

蛋清中食物不耐受组分分析

任杰 常艳敏 李韶深 李会强

基金项目:国家“863”项目基金(2012AA022600);天津市中小企业创新基金(12ZXCXSY09500)

作者单位:300070 天津市,天津医科大学免疫教研室(任杰 李会强)

300100 天津市,天津市南开医院检验科(常艳敏)

300160 天津市,天津市中医药研究院附属医院检验科(李韶深)

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

【摘要】 目的 分析引起患者鸡蛋不耐受的主要蛋白组分。**方法** 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)分析蛋清粗提取物中的蛋白组分。以鸡蛋不耐受患者血清特异性 IgG 作为识别抗体,经 Western blotting 和间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析与患者血清特异性 IgG 结合的蛋白成分。**结果** 蛋清粗提物 SDS-PAGE 电泳结果主要有 4 个条带,相对分子质量分别为: 14×10^3 、 34×10^3 、 45×10^3 和 76×10^3 ,根据相对分子质量推测分别为溶菌酶、卵类黏蛋白、卵清白蛋白和卵转铁蛋白。患者血清的免疫印迹结果主要呈现 4 个条带,分别对应溶菌酶、卵类黏蛋白、卵清白蛋白和卵转铁蛋白,间接 ELISA 法结果显示四种纯化抗原均与患者血清有反应。**结论** 引起患者鸡蛋不耐受的蛋白主要有两种,分别为卵类黏蛋白和卵清白蛋白,其相对分子质量分别为 34×10^3 和 45×10^3 。

【关键词】 鸡蛋;食物不耐受;特异性 IgG;免疫印记;间接酶联免疫吸附试验

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.04.005

Analysis the protein components which caused egg intolerance

REN Jie¹, CHANG Yan-min², LI Shao-shen³, et al. ¹Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China ²Department of Clinical Laboratory, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China ³Department of Clinical Laboratory, Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300160, China

【Abstract】 Objective To analysis the protein components of egg leading to egg intolerance. **Methods** The components of protein extracted from egg were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The serum of patients with egg intolerance as the identification antibody. Western blotting and indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to identify the major components of egg protein which bound with the egg intolerance patients' serum specific IgG. **Results** The SDS-PAGE results showed four straps which relative molecular weight were 14×10^3 , 34×10^3 , 45×10^3 and 76×10^3 . They were lysozyme, ovomucoid, ovalbumin and ovotransferrin, respectively according to the relative molecular mass. The western blotting showed four straps which corresponding with lysozyme, ovomucoid, ovalbumin and ovotransferrin. The results of indirect ELISA method showed that the four kinds of purified proteins all had reaction with patients' serum. **Conclusion** There are two main proteins including ovomucoid and ovalbumin caused egg intolerance. The relative molecular weight are 34×10^3 and 45×10^3 , respectively.

【Key words】 Egg; Food intolerance; Specific IgG; Western blotting; Indirect ELISA

食物的不良反应被分为中毒性食物不良反应和非中毒性食物不良反应,其中和免疫机制关系密切的是非中毒性食物不良反应^[1]。非中毒性食物不良反应又分为 IgE 介导的食物过敏和非 IgE 介导的食物不耐受。与食物过敏不同,食物不耐受主要引起机体产生特异性 IgG 抗体,从而引起机体呼吸系统、消化系统、以及神经系统等一系列相关的临床症状^[2]。据近期报道^[3],食物不耐受还可能与肿瘤的发生有

关。所以食物不耐受越来越多的引起广大学者的注意。目前,对于食物不耐受的主要判定依据是血清中特异性 IgG 的存在,患者血清中特异性 IgG 含量的变化也是脱敏治疗疗效评估的指标^[4]。然而,有关食物不耐受的报道远不及食物过敏的相关报道深入。因此,本文研究致力于引起食物不耐受相关抗原的研究,为临床诊治提供可靠的实验依据。鸡蛋是人们日常饮食中的常见食材,但也是引起人们食物不耐

受的主要食物之一^[5]。本文研究利用鸡蛋不耐受患者血清(特异性 IgG)作为鉴别探针(识别抗体),采用酶免疫印记技术和间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),对鸡蛋中诱导特异性 IgG 抗体产生的蛋白组分进行分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 垂直板型电泳(Mini P-4,北京凯元信瑞仪器公司);电转印槽(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(ChampGel 北京赛智公司);酶标仪(美国 Thermo scientific 公司);NanoDrop 2000/2000c 分光光度计(美国 Thermo scientific 公司)。鸡蛋购于天津津工超市;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、SDS、四甲基乙二胺(TEMED)、Tween-20、卵清白蛋白、卵类黏蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶均购自 Sigma 公司;蛋白分子量标准(SM0671)购自 MBI Fermentas 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司);兔抗人 IgG-AP 购自 SouthernBiotech 公司;兔抗人 IgG-HRP、蛋清粗提总蛋白和四种纯品(卵清白蛋白、卵类黏蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶)分别包被的 96 微孔板、酶标抗体稀释液(0.1 MPB)、血清稀释液(10%的牛血清白蛋白)。

1.2 标本采集 血清标本均为天津市中研院附属医院进行食物不耐受检测的常规标本,检测试剂为 BIOMERICA 公司生产的 ELISA 法试剂盒。选取鸡蛋中等强度阳性以上的标本作为阳性血清,选择鸡蛋阴性的标本作为阴性血清。血清分离分装后-20℃保存备用。

1.3 方法

1.3.1 蛋清粗提液的制备 本研究选取蛋清作为鸡蛋不耐受的研究对象,进行蛋白粗提制备^[6]。取新鲜鸡蛋,收集蛋清,按 1:5 的体积比加入-20℃预冷丙酮,脱脂弃去丙酮,干燥。按 8 ml/g 的比例溶于 PBS 缓冲液,离心收集上清液即为蛋清过敏原粗提液。分装后于-20℃保存。

1.3.2 蛋清粗提蛋白的组分分析 采用 SDS-PAGE 技术,浓缩胶为 5%,分离胶为 12%;样品浓度为 8.7 mg/mL,和上样缓冲液以 1:3 混合,煮沸 5 min,每孔上样 6 μl;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。

1.3.3 蛋清蛋白组分分析 方法一:采用 Western blotting 技术。80 V 电压下 50 min,湿转到 PVDF 膜

上随后采用 5%脱脂牛奶封闭过夜;转印好的 PVDF 膜分别与 5 份阳性混合血清、5 份阴性混合血清和 5 份单例阳性血清反应。将膜用蒸馏水洗净,吹干后观察结果。方法二:间接 ELISA 法。将 25 μl 患者血清(1:20 稀释)加入已包被好的 96 微孔板中,37℃反应 1 h。洗板三次。再加入 125 μl 兔抗人 IgG-HRP(1:12 000 稀释),37℃反应 30 min,洗板。最后加入底物,37℃显色 10 min,加入终止剂,450 nm 处测 OD 值。

2 结果

2.1 蛋清蛋白组分分析 蛋清粗提物经 SDS-PAGE 分析,结果如图 1 所示。得到 5 种主要蛋白组分,相对分子质量分别为 76×10^3 、 55×10^3 、 43×10^3 、 34×10^3 、 14×10^3 ,其中 43×10^3 左右处的蛋白含量较高,电泳条带清晰。依据文献^[7]推测 76×10^3 、 43×10^3 、 34×10^3 、 14×10^3 可能分别为卵转铁蛋白、卵清白蛋白、卵类黏蛋白、溶菌酶。

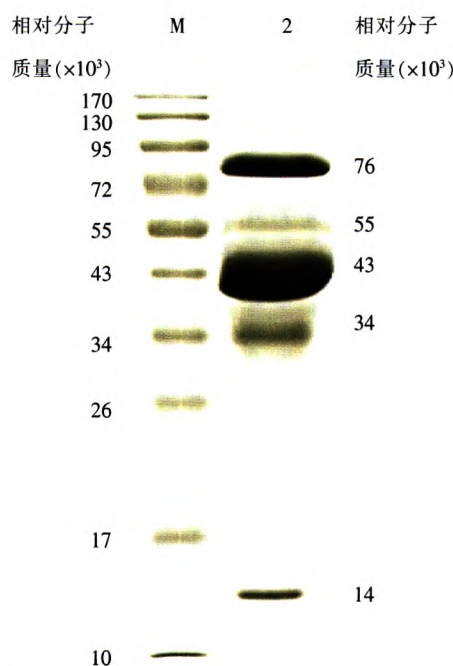


图 1 蛋清粗提物组分(SDS-PAGE)分析结果

注:M 为低分子量 Marker;2:蛋清提取物

2.2 Western blotting 检测结果 以鸡蛋不耐受患者混合(单例)血清(特异性 IgG)作为第一(识别)抗体,以碱性磷酸酶标记兔抗人 IgG(R&H IgG-HRP)作为标记抗体进行印迹实验。结果如图 2 显示。1 号阴性对照血清在 15×10^3 和 70×10^3 左右处出现两条较为明显的条带;2~6 号单例阳性血清分别在 15×10^3 、 25×10^3 、 45×10^3 和 70×10^3 左右处有四条明显的反应条带。根据相对分子质量推测,蛋白组分分别为溶菌酶、卵类黏蛋白、卵清白蛋白和卵转铁蛋白。

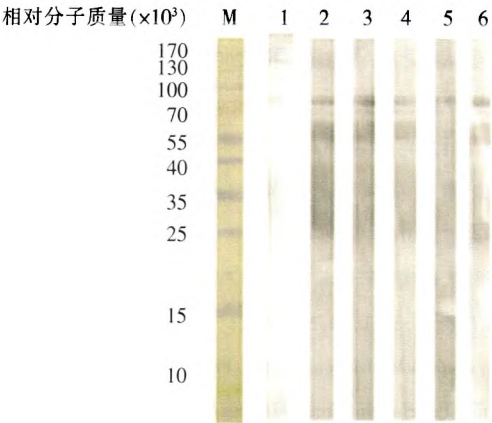


图 2 蛋清粗提物不耐受蛋白组分的 Western blotting 鉴定结果

注:M:低分子量 Marker;1:阴性对照印迹图谱;2~6:单例阳性血清印迹图谱

2.3 间接 ELISA 法检测结果 间接 ELISA 结果如表 1、图 3 所示;以提取的蛋清总蛋白作为包被检测抗原的阳性血清检测 OD 值低于卵清白蛋白、卵类黏蛋白纯品作为检测抗原的检测 OD 值;和包被了卵转铁蛋白作为检测抗原的检测结果基本相同;但高于包被溶菌酶纯品的检测 OD 值。因此,使用卵清白蛋白和卵类黏蛋白作为检测抗原时的检测灵敏度是相对较高的。

表 1 五种检测抗原间接 ELISA 法 OD 均值

组别	蛋清总蛋白	OVT	OVA	OVM	Lys
阴性对照 OD 值	0.181	0.226	0.157	0.174	0.155
阳性血清 OD 值	0.501	0.522	1.370	1.215	0.231

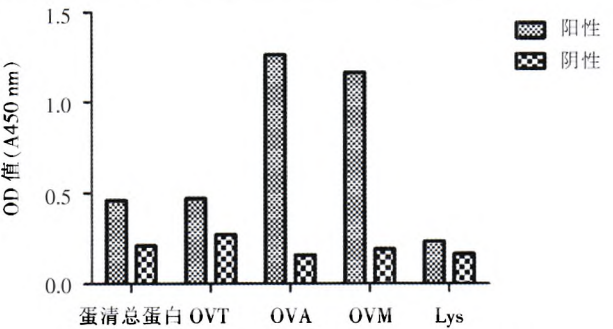


图 3 5 种检测抗原间接 ELISA 法柱状图结果

注:OVT 为卵转铁蛋白;OVA 为卵清白蛋白;OVM 为卵类黏蛋白;Lys 为溶菌酶

3 讨论

食物不耐受是近几年才逐渐受到人们关注的课题,目前对其研究尚不深入,相关的报道^[8]也不全面。与食物过敏反应不同,对食物不耐受的患者并不产生特异性 IgE 抗体,而是会出现较高水平特异性

IgG 抗体^[9]。研究^[10]表明,这些抗体会参与机体由于食物不耐受而产生的各种反应。鸡蛋是人们日常生活中营养物质摄取的普遍来源,其蛋白组分复杂,是引起儿童和成人食物不耐受的主要食物之一^[11]。

本文研究通过免疫印迹法检测出了引起人鸡蛋不耐受的两种主要蛋白,相对分子质量分别为:34×10³ 和 45×10³,据相对分子质量及文献^[7]报道推测,分别为卵类黏蛋白和卵清白蛋白。Western blotting 结果显示,正常人的阴性对照血清和卵转铁蛋白有条带反应,提示正常人血清中就存在抗卵转铁蛋白的 IgG 抗体。这可能是物种差异引起的,有待进一步研究探讨;而溶菌酶的阳性反应较弱,印迹反应的结果显示,阳性血清和阴性对照血清结果差别不明显。卵类黏蛋白和卵清白蛋白组分和不同患者血清中特异性 IgG 反应基本相同,两种蛋白之间也未见明显差异。单例患者的免疫印迹结果基本没有差别,这提示我们,鸡蛋引起的不同人食物不耐受的组分不同于鸡蛋过敏反应^[12],不同患者对于鸡蛋的不耐受的组分没有异质性。

根据间接 ELISA 实验结果显示,蛋清中的四种蛋白和患者血清中的特异性 IgG 均有反应。阳性混合血清卵清白蛋白和卵类黏蛋白的吸光度值较高,其 P/N 比值分别达到了 8.72(1.370/0.157)和 6.98(1.255/0.174)。而卵转铁蛋白和溶菌酶的阳性对照和阴性血清的 P/N 比值较小,分别为 2.31(0.522/0.226)和 1.49(0.231/0.155)。综上所述,蛋清粗提物中引起患者食物不耐受的蛋白主要有两种,分别为相对分子质量为 34×10³ 的卵类黏蛋白和 45×10³ 的卵清白蛋白。经过对 ELISA 结果的数据进行分析后,认为该方法可以有效区分阴性和阳性患者,这就为接下来方法学的建立提供了前提条件。ELISA 检测体系可以有效的区分鸡蛋不耐受患者和正常人,提高了检测的灵敏度。接下来我们将进行 ELISA 试剂盒的进一步研究,完善 IgG 的 ELISA 检测体系,并对其进行方法学评估,从而实现临床鸡蛋不耐受患者的可靠、快速、灵敏和特异的检测,进而为疾病的诊疗建立更为有效的检测方法。

4 参考文献

1 Guandalini S, Newland C. Differentiating food allergies from food intolerances. Curr Gastroenterol Rep, 2011, 13:426-434.

2 Palmieri B, Esposito A, Capone S, et al. Food intolerance: reliability and characteristics of different diagnostic alternative tests. Minerva Gastroenterol Dietol, 2011, 57:1-10.

3 Patel NJ, Jenzarli A. Does food intolerance play a role in recurrent

- respiratory papillomatosis? *Int Forum Allergy Rhinol*, 2012, 2: 85-88.
- 4 Vojdani A. Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6: 22.
- 5 徐卫华, 符生苗, 赵英. 690 例食物不耐受 14 种 IgG 抗体检测结果分析. *中国热带医学*, 2011, 11: 1353-1354.
- 6 Omana DA, Wang J, Wu J. Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878: 1771-1776.
- 7 Everberg H, Brostedt P, Oman H, et al. Affinity purification of egg-white allergens for improved component-resolved diagnostics. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 154: 33-41.
- 8 Zopf Y, Baenkler HW, Silbermann A, et al. The differential diagnosis of food intolerance. *Dtsch Arztebl Int*, 2009, 106: 359-369.
- 9 常艳敏, 任杰, 李婵, 等. 引起牛奶不耐受的蛋白成分分析. *实用检验医师杂志*, 2012, 4: 111-113.
- 10 马悦, 高泽斌, 李季. 食物不耐受特异性 IgG 抗体检测的临床应用. *放射免疫学杂志*, 2010, 4: 474-475.
- 11 邱大为, 祝继华, 向瑜, 等. 体检人群 14 种食物不耐受血清特异性 IgG 检测. *重庆医学*, 2011, 40: 242-243.
- 12 Maehashi K, Matano M, Irisawa T, et al. Primary Structure of Potential Allergenic Proteins in Emu (*Dromaius novaehollandiae*) Egg White. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 12530-12536.
- (收稿日期: 2013-11-05)
(本文编辑: 陈淑莲)

中华医学会第八次全国中青年检验医学学术会议

由中华医学会、中华医学会检验分会主办的第八次全国中青年检验医学学术会议定于 2014 年 4 月 17-19 日在济南市召开。全国中青年检验医学学术会议是中国检验医学专业的一项大型学术活动, 近年来, 随着检验医学的迅猛发展, 中国中青年检验工作者开拓进取, 成绩斐然, 为实时有效地展示他们的学术成果并促进学术交流, 全国中青年检验医学学术会议每 2 年举行一次。届时将邀请国内外知名专家就检验医学及相关学科的最新研究进展进行学术演讲。会议将进行优秀论文评奖, 同时举行临床检验设备展览会。会议将授予国家级继续教育学分。

1 征文范围

(1) 临床基础检验和血液学检验: 血液学、体液学、细胞形态学、血液病基因诊断、血栓与止血、血型与输血等临床与基础研究;

(2) 临床生化检验: 临床生物化学检验技术和方法学研究与应用、生物化学指标在临床各种疾病诊断中的应用与基础研究;

(3) 临床微生物学: 微生物细菌鉴定与药敏试验、院内交叉感染检测与控制、临床病毒学检测、实验室生物安全等相关研究;

(4) 临床免疫学诊断和分子生物学技术: 感染性疾病的实验室诊断、肿瘤标志物及其应用、自身免疫疾病的实验室诊断、免疫相关技术和分子生物学技术在临床诊断和监测中的应用等临床与基础研究;

(5) 临床实验室管理、医学实验室认可、临床实验室室内质量评价、临床实验室质量控制、临床实验室标准化等实践

与研究;

(6) 英文交流专场稿件(交流语言为英文, 评选以学术为主兼顾英文表达);

(7) 其他相关领域的基础与临床研究等。

2 征文要求

(1) 稿件要求: 论著、经验总结、综述和评论性文章均可, 必须是未公开发表过的文章。请在投稿时选择是否参加评奖。评奖入围论文原则上以原始研究(论著)为主, 第一作者年龄要求 1969 年 1 月 1 日以后出生, 请提供 1000 字的摘要, 摘要内容包括目的、方法、结果、结论。同一篇文章不能同时提交中文和英文稿件。请勿写成过于简短的内容提要形式。摘要请采用文字表述, 不要附图、表。无摘要或摘要字数过少者不能评奖。

(2) 投稿形式: 大会采用网上在线投稿, 不接受电子邮件投稿, 网址: www.cslm.org.cn/young2014。

(3) 会议成立优秀论文评奖专家委员会。论文以“科学性、创新性、实用性”为基本准则在来稿中进行遴选和评审, 最后以无记名投票形式产生一、二、三等奖。

3 时间及地址

会议时间: 2014 年 04 月 17 日-19 日

会议地址: 山东省济南市

4 联系方式

联系人: 贾玲

电话: 010-89292552

传真: 010-85158132

E-mail: lilyjia@163.com