

论著

鸡蛋过敏人群中主要过敏原的反应性及卵类粘蛋白
抗原表位的初步研究楚海荣¹, 林书祥², 侯丽英³, 张盈莹³, 朱黎娜³, 闫娟娟³, 李会强³(1. 潍坊医学院医学检验学系, 山东 潍坊 261053; 2. 天津市儿童医院, 天津 300204;
3. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203)

摘要:目的 分析年龄、性别对鸡蛋过敏人群中主要过敏原反应性的影响, 初步探索我国鸡蛋过敏儿童卵类粘蛋白的主要抗原表位。方法 以卵类粘蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白纯品为抗原, 采用免疫斑点印迹, 检测 21 例鸡蛋过敏儿童血清特异性免疫球蛋白 E (sIgE) 与蛋白反应性, 分析年龄、性别因素对过敏原反应性的影响; 应用 DNASar 生物分析软件, 预测并合成卵类粘蛋白抗原表位肽段, 采用免疫斑点印迹检测抗原表位与鸡蛋过敏儿童血清的反应性。结果 A (≤ 1 岁) 组、B 组 (2~3 岁包括 3 岁)、C 组 (> 3 岁) 的卵类粘蛋白反应率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 卵白蛋白、卵转铁蛋白反应率各组间均差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 性别对各过敏原的反应率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 卵类粘蛋白抗原表位反应率较低。结论 卵类粘蛋白 sIgE 在不同年龄段存在差别, 卵白蛋白 sIgE 在 21 例患者均可检测出, 卵转铁蛋白 sIgE 在各年龄段无明显差别; 应用 DNASar 生物软件预测的卵类粘蛋白抗原表位, 在天津地区反应性低, 不是该地区主要抗原表位。

关键词: 鸡蛋过敏; 特异性免疫球蛋白 E; 卵类粘蛋白; 抗原表位; 食物过敏; 食品; 儿童

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)02-0144-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.02.002

Effect of major allergen in egg allergy and preliminary analysis of ovomuciod epitopes in egg-allergy childrens

CHU Hai-rong, LIN Shu-xiang, HOU Li-ying, ZHANG Ying-ying, ZHU Li-na, YAN Juan-juan, LI Hui-qiang
(Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Shandong Weifang 261053, China)

Abstract: Objective To analyze the effect of age and gender on egg allergens, and to explore the main epitopes of OM in Chinese population. **Methods** 21 patients diagnosed as egg allergy were included, patients were divided into 3 groups: younger than 1-year-old (group A, 6 subjects), 2 to 3-years-old (group B, 7 subjects), and elder than 3-years-old (group C, 8 subjects). The serum of patients, the specific IgE of ovomuciod, ovalbumin, ovotransferrin and epitopes of ovomuciod were detected by immunodot-blot. Epitopes of ovomuciod were predicted by DNASar. **Results** Immunodot-blot analysis showed that the numbers of serum samples which could react with ovomuciod were 2 in group A, 7 in group B and 5 in group C, respectively. All patients samples showed positive to ovalbumin. 3 patients IgE in group A could binding to ovotransferrin, as well as 6 samples in group B and 5 samples in group C. **Conclusion** Ovomuciod sIgE reactivity to egg allergens differed according to children's age. The DNASar biological software was used to predict the epitopes of the egg type mucin which was low in Tianjin.

Key words: Egg allergy; specific IgE; ovomuciod; epitopes; food allergy; food; children

食物过敏 (food allergy) 是由某种食物或食品添

加剂等引起的免疫球蛋白 E (IgE) 介导和非 IgE 介导的免疫反应, 会引起消化系统或全身性的变态反应。据报道, 多达 10% 的学龄前儿童受到过食物过敏的影响, 在很多国家患病率仍在继续升高^[1]。鸡蛋是引起儿童食物过敏反应的最常见的食物^[2], 其中卵类粘蛋白 (OM)、卵白蛋白 (OA)、卵转铁蛋白 (OT) 是主要的过敏原, 而卵类粘蛋白被证实是最主要的过敏原^[3]。但卵类粘蛋白在不同性别、年龄的过敏儿童间反应性有无差别, 其主要的抗原表位在不同地域是否

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81371882); 山东省高等学校优秀青年教师国内访问学者项目

作者简介: 楚海荣 女 实验师 研究方向为食物过敏原鉴别与应用研究 E-mail: chr7968@163.com

通信作者: 李会强 男 教授 研究方向为标记免疫分析化学研究及过敏性疾病的实验室诊断 E-mail: lihuiqiang1965@163.com

存在差异鲜见报道。本研究以鸡蛋主要过敏原为抗原,采用免疫斑点印迹法对 21 例鸡蛋过敏儿童血清特异性免疫球蛋白(sIgE)进行检测,分析年龄、性别对鸡蛋主要过敏原反应性的影响,应用 DNASTar 生物分析软件,预测并合成卵类粘蛋白主要抗原表位,免疫斑点印记检测各表位的反应性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本

2014 年 1 月—2014 年 12 月本课题组收集天津市儿童医院的儿童鸡蛋过敏患者血清 21 例,临床诊断依据包括:典型临床过敏史,鸡蛋清 sIgE > 0.35 IU/ml。其中男性 10 例,女性 11 例,年龄 1~8 岁。阴性对照血清来自无任何过敏史的健康儿童。

1.1.2 主要仪器与试剂

垂直电泳仪及电泳槽(美国 BioRad);碱性磷酸酶(AP)显色底物、卵类粘蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白均购自美国 Sigma,脱脂奶粉、蛋白分子量标准(Maker)均购自美国 Thermo,羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)、碱性磷酸酶标记的羊抗人免疫球蛋白 E(抗 IgE-AP)抗体均购自美国 Jackson,甲醇、冰乙酸、吐温-20、Tris 等试剂均为国产分析纯;卵类粘蛋白抗原表位多肽段应用分子生物学软件 DNASTar 预测,由上海吉尔生化有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 蛋清蛋白提取物组分分析

将蛋清提取物(碳酸氢钠提取法制备^[4])和 3 种蛋白质,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):分离胶 10%,堆积胶 5%,上样量 20 μ g,堆积胶电压为 65 V,分离胶电压为 135 V,电泳约 1 h。产物用考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h,经甲醇充分脱色后,用凝胶成像系统对 SDS-PAGE 电泳结果进行图像分析。

1.2.2 主要过敏原和卵类粘蛋白表位与患者血清反应情况分析

将蛋清蛋白提取物,卵类粘蛋白,卵白蛋白,卵转铁蛋白,卵类粘蛋白(AN10、PLI2、FN14、VD12)分别溶于磷酸盐缓冲液(PBS,浓度为 10 mg/ml),羊抗鼠 IgG 做阳性对照,PBS 溶液做阴性对照,分别取 1.5 μ l 于硝酸纤维素膜上(NC),0.5%脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 溶液(其中含 Tris-HCl、NaCl、吐温-20)洗 3 次;将待检血清按 1:10 的比例稀释后分别加到膜上,室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,加 1:500 稀释的 IgE-AP,室温孵育 1.5 h, TBST 洗 3 次,加 AP 显色底物,避光显色 10 min,观察结果。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据整理和统计分析。各组间总 IgE 比较用秩和检验,sIgE 比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床样本资料及分组

本研究将临床鸡蛋过敏患者根据年龄分为 3 组:A 组(≤ 1 岁)6 例,B 组(1~3 岁包括 3 岁)7 例,C 组(>3 岁)8 例;总 IgE 水平 B 组高于 A 组、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$),不同性别组的 sIgE 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 鸡蛋过敏患者的临床资料

Table 1 Clinical characteristics of patients

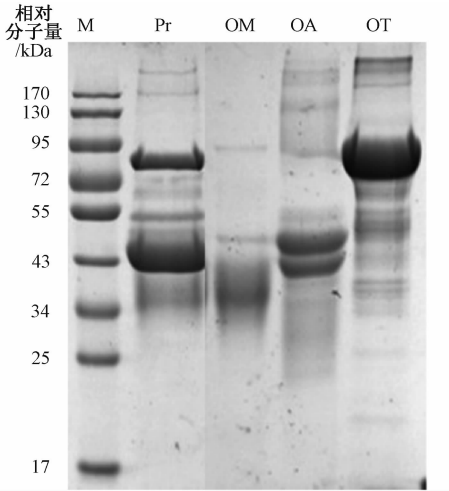
分组	编号	性别	年龄	总 IgE 水平 (IU/ml)	sIgE 水平 (IU/ml)
A	1	女	1	<100	0.60
	2	男	1	<100	0.50
	3	男	1	<100	0.40
	4	女	1	>200	0.75
	5	女	1	>100	0.53
	6	男	1	>200	2.90
B	7	男	2	>200	0.77
	8	男	2	>200	1.80
	9	女	2	>100	2.50
	10	女	2	>100	4.60
	11	男	3	>200	0.50
	12	女	3	>200	3.60
C	13	男	3	>200	0.83
	14	女	4	<100	0.50
	15	男	4	<100	0.60
	16	女	4	>200	1.00
	17	女	4	>100	0.69
	18	男	5	<100	2.00
	19	女	7	>100	0.60
20	女	8	<100	0.40	
21	男	8	>100	0.50	

2.2 蛋清蛋白提取溶液的组分分析

SDS-PAGE 电泳图谱见图 1,卵类粘蛋白在 34 kD 位置有一主要条带,卵白蛋白在 43 kD 位置有一清晰条带,卵转铁蛋白在 76 kD 位置有一清晰条带,蛋清提取液中清晰可见的蛋白条带主要有 3 条,OT、OA、OM 相对分子量分别为 76、43、34 kD,且卵白蛋白蛋白质质量浓度较高,分别与 3 种蛋白位置相吻合,说明本试验所提取蛋清蛋白溶液蛋白组分完整。

2.3 鸡蛋过敏儿童血清 sIgE 所针对致敏组分分析

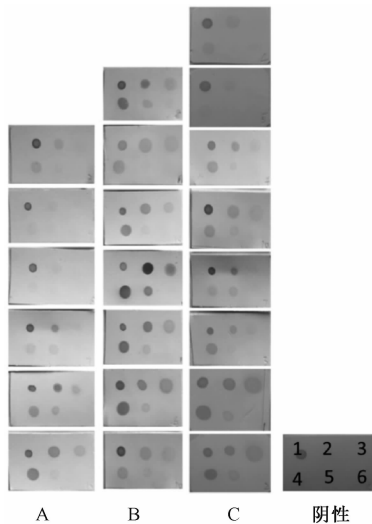
鸡蛋过敏儿童血清 sIgE 所针对致敏组分见图 2。21 例患者均可检测到卵白蛋白 sIgE,在 A 组 6 例患者中有 2 例检测到卵类粘蛋白 sIgE,3 例检测到卵转铁蛋白 sIgE,但相对较弱;B 组 7 例患者,卵白蛋白 sIgE、卵类粘蛋白 sIgE 在 7 例患者中均可检



注: M. Marker 为预染蛋白; Pr. 蛋白提取物

图1 SDS-PAGE 分析蛋白提取物和卵类粘蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白

Figure 1 SDS-PAGE analysis of albumen extract and OM, OA, OT



注: 1. 阳性对照; 2. 蛋清总蛋白; 3. OM; 4. OA; 5. OT; 6. 阴性对照; 因杂志为黑白印刷, 试验结果可能体现不准确

图2 蛋清主要过敏原免疫斑点印迹

Figure 2 Immunodot-blots of egg allergens

测到, 6 例患者可检测到卵转铁蛋白 sIgE; C 组 8 例患者中 5 例可检测到卵类粘蛋白 sIgE, 5 例可检测到卵转铁蛋白 sIgE, 见表 2、图 3。

2.4 卵类粘蛋白抗原表位预测结果分析

运用生物学软件 DNASTar 对卵类粘蛋白的表位特性进行分析, 如亲水性、柔韧性、表面可及性及抗原指数, 抗原表位预测结果见图 4, 预测线性抗原表位 4 段, 抗原表位多肽段委托上海吉尔生化有限公司合成, 见表 3。

2.5 血清 sIgE 所针对卵类粘蛋白抗原表位分析

如表 4 所示, 仅有 2 例患者血清能检测到 AN10 (aa1-10) 的 sIgE, 2 例能检测到 PL12 (aa9-20) 的 sIgE, 而且反应信号较弱, FN14、VD12 均未检测到信号。

表 2 鸡蛋过敏患者血清 sIgE 所针对过敏原

Table 2 Egg allergens of the egg allergy patients

分组	编号	OM	OA	OT
A	1	-	+	-
	2	-	+	-
	3	-	+	-
	4	-	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+
B	7	+	+	+
	8	+	+	-
	9	+	+	+
	10	+	+	+
	11	+	+	+
	12	+	+	+
C	13	+	+	+
	14	-	+	-
	15	-	+	-
	16	+	+	-
	17	+	+	+
	18	+	+	+
	19	-	+	+
	20	+	+	+
	21	+	+	+

注: + 表示阳性; - 表示阴性

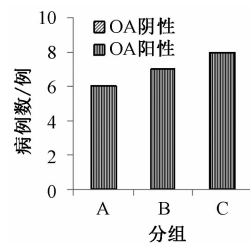
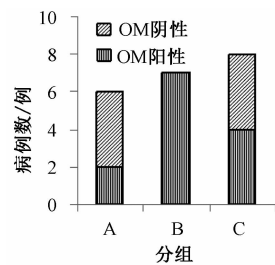
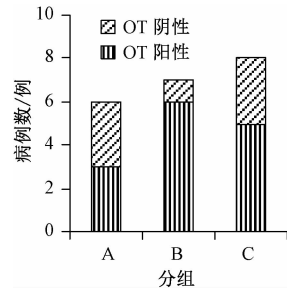


图3 鸡蛋过敏患者血清 sIgE 对蛋清主要过敏原反应统计结果

Figure 3 Responsiveness of the serum sIgE to egg allergens

3 讨论

鸡蛋富含蛋白质和微量元素, 尤其含有大量必

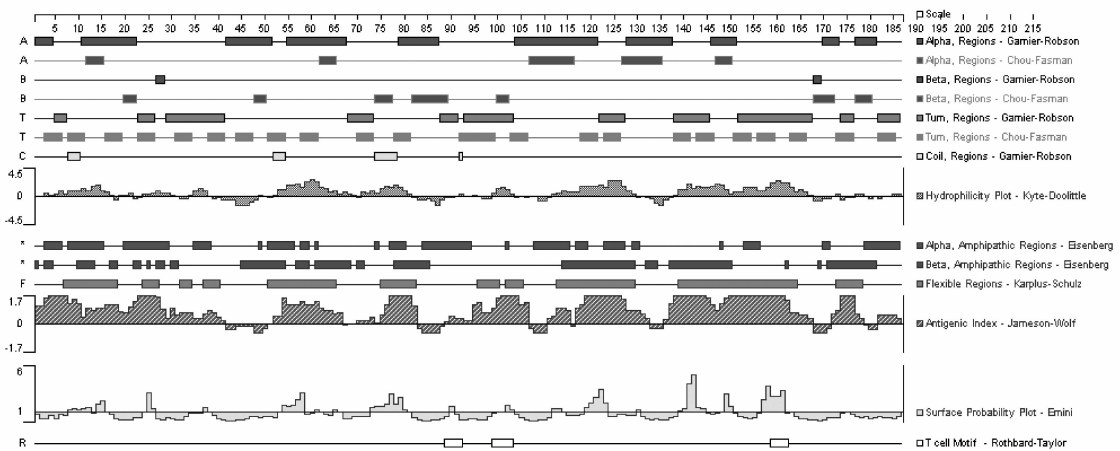


图4 卵类粘蛋白线性表位的初步预测

Figure 4 Prediction of linear epitopes in hen's egg allergen ovomucoid

表3 卵类粘蛋白合成表位信息

Table 3 Information of peptides in hen's egg allergen ovomucoid

序号	名称	编号	序列	纯度/%
1	AN10(aa1-10)	420855	AEVDCSRFPN	85
2	PL12(aa9-20)	420857	PNATDKEGKDVL	85
3	FN14(aa91-104)	422322	FNPVCGTDGVTYDN	85
4	VD12(aa113-124)	420859	VEQGASVDKRHD	85

表4 鸡蛋过敏患者血清 sIgE 所针对卵类粘蛋白抗原表位

Table 4 Ovomucoid's epitopes of the egg allergy patients

分组	编号	AN10 (aa1-10)	PL12 (aa9-20)	FN14 (aa91-104)	VD12 (aa113-124)
	9	-	+	-	-
B	10	+	-	-	-
	12	-	+	-	-
C	18	+	-	-	-

注：+ 表示阳性；- 表示阴性

须通过膳食补充的组氨酸,由于鸡蛋易消化、营养物质吸收率高,是婴幼儿理想的营养食品,但鸡蛋又是引起婴幼儿食物过敏的主要过敏原。鸡蛋过敏可引起婴幼儿严重的皮炎和皮肤湿疹^[5],还可以导致气源性过敏症,如过敏性鼻炎、支气管哮喘等^[6]。鸡蛋中的过敏原主要存在于蛋清中,目前已知有4种蛋白成分能引起过敏反应,分别是卵类粘蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶(lysozyme)。由于卵类粘蛋白对加热和消化酶相对稳定并且具有较强的免疫原性,故被认为是最主要的过敏原。

免疫斑点印迹结果显示,21例患者均可检测到卵白蛋白 sIgE, A组6例患者中有2例检测到卵类粘蛋白 sIgE, 3例检测到卵转铁蛋白 sIgE, 但信号相对较弱; B组7例患者中均可检测到卵类粘蛋白 sIgE, 6例患者可检测到卵转铁蛋白 sIgE; C组8例患者中5例可检测到卵类粘蛋白 sIgE, 5例可检测到卵转铁蛋白 sIgE。由以上结果可知,卵类粘蛋白作为鸡蛋过敏最重要的过敏原,1岁以内的患者较

少检测到其对应的 sIgE, 但1岁以上患者 sIgE 检出率明显升高; 卵白蛋白 sIgE, 21例患者均可检测到, 不随着年龄的变化而发生变化; 卵转铁蛋白 sIgE 在各年龄段均可被检测到, 但随着年龄的增长变化不明显。李婵等^[7]研究天津地区梭子蟹中过敏原组分, 证实食物主要过敏蛋白存在个体差异, 即不同个体间食物过敏存在异质性, 本研究也证实天津地区鸡蛋过敏儿童对过敏原存在异质性。根据文献^[8-9], 患者血清卵类粘蛋白 sIgE 水平和诊断年龄在预测鸡蛋过敏症状、判断鸡蛋过敏发展预后中有重要作用; 在本研究中, 鸡蛋过敏患者血清总 IgE B组高于A组和C组, 其趋势和卵类粘蛋白 sIgE 在各年龄段检出率变化趋势一致, 两者之间是否存在着某种联系, 仍需要进一步的证实。

决定过敏原的致敏作用的是抗原表位, 抗原表位包括构象表位和线性表位, 但线性表位在食物过敏中占有更重要的地位, 文献报道线性表位的致敏作用和鸡蛋、牛奶过敏的不同临床类型有关^[10-11], 卵类粘蛋白作为鸡蛋过敏最重要的过敏原, 其线性表位国外常有报道, Järvinen等^[12]应用 SPOT array 的方法, 利用23例鸡蛋过敏血清, 筛选出卵类粘蛋白的4段主要抗原表位, 分别为 OM 1-10, OM 9-20, OM 47-56 和 OM 113-124, Martínez-Botas等^[13]应用 Peptide Microarray 技术, 利用50例鸡蛋过敏患者血清, 筛选出3段主要抗原表位, 分别为 OM 4-20, OM 46-59, OM 91-104; 国内关于卵类粘蛋白抗原表位报道比较鲜见, 本课题组应用生物学软件 DNASTar 预测的4段抗原表位与上述报道基本吻合, 但本研究结果提示, 国外报道的卵类粘蛋白主要抗原表位在天津地区人群不是主要抗原表位, 卵类粘蛋白抗原表位在不同人种、不同地域之间可能存在差别。

综上所述,本课题组发现因年龄不同,鸡蛋过敏患者血清对卵类粘蛋白的反应性不同,个体之间也存在一定的差异;下一步应该获取更多临床病例资料,对卵类粘蛋白 sIgE 进行定量分析,以期发现不同年龄的患者血清卵类粘蛋白 sIgE 变化规律,对卵类粘蛋白的抗原表位进行深入的探讨,筛选出天津地区鸡蛋过敏患者卵类粘蛋白主要抗原表位,以卵类粘蛋白为靶点,研究预防和治疗鸡蛋过敏的新方法,为研发高特异度、高敏感度的鸡蛋过敏临床诊断试剂盒提供理论基础。

参考文献

- [1] Prescott S L, Pawankar R, Allen K J, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children [J]. World Allergy Organ J, 2013, 6(1): 21.
- [2] Benhamou A H, Caubet J C, Eigenmann P A, et al. State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy [J]. Allergy, 2010, 65(3): 283-289.
- [3] Dieguez M C, Cerecedo I, Muriel A, et al. Utility of diagnostic tests in the follow-up of egg-allergic children [J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(10): 1575-1584.
- [4] 相平,王瑞,周宇捷,等.体检人群血清 IgG 抗体检测及不耐受组分分析 [J]. 免疫学杂志, 2014(4): 359-362.
- [5] Kim J, CHANG E, HAN Y, et al. The incidence and risk factors of immediate type food allergy during the first year of life in Korean infants; a birth cohort study [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2011, 22(7): 715-719.
- [6] Ricci G, Patrizi A, Baldi E, et al. Long-term follow-up of atopic dermatitis: retrospective analysis of related risk factors and association with concomitant allergic diseases [J]. J Am Acad Dermatol, 2006, 55(5): 765-771.
- [7] 李婵,李韶深,任杰,等.天津地区梭子蟹中过敏原组分分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 421-424.
- [8] Ando H, Moverare R, Kondo Y, et al. Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(3): 583-588.
- [9] Kim J, Chung Y, HAN Y, et al. The natural history and prognostic factors of egg allergy in Korean infants with atopic dermatitis [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2009, 27(2/3): 107-114.
- [10] Lemon-Mule H, Sampson H A, Sicherer S H, et al. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(5): 977-983.
- [11] WANG J, LIN J, Bardina L, et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(3): 695-702, 701-702.
- [12] Järvinen K M, Beyer K, Vila L, et al. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy [J]. Allergy, 2007, 62(7): 758-765.
- [13] Martinez-Botas J, Cerecedo I, Zamora J, et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of ovomucoid with a peptide microarray immunoassay [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2013, 161(1): 11-20.

· 请示批复 ·

食品药品监管总局办公厅关于自制二氧化碳和氢氧化钙生产许可有关问题的复函

(食药监办食监一函〔2016〕187号)

内蒙古自治区食品药品监督管理局:

你局《关于制糖企业自制二氧化碳、氢氧化钙是否需要取得食品生产许可证的请示》(内食药监〔2016〕24号)收悉。经研究,现函复如下:

《中华人民共和国食品安全法》规定,国家对食品添加剂生产实行许可制度。《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014)规定,二氧化碳和氢氧化钙可在各类食品加工过程中作为加工助剂使用。《食品添加剂 液体二氧化碳》(GB 10621—2006)和《食品安全国家标准 食品添加剂 氢氧化钙》(GB 25572—2010)规定了食品添加剂二氧化碳和氢氧化钙的有关技术要求。因此,企业生产(包括自制)食品添加剂二氧化碳和氢氧化钙应依法取得食品生产许可。(来源:食品伙伴网)

(相关链接:<http://www.foodmate.net/law/shipin/188368.html>)

食品药品监管总局办公厅

2016年3月22日