

一步法分离鸡蛋清中三种主要过敏原的研究

麻小娟^{1,2}, 习斌蓉³, 陈红兵^{1,4}, 高金燕^{2,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学生命科学与食品工程学院食品系, 江西 南昌 330047; 3.江西省妇幼保健院, 江西 南昌 330006; 4.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 为快速高效分离鸡蛋中主要过敏原开展鸡蛋过敏的研究, 本实验采用 DEAE-Sepharose FF 色谱柱一步分离鸡蛋中的三种主要过敏原卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶, 通过 SDS-PAGE 比对, 纯度均高于相应标准品纯度, 得率分别为 87.66%、55.87% 和 92.80%。本实验操作简便、设备简单、分离效率高, 是一种分离鸡蛋过敏原的好方法。

关键词: 卵白蛋白; 卵转铁蛋白; 溶菌酶; 鸡蛋过敏

Simultaneous Separation of Three Major Allergens in Hen's Egg White

MA Xiao-juan^{1,2}, XI Bin-rong³, CHEN Hong-bing^{1,4}, GAO Jin-yan^{2,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Department of Food Science, School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330006, China; 4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract Hen's egg is one of the most common causes of food allergy. In order to obtain egg white allergens as a material for further studies, three major allergens, i.e., ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme, were separated by DEAE-Sepharose FF chromatography, with recovery rates of 87.66%, 55.87 % and 92.80% and purities of higher than 90%, respectively.

Key words: ovalbumin; ovotransferrin; lysozyme; egg allergy

中图分类号: O658.13

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)22-0040-04

据报道, 大约有 2% 的成年人和 5%~8% 的儿童存在 IgE 介导的食物过敏, 它影响婴幼儿的正常生长发育和生活质量, 严重时导致急性皮炎和哮喘^[1]。其中鸡蛋通常被认为是引发过敏反应最常见的食物之一。目前公认的鸡蛋四大过敏原包括卵类黏蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶^[2-4], 分别占 11%、54%、12% 和 3.4%^[5]。已有文献表明鸡蛋主要过敏原的纯化方法很多, 包括盐析法^[6]、等电点沉淀法^[6]、离子交换法^[7]和膜过滤法^[8]。其中, 盐析法、等电点沉淀法步骤繁琐, 需要反复沉淀以达到提纯的目的, 且前者要经过脱盐处理; 膜过滤法的条件要求较苛刻, 需要经过大量的摸索实验; 离子交换法则以其步骤简单, 对蛋白活性影响小的优势已被广泛接受。本实验采用 DEAE-Sepharose FF 弱阴离子交换柱一次分离三种主要过敏原, 将为鸡蛋过敏研究提供良好的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋 农贸市场。

卵白蛋白标准品(纯度>98%) 上海捷瑞生物工程有限公司; 溶菌酶标准品(纯度>90%)、卵转铁蛋白标准品(纯度>90%) Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机 Backman 公司; DHL-A 电脑恒流泵、HD21-1 核酸检测仪、BSZ-160 自动部分收集器、梯度制造器 上海青浦沪西仪器厂; 迷你型蛋白电泳仪美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 蛋清预处理^[9]

鲜鸡蛋表面洗净后小心地敲破蛋壳, 用分蛋器使蛋

收稿日期: 2009-07-05

基金项目: 江西省自然科学基金项目(2008GZN0040);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目(SKLF-TS-200820); 江西省研究生创新专项资金项目

作者简介: 麻小娟(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品卫生与安全。E-mail: martha_ok@126.com

* 通讯作者: 高金燕(1967—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品卫生与安全。E-mail: gjy1967@yahoo.com.cn

清与蛋黄分开。将蛋清缓慢搅拌(以不引起泡沫为准)至胶状部分破坏;用蛋液两倍体积的 Tris-HCl(50mmol/L, pH7.5)稀释后,在 4℃ 条件下缓慢搅拌 3h,以沉淀球蛋白,然后在 4℃、转速为 10000r/min 条件下,离心 45min 去除沉淀;取上清液备用。

1.3.2 层析柱的制备和蛋白的分离

1.3.2.1 层析柱的制备

将溶胀在体积分数 20% 乙醇中的 DEAE-Sepharose FF 层析介质取出适量,用蒸馏水置换 4~5 次后,沸水浴煮 30min。待介质冷却,用玻璃棒搅匀后缓缓装柱(2.0cm × 22cm),最终柱体积约为 40ml。

1.3.2.2 蛋白的分离

用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)平衡至紫外监测仪读数稳定。按照介质的吸附量加入处理过的蛋清,待穿过峰洗出后用含 0~0.12mol/L NaCl 50mmol/L Tris-HCl(pH5.5)梯度洗脱,分部收集,直至读数回到水平。

1.3.3 蛋白纯度检测^[10]

将分离所得蛋白收集,取样 10 μl(或适量多取,以使电泳图更清晰)与 10 μl 上样缓冲液混合后,取 15 μl 加入聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)胶孔内(15% 分离胶,5% 浓缩胶),电流设置为 10mA、15min 和 20mA、1h。电泳后,凝胶经考马斯亮蓝显色,比标准品定量分析。

1.3.4 蛋白浓度测定

采用 Lowry 法测定蛋白质的质量浓度。以 BSA 标准品作标准溶液,制作标准曲线: $y = 0.0007x + 0.0025$ ($R^2 = 0.9962$),在 0~150 μg/ml 质量浓度范围内呈现良好的线性关系。适度稀释样品,使其质量浓度在准曲线范围内,从标准曲线中查未知样品质量浓度(图 1)。

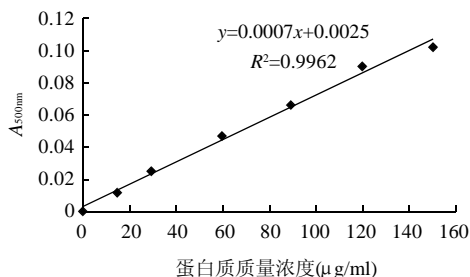


图1 Lowry 法测蛋白浓度的标准曲线

Fig.1 Standard curve of Lowry assay of protein concentration

1.3.5 过敏原蛋白提取率的计算

依据 Lowry 法测定的蛋白质量浓度,其中卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶的质量分数分别为 54%、12% 和 3.4%,再结合收集的蛋白液体积,按照下式计算蛋白提取率。

$$\text{蛋白提取率(\%)} = \frac{\text{蛋白质量浓度} \times \text{收集体积}}{\text{上样量} \times \text{蛋白质量分数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 三种主要过敏原蛋白的提取率

分离过程中,卵转铁蛋白一部分在穿过峰中洗出,纯度较高,另一部分在梯度洗脱时洗出,混杂有部分卵黄素蛋白。表 1 所示的卵转铁蛋白提取率仅为穿过峰中较纯的部分。

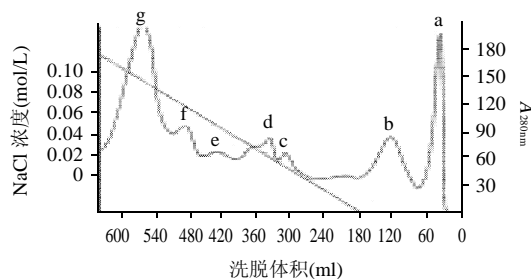
表1 Lowry 法测定的蛋白质量浓度和三种主要过敏原蛋白的提取率
Table 1 Summary of separation of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme by DEAE-Sepharose FF chromatography

指标	卵白蛋白	卵转铁蛋白	溶菌酶	上样前蛋清
质量浓度(mg/ml)	0.72	0.18	0.18	54.76
上样蛋白量(mg)	147.85	32.86	9.31	273.8
回收量(ml)	180	102	42	
提取率(%)	87.66	55.87	92.80	

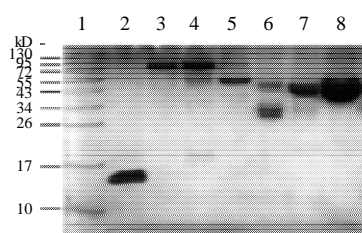
2.2 三种过敏原蛋白的分离效果

先用 pH7.5、0.05mol/L Tris-HCl 起始缓冲液平衡离子交换柱,上样后,未被吸附的蛋白质先被起始缓冲液洗脱。梯度洗脱用含 0~0.12mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(pH5.5, 0.05mol/L)洗脱,分离蛋白纯度高。接着用 SDS-PAGE 电泳进行纯度的检测。

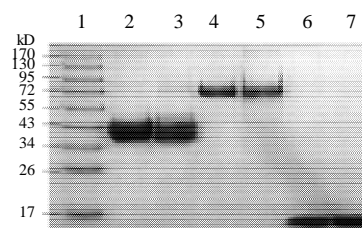
根据 SDS-PAGE 电泳图的蛋白分子量来确定蛋白种类。图 2b 中第 1 泳道为 Marker; 第 2 泳道对应图 2a 中峰 a 收集蛋白,分子量约 14kD,为溶菌酶;第 3 泳道对应峰 b 收集蛋白,分子量约为 72kD,为卵转铁蛋白;第 4 泳道对应峰 c 收集蛋白,其中混有两种蛋白质,主要为卵转铁蛋白,少量蛋白分子量约为 55kD,为卵黄素蛋白;第 5 泳道对应峰 d 中的收集蛋白,所含蛋白质种类与峰 c 相同,但含量恰好相反,卵黄素蛋白占大部分,少量是卵转铁蛋白;第 6 泳道对应峰 e 收集的两种蛋白质,分子量约为 45kD 和 28kD,分别对应卵白蛋白和卵类黏蛋白;第 7 和第 8 泳道分别对应峰 f 和峰 g 收集蛋白,均为卵白蛋白。



a. 离子交换层析曲线



b. 过敏原蛋白 SDS-PAGE 的分离图



c. 三种过敏原蛋白与相应标准品的 SDS-PAGE 图

图 b 泳道顺序与图 a 记录仪出峰顺序相对应, 分别为: 泳道 1. Marker; 泳道 2~8 分别对应图 a 中峰 a~g 的收集蛋白。图 c 泳道顺序: 1. Marker; 2. 卵白蛋白; 3. 卵白蛋白标准品; 4. 卵转铁蛋白; 5. 卵转铁蛋白标准品; 6. 溶菌酶; 7. 溶菌酶标准品。

图 2 三种主要过敏原蛋白的分离效果图

Fig.2 Elution profile (a) and SDS-PAGE patterns (b) of major hen's egg white proteins and SDS-PAGE patterns (c) of ovalbumin, ovomucoid and lysozyme samples and their standards

由图 2 可知, 高纯度的溶菌酶和卵转铁蛋白均在穿过峰中获得。穿过峰用 pH7.5、0.05mol/L Tris-HCl 洗脱, 溶菌酶等电点是 10.7, 在此 pH 值时带正电荷, 不与阴离子柱层析介质结合, 直接随洗脱液流出。卵转铁蛋白等电点是 6, 在此 pH 值时带负电荷, 与阴离子层析介质结合。但鸡蛋清中其余蛋白质等电点均较卵转铁蛋白低, 与层析介质更容易结合, 可将已结合的卵转铁蛋白置换下来, 使卵转铁蛋白未经梯度洗脱就出现在穿过峰中。卵白蛋白(pI=4.5)和卵类黏蛋白(pI=4.1)的等电点相似, 普通条件下很难用离子交换法分开。为了达到使这两种蛋白质分开的目的, 梯度洗脱时用含 0~0.12mol/L NaCl 的 Tris-HCl, 盐浓度增加较慢, 实现了卵白蛋白的高纯度分离。

从图 2c 可以看出, 分离的三种过敏原在与相应标准品上样量相同的情况下, 杂带的量均少于标准品, 可知三种过敏原蛋白的纯度均高于相应标准品。

2.2.1 上样量对三种过敏原蛋白分离效果的影响

上样量小于 5ml 时, 卵转铁蛋白在穿过峰中洗出量很少, 影响转铁蛋白的得率。上样量 6ml 以上时, 溶菌酶中有转铁蛋白混杂。实验选择在柱体积 40ml 时, 三种蛋白的分离上样量是 5ml, 此时分离效果最佳。但上样量增多对卵白蛋白的纯度和得率没有显著影响, 对于卵白蛋白的单独分离纯化可以采用增大上样量的方法来制备。卵转铁蛋白的等电点是 6, 穿过峰洗脱时 pH7.5,

此时卵转铁蛋白带负电荷, 应该吸附在层析介质上, 其在穿过峰内出现是由于上样量超过了层析介质的承载量, 卵转铁蛋白被与层析介质结合能力强的其他蛋白置换下来。卵白蛋白与层析介质的结合能力强, 增大上样量对其分离影响不大。

2.2.2 pH 值对三种过敏原蛋白分离效果的影响

本实验设计了 6 个 pH 值分别是 8、7.5、7、6.5、6、5.5, 结果显示 pH 值低于 7.5 时, 溶菌酶的峰中即混有杂质转铁蛋白。pH8 时, 转铁蛋白未在穿过峰出现, 梯度洗脱所得转铁蛋白混有少量杂质, 而 pH7.5 时三种主要过敏原恰好均能单独分开。因此, 实验设计在以 pH7.5 的 Tris-HCl 洗脱穿过峰, pH5.5 的 Tris-HCl 梯度洗脱, 以获得三种较纯蛋白。穿过峰洗脱时, 本实验选择 pH7.5。溶菌酶的等电点是 10.7, 可以直接随缓冲液流出。卵转铁蛋白在穿过峰第二个峰内的出现是由于上样量较多, 与层析介质结合后被其他蛋白质置换下来。卵白蛋白和卵类黏蛋白的等电点相近, 利用离子交换柱很难将两者完全分开。pH5.5 时, 卵白蛋白可以得到较纯的分离, 而卵类黏蛋白内仍有少量卵白蛋白混杂。

3 讨论与结论

离子交换色谱是基于蛋白与离子交换树脂间的电荷相互作用, 通过选择不同的缓冲液使蛋白带上不同的电荷, 然后选择合适的色谱柱加以分离纯化。鸡蛋清中的蛋白质除了溶菌酶(pI=10.7)和抗生物素蛋白(pI=10), 其余的等电点都在 4.0~6.0 之间^[11], 故前两种蛋白很容易与其余蛋白分离, 然后通过条件的优化使单个蛋白分离开来。目前溶菌酶已通过色谱分离加盐析沉淀实现了工业化生产^[11], 卵转铁蛋白和卵白蛋白也实现了多种色谱法分离纯化^[7]。Guérin-Dubiard 等^[7]曾用两步色谱法分离出了卵白蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶, 纯度分别为 91%、89%、95%, Vachier 等^[12]用阴离子交换柱分离出了卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶, 两溶菌酶峰纯度分别为 99% 和 88%, 卵转铁蛋白纯度 75%, 两卵白蛋白峰纯度分别为 54% 和 98%, 但前者用阳离子柱所得的产物作为阴离子柱的样品, 操作较麻烦; 后者所得卵转铁蛋白纯度较低。本实验的一步三分法克服了它们的缺点, 用便捷的方法得到了较纯的产物, 纯度均高于标准品, 所得产品卵白蛋白、卵转铁蛋白和溶菌酶得率分别为 87.66%、55.87% 和 92.80%, 且 DEAE-Sephrose FF 色谱柱廉价易得, 再生简单, 故认为这是一种分离鸡蛋过敏原的好方法。

参考文献:

- [1] ANDERSON J A. Allergic reactions to foods[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36(Suppl1): 12-38.

- [2] ANET J, BACK J F, BACKER R S, et al. Allergens in the white and yolk of hen's egg: a study of IgE binding by egg proteins[J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1985, 77(3): 364-371.
- [3] HOFFMAN D R. Immunochemical identification of the allergens in egg white[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1983, 71(5): 481-486.
- [4] LANGELAND T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white III: allergens in hen's egg white studied by crossed radio-immunoelectrophoresis(CRIE)[J]. *Allergy*, 1982, 37(7): 521-530.
- [5] MINE Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 7(6): 225-232.
- [6] 聂珍媛, 夏金兰, 潘佳民. 卵白蛋白的分离及卵白蛋白铁的制备与表征[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(5): 870-875.
- [7] GUÉRIN-DUBIARD C, PASCO M, HIETANEN A, et al. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1090(1/2): 58-67.
- [8] LU J R, WAN Y H, CUI Z F. Strategy to separate lysozyme and ovalbumin from CEW using UF[J]. *Desalination*, 2006, 200(1/3): 477-479.
- [9] 高真. 蛋制品工艺学[M]. 北京: 中国商业出版社, 1993: 36-40.
- [10] 李建武, 萧能庚, 于瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 216-222.
- [11] LI-CHAN E, NAKAI S, SIM J, et al. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography[J]. *J Food Sci*, 1986, 51(4): 1032-1036.
- [12] VACHIER M C, PIOT M, AWADÉ A C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix[J]. *Journal of Chromatography B*, 1995, 664(1): 201-210.