

牦牛乳中主要过敏原研究

李海梅¹, 马 莺¹, 崔艳华¹, 汪加琦², 李启明², 何胜华¹

(1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 150090 哈尔滨; 2. 新希望乳业有限公司研究开发中心, 610041 成都)

摘 要: 为分析牦牛乳中主要的过敏原, 腹腔注射牦牛乳蛋白质免疫 Balb/C 小鼠. 末次免疫后, 小鼠摘眼球取血, 测定特异性抗体和组胺质量浓度. 在无菌条件下收集并培养脾淋巴细胞. Western-Blotting 方法分析牦牛脱脂乳中主要过敏原组分. 结果显示, 牦牛脱脂乳中主要的过敏原组分为 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白和 β -酪蛋白, 这3种过敏原蛋白质致敏强度的大小为 β -乳球蛋白 > α -酪蛋白 > β -酪蛋白. 因为脾淋巴细胞产生的细胞素 IL-4、IL-5 质量浓度较高而 IFN- γ 较低, 所以牦牛乳蛋白质为 Th2 应答.

关键词: 牦牛乳; 过敏原; 免疫; 酪蛋白; 免疫印迹

中图分类号: TS252

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)06-0097-05

Major allergens in yak milk

LI Hai-mei¹, MA Ying¹, CUI Yan-hua¹, WANG Jia-qi², LI Qi-ming², HE Sheng-hua¹

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2. Research and Development Central of New Hope Dairy Company, 610041 Chengdu, China)

Abstract: The aim of this study is to analyze the major allergens in yak milk. The Balb/C mice were sensitized by intraperitoneal injection with yak milk protein. After the last sensitization, blood was collected through the eyes for antibodies and histamine determinations. The lymphocytes derived from spleens were cultured under sterile condition. The major allergens in yak milk were analyzed using western-blotting. The results showed the major allergens in yak milk were β -lactoglobulin, α -casein, and β -casein, and the allergenous extent was β -lactoglobulin > α -casen > β -casein. The higher content of IL-4, IL-5 and lower IFN- γ produced by the spleen lymphocyte proliferation indicated that the yak milk protein was the Th2 response.

Key words: yak milk; allergen; immunity; casein; western-blotting

牛乳作为母乳的替代品是新生儿主要的营养来源,但是约有 1.8% ~ 7.5% 婴儿对牛乳是过敏的^[1]. 这种食品过敏反应常表现为腹泻、气喘、荨麻疹,有时可能会出现休克或死亡^[2-4]. 牦牛乳的营养价值极高,其脂肪、蛋白质和乳糖质量分数分别为脂肪 (5.5% ~ 7.5%)、蛋白质 (4.0% ~ 5.9%)、乳糖 (4.0% ~ 5.9%)^[5-6],被誉为天然的浓缩乳. 牦牛乳蛋白质同牛乳蛋白质一样也是由酪蛋白和乳清蛋白组成. 其中酪蛋白主要由 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白组成,乳清蛋白主

要由 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和血浆白蛋白组成^[7]. 牦牛乳蛋白质的氨基酸组成与牛乳相近,因此,牦牛乳可能也存在过敏原性^[8-10].

目前确定食品中过敏原最有效的方法是食品产物标记,但该方法不能覆盖到由于食品交叉接触而污染的过敏原. 另外还有应用基于蛋白质组学的质谱分析方法、液相色谱方法等^[11],但目前应用最广泛的还是免疫分析方法^[12]. 免疫印迹、酶联免疫 (ELISA) 已用来确定牛乳、蛋清、大豆和小麦蛋白等食品中的过敏原^[9,13-15].

本研究主要通过免疫印迹和酶联免疫的方法分析牦牛乳蛋白质中主要的过敏原. 小鼠腹腔注射牦牛乳中 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白,通过分析受试小鼠血浆中的特异性抗体 sIgG、sIgE 的质量浓度,细胞因子 IL-4、IL-5、IFN- γ 的质

收稿日期: 2011-04-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871953).

作者简介: 李海梅 (1974—),女,博士研究生,讲师;

马 莺 (1961—),女,教授,博士生导师.

通信作者: 马 莺, maying@hit.edu.cn.

量浓度和受试小鼠血浆中的组胺质量浓度,评价牦牛乳蛋白质的过敏性,并利用 Western-blotting 确定脱脂牦牛乳过敏原组分,为牦牛乳过敏症防治提供理论论据。

1 实验

1.1 实验材料

1.1.1 试剂和牦牛乳样品的制备

Concanavalin A 购于 Sigma 公司 Co. (C2010);山羊抗小鼠 IgE 和 IgG 抗体,IL-4、IL-5、IFN- γ 试剂盒购于莱博赛斯生物技术公司(哈尔滨,中国);增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购于 Tiange 生物技术公司(北京,中国);PVDF 膜 Millipore 公司.其他试剂均为分析纯。

牦牛乳 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白的质量分数分别为 87.13%、88.58%、80.00%,由哈尔滨工业大学食品科学与工程学院提供.用 0.05 mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液分别将牦牛乳 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白溶液的质量浓度调整为 0.5 g/L。

1.1.2 实验动物

Balb/c 小鼠,洁净二级,雌性,4~6 周龄,18~20 g,购于哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 腹腔注射牦牛乳蛋白质免疫 Balb/c 小鼠

Balb/c 小鼠随机分成牦牛脱脂乳组、 β -乳球蛋白组、 α -酪蛋白组、 β -酪蛋白组和对照组,每组 6 只.小鼠饲养到 6~8 周龄后开始免疫,分别取 0.5 g/L 的牦牛脱脂乳、 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 β -乳球蛋白与氟氏佐剂等体积混匀后,腹腔注射每组小鼠 0.2 mL/只;对照组小鼠腹腔注射等体积的 PBS 和氟氏佐剂混合液.首次免疫后在第 3 周、第 4 周共两次加强免疫,每次免疫后观察过敏症状.在第 5 周小鼠禁食 1 夜,次日小鼠摘眼球取血,在 $5\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min 得血清.在小鼠血中加 30~40 μL 7.5% 钾-EDTA 后, $5\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min 得血浆.在无菌条件下解剖取脾脏,并制得脾淋巴细胞进行培养。

1.2.2 Western-Blotting 分析牦牛乳中主要过敏原组分

牦牛脱脂乳 SDS-PAGE 电泳后,凝胶在转移缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl,192 mmol/L 甘氨酸,20% 甲醇,pH8.3)中用电转移的方法将蛋白质转移至硝酸纤维膜上.在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、90 mA 条件下转移 2 h 后,将转移完毕的硝酸纤维膜在 TBST 缓冲液

(20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween-20)中漂洗 1 次,转入到 10 mL 3% BSA 溶液中在脱色摇床上缓慢摇动,室温(25 $^{\circ}\text{C}$)封闭 1 h.封闭完成后,直接在封闭液中加入羊抗鼠 IgG-HRP 10 μL ,在脱色摇床上缓慢摇动,室温(25 $^{\circ}\text{C}$)反应 1 h.反应完成后将硝酸纤维膜在 TBST 缓冲液中漂洗 3 次,每次 10 min.再将硝酸纤维膜浸在 10 mL 的 TBST 缓冲液中,并加入 10 μL 的脱脂乳免疫小鼠抗血清,室温(25 $^{\circ}\text{C}$)反应 1 h.反应完成后,硝酸纤维膜在 TBST 缓冲液中漂洗 3 次,每次 10 min.用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色,显色后用水终止反应,结果扫描保存。

1.2.3 间接 ELISA 检测过敏原特异性抗体 IgG 和 IgE

96 孔板分别用 20 mg/L 的牦牛乳 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白和 β -酪蛋白(溶于 0.1 mol/L, NaCO_3 溶液, pH9.6)包被,4 $^{\circ}\text{C}$ 过液.用洗液(50 mmol/L Tris,0.14 mol/L NaCl,0.05% Tween20)洗板 3 次,每次 3 min.用封闭液 150 μL /孔(50 mmol/L Tris,0.14 mol/L NaCl,1% BSA)封闭每孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中温育 2 h 后用洗液洗板.100 μL 的 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白和 β -酪蛋白组小鼠血浆样品(1:10 稀释)加到各自包被的孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h.孵育结束后,用洗液洗板 5 次,每次 3 min,再向每孔中加 100 μL 的羊抗鼠 IgG 或 IgE 抗体,在室温条件下孵育 1 h.同上洗涤.样品用 3,3'-5,5'-tetramethyl-benzidine (3,3'-5,5'-四甲基苯胺,TMB)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、暗室染色 30 min.染色结束后向每孔中加终止液(0.5 mol/L H_2SO_4) 50 μL 终止反应,最后在 450 nm 波长下读取吸光值,并以此波长下的光密度表示 IgG 和 IgE 的含量。

1.2.4 小鼠免疫血浆中组胺的测定

利用酶联免疫的方法测定 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白和 β -酪蛋白组小鼠免疫血浆中组胺的量.测定方法参照组胺测定试剂盒说明。

1.2.5 脾淋巴细胞培养

末次免疫后 30 min,无菌条件下分离脾细胞,去除结缔组织,在培养皿中剪切成数立方毫米大小的组织块,用 Hanks 液冲洗血液后,将组织块转移至 70~100 μm 孔径的尼龙或不锈钢筛网上,用空针内芯轻轻挤压研磨组织,并不断用 Hanks 液冲洗.将细胞悬液再依次通过 150 目和 600 目的不锈钢滤网以形成单个细胞悬液.收集筛网过滤过的细胞悬液于离心管,1 500 r/min 5 min.用溶解液(NH_4Cl ,1.7 mol/L; KHCO_3 ,0.12 mol/L; EDTA,

0.009 mol/L)在4℃条件下溶解红细胞15 min.再次离心洗涤,重悬细胞,作细胞计数.以上操作过程中,细胞均置于0~4℃冰浴中.脾细胞用DMEM+10% FBS培养,37℃、湿润的5% CO₂环境.

1)脾淋巴细胞增殖分析——MTT 比色法

分别取β-乳球蛋白、α-酪蛋白和β-酪蛋白组小鼠脾细胞悬液加入24孔培养板中,其中实验孔加0.5 mL,对照孔加0.5 mL.再在实验孔中加30 mg/L的 ConA 0.05 mL,对照孔加完全培养基0.5 mL,混匀后置37℃、5% CO₂ 孵育72 h.培养结束前4 h,每孔轻轻吸上清液700 μL,加入700 μL不含小牛血清的1640培养液,同时加MTT(5 g/L) 50 μL/孔,混匀后继续培养4 h,每孔加1 mL的盐酸异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解,然后分装到96孔板中,置酶标仪(波长分别为570和630 nm)测定吸光度值.

2) ELISA 法检测细胞因子质量浓度

各实验组小鼠死后取脾脏,并在无菌条件下制得脾细胞淋巴细胞.将各实验组脾淋巴细胞分别悬浮在完全培养基中(RPMI-1640加10%小牛血清,1%青霉素/链霉素和1%谷氨酸盐).细胞悬浮液在24孔板中培养(2×10⁶细胞/孔),每孔中加2 mg/L的伴刀豆球蛋白0.05 mL,并在各组实验孔中加入对应的牦牛乳β-乳球蛋白、α-酪蛋白和β-酪蛋白,72 h后收集上清液,用ELISA检测IFN-γ(干扰素)、IL-4、IL-5(白细胞介素)的水平.

1.2.6 统计分析

采用SPSS13.0软件进行统计分析. *t* 检验分析数据间是否存在统计学意义(*P* < 0.05).

2 实验结果

2.1 SDS-PAGE 和 Western-Blotting 分析牦牛脱脂乳主要过敏原组分

牦牛脱脂乳的 SDS-PAGE 图谱见图1. 牦牛脱脂乳中主要的蛋白质为α-酪蛋白、β-酪蛋白和β-乳球蛋白,酪蛋白的质量浓度远高于乳清蛋白的质量浓度.在 Western-blotting 中应用牦牛脱脂乳实验组小鼠血,羊抗鼠 IgG 能检测到3种蛋白质即α-酪蛋白、β-酪蛋白和β-Lg,如图2所示.从结果可基本确定牦牛乳中主要的过敏原蛋白质为α-酪蛋白、β-酪蛋白和β-Lg.

2.2 间接 ELISA 检测过敏原特异性抗体 IgG 和 IgE

为确定牦牛乳α-酪蛋白、β-酪蛋白和β-乳球蛋白诱发的特异性抗体 Ig G 和 Ig E,小鼠在未次

免疫后摘眼球采血,分离血清,用间接 ELISA 法检测 sIgG 及 sIgE,结果如图3、4.3个实验组小鼠血清中的 sIgG 滴度为25 600,而 sIgE 的滴度仅为640.且β-乳球蛋白实验组的 sIgG 和 sIgE 的量要高于α_{s1}-酪蛋白和β-酪蛋白实验组.说明在相同蛋白质质量浓度(0.5 g/L)的条件下,β-乳球蛋白的致敏性要高于α-酪蛋白、β-酪蛋白,α-酪蛋白的致敏性要大于β-酪蛋白.

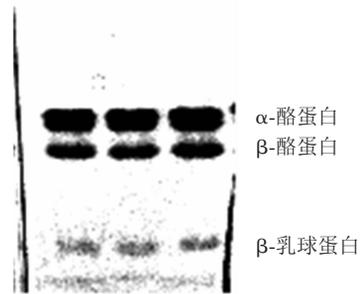


图1 牦牛脱脂乳 SDS-PAGE 图谱

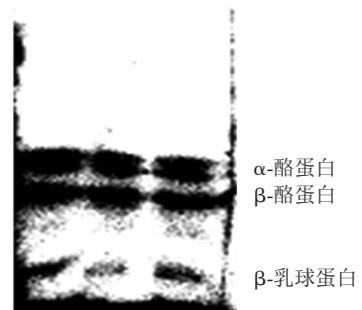


图2 牦牛脱脂乳 Western-Blotting 图谱

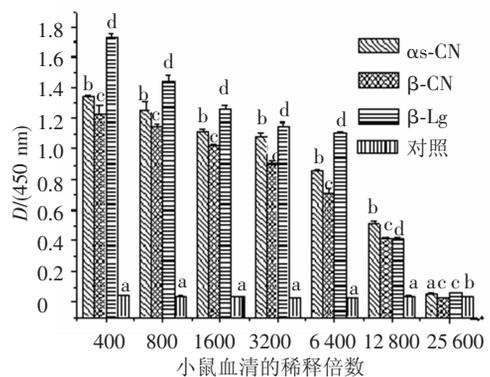


图3 小鼠免疫血清中的 sIgG 含量

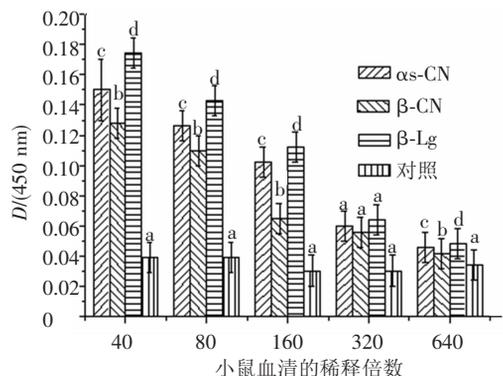


图4 小鼠免疫血清中的 sIgE 含量

2.3 小鼠免疫血浆中组胺的测定

为研究小鼠经腹腔注射牦牛乳蛋白质后引起的过敏反应,收集各实验组小鼠血浆,采用 ELISA 的方法测定小鼠血浆中组胺的质量浓度,结果见图 5. 小鼠血浆中组胺的质量浓度与血清中 sIgG 和 sIgE 具有相同的变化趋势. β -乳球蛋白组小鼠血浆中组胺的质量浓度为 $(38.71 \pm 2.32) \mu\text{g/L}$, 高于由 α -酪蛋白实验组的 $(30.62 \pm 2.10) \mu\text{g/L}$ 和 β -酪蛋白实验组的 $(21.76 \pm 1.98) \mu\text{g/L}$, 在实验过程中观察到 β -乳球蛋白组小鼠发生腹泻的数量也高于 α -酪蛋白和 β -酪蛋白组,这说明组胺质量浓度越高过敏症状越强.

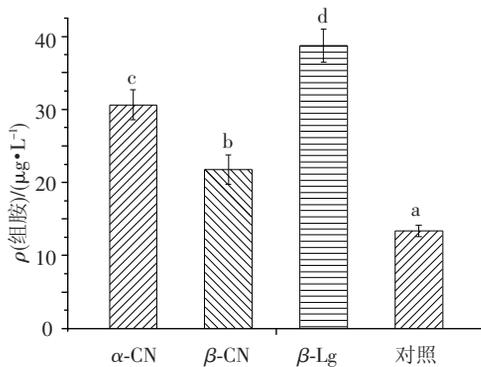


图5 小鼠免疫血浆中组胺的质量浓度

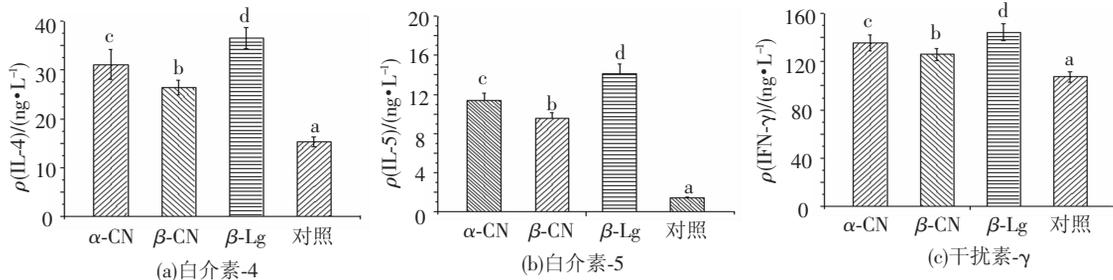


图7 脾淋巴细胞产生的细胞素质量浓度

3 讨论

首次应用动物实验通过 ELISA、Western blotting 方法对牦牛乳中 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白的过敏性进行研究. 牦牛乳中酪蛋白的质量浓度约为 40.21 g/L , 约是牛乳的 1.5 倍. 牦牛乳中酪蛋白约占总蛋白质的 77%, 而牛乳中酪蛋白约占总蛋白的 79.4%^[2,7]. 酪蛋白在总蛋白中所占的比例越高, 其潜在的致敏性越强^[16]. 因为酪蛋白过敏反应可能会触发 Th2 应答反应, 打破 Th1/Th2 之间的免疫平衡, 使婴儿倾向于受其他乳蛋白质的致敏如 β -乳球蛋白. 因此, 低的 α -酪蛋白可能会降低乳蛋白质的致敏性. 而牦牛乳中酪蛋白与乳清蛋白比值要低于牛乳, 因此推测牦

2.4 脾淋巴细胞增殖分析——MTT 比色法

小鼠摘眼球取血后在无菌条件下解剖小鼠, 取出小鼠脾脏, 分离脾淋巴细胞进行增殖培养, 并分析脾淋巴细胞对牦牛乳过敏原的反应. 结果见图 6. 各实验组小鼠脾淋巴细胞的水平均高于对照组. 由于 β -乳球蛋白实验组小鼠脾淋巴细胞的增殖幅度高于由 α -酪蛋白、 β -酪蛋白诱发组, 说明小鼠脾淋巴细胞对 β -乳球蛋白刺激的反应最强烈.

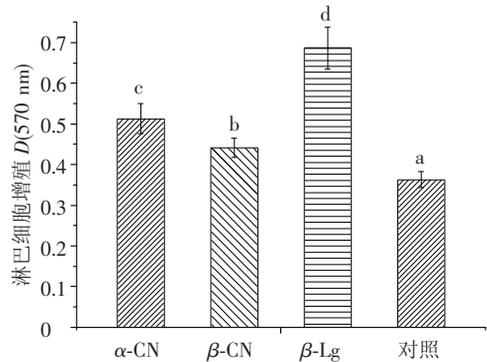


图6 小鼠脾淋巴细胞增殖分析

2.5 ELISA 法检测细胞因子质量浓度

实验中主要测定了细胞因子 IL-4、IL-5 和 IFN- γ 的质量浓度, 结果见图 7. β -乳球蛋白实验组小鼠体细胞产生的 IL-4 和 IL-5 的量高于 α -酪蛋白、 β -酪蛋白实验组, 与对照组相比 IFN- γ 水平没有明显增多.

牛乳的过敏程度可能会低于牛乳, 但这有待于进一步的研究.

过敏小鼠血浆中 IgG 抗体的量要高于 IgE 抗体的量. 可能是 IgG 抗体刺激了小鼠血浆中组胺的释放, 说明 IgG 也能介导 1 型超敏反应^[17-19]. 在巨细胞上当 IgG1 抗体与 Fc-受体相结合产生特异性的抗原抗体反应时, 会促使巨细胞脱颗粒, 也就增加了组胺的水平. 在各实验组小鼠血清中, β -乳球蛋白实验组小鼠血清中 sIgG 和 sIgE 的量要高于 α -酪蛋白和 β -酪蛋白实验组, 血浆中的组胺水平也有同样的规律.

T 淋巴细胞的增殖和细胞因子的产生对调节过敏疾病如气喘起着重要的作用^[20]. β -乳球蛋白实验组的脾淋巴细胞的增殖幅度要高于 α -酪

蛋白和 β -酪蛋白实验组,同样,在 β -乳球蛋白实验组中细胞因子IL-4和IL-5的量要高于 α -酪蛋白和 β -酪蛋白实验组,但IFN- γ 在各实验组中的量均较低.这些结果表明牦牛乳蛋白质过敏是Th2应答介导的,同时也说明 β -乳球蛋白的致敏性要高于 α -酪蛋白和 β -酪蛋白.组胺对调节Th1/TH2之间的免疫平衡也起到关键的作用.它能够加强Th2细胞因子的分泌如IL4、IL5,并抑制Th1细胞因子IFN- γ 的分泌^[21-22].

本研究首次应用免疫学的方法分析了牦牛乳中的过敏原.结果显示牦牛乳主要的过敏原为 α -酪蛋白、 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白,过敏强度的次序为 β -乳球蛋白 > α -酪蛋白 > β -酪蛋白,且牦牛乳蛋白质的过敏反应为Th2应答.牦牛乳具有广阔的应用前景,其过敏机制及与牛乳蛋白质过敏原的对比都应进行深入研究.

参考文献:

- [1] FOX P F, McSWEENEY P L H. Advanced dairy chemistry - 1 proteins[M]. 3rd edition. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003: 647 - 667.
- [2] SCOTT H S, MICHAEL A K. Food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(2): 116 - 125.
- [3] MALCOLM G. Chronic urticaria[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000, 105(4): 664 - 672.
- [4] ALBERT H R, ALBERT R J, KAHN U E, *et al.* Diarrhea caused by food allergy [J]. Journal of Allergy, 1956, 27(5): 424 - 436.
- [5] WALSTRA P G T J, NOOMEN A, JELLEMA A, *et al.* Dairy technology [M]. New York: Publisher Marcel Dekker, 1999: 71 - 143.
- [6] WIENER G, JIANLIN H, RUIJUN L. The yak[M]. Bangkok, Thailand: Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003: 1 - 167.
- [7] LI Haimei, MA Ying, DONG Aijun, *et al.* Protein composition of yak milk[J]. Dairy Sci Technol, 2010(90): 111 - 117.
- [8] BARBARA B B. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999, 103(6): 1191 - 1194.
- [9] AGAMY E I E I. The challenge of cow milk protein allergy[J]. Small Ruminant Research, 2007, 68(1/2): 64 - 72.
- [10] BAI W L, YIN R H, ZHENG Y C, *et al.* Cloning and molecular characterization of a yak α -lactalbumin cDNA from mammary tissue [J]. Livestock Science, 2010, 129: 122 - 128.
- [11] LINDA M, ANGELO V. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(5): 581 - 591.
- [12] GABRIELA S, NICOLE G, SUSANNE H, *et al.* Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, 124(5): 997 - 1002.
- [13] ZACHARY H R, JAE W P. Estimating the quantity of egg white and whey protein concentrate in prepared crabstick using ELISA [J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 575 - 581.
- [14] MA Xi, SUN Peng, HE Pingli, *et al.* Development of monoclonal antibodies and a competitive ELISA detection method for glycinin, an allergen in soybean [J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 546 - 551.
- [15] INGRID S, ANGELIKA F, ROLF M, *et al.* Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001, 107(5): 907 - 913.
- [16] VILLOSLADA L F, OLIVARES M, XAUA J. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(5): 1654 - 1660.
- [17] ANDREAS J B, CZESLAW H C, SABINE L M, *et al.* Acute urticaria caused by subcutaneous recombinant hirudin: evidence for an IgG-mediated hypersensitivity reaction [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1996, 98(5): 994 - 996.
- [18] ABDUL M B, MINORU H, KEISUKE M, *et al.* Contact hypersensitivity reaction to ovalbumin in newborn guinea pigs from maternally sensitized animals [J]. Journal of Dermatological Science, 1992, 4(3): 156 - 165.
- [19] DOUGLAS S R. The role of the T cell in asthma [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 126(6): 1081 - 1091.
- [20] KATHLEEN A P, MANZOOR M K. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance [J]. International Immunopharmacology, 2003(3): 909 - 920.
- [21] CARLSSON R, DOHLSTEN M, SJÖGREN H O. Histamine modulates the production of interferon-gamma and interleukin-2 by mitogen-activated human mononuclear blood cells [J]. Cell Immunol, 1985, 96(1): 104 - 112.
- [22] CARLSSON R, DOHLSTEN M, SJÖGREN H O. Histamine modulates the production of interferon-gamma and interleukin-2 by mitogen-activated human mononuclear blood cells [J]. Cell Immunol, 1986, 101(2): 493 - 501.