

引起牛奶不耐受的蛋白成分分析

常艳敏 任杰 李婵 相平 周宇捷 Anna Xue 李会强

基金项目:天津市卫生局科学基金项目(2010KY12)

作者单位:300100 天津市,天津市南开医院检验科(常艳敏)

300070 天津市,天津医科大学(任杰 李婵 相平 周宇捷 李会强)

98100 USA, Intern of Washington State(Anna Xue)

通讯作者:李会强, E-mail: lihuiqiang1965@163.com

【摘要】 目的 分析引起牛奶不耐受的蛋白成分。**方法** 脱脂奶经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,干法转至 PVDF 膜并作为分析对象,以牛奶不耐受患者血清特异性 IgG(specific IgG, sIgG)作为识别抗体,以酶标记兔抗人 IgG 作为标记抗体,经免疫印记技术分析 sIgG 结合的蛋白成分。**结果** 脱脂奶经 SDS-PAGE 分析,主要成分酪蛋白(casein, CN)、 β 乳球蛋白、 α 乳白蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)条带清晰。阳性血清的免疫印记图谱显示 3 条明显区带,对应的蛋白组分为:免疫球蛋白、BSA 和 CN。**结论** 免疫球蛋白、BSA 和 CN 是引起牛奶不耐受的主要成分,且个体之间未见明显差别。

【关键词】 牛奶;食物不耐受;特异性 IgG;免疫印记

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.011

Analysis of the protein compositions leading to milk intolerance

¹CHANG Yan-min, ²REN Jie, ²LI Chan, et al. ¹Department of Clinical Laboratory, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China ²Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

【Abstract】 Objective To analyze the protein compositions leading to milk intolerance. **Methods** Skim milk protein was isolated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and dry transferred to PVDF membrane, the protein was used to be the object of analysis. Then specific IgG (sIgG) in serum of the milk intolerance patients was used to be the antibody to distinguish the skimmed milk protein. Enzyme labeled antibody was made to be the second antibody, and the proteins connected with the sIgG were detected by immunoblot technical analysis. **Results** The main components of skim milk including casein (CN), beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin (BSA) showed clear zones through SDS-PAGE analysis. Immunoblot map of positive serum showed three clear zones, corresponding to the proteins: immunoglobulin, BSA, and CN. **Conclusion** Immunoglobulin, BSA and CN are the main components leading to milk intolerance, there is no significant difference between individuals.

【Key words】 Milk; Food intolerance; Specific IgG; Immunoblot

与食物过敏不同,食物不耐受(food intolerance, FI)是机体免疫系统针对某种或多种食物发生的过度保护性免疫反应,使机体产生食物特异性 IgG (specific IgG, sIgG)抗体,引起相应组织发生炎症反应,表现为全身各系统的症状或疾病^[1]。国内外的研究^[2,3]证明 FI 患者血清中存在高水平 sIgG 抗体;同时,检测血清 sIgG 对 FI 诊断和特异性脱敏治疗具有重要价值。然而,无论是建立血清食物 sIgG 检测方法,还是临床进行脱敏治疗,二者均需要制备已知抗原(或耐受原)。但是,关于引起 FI 成分的研究远没有食物过敏原深入和清晰。因此,有必要分析鉴别引起 FI 的蛋白组分,为建立食物 sIgG 检测方法提

供已知抗原,并为脱敏治疗提供针对性更强的耐受原。牛奶是我们重要的食物营养来源,且牛奶引起不耐受的发病率位居首位。为此,本文研究应用牛奶不耐受患者血清 sIgG 作为鉴别探针(识别抗体),采用酶免疫印迹技术,对牛奶中诱导 sIgG 抗体产生的蛋白组分进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集天津市中医药研究院附属医院进行 FI 检测阳性的患者 30 例,男 18 例,女 12 例,平均年龄(27.1±8.4)岁,所有患者均存在饮用牛奶后的不适症状,牛奶 sIgG 检测阳性。收集同期健康体检者 30 例,男 16 例,女 14 例,平均年龄(26.1±

7.8)岁,均无过敏史,常见食物 sIgG 检测阴性。受检者血清均以 BIOMERICA 公司生产的酶联免疫法检测试剂盒进行检测。将牛奶特异性抗体中等强度阳性以上的标本混合作为阳性血清,选择牛奶特异性抗体阴性的标本作为阴性血清。血清分离后-20℃保存备用。

1.2 主要仪器与试剂 垂直板型电泳仪(Mini P-4, 北京凯元信瑞仪器公司);干转膜仪(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(ChampGel 北京赛智公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、Tween-20 均购自 Sigma 公司;蛋白分子量标准(SM0671),购自 MBI Fermentas 公司;兔抗人 IgG-AP,购自 Southern Biotech 公司。

1.3 牛奶蛋白组分的电泳分离 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)技术,用不连续系统进行垂直板电泳,对制备的脱脂奶进行分析。浓缩胶为 5%,分离胶为 12%;样品浓度为 3.5 mg/mL,与上样缓冲液以 1:4 混合,煮沸 5 min,上样量 15 μ L;电泳条件恒压,65 V 电压堆积 40 min,135 V 电压分离,待溴酚蓝指示到达底部,电泳完毕,考马斯亮蓝染色 40 min,脱色液充分洗脱。

1.4 牛奶各组分免疫印迹条的制备 采用 Western-blot 技术。SDS-PAGE 电泳后,采用干转方式进行转膜。转膜条件:15 V 电压下 30 min,干转到 PVDF 膜上;随后采用 2%聚乙烯醇溶液封闭过夜。

1.5 牛奶不耐受蛋白组分的鉴别 将已封闭的膜置入反应槽内,分别加入阳性混合血清、阴性混合血清和单例阳性血清。用 TBST 将血清稀释 20 倍,室温摇床孵育 3 h;弃血清加入 TBST 溶液,洗涤 5 次,每次 5 min;加入标记抗体(兔抗人 IgG-AP)应用液(稀释度 1:8000),室温摇床孵育 0.5 h;弃标记抗体加入 TBST 溶液,洗涤 5 次,每次 5 min;加入 AP 底物避光显色 10 min,将膜用蒸馏水洗净,风干后观察结果。

2 结果

2.1 脱脂奶蛋白组分分析 脱脂奶经 SDS-PAGE 分析,结果如图 1 所示。牛奶中主要组分酪蛋白(casein, CN) (30.0×10^3)、 β 乳球蛋白(beta-lactoglobulin, BLG) (18.3×10^3)、 α 乳白蛋白(alpha-lactalbumin, ALA) (14.2×10^3)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) (67.0×10^3)条带清晰,其他组分

因含量低未显示蛋白区带。

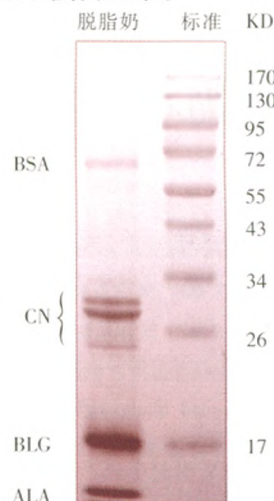


图 1 牛奶蛋白组分分析(SDS-PAGE)结果

2.2 牛奶不耐受蛋白组分分析 以牛奶不耐受患者混合(单例)血清 sIgG 作为第一识别抗体,以碱性磷酸酶标记兔抗人 IgG(兔抗人 IgG-AP)作为标记抗体。应用酶免疫印迹技术,可以检测 PVDF 膜中与特异性抗体结合的蛋白区带,结合分子量标准可推测牛奶中引起不耐受的蛋白组分。实验结果如图 2 所示。

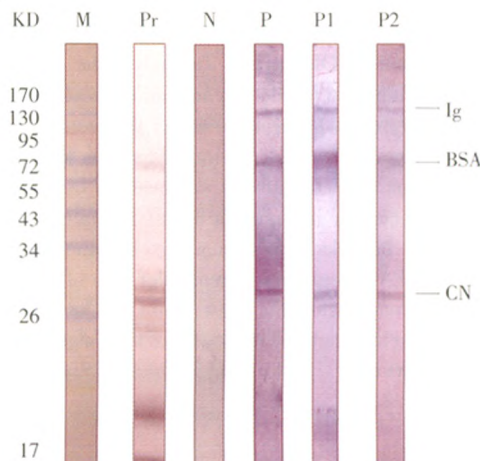


图 2 牛奶不耐受蛋白组分分析结果

注:M 为分子量 Marker;Pr 为脱脂奶电泳图谱;N 为阴性对照印记图谱;P 为混合阳性血清印记图谱;P1 和 P2 为单例阳性血清印记图谱

结果显示,阴性对照血清未见显示区带,说明正常人血清不含有与脱脂奶蛋白组分相结合的 sIgG;阳性混合血清显示三条印记条带,结合相对分子质量和脱脂奶蛋白成分分析,分别为针对免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) (160.0×10^3)、BSA (67.0×10^3)、CN (30.0×10^3)的 sIgG。另外,单例阳性血清与混合血清显色条带相同,且个体之间不存在差异,只是条带深浅不同。

3 讨论

FI 涉及免疫因素(变态反应)和非免疫因素(消化酶缺陷),其中,前者患者血清中会出现较高水平 sIgG 抗体,这些抗体正是免疫系统对食物蛋白过强免疫应答的结果。目前对于牛奶引起过敏反应(IgE 介导)的研究比较深入,认为 BLG、ALA、CN 等为主要过敏原^[4]。然而,FI 与食物过敏反应机制不同,引起免疫应答的牛奶蛋白组分是否与之相同,尚未见文献报道。因此,分析鉴别导致牛奶不耐受的蛋白组分对进一步探讨牛奶不耐受的发生机制具有一定理论价值,同时对建立高质量的 sIgG 检测试剂和指导临床治疗具有实用价值。

酶免疫印迹技术已广泛应用于食物过敏原的分析和鉴别。利用 SDS-PAGE 技术可分离食物中各种蛋白组分,以过敏患者血清作为识别抗体(探针),经酶免疫印迹技术能够分析、鉴别与特异性抗体结合的蛋白区带即被识别为过敏原^[5,6]。本文研究将脱脂奶经 SDS-PAGE 分析,电泳图谱显示脱脂奶各种蛋白组分完整,且蛋白条带清晰,具备转膜条件。免疫印迹结果显示:与牛奶不耐受患者血清特异性 IgG 结合的蛋白组分主要集中在大分子物质(如 Ig、BSA、CN),而 BLG 和 ALA 并未显示明显的印记条带。因此,本文研究认为导致牛奶不耐受的蛋白组分与导致牛奶过敏的蛋白组分存在差别,Ig、BSA 和 CN 为主要不耐受原;同时发现,牛奶不耐受个体之间牛奶 sIgG 的滴度(效价)虽然不同,但显色条带不

存在明显差别,推测引起牛奶不耐受的蛋白组分基本相同。然而,由于研究病例不足,尚需进一步扩大病例数才能得出最终结论。研究^[7]发现引起 FI 的因素很多,个体消化能力和免疫因素是两个重要因素。牛奶中大分子蛋白不容易彻底消化,同时某些免疫系统对未消化的蛋白(或多肽)过于敏感,二者同时作用导致牛奶不耐受。

4 参考文献

- 1 Bahna SL. Food allergy & intolerance. *Pediatr Ann*, 2006, 35: 692-693.
- 2 Gerez IFA, Shek LPC, Chng HH, et al. Diagnostic tests for food allergy. *Singapore Med J*, 2010, 51: 4-9.
- 3 Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, et al. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy*, 2002, 57: 83-91.
- 4 Benhamou AH, Schappi Tempia MG, et al. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly*, 2009, 139: 300-307.
- 5 陈寅,李会强,王平,等.以特异性 IgE 为探针的鸡蛋过敏原成分分析. *第三军医大学学报*, 2010, 32: 2030-2032.
- 6 DG Ebo, A Kuehn, CH Bridts, et al. Monosensitivity to Pangasius and Tilapia Caused by Allergens Other Than Parvalbumin. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2010, 20: 84-88.
- 7 Stefano Guandalini, Catherine Newland. Differentiating Food Allergies from Food Intolerances. *Curr Gastroenterol Rep*, 2011, 10: 426-434.

(收稿日期:2012-04-12)

(本文编辑:张志成)

消 息

2012 第六届检验医学新进展热点会议

中华医学会继续教育部定于 2012 年 7 月 25 日于北京举办第六届检验医学新进展热点会议。期间将安排参观北京大学人民医院检验科。本活动授 I 类继续教育学分。

1 会议专家

会议将邀请:郭健、左大鹏、马俊龙、乐家新、张时民、鄢盛凯、赵秀英、张捷、齐军、王辉、王北宁、王清涛、康熙雄、李永哲、毛远丽等专家进行专题讲座。

2 会议内容

主要内容为:1、医学实验室如何做好室内控制;2、出血性疾病的分层检验和标准化;3、尿液分析现状与质量控制;4、血细胞分析与质量控制;5、血常规检验的进展和病例分析;6、调制治疗的靶标—LDL-C, non-HDL-C;7、梅毒实验室

检测;8、糖尿病的实验室检测;9、肿瘤标志物检测的临床应用评价;10、细菌耐药与抗生素合理应用;11、临床免疫学方法学进展及质量控制;12、临床检验质量与安全监控;13、个体化评价与实验室诊断;14、自身抗体及临床应用价值;15、实验室生物安全;16、北京大学人民医院检验科参观考察学习等。

3 联系方式

联系人:李明、汪琪

电话:(010)51213558;51213556

传真:(010)51213550;51213551

地址:丰台区五间楼 10 号五岳大厦 A 座 D30 房间

邮编:100079