究. 博士学位论文. 广州: 广州医科大学, 2023]
- 11 Hou X, Luo W, Wu L, et al. Associations of four sensitization patterns revealed by latent class analysis with clinical symptoms: a multi-center study of China. *eClinicalMedicine*, 2022, 46: 101349
- 12 Gao Z S, Fu W Y, Zhao L, et al. Localization of four allergens in *Artemisia* pollen by immunofluorescent antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019, 179: 165–172
- 13 Zhao L, Xie H, Wang X, et al. Molecular characterization of allergens and component-resolved diagnosis of IgE-mediated mango fruit allergy. *Allergy*, 2023, 78: 1699–1703
- 14 Akhtemova N, Sergazina A, Bolatbekov T, et al. The role of major allergens Art v 1 and Art v 3 in *Artemisia* pollen-induced asthma: a mouse model study. *Front Immunol*, 2025, 16: 1590791
- 15 Lin Y R. The classification, distribution and application of *Artemisia linn* in China (in Chinese). *Bull Bot Res*, 1988, 8: 1–61 [林有润. 中国蒿属志——中国蒿属植物的系统分类、分布和主要经济用途. 植物研究, 1988, 8: 1–61]

- 16 Qiao B S. Color Atlas of Air-Borne Pollens and Plants in China (in Chinese). Beijing: Peking Union Medical College Press, 2005 [乔秉善. 中国气传花粉和植物彩色图谱. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005]
- 17 Ruiz-Hornillos J, López-Matas M A, Berges Jimeno P, et al. Profilin is a marker of severity in allergic respiratory diseases. *Allergy*, 2020, 75: 853–861
- 18 Hao G, Zheng Y, Gjesing B, et al. Prevalence of sensitization to weed pollens of *Humulus scandens*, *Artemisia vulgaris*, and *Ambrosia artemisiifolia* in northern China. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14: 240–246
- 19 Lou H, Huang Y, Ouyang Y, et al. *Artemisia annua*-sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *Allergy*, 2020, 75: 2026–2036
- 20 Becker S, Fassio F, Muñoz-Cano R, et al. Major allergen content in allergen immunotherapy products: the limited value of numbers. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2022, 32: 345–356
- 21 Goodman R E, Chapman M D, Slater J E. The allergen: sources, extracts, and molecules for diagnosis of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol-Pract*, 2020, 8: 2506–2514
- 22 Bonertz A, Mahler V, Vieths S. Manufacturing and quality assessment of allergenic extracts for immunotherapy: state of the art. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2019, 19: 640–645
- 23 Mahler V, Esch R E, Kleine-Tebbe J, et al. Understanding differences in allergen immunotherapy products and practices in North America and Europe. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143: 813–828
- 24 Spiric J, Schulenburg T, Holzhauser T, et al. Quality control of allergen products with mass spectrometry part I: positioning within the EU regulatory framework. *Allergy*, 2024, 79: 2088–2096
- 25 Kaul S, Zimmer J, Dehus O, et al. Standardization of allergen products: 3. Validation of candidate European Pharmacopoeia standard methods for quantification of major birch allergen Bet v 1. *Allergy*, 2016, 71: 1414–1424
- 26 Zimmer J, Bridgewater J, Ferreira F, et al. The history, present and future of allergen standardization in the United States and Europe. *Front Immunol*, 2021, 12: 725831
- 27 Zimmer J, Schmidt S, Kaul S, et al. Standardisation of allergen products: 4. Validation of a candidate European Pharmacopoeia standard method for quantification of major grass pollen allergen Phl p 5. *Allergy*, 2022, 77: 633–642
- 28 Zhao F, Elkelish A, Durner J, et al. Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.): allergenicity and molecular characterization of pollen after plant exposure to elevated NO₂. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 147–164
- 29 Zhao F, Durner J, Winkler J B, et al. Pollen of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.): illumina-based *de novo* sequencing and differential transcript expression upon elevated NO₂/O₃. *Environ Pollut*, 2017, 224: 503–514
- 30 Hauck P R, Williamson S. The manufacture of allergenic extracts in North America. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2001, 21: 93–110
- 31 Huber S, van der Kleij H, Wildner S, et al. Chemical modification of ragweed extract results in an increased safety profile while maintaining immunogenicity. *Allergy*, 2021, 76: 2226–2229
- 32 Kapingidza A B, Pye S E, Hyduke N, et al. Comparative structural and thermal stability studies of Cuc m 2.0101, Art v 4.0101 and other allergenic profilins. *Mol Immunol*, 2019, 114: 19–29
- 33 Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, et al. Allergen extracts for *in vivo* diagnosis and treatment of allergy: is there a future? *J Allergy Clin Immunol-Pract*, 2018, 6: 1845–1855.e2
- 34 Matricardi P M, Dramburg S, Potapova E, et al. Molecular diagnosis for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143: 831–843

Summary for “黄花蒿和大籽蒿花粉提取物中过敏原组分定量标准化初步研究”

Preliminary study on the quantitative standardization of allergen components in *Artemisia annua* and *Artemisia sieversiana* pollen extracts

Tingting Ma^{1†}, Lan Zhao^{2,3†*}, Biyuan Gao⁴, Meirong Yang⁵, Yirong Guo², Zhongshan Gao^{2,3} & Xueyan Wang^{1*}

¹ Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

² College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

³ Institute of Immunology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

⁴ Hangzhou Aileji Biotech Ltd, Hangzhou 310050, China

⁵ Ordos Second People's Hospital, Ordos 017010, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: zhaolan663@zju.edu.cn; wangxueyan2018@163.com

In China, *Artemisia* pollen is one of the most prevalent allergens in late summer and autumn, especially in northern regions, causing various clinical symptoms and significantly affecting patients' quality of life. Currently, clinical diagnosis and allergen immunotherapy (AIT) for *Artemisia* pollen allergy rely on crude pollen extract, whose effectiveness varies depending on the source of the pollen, extraction methods, and storage conditions. Our previous study demonstrated that the allergenicity of *Artemisia* pollen extract is primarily related to the content of major allergens. Among the ten allergen components identified, the defensin-like protein (Art v 1 homologues), non-specific lipid transfer protein (Art v 3 homologues, nsLTP) and putative galactose oxidase (Art an 7) are the major allergens in Chinese patients.

Allergy diagnosis and treatment using allergen extracts are dose-dependent, so it is crucial to quantify the clinically relevant allergen components using reliable standardized methods. In this study, *Artemisia annua* pollens were collected from various regions over several years. Two methods of extraction and various preparations of pollen extracts from different *Artemisia* pollen species and manufacturers were compared for total protein content. Sandwich ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) methods were developed and applied for the quantification of major allergen components Art v 1, Art v 3, and minor pan-allergen profilin Art v 4 in *Artemisia* pollen extracts with highly purified allergen components serving as standards. The total protein content and concentrations of the three important allergen components in crude extracts did not vary significantly across Chinese regions or in different years, nor with the extraction methods. However, concentrations of three allergen components differed significantly in *A. annua* pollen sourced from Kazakhstan versus China. Notably, total protein content and the allergen component concentrations varied significantly in different *Artemisia* species and those obtained from different manufacturers. The content of Art v 1 and Art v 3 homologues in pollen extracts were significantly higher than Art v 4. In general, the contents of nsLTP were notably lower in the extract derived from *A. sieversiana* than *A. annua*. In the commercial extracts, Art v 1 homologues content varied four-fold (2.9%–12.2%), and Art v 3 homologues 18-fold (0.6%–11.4%). Furthermore, Art v 4 homologues were only detected in three of the nine extracts.

Standardized main allergen components in the allergen extracts are essential for improving the sensitivity and safety of clinical diagnosis and treatment. There is a pressing need for the harmonization and standardization of *Artemisia* pollen extracts in China. Allergen standardization is a complex process requiring extensive effort. Our study developed a highly sensitive ELISA method for quantifying three main allergen components in *Artemisia* pollen extracts. Standard quantification of other allergen components is under development. This will facilitate the standardization of *Artemisia* pollen extracts and improve the efficiency of clinical diagnosis and treatment.

artemisia pollen extract, allergen quantification, standardization

doi: [10.1360/TB-2025-0143](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0143)