

鸡蛋过敏原卵转铁蛋白标准物质 候选物的研究

袁锦^{1,2} 周煌³ 佟平¹ 吴志华^{1,4} 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.南昌大学食品学院,江西南昌 330047;
 3.吉安职业技术学院现代农林工程学院,江西吉安 343000;
 4.南昌大学中德联合研究院,江西南昌 330047)

摘要:目的:制备高纯度的鸡蛋过敏原卵转铁蛋白,并详细表征其理化性质及免疫学性质,满足标准物质候选物的质量要求。方法:通过两步柱层析法制备卵转铁蛋白并分装、冻干,然后借助质谱鉴定身份;采用 SDS-PAGE 银染方法鉴定纯度,圆二色光谱、荧光光谱和核磁共振表征高级结构;利用 Bradford 法检测含量和 SDS-PAGE 银染方法评估稳定性,间接 ELISA 方法评估其与 IgE 结合能力。结果:制备的蛋白经质谱鉴定为鸡蛋卵转铁蛋白,分子量约 79.55 ku,等电点为 6.85,纯度高达 94.6%;结构分析显示,制备的卵转铁蛋白保留了其天然结构特性,并且冻干未使卵转铁蛋白的结构产生明显的变化;在 4℃ 条件下储藏 5 个月,卵转铁蛋白的含量、纯度、结构和免疫学活性均无明显变化。结论:制备的卵转铁蛋白可作为标准物质候选物。

关键词:鸡蛋过敏原,卵转铁蛋白,标准物质候选物

Study on hen egg allergen ovotransferrin as a reference material candidate

YUAN Jin^{1,2} ZHOU Huang³ TONG Ping¹ WU Zhi-hua^{1,4} 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, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
 3.Jian Vocational and Technical College of Modern Agriculture and Forestry, Ji'an 343000, China;
 4.Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Objective: To guarantee ovotransferrin (OVT) quality as a food allergen reference material candidate, ovotransferrin was prepared with high purity, and the physicochemical and immunological properties were characterized well. Methods: Ovotransferrin was prepared through two step chromatographies, followed by being subdivided and lyophilized. Afterwards, the prepared ovotransferrin was identified by MALDI TOF/TOF, and the purity was tested by SDS-PAGE with silver staining, followed by measuring the structure by circular dichroism spectroscopy, fluorescence spectroscopy and ¹H NMR. The content and stability were detected by Bradford protein assay and SDS-PAGE with silver staining. The potential allergenicity of ovotransferrin was assessed by ELISA. Results: The prepared protein was identified to be egg ovotransferrin by MALDI TOF/TOF, with a molecular weight of 79.55 ku and a pI of 6.85. The purity of ovotransferrin was 94.6%. The prepared ovotransferrin maintained its natural structure, and the lyophilization had no significantly effect on ovotransferrin structure. The stability, quality and IgE-binding capacity showed no significant difference within 5 months storage period at 4℃. Conclusion: The prepared egg allergen ovotransferrin could be qualified as a reference material candidate.

Key words: egg allergen; ovotransferrin; reference material candidate

中图分类号: TS253.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2017)04-0342-06
 doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.04.056

收稿日期: 2016-09-02

作者简介: 袁锦(1993-)男,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生, E-mail: yuan2jin@126.com。

* 通讯作者: 高金燕(1967-)女,硕士,教授,研究方向:食品营养与安全, E-mail: chbgjy@hotmail.com。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2013AA102205); 科技部国际科技合作项目(2013DFG31380); 国家自然科学基金(31301524); 江西省自然科学基金计划(20133ACB20009, 20142BAB214001); 食品科学与技术国家重点实验室项目(SKLF-ZZA-201612, SKLF-QN-201514)。

食物过敏是目前公认的人类健康问题之一,发生率在幼儿中约占8%,在成人中约占3%~4%,且近年来逐渐增高^[1]。牛奶、鸡蛋、花生、坚果、鱼、甲壳类水产动物、小麦和大豆是公认的八大过敏食物^[2]。其中,鸡蛋可为人体提供优质的蛋白质,氨基酸比例适合人体生理需要,易被吸收,但同时也是仅次于牛奶的第二大过敏食物^[3],其主要的过敏原蛋白包括卵白蛋白、卵类粘蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶、卵黄糖蛋白42和 α -卵黄蛋白^[4]。据报道,约有1%~2%的婴儿和1.6%~3.2%的儿童对鸡蛋过敏^[5],严重影响了他们的健康。为了减少鸡蛋过敏的危害,需要进行食品中鸡蛋过敏原蛋白的精准检测以及鸡蛋过敏的正确诊断,而检测和诊断离不开过敏原标准物质的参比作用。Brand^[6]等已经开展了鸡蛋过敏原卵转铁蛋白(Ovotransferrin, OVT)的分离和纯化研究工作,市场上也有一些昂贵的卵转铁蛋白试剂,但尚不能满足精准检测和诊断需求,无法保证食物蛋白过敏原测量的溯源性、有效性、可比性以及国际等效性。迄今为止,卵转铁蛋白过敏原标准物质的研究仍是空白,值得探索。因此,本研究以蛋清为原料,通过离子交换和羟基磷灰石柱层析两步法制备卵转铁蛋白并分装、冻干,然后进行蛋白身份和纯度鉴定,并借助一系列理化和免疫学方法评价其质量性能,为卵转铁蛋白过敏原标准物质的研制提供关键技术和实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

柱材 CM Sepharose Fast Flow 和 Bio-Gel HT Fully Hydrated Hydroxyapatite GE 公司(美国);牛血清白蛋白标准品 中国国家计量院(NIM);过硫酸铵(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)和 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质 Sigma 公司(美国);40%丙烯酰胺/双丙烯酰胺储液 伯乐公司(美国);乙腈和三氟乙酸 默克公司(德国);其他化学试剂 均为分析纯;鸡蛋 从当地市场购买。

Milli-Q 纯水仪 美国 Millipore 公司;蛋白电泳仪、凝胶成像系统、Mode 1860 酶标仪 美国伯乐公司;N2000 色谱工作站 STS 浙江大学智达信息工程有限公司;高速冷冻离心机 德国贝克曼公司;PB-10 酸度计 德国 Sartorius 公司;ABI 4800 MALDI TOF/TOF 串联飞行时间质谱仪 美国 Applied Biosystems;MOS-450/AF-CD 圆二色光谱 法国 Bio-Logic 公司;核磁共振仪 德国 Bruker Avance。

1.2 实验方法

1.2.1 卵转铁蛋白的制备

1.2.1.1 CM Sepharose Fast Flow 柱层析分离卵转铁蛋白 新鲜鸡蛋取蛋清,用玻璃棒轻轻搅拌,使蛋清中胶状物溶解,于4℃层析柜中低速磁力搅拌30 min。用50 mmol/L、pH4.7的醋酸钠缓冲液将蛋清pH调至6.0,再4℃层析柜中磁力搅拌3.5 h,8000×g离心30 min,取上清液分装,于-20℃保存。参照袁角建^[7]分离纯化卵转铁蛋白的方法,采用CM Sepharose Fast Flow 阳离子柱对前处理蛋清中的卵转

铁蛋白进行初步分离,所选柱子的规格为3.5 cm×50 cm。经活化、脱气等步骤处理后,将柱材装入柱子中,用蒸馏水以7 mL/min的流速压柱,用阳离子柱平衡液以5 mL/min的流速平衡阳离子柱,基线平稳后,取63 mL处理过的蛋清上样,用700 mL阳离子柱平衡液加上700 mL阳离子柱梯洗液进行线性梯度洗脱。

1.2.1.2 羟基磷灰石柱层析分离 同样参照袁角建^[7]的实验方法,采用450 mL羟基磷灰石柱(Bio-Gel HT Fully Hydrated Hydroxyapatite)对卵转铁蛋白作进一步纯化。具体步骤如下:用蒸馏水以4 mL/min的流速压柱,羟基磷灰石柱平衡液以3 mL/min的流速平衡,平衡后上样 PEG20000 浓缩的粗提物卵转铁蛋白16 mL,分别用450 mL羟基柱梯度洗液1(pH7.0, 80 mmol/L的磷酸缓冲液)和450 mL的羟基柱梯度洗液2(pH7.0, 300 mmol/L的磷酸缓冲液)进行线性梯度洗脱,收集目标产物。

1.2.1.3 蛋白的真空冷冻干燥 将收集到的纯卵转铁蛋白溶液按860 μ L/瓶均匀分装到3 mL冻干瓶中,并于-80℃冰箱中冷冻30 h。采用VIRTIS真空冷冻干燥机进行冻干,-70℃下抽真空,冻干约23.5 h后,将冻干机加热温度调为30℃;30 min后停止冻干,取出用铝盖封口、贴标,保存在4℃冰箱中。

1.2.2 蛋白质身份鉴定 制备的卵转铁蛋白酶解后真空冻干,用1.5 μ L质谱上样缓冲液(30%乙腈,0.1%三氟乙酸)溶解,取0.8 μ L点在384孔不锈钢点样板上,加0.4 μ L α -氰基-4-羟基肉桂酸基质溶液(5 mg/mL),自然风干、结晶后采用ABI 4800 MALDI/TOF 串联飞行时间质谱仪进行质谱检测。获得的一级和二级质谱数据使用GPS Explore(V3.6, Applied Biosystems)软件进行分析,并通过内置的MASCOT(V2.1, Matrix Science, London, U.K)搜库软件对本地数据库进行检索、鉴定蛋白质。

1.2.3 纯度鉴定 用不连续的SDS-PAGE电泳检测卵转铁蛋白,上样量为0.125 μ g/孔(4%的浓缩胶和12%的分离胶),待电泳跑完后,剥胶进行银染,对所制备卵转铁蛋白的纯度进行鉴定。

1.2.4 卵转铁蛋白结构表征

1.2.4.1 二级结构检测 采用MOS-450/AF-CD圆二色光谱仪表征卵转铁蛋白的二级结构。将卵转铁蛋白的浓度稀释至0.1 mg/mL(500 μ L),以蒸馏水做空白。设定远紫外扫描波长范围为190~240 nm,光径为0.1 cm,带宽为1 nm,光谱间隔0.1 nm,扫描速度为0.05~20 nm/s,每个样品分别做三次平行,取其平均值。所得数据用CD在线软件<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>进行分析。

1.2.4.2 表面疏水性检测 将卵转铁蛋白样品稀释至0.1 mg/mL,取6 mL蛋白,加入60 μ L的ANS(5 μ mol/L),混匀后避光反应2 h。用日立F-4500荧光分光光度计,激发波长为390 nm,发射波长为400~600 nm,扫描速度为1200 nm/min,测定卵转铁蛋白的荧光值,分析卵转铁蛋白的表面疏水性。

1.2.4.3 三级结构检测 取450 μ L,10.13 mg/mL的卵

转铁蛋白和 50 μL D_2O 于核磁管中,使卵转铁蛋白最终浓度为 0.12 mmol/L。通过 Bruker Avance 600 MHz 核磁共振波谱仪,分析卵转铁蛋白的核磁图谱。测定中脉冲序列为 zgpr,磁体为 14.09 Tesla,扫描次数为 1228,温度控制为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 卵转铁蛋白稳定性检验 标准物质的长期稳定性是指在规定的贮存条件下,在规定的时间内,使其描述的特性值保持在规定范围内的能力^[8]。

1.2.5.1 含量、纯度及其储藏稳定性检测 将冻干后的卵转铁蛋白置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、避光及干燥条件下保存。随机抽取 3 瓶样品,在放置第 0 至 5 个月后,分别采用 Bradford 法和 SDS-PAGE 银染的方法测定含量和纯度。

1.2.5.2 卵转铁蛋白的免疫活性检测 卵转铁蛋白的免疫学活性采用人血清间接 ELISA 对冻干前后卵转铁蛋白的 IgE 结合能力和储藏稳定性进行检测,鸡蛋过敏患者的血清池由 18 位对鸡蛋过敏的患者的血清混合而成,这 18 位鸡蛋过敏患者的信息如表 1。所选患者的血清具备如下特点:对鸡蛋过敏呈阳性,且总 IgE 水平基本都在 100 IU/mL 左右。

表 1 鸡蛋过敏患者信息
Table 1 Information of egg allergic patients

编号	性别	年龄 (月)	临床症状	总 IgE 水平 (IU/mL)
1	男	ND*	变应性鼻炎	356
2	男	71	ND*	>400
3	男	33	咳嗽	236
4	男	ND*	特应性皮炎	303
5	男	104	皮炎	188
6	女	57	哮喘	125
7	男	27	支气管炎	109
8	女	7	湿疹	229
9	女	3	湿疹	129
10	男	48	ND*	<100
11	男	60	ND*	100~200
12	女	24	ND*	ND*
13	男	ND*	ND*	>100
14	男	36	ND*	>200
15	男	396	ND*	100~200
16	女	36	荨麻疹	<100
17	男	36	荨麻疹	>200
18	女	36	湿疹	<100

注:ND*:未检测。

间接 ELISA 具体步骤如下:将卵转铁蛋白稀释至 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在一块酶标板上包被 100 μL ,用 PBS (磷酸盐缓冲液)作阴性对照。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后,用 PBST (磷酸缓冲溶液溶液加上 Tween-20)洗板 3 次,每次 5 min;每孔加入 250 μL 5% 的脱脂乳,37 $^{\circ}\text{C}$ 封阻 1 h,然后用 PBST 洗板 3 次;每孔加入 100 μL 1:20 稀释度的人血清池,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, PBST 洗板 3 次;每孔加入 1:5000 稀释的生物素标记羊抗人 IgE 二抗 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, PBST 洗板 3 次;每孔加入

100 μL 1:60 稀释的 HRP-链霉素标记的亲合素,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应, PBST 洗板 3 次;每孔加入 100 μL 现配的 OPD 显色液后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光反应 15 min,反应结束后,每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,于 490 nm 处检测其 OD 值。

1.2.6 数据处理 采用 SPSS 20.0 进行数据处理和显著性分析,采用 $p < 0.05$ 为显著性差异;应用 Origin9.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 卵转铁蛋白的身份鉴定和纯度分析

制备的蛋白经质谱鉴定分析后,结果如表 2 所示。通过本地数据库 MASCOT 检索,所鉴定蛋白质与数据库中编号为 sp|P02789 的卵转铁蛋白匹配度达 100%。因此,可以确定制备的蛋白质为鸡蛋卵转铁蛋白,分子量约 79.55 ku,等电点为 6.85。

本文首先采用 SDS-PAGE 考染方法鉴定卵转铁蛋白纯度,结果显示为 100%。但是,世界卫生组织和国际免疫学联合会过敏原物质标准化小组建立的过敏原物质标准化项目 (Development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification, CREATE) 推荐使用 SDS-PAGE 银染方法鉴定过敏原纯度^[9],因为银染的灵敏性是考染的 50~100 倍^[10]。因此,所制备卵转铁蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,经银染方法显色,结果如图 1 所示,Quantity One 灰度扫描显示卵转铁蛋白纯度为 94.6%。



图 1 卵转铁蛋白的 SDS-PAGE 银染图

Fig.1 SDS-PAGE profile of the prepared ovotransferrin by silver staining

2.2 卵转铁蛋白的结构表征及冷冻干燥对其结构的影响

为进一步鉴定所制备的卵转铁蛋白是否保持其天然结构,同样参考 CREATE 项目^[9]中推荐的方法,采用圆二色光谱、荧光探针光谱和核磁共振图谱对制备卵转铁蛋白的二级结构、表面疏水性和三级结构进行表征,与文献中报道的卵转铁蛋白结构进行比较。同时在制备过程中,为了保持蛋白质原有的生物性状和活性,采用真空冷冻干燥的方法进行干燥^[11-12]。

2.2.1 卵转铁蛋白的二级结构 卵转铁蛋白的二级结构经圆二色光谱检测,结果见图 2。从图 2 中可知,卵转铁蛋白在 195 nm 和 215 nm 附近出现了蛋白质的二级结构特征峰,平均摩尔椭圆率最高在

表2 卵转铁蛋白的质谱鉴定报告

Table 2 The identity of ovotransferrin tested by Mass Spectrometry

理论质量	检测质量	质量偏差	百万分之偏差率	开始序列	终止序列	序列	离子得分	修饰	结果排列方式
988.4629	988.4744	0.0115	12	132	140	TSCHTGLGR		脲甲基化 (Q) [3]	Mascot
1041.5687	1041.5842	0.0155	15	352	360	KDQLTPSPR			Mascot
1047.5258	1047.536	0.0102	10	540	548	YFGYTGALR			Mascot
1047.5258	1047.536	0.0102	10	540	548	YFGYTGALR			Mascot
1223.6306	1223.6016	-0.029	-24	279	288	VEDIWSFLSK			Mascot
1223.6306	1223.6016	-0.029	-24	279	288	VEDIWSFLSK			Mascot
1315.7985	1315.6674	-0.1311	-100	310	320	KDPVLKDLLFK			Mascot
1469.6577	1469.6838	0.0261	18	241	252	DEYELLCLDGSR		脲甲基化 (Q) [7]	Mascot
1534.8489	1534.8646	0.0157	10	141	154	SAGWNPIGTLHR			Mascot
1534.8489	1534.8646	0.0157	10	141	154	SAGWNPIGTLHR			Mascot
2048.0593	2048.0798	0.0205	10	602	619	ECNLAEVPHAVVVRPEK		脲甲基化 (Q) [2]	Mascot
2048.0593	2048.0798	0.0205	10	602	619	ECNLAEVPHAVVVRPE K		脲甲基化 (Q) [2]	Mascot
2070.0251	2070.0579	0.0328	16	222	240	GDVAFVKHTTVNENAPD QK			Mascot
2550.0295	2550.0605	0.031	12	494	516	TGTCNFDEYFSEGCAPGSPNSR		脲甲基化 (Q) [4, 14]	Mascot
2656.2129	2656.2942	0.0813	31	572	593	NKADWAKNLQMDDFELLCTDGR		脲甲基化(Q) [18], 氧化(M) [11]	Mascot

8000 deg·cm²/dmol左右,最低在-7000 deg·cm²/dmol左右,这与袁角建^[7]和 Jacobsen^[13]的实验结果吻合。冻干前后的卵转铁蛋白在195 nm附近都有一个明显的正峰,为β-折叠的特征峰;在215 nm附近也都有一个明显的负峰,为α-螺旋的特征峰,CD曲线的趋势基本一致。将所得的圆二色光谱数据通过在线软件进行分析,得到冻干前后卵转铁蛋白的二级结构含量(图2B)。图2B中显示,冻干前后卵转铁蛋白的二级结构(包括α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲)含量基本一致。因此,制备的卵转铁蛋白冻干前后未发生明显的变化,保持了天然二级结构。

2.2.2 卵转铁蛋白表面疏水性 ANS 荧光探针实验结果如图3所示,曲线的趋势也与袁角建^[7]的实验结果相同。而卵转铁蛋白冻干前后的荧光曲线比较,在500 nm左右的荧光强度都达到最大,在550~600 nm处两条曲线出现重叠,但在400~550 nm处,冻干卵转铁蛋白比未冻干卵转铁蛋白的荧光值略大,且荧光值在500 nm处达最大,表明真空冷冻干燥可能会引起卵转铁蛋白部分去折叠,导致分子内部更多的疏水基团暴露出来,从而提高蛋白表面疏水性。

2.2.3 卵转铁蛋白三级结构 抗原抗体特异性结合是二者空间结构契合、分子间力相互作用的结果,三级结构的稳定是卵转铁蛋白过敏原蛋白维持稳定免疫活性的基础。卵转铁蛋白冻干前后的 Bruker Avance 600 MHz ¹H 核磁共振结果如图4所示,与 Jacobsen^[13]的 Bruker Avance 700 MHz ¹H 结果相符,说明所制备卵转铁蛋白保持其天然三级结构。从图4中可以发现,冻干后卵转铁蛋白的化学位移都分布在0~7 ppm处,其中4.8 ppm处都为D₂O的化学位移,证明其三级结构未发生明显的变化。

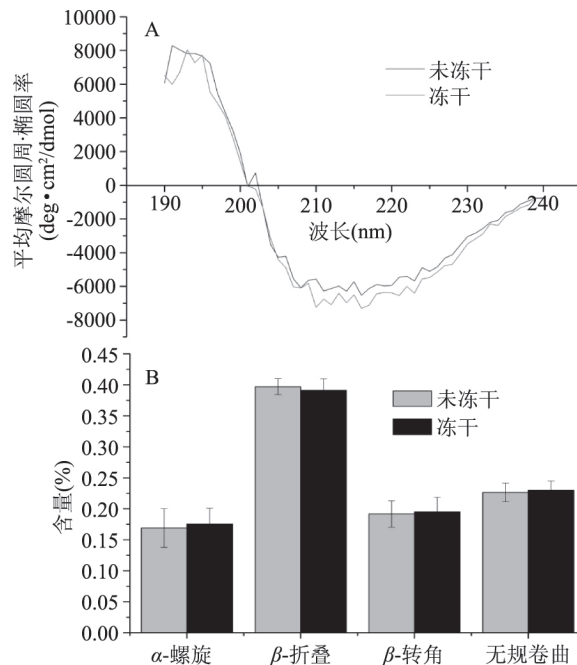


图2 卵转铁蛋白的二级结构

Fig.2 The secondary structure of ovotransferrin

注: A: 卵转铁蛋白冻干前后的圆二色光谱;

B: 冻干前后卵转铁蛋白二级结构含量的变化。

2.3 卵转铁蛋白的稳定性

稳定性是指在规定贮存和使用条件下,标准物质的含量、纯度等特性量值保持在规定范围内的能力^[8]。本研究参考 Itoh^[14]和 Johnston^[15]相类似方法测试卵转铁蛋白的储藏稳定性,研究结果可为用户提供参考数据。不同蛋白质具有不同的稳定性,在储藏过程中如果储藏不当或者储存时间过久很容易

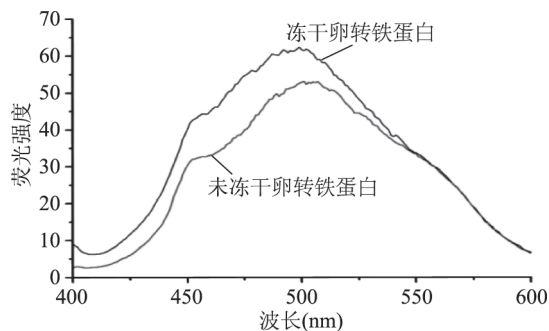


图3 冻干前后卵转铁蛋白表面疏水性的变化
Fig.3 The surface hydrophobicity of ovotransferrin before and after lyophilization

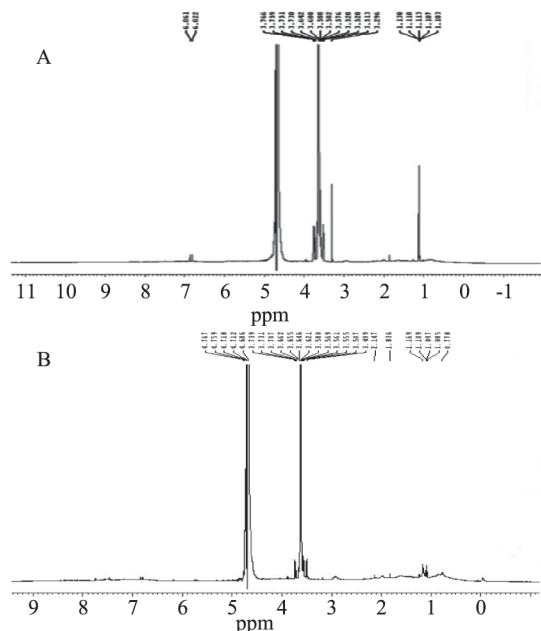


图4 冻干前后卵转铁蛋白的¹H核磁共振结果
Fig.4 ¹H NMR spectra of the ovotransferrin before (a) and after (b) lyophilization
注: A: 冻干前卵转铁蛋白的¹H核磁共振结果;
B: 冻干后卵转铁蛋白的¹H核磁共振结果。

发生降解,其含量和纯度都可能会发生变化。本研究将卵转铁蛋白冻干后置于4℃储藏,连续监测5个月内卵转铁蛋白的含量和纯度(图5和图6)。从图5可以看出卵转铁蛋白4℃储藏5个月内含量无显著变化,图6中采用高灵敏的银染方法也显示没有降解片段。因此,卵转铁蛋白在4℃储藏5个月内含量、纯度未发生变化,稳定性好,满足作为标准物质候选物的稳定性要求。

2.4 卵转铁蛋白与特异性IgE的结合能力

除了质量、纯度的稳定性,合格的过敏原标准物质候选物还应进行免疫学性质的测定和免疫活性稳定性的测定^[16-17]。过敏患者血清IgE结合能力的检测是评价过敏原免疫活性的有效手段^[18],本研究采用间接ELISA测定卵转铁蛋白的IgE人血清结合能力(图7)。图7中每个月的数据是三次重复测定所得的平均值,所得数据采用SPSS软件进行显著性差异分析,结果显示储藏过程中每个月卵转铁蛋白IgE

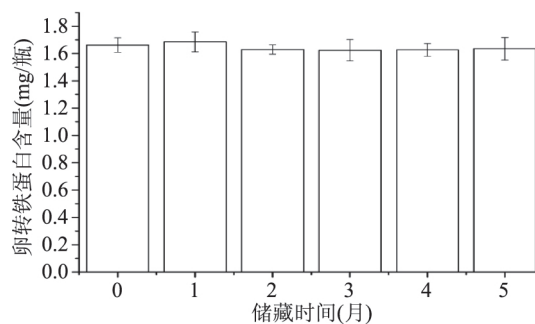


图5 卵转铁蛋白储藏过程中含量测定结果
Fig.5 The content of the prepared ovotransferrin during the storage

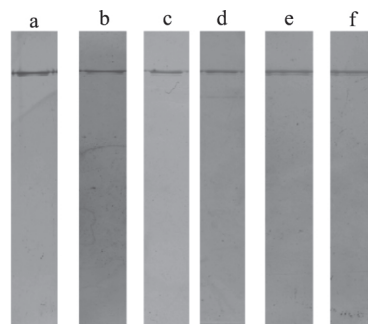


图6 卵转铁蛋白储藏过程中银染纯度鉴定结果
Fig.6 SDS-PAGE silver staining for purity of ovotransferrin during the storage

注: a: 冻干前; b、c、d、e、f: 4℃储藏1、2、3、4、5个月。

结合能力与未冻干相比都无显著性差异($p > 0.05$)。证明制备的卵转铁蛋白免疫活性稳定,可以满足过敏原标准物质候选物的要求。

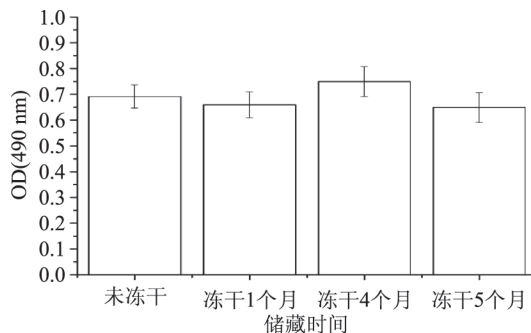


图7 卵转铁蛋白储藏过程中IgE结合能力的变化
Fig.7 IgE binding ability of ovotransferrin during storage

3 结论

本研究通过两步法制备了较高纯度的卵转铁蛋白,并对其身份、纯度、结构、免疫学性质及其储藏稳定性进行了详细表征。结果表明:制备的蛋白经质谱鉴定为鸡蛋卵转铁蛋白,分子量约79.55 ku,等电点为6.85,纯度可达94.6%;结构分析显示,分离纯化的卵转铁蛋白保留了其天然结构特性,并且在分装和冻干过程中,卵转铁蛋白的结构未产生明显的变化;在4℃条件下储藏5个月,卵转铁蛋白的含量、纯度和免疫学活性均无明显变化。制备的鸡蛋过敏原卵转铁蛋白冻干产品符合标准物质候选物的要求,可为最终申报卵转铁蛋白有证标准物质提供关键数据支撑。

参考文献

[1] Liu T, Navarro S, Lopata A L. Current advances of murine models for food allergy [J]. *Molecular Immunology*, 2016 (70): 104-117.

[2] Xepapadaki P, Fiocchi A, Grabenhenrich L, et al. Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life—the EuroPrevall birth cohort study [J]. *Allergy*, 2016, 71 (3): 350-357.

[3] Eggesb M, Botten G, Halvorsen R, et al. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children [J]. *Allergy* 2001 56(5): 403-411.

[4] Heiner G, Laske N, Hill D J, et al. The diagnosis and management of egg allergy [J]. *Current Allergy and Asthma Reports* 2006 6(2): 145-152.

[5] Savage J H, Matsui C, Skripak J M, et al. The natural history of egg allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 120(6): 1413-1417.

[6] Brand J, Dachmann E, Pichler M, et al. A novel approach for lysozyme and ovomucoid fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables [J]. *Separation and Purification Technology*, 2016, 161: 44-52.

[7] 袁角建. 高纯度鸡蛋过敏原卵转铁蛋白和溶菌酶的制备及十克级制备工艺设计[D]. 南昌: 南昌大学 2012: 24-40.

[8] JJF1343-2012, 标准物质定值的通用原则及统计学原理[M]. 北京: 中国质检出版社 2012.

[9] Vanree R, Chapman M, Ferreira F. The CREATE Project: Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for Their Quantification [J]. *Allergy* 2012 63(3): 149-179.

[18] Gao Q-H, Wu P-T, Liu J-R, et al. Physico-chemical properties and antioxidant capacity of different jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) cultivars grown in loess plateau of China [J]. *Scientia Horticulturae* 2011 130(1): 67-72.

[19] 罗依扎瓦哈甫, 骆新, 谢飞, 等. 红枣多糖对小鼠血糖及血清胰岛素水平影响的初步研究[J]. *食品工业科技* 2012, 33 (22): 369-371.

[20] 戚晨晨, 张帆, 沈艾彬. 红枣乳酸发酵饮料生产工艺研究[J]. *食品工业* 2015 36(6): 89-91.

[21] 李强坤, 柳陈坚, 张园莲, 等. 植物乳杆菌对食源性病原菌作用的研究[J]. *食品科学* 2016 37(11): 18-23.

[22] 王曦, 罗霞, 徐晓燕, 等. 不同乳酸菌菌株抗氧化能力的比较研究[J]. *食品科学* 2010 31(9): 197-201.

[23] 郭春峰, 张兰威. 益生菌降胆固醇功能研究进展[J]. *微生物学报* 2010 50(12): 1590-1599.

[24] 鲁周民, 张丽, 尹蓉, 等. 酶解条件对红枣汁主要成分的影响[J]. *农业工程学报* 2009 25(1): 300-302.

[25] GB 478935-2010, 食品微生物学检验乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社 2010.

[26] Kampfenkel K, Montagu M V, Inze D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue [J]. *Analytical Biochemistry*, 1995(225): 165-167.

[27] Xu W-T, Peng X-l, Luo Y-B, et al. Physiological and

[10] 林栖凤. 凝胶中痕量蛋白质和核酸的银染色法[J]. *病毒学杂志*, 1986(3): 80-84.

[11] 张郁松, 罗仓学. 真空冷冻干燥食品[J]. *食品研究与开发* 2005 26(1): 91-93.

[12] 刘婷婷, 张婷婷, 王大为. 真空干燥与冷冻干燥对 Zein 性质及结构的影响[J]. *食品科技* 2013 38(11): 158-163.

[13] Jacobsen B, Hoffmann S K, Have T T. The panel of egg allergens, Gal d 1 - Gal d 5: Their improved purification and characterization [J]. *Molecular Nutrition & Food Research* 2008, 52(S2): S176-S185.

[14] Itoh Y, Ichihara K, KISHI K, et al. Preparation of highly purified monomeric human serum albumin as secondary reference material for standardization of urinary albumin immunoassays [J]. *Clinica Chimica Acta* 2012 413(1): 175-181.

[15] Johnston L, Croft M, Murby J, et al. Preparation and characterisation of certified reference materials for furazolidone and nitrofurazone metabolites in prawn [J]. *Accreditation and Quality Assurance* 2015 5(20): 401-410.

[16] Himly M, Nony E, Chabre H. Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP - produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation [J]. *Allergy* 2009 64(7): 1038-1045.

[17] Singh H, Cantoria M J, Malave P, et al. Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 [J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 383-390.

[18] Chapman M D, Ferreira F, Villalba M, et al. The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008 122(5): 882-889.

(上接第 336 页)

biochemical responses of grapefruit seed extract dip on 'Redglobe' grape [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2009 42(2): 471-476.

[28] 李顺峰, 刘兴华, 张丽华, 等. 真姬菇子实体多糖的提取工艺优化[J]. *农业工程学报* 2008 24(2): 281-284.

[29] M.B M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976 72: 248-254.

[30] 郑欣, 余元善, 吴继军, 等. 荔枝汁经乳酸菌发酵后营养品质的变化及贮藏稳定性研究[J]. *现代食品科技* 2013 29(12): 2909-2914.

[31] 刘磊, 汪浩, 张名位, 等. 龙眼乳酸菌发酵工艺条件优化及其挥发性风味物质变化[J]. *中国农业科学* 2015 48(20): 4147-4158.

[32] 郑欣, 余元善, 吴继军, 等. 不同乳酸菌在荔枝汁中的发酵特性研究[J]. *广东农业科学* 2013(7): 95-98.

[33] 徐辉艳. 红枣汁非酶褐变及其控制研究[D]. 杨凌: 陕西师范大学 2009.

[34] Chang S C, Hsu B Y, Chen B H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity [J]. *Int J Biol Macromol* 2010 47(4): 445-453.

[35] 初乐, 刘雪梅, 赵岩, 等. 红枣多糖在加工过程中的变化研究[J]. *中国果菜* 2014 34(12): 17-20.