

论著

牛奶过敏原制备方法的研究和免疫活性鉴别

常艳敏¹,陈寅^{2,3},林书祥⁴,吴瑞杰¹,李会强²(1. 天津市南开医院,天津 300100; 2. 天津医科大学,天津 300070;
3. 云南武警总队医院,云南 昆明 650111; 4. 天津市儿童医院,天津 300204)

摘要:目的 探索牛奶主要过敏原的制备工艺。方法 采用等电点沉淀、凝胶层析和分子筛等技术纯化牛奶中主要过敏原组分;采用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度,采用双抗原夹心-ELISA 鉴定免疫活性。结果 成功获得牛奶中的四种主要过敏原组分:酪蛋白、 β 乳球蛋白、 α 乳白蛋白和分子量较高的 P1 组分,并经过免疫实验证实这四种组分均能与过敏血清产生反应,而其中 β 乳球蛋白和 P1 组分反应性较高。结论 本研究探索出一种简单、实用的牛奶主要过敏原制备工艺,并证实牛奶中的 β 乳球蛋白和高分子量蛋白质为主要过敏原。

关键词:牛奶;过敏原;制备方法;免疫活性

中图分类号:TS252.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)04-0297-04

Investigation on the preparation of milk allergens and the identification of immunoreactivityChang Yanmin, Chen Yin, Lin Shuxiang, Wu Ruijie, Li Huiqiang
(Nankai Hospital in Tianjin, Tianjin 300100, China)

Abstract: Objective To investigate the method of preparing main components of milk allergens. **Methods** Isoelectric precipitation, gel chromatography, molecular sieve and other possible methods were used to purify the main allergens in milk. SDS-PAGE was used to identify the purity of protein and double antigen sandwich-ELISA was established to confirm the immunoreactivity of milk allergen. **Results** Four components of milk allergen, including caseins, β -lactoglobulin, α -lactoalbumin and several macromolecule proteins (P1), were separated and purified by the methods established in this study, and all these components can react with positive serums, whereas β -lactoglobulin and P1 components showed higher immunoreactivity. **Conclusion** A simple and practical method for preparing milk allergens was found in this study; β -lactoglobulin and P1 components were considered to be the main allergen components in milk.

Key words: Milk; allergen; prepare method; immunoreactivity

血清特异性抗体(IgE 或 IgG)检测是确定食物过敏原的重要手段之一,因具有安全、不受药物影响等诸多优点,而广泛应用于临床实验室^[1-2]。检测特异性抗体需要以高质量已知抗原为基础,然而,引起食物过敏反应的蛋白不是单一蛋白,食物中的任何蛋白成分均有可能作为过敏原诱导机体产生特异性抗体;而且,因个体差异会导致同种食物在不同个体间引起过敏反应的过敏原种类可不相同。以常见过敏食物牛奶为例,牛奶中蛋白组分复杂,各蛋白组分含量差异很大^[3-4],检测牛奶抗体时如使用牛奶中提取的总蛋白作为已知抗原则效果不佳。因此,只有从牛奶中提取主要过敏蛋白组

分并根据其致敏活性合理配制,才能防止原始含量较低而致敏活性较强组分所对应的抗体不能被检出现象的发生。为此,本文拟建立一种较为实用的牛奶过敏原制备工艺,并对制备的主要过敏原组分的免疫活性进行鉴别。

1 材料与方法**1.1 材料****1.1.1 试剂**

蛋白层析填充材料 Sephadex G200 和 DEAE-Sephadex A50 购自瑞典 Pharmacia 公司;蛋白电泳材料十二烷基磺酸钠、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺等购自美国 Sigma 公司;标记用酶辣根过氧化物酶购自美国 Sigma 公司;96 孔酶标反应板为美国康宁公司产品。

1.1.2 血清标本

牛奶过敏患者血清选自天津市儿童医院,累计 48 例,皮肤点刺试验阳性,血清特异性 IgE 检测

收稿日期:2012-04-23

基金项目:天津市卫生局科学基金项目(2010KY12)

作者简介:常艳敏 女 主任技师 研究方向为医学检验方法与应用

通信作者:李会强 男 教授 研究方向为临床免疫学检验

E-mail:lihuiqiang1965@163.com

(ASI)阳性;健康对照血清选自天津市儿童医院,累计52例,血清特异性IgE检测阴性,血清总IgE检测在正常参考范围之内。空腹采血,分离血清于-20℃冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 牛奶脱脂

新鲜牛奶5000 r/min离心30 min后,弃去上层脂肪,按1:5的体积比加入-20℃预冷丙酮,于4℃环境中浸泡24 h去脂,其间搅拌数次,换液数次至丙酮澄清。而后3000 r/min离心30 min,弃上清,将沉淀置于超净通风橱,于低温环境中通风挥干丙酮后称重,按8 ml/g的比例溶于PBS(0.01 mol/L, pH7.4),于4℃环境中提取24 h,其间搅拌数次。最后以12000 r/min低温离心20 min,收集上清即为牛奶总蛋白粗提液。

1.2.2 等电点沉淀制备酪蛋白

新鲜牛奶低温离心5000 r/min,20 min,弃去上大部分脂肪,取下层清液并用双层纱布过滤后即得脱脂奶。脱脂奶加入等量PB,用盐酸调pH至4.6,40℃水浴30 min,使酪蛋白充分析出。8000 r/min,离心30 min,上清即为乳清,沉淀为酪蛋白,分别收集。酪蛋白用丙酮按1.2.1方式进一步脱脂24 h后弃去丙酮获得酪蛋白。

1.2.3 Sephadex G200 凝胶层析制备乳清中大分子蛋白组分

取1.2.2制备的乳清,采用millipore超滤器,用截流分子量10 kDa的YM-10滤膜对乳清进行正压超滤浓缩,将蛋白浓度调整至5~10 mg/ml。按常规处理Sephadex G200凝胶并装柱,平衡缓冲液为pH 7.4的0.01 mol/L PBS,每次上样约3 ml;紫外监测洗脱液蛋白浓度变化,分别收集各蛋白峰。共监测到4个洗脱峰,首个洗脱峰(暂命名为P1)为大分子蛋白组分,其余3个洗脱峰为小分子蛋白。将P1单独存放,其余3个合并后经millipore超滤器正压超滤浓缩用于制备α乳白蛋白(ALA)和β乳球蛋白(BLG)。

1.2.4 DEAE Sephadex A50 离子交换层析制备α乳白蛋白和β乳球蛋白

取1.2.3制备的混合洗脱峰,经正压超滤浓缩并将蛋白浓度调整至5~10 mg/ml。按常规处理DEAE Sephadex A50并装柱,用pH 6.8的0.01 mol/L PB充分平衡后上样,每次上样约3 ml,用上述平衡溶液洗脱至基线。随后用浓度为0.1~1 mol/L NaCl的PB进行梯度洗脱,紫外监测洗脱液蛋白浓度变化,分别收集各蛋白峰。共监测到2个蛋白峰(0.15 mol/L洗脱峰和0.3 mol/L洗脱峰)。

1.2.5 提取组分蛋白成分分析

采用SDS-PAGE分析提取组分的蛋白成分:选择堆积胶浓度为5%,分离胶浓度为15%,样品蛋白浓度约5 mg/ml,按4:1体积比加入上样缓冲液,100℃水浴处理10 min。电泳条件:堆积胶为90 V恒压,分离胶140 V恒压。电泳结束后取出凝胶,将分离胶先用固定液固定1 h,再用考马斯亮蓝染液染色1.5 h,最后用脱色液脱色并于凝胶成像仪上拍照分析。

1.2.6 提取组份免疫活性鉴定

采用双抗原夹心法测定提取蛋白与血清特异性IgE反应情况。采用改良过碘酸钠法分别标记P1组分、酪蛋白、β-乳球蛋白、α-乳白蛋白,同时将上述4种蛋白组分包被酶标反应板(蛋白浓度为10 μg/ml,150 μl/孔)。微孔内直接加入阳性对照血清或阴性对照血清10 μl和酶标抗原100 μl,混合后于37℃温浴1 h;洗涤3~5次加通用酶底物溶液100 μl,室温反应15 min,再加终止液(0.2 NH₂SO₄)终止反应并测定吸光度值(A_{450nm});如测定孔A_{450nm}>2.1倍阴性对照A_{450nm}则为阳性反应,如测定孔A_{450nm}≤2.1倍阴性对照A_{450nm}则判定为阴性结果^[5]。提取组分的免疫活性用阳性比率(阳性结果例数/阳性血清例数)表示。

2 结果

2.1 牛奶过敏原制备工艺

本研究曾尝试多种提取流程,经反复比较后最终确定牛奶过敏原制备工艺如图1所示。

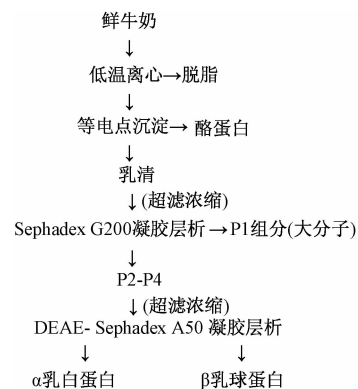


图1 牛奶过敏原制备流程图

Figure 1 Flow chart of preparing milk allergens

2.2 乳清经Sephadex G200凝胶层析分离结果

脱脂牛奶经等电点沉淀分离酪蛋白后获得乳清,经正压超滤浓缩后,直接采用Sephadex G200凝胶层析可获得4个蛋白峰,如图2所示。经电泳分析显示第1个洗脱峰(暂命名为P1)主要是大分子蛋白组分,单独收集;而第2、3、4个洗脱峰(暂命名

为 P2-P4) 组分差别不明显, 主要含有 α 乳白蛋白和 β 乳球蛋白, 因此将 P2-P4 合并。

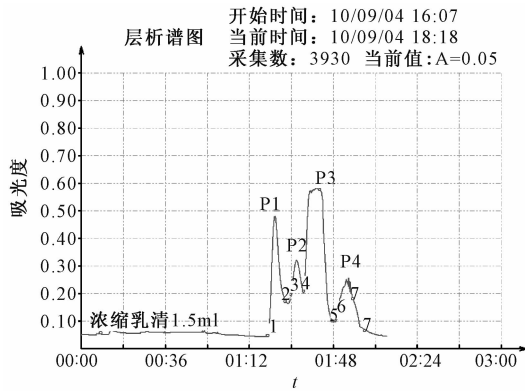


图2 乳清经 Sephadex G200 凝胶层析图谱

Figure 2 Diagram of Sephadex G200 gel chromatography of whey protein

2.3 DEAE- Sephadex A50 离子交换层析分离结果

乳清经 Sephadex G200 凝胶层析获得第 2 峰-第 4 峰 (P2-P4), 合并, 经正压超滤浓缩, 采用 DEAE Sephadex A50 离子交换层析, 用 0.1 ~ 1 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 收获 0.15 mol/L 洗脱峰和 0.3 mol/L 洗脱峰, 经电泳分析显示分别为 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白。离子交换层析结果如图 3 所示。

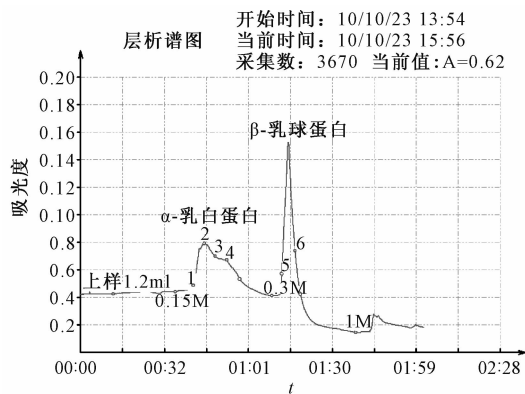


图3 乳清 (P2-P4) 经 DEAE Sephadex A50 离子交换层析图谱

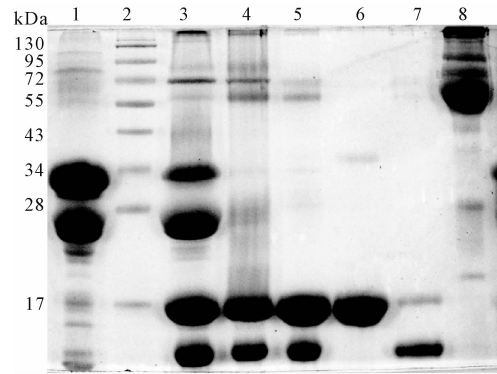
Figure 3 Diagram of DEAE Sephadex A50 ion exchange chromatography of whey protein (P2-P4)

2.4 提取过程中间组分和最终组分蛋白成分分析

牛奶过敏原提取过程中共依次收集脱脂奶、酪蛋白、乳清、P1 组分、P2-P4 组分、 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白, 经 SDS-PAGE 分析, 电泳图谱如图 4 所示。由图可知, 通过本研究中摸索的纯化方法, 使牛奶中的酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白等主要蛋白组分得到了有效的分离纯化。

2.5 提取组分与牛奶过敏阳性血清 (IgE) 反应性研究结果

从牛奶中提取 4 种组分经双抗原夹心法鉴别,



1: 酪蛋白; 2: Marker; 3: 脱脂奶; 4: 乳清; 5: P2-P4 组分; 6: BLG; 7: ALA; 8: P1 组分

图4 中间组分和最终组分 SDS-PAGE 蛋白分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of intermediate and final components

它们与牛奶过敏患者血清反应性如图 5 所示。结果显示, 4 种蛋白均能与牛奶过敏患者血清发生反应, 各自阳性反应的百分比有所不同, 其中, P1 组分和 β -乳球蛋白的阳性反应率较高, 分别达到 80% 和 71.1%, α -乳白蛋白的反应率次之 (40%), 而酪蛋白的阳性反应率较低, 只有 17.5%。

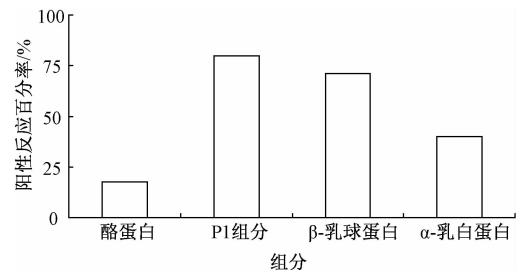


图5 4 种组分与过敏患者血清反应情况

Figure 5 The response of four antigenic components in milk to positive serum

3 讨论

如前文所述, 牛奶蛋白成分复杂, 各蛋白组分均有可能成为过敏原。牛奶过敏患者虽然均表现为对牛奶过敏, 但因个体差异而导致个体间免疫反应不同, 过敏原种类及所产生特异性抗体种类也不同。因此, 在确认牛奶主要过敏原组分的基础上, 建立简易主要过敏原提取工艺, 并将过敏原组分进行合理配比以制备优质包被抗原原料是制备特异性 IgE 检测试剂的重要环节。

研究证实, 牛奶中主要过敏原包括酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和牛血清白蛋白等等^[4,6-7]。本研究以上述组分作为目标蛋白, 采用选择性沉淀、凝胶层析和离子交换等技术, 探索出一种简单、实用的牛奶主要过敏原制备工艺; 经 SDS-PAGE 电泳分析, 各提取组分蛋白纯度能够满足特异性 IgE 检测的要求; 经双抗原夹心 ELISA 证实, 各提取组分

与过敏患者血清有较好的反应性。另外,提取过程中采取两次正压超滤技术,通过控制滤膜孔径,在浓缩的同时也去除一些小分子(分子量小于 10 000 Da)物质。此外,本研究意外发现乳清经 Sephadex G200 层析后最先被洗脱的蛋白峰(P1),与牛奶过敏患者血清具有良好的反应性,且具有相当高的阳性反应比率(80%)。经电泳分析显示 P1 不是单一成分,主要集中在高分子量部分,可能是牛奶中免疫球蛋白(160 kDa)、乳铁蛋白(80 kDa)和牛血清白蛋白(66 kDa)等成分。因此,此大分子蛋白在牛奶中所占比例虽然很低,但在制备包被抗原原料时需要重点考虑。

目前,用一种或两种方法同时获得牛奶中所有过敏原组分是不易实现的,并且与 sIgE 结合的基本单位是一段氨基酸序列(抗原表位),并不是完整的蛋白分子。近年来,关于过敏原表位鉴别技术及重组过敏原的工艺日渐成熟,过敏原的鉴别已经深入到抗原表位水平,且已经进行重组免疫原的制备^[8-9]。因此,在特异性 IgE(IgG)检测领域,仍然需要对过敏性食物中过敏原组分进行深入研究,通过研究牛奶中主要过敏原(蛋白分子)的重要抗原表位(十几个氨基酸序列),期望寻找不同蛋白分子中的共同抗原表位(几个或几十个),然后再通过蛋白重组技术给予表达和纯化^[10]。抗原表位分析和重组过敏原有可能是食物过敏原制备的发展方向。

参考文献

[1] GEREZ I F A, SHEK L P C, CHNG H H, et al. Diagnostic tests for food allergy [J]. Singapore Med J, 2010, 51 (1) : 4-9.

[2] FRANK K C M, YOLANDA M. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow ' s milk allergy [J]. Eur J Pediatr, 2009, 168 : 891-896.

[3] PATRIZIA R, CINZIA B, CHIARA D L, et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395 : 47-56.

[4] AVIGAEL H B, MICHELA G S T, DOMINIQUE C B, et al. An overview of cow's milk allergy in children [J]. Swiss Med Wkly, 2009, 139 (21-22) : 300-307.

[5] 刘辉,陶志华. 临床免疫学检验实验指导 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2012 : 30-31.

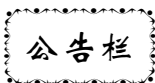
[6] 蒋红玲,向军俭,王宏,等. 牛奶中过敏原组分的分离纯化及主要过敏原的鉴定 [J]. 暨南大学学报, 2008, 29 (4) : 341-346.

[7] 罗曾玲,高金燕,陈红兵. 牛乳中主要过敏原的研究进展 [J]. 食品科学, 2007, 28 (2) : 346-350.

[8] TANABE S. Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patient [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72 (3) : 649-59.

[9] LIN Jing, LUDMILLA B, WAYNE G S, et al. Development of a Novel Peptide Microarray for Large Scale Epitope Mapping of Food Allergens [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124 (2) : 315-322.

[10] 曹燕娟,胡东生,刘志刚,等. 牛奶主要过敏原 α s1-酪蛋白全长与片段区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定 [J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26 (7) : 601-605.



关于公布硼酸等 301 种食品包装材料用添加剂名单的公告

2012 年 第 5 号

根据《食品安全法》及其实施条例的规定,按照卫生部等 7 部门《关于开展食品包装材料清理工作的通知》(卫监督发[2009]108 号)的要求,经组织专家评估,现公布硼酸等 301 种食品包装材料用添加剂名单。

特此公告。

附件:硼酸等 301 种食品包装材料用添加剂名单.pdf(略)

卫生部
二〇一二年四月九日