

免疫斑点印迹法检测水解乳蛋白婴幼儿配方粉免疫反应

孙丽娟¹, 韩诗雯¹, 曾冰蕙¹, 段素芳², 屠振华³, 李放², 车会莲^{1*}

(¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

² 内蒙古伊利实业集团股份有限公司 内蒙古乳业技术研究院有限责任公司 呼和浩特 010110

³ 中国食品发酵工业研究院有限公司 北京 100015)

摘要 目的:建立一种快速且精准的方法,以确定水解乳蛋白婴幼儿配方粉的免疫反应性。方法:首先采用直接免疫斑点印迹法,利用牛奶过敏患儿血清初步评估待测样品的免疫反应性;然后通过间接竞争免疫斑点印迹法以市售普通牛奶粉为阳性对照,评估水解乳蛋白婴幼儿配方粉与血清免疫球蛋白 E(IgE)的结合能力;最后采用间接和间接竞争酶联免疫检测法,以佐证免疫斑点印迹结果。结果:部分水解乳蛋白婴幼儿配方粉仍可以结合 IgE 以诱发过敏反应,而深度水解乳蛋白婴幼儿配方粉不具有免疫反应性。免疫斑点印迹和酶联免疫检测评价免疫反应性结果显著且一致。结论:免疫斑点印迹技术操作性强,周期短,成本低,结果可靠,为利用较难获取的婴幼儿过敏患儿血清初步评估乳蛋白产品致敏性提供了新思路。

关键词 牛奶过敏;免疫斑点印迹;酶联免疫吸附;间接和间接竞争;过敏血清

文章编号 1009-7848(2024)07-0342-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.034

食物过敏在全球范围内的发病率正逐年上升,已成为影响儿童和成人身心健康的重要公共卫生问题^[1]。其临床症状包括过敏性皮炎、过敏性鼻炎、恶心、呕吐、哮喘等,严重情况下可能导致休克或死亡。发达国家有 3%~4% 的成年人和 8% 左右的儿童及婴幼儿患有食物过敏^[2]。在我国,儿童存在食物过敏比成人更常见,发病率远高于成人^[3]。根据 2020 年在江西省进行的针对 21 273 名儿童和成人开展的多中心、横断面的食物过敏流行病学调查结果显示,食物过敏发生率为 4.3%^[4]。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)和联合国粮食与农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations,FAO)将牛奶、鸡蛋、花生、含麸质谷物、树坚果、芝麻、鱼和甲壳类动物确定为新八大类致敏食物清单^[5]。其中牛奶是婴幼儿的重要营养来源,也是婴幼儿中最常见的致敏食物之一。

在无法进行母乳喂养或母乳供应不足的情况下,婴幼儿配方奶粉可作为母乳替代品,成为婴幼

儿的主要食物,其富含能够满足新生儿生长发育所需的多种营养成分,尤其是牛乳蛋白^[6]。然而,由于肠道屏障和免疫系统尚未发育完全,婴儿易对牛奶中一种或多种蛋白质产生牛奶过敏反应(Cow's milk allergy,CMA)^[7]。由于牛奶蛋白通常是婴儿最早接触的食物蛋白质,因此 CMA 被认为是婴幼儿最早诊断出的食物过敏之一^[8],其中以 IgE 介导引发的儿童牛奶过敏发病率为 0.5%~3.8%^[9-11]。儿科医生建议牛奶过敏患儿父母选择低致敏配方粉进行喂养^[12]。低致敏配方粉主要通过化学法或酶法水解来破坏牛乳蛋白的肽链,从而降低或消除牛奶蛋白的免疫反应性,降低发生牛奶蛋白过敏的风险^[13-14]。经过酶解,抗原表位的序列或构象被破坏,免疫反应性降低。同时,酶水解加工条件温和,反应条件易于控制,且残留的污染物少,是目前制备生物活性肽最主要的方法^[15]。根据配方粉水解程度可分为 3 类:部分水解(Partially hydrolyzed formula,PHF)、深度水解(Extensively hydrolyzed formula,EHF)和氨基酸配方粉(Amino-acid-based infant formulas,AAF)。PHF 主要应用于有牛奶过敏家族史的婴儿预防过敏,EHF 主要针对已经发生牛奶过敏的婴儿,而 AAF 主要用于已经对牛奶蛋白严重过敏的婴幼儿^[16]。配方粉可为过敏患儿提供必需氨基酸,对婴幼儿生长发育至关重要。

收稿日期: 2023-07-08

基金项目: 中国食品科学技术学会食品科技基金-伊利健康科学基金项目(2022-Y02);国家自然科学基金面上项目(31972185)

第一作者: 孙丽娟,女,博士生

通信作者: 车会莲 E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

鉴于婴幼儿配方粉的水解程度、酶的使用种类以及过滤技术不尽相同,其残留的抗原性也有所不同^[17]。虽然部分水解配方粉和深度水解配方粉降低了免疫反应性,但是仍可能会引发过敏反应^[18]。因此,评估水解配方粉的安全性和残留免疫反应性非常必要。目前,常用的体内评估方法是使用啮齿类动物过敏模型来评估致敏风险。然而,该方法受品系、致敏途径和动物的口服耐受等因素的影响,且造模周期长,成本高。相比之下,免疫斑点印迹法(Dot-immunobinding blot assay,DB)作为一种体外评价方法,不需要进行电泳或转膜,且可使用灵敏度较低的化学发光试剂显色,相比于免疫印迹法(Western blot,WB),DB耗时短,操作简单,成本也较低^[19],是一种快速、简便、经济的检测方法^[20]。由于评估致敏风险需使用血清作为抗体来源,而患者血清通常十分有限,尤其是婴幼儿的血清。为评估婴幼儿配方粉的潜在免疫反应性,本研究首先通过直接免疫斑点印迹法,使用牛奶过敏患儿的血清作为一抗,辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗人IgE作为二抗,初步确定目标样品的免疫反应性。采用间接竞争免疫斑点印迹法评估样品间的致敏风险。最后,通过酶联免疫吸附法(Enzyme linked

immunosorbent assay,ELISA)验证DB结果。本研究旨在提供一种操作简便,周期短,成本低,结果可靠的评估免疫反应性方法,为利用较难获取的婴幼儿过敏患儿血清初步评估乳蛋白产品免疫反应性提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

康宁 96 孔酶标板(8 孔/条×12 条)、盖板膜,北京拜尔迪生物技术有限公司;硝酸纤维素转印膜(Nitrocellulose filter membrane,NC 膜)、化学发光底物(Enhanced chemiluminescence,ECL),美国 Millipore;HRP 标记山羊抗人 IgE 抗体,美国 Abcam;Western 溶液套装,北京兰杰柯科技有限公司;TMB 显色液、非过敏血清 SL010,北京索莱宝科技有限公司。

婴幼儿配方粉样品由内蒙古伊利实业集团股份有限公司提供。本研究主要针对两款婴幼儿配方粉进行血清学免疫反应性评价,即部分水解配方粉(样品 6)和深度水解配方粉(样品 7)。为了进一步确定血清学方法的有效性,及配方粉中原料的潜在免疫反应性,试验共设置 7 组。具体分组信息及样品总蛋白含量如表 1 所示。

表 1 7 款样品信息及总蛋白含量

Table 1 Information and total protein content of the seven samples

样品编号	样品名称	样品设置说明	总蛋白含量/(g/100 g)
1	市售普通牛奶粉	阳性对照	11.457 ± 0.094
2	市售乳清蛋白粉原料①	普通原料对照	75.842 ± 0.728
3	市售乳清蛋白粉原料②	普通原料对照	92.636 ± 0.379
4	部分水解乳清蛋白粉原料	部分水解原料对照	77.045 ± 0.458
5	深度水解乳清蛋白粉原料	深度水解原料对照	84.333 ± 0.284
6	部分水解配方粉	水解配方粉样品	13.144 ± 0.244
7	深度水解配方粉	水解配方粉样品	10.411 ± 0.101

本研究所用患者血清来自河南新乡医院、河南漯河医学高等专科学校附属医院,已取得患者知情同意。血清样本采集方法、贮存方法、研究方案及样本处理均已获得中国农业大学人体研究伦理委员会的审核批准。本研究共收集到 0~2 岁牛奶过敏患儿血清样本 34 例,其中男性患儿 14 例,女性患儿 20 例,年龄在 0~12 月龄的患儿 12 例,

13~24 月龄的患儿 22 例。其中,有 24 个患儿出现了湿疹、皮炎、荨麻疹、上呼吸道感染等典型的临床过敏症状,经儿科医生诊断被确诊为牛奶过敏。另有 10 例患儿是在常规体检中被检测出血清对牛奶中主要过敏原有不同程度的结合反应。详细信息如表 2 所示。

表2 牛奶过敏患儿血清信息

Table 2 Information of serum samples from children with cow's milk allergy

序号	性别	年龄	临床诊断	过敏原及等级
1	男	2岁	湿疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
2	女	14月	皮炎	牛奶(+);牛肉(+)
3	女	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+);牛肉(+)
4	女	14月	常规体检	鸡蛋白(+);牛奶(++);牛肉(+)
5	男	1岁	肺炎	鸡蛋白(+);牛奶(+)
6	男	11月	湿疹	鸡蛋白(+);牛奶(+);牛肉(+);羊肉(+)
7	女	2岁	湿疹	鸡蛋白(+);牛奶(+/-)
8	女	14月	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+);牛肉(+);羊肉(+)
9	女	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
10	女	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+);牛肉(+)
11	男	2岁	荨麻疹	牛奶(+/-)
12	女	11月	甲功异常	鸡蛋白(+);牛奶(+/-)
13	男	7月	湿疹	牛奶(+)
14	男	2岁	发育迟缓	鸡蛋白(+);牛奶(+)
15	女	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
16	女	23月	皮疹	牛奶(+);黄豆(+)
17	男	2岁	常规体检	鸡蛋白(+);牛奶(+);牛肉(+)
18	男	2岁	皮炎	鸡蛋白(+);牛奶(+);黄豆(+)
19	女	2岁	荨麻疹	花生(+);牛奶(+)
20	女	1岁	皮炎	鸡蛋白(+);牛奶(+/-)
21	男	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
22	女	2岁	荨麻疹	黄豆(+);牛奶(+);牛肉(+);羊肉(+)
23	女	2岁	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
24	女	1岁	荨麻疹	鸡蛋白(+/-);牛奶(+)
25	男	20月	荨麻疹	鸡蛋白(+);牛奶(+)
26	女	15月	皮疹	花生(+);牛奶(+)
27	男	2岁	上呼吸道感染	鸡蛋白(+/-);牛奶(+);牛肉(+)
28	女	9月	湿疹	牛奶(+);牛肉(+)
29	男	7月	常规体检	牛奶(+)
30	女	7月	常规体检	牛奶(+)
31	女	9月	常规体检	牛奶(+)
32	男	2岁	常规体检	鸡蛋白(+);牛奶(+)
33	男	1岁	常规体检	牛奶(+)
34	女	1岁	常规体检	牛奶(+)

注: +/-, 弱阳性; +, 低浓度变应原特异性 IgE; ++, 中等浓度变应原特异性 IgE。

1.2 主要仪器

电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; 超纯水仪, 厦门锐思捷水纯化技术有限公司; 凯氏定氮仪 K-360, 步琦实验室设备贸易(上海)有限公司; 多功能酶标仪, 美国 Thermo Scientific; 化学发光成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 凯氏定氮测定蛋白质含量 以便后续的免

疫反应统一蛋白量, 采用凯氏定氮法测定样品蛋白质含量。称量 0.5 g 样品, 倒入消化管中, 加入 0.4 g 硫酸铜, 6 g 硫酸钾催化剂, 加浓硫酸消化至澄清透明的蓝绿色, 继续加热 0.5 h 后, 冷却至室温。上机蒸馏, 用硼酸做接收液, 加 2 滴甲基红-溴甲酚绿指示剂, 蒸馏 10 min 后移动蒸馏液锥形瓶, 使液面低于冷凝管下端, 再蒸馏 1 min, 然后用少量纯水冲洗冷凝管下端, 以 HCl 标准滴定溶液

滴定至灰红色。同时做空白试验,计算公式为:

$$X = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.0140}{m} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中: X 为100 g样品中蛋白质含量,g/100 g; c 为盐酸标准滴定液浓度,mol/L; V_2 为消耗体积,mL; V_1 为滴定空白体积,0.2520 mL; m 为样品质量,g; F 为蛋白质换算系数,6.25。

1.3.2 直接免疫斑点印迹 NC膜按照1 cm×1 cm的小格拆剪,蒸馏水中浸泡5 min,静置晾干。7款样品用纯水配制为1.0 mg/mL的溶液,取5 μL点样于硝酸纤维素膜并静置晾干。将膜浸泡于Western无蛋白快速封闭液中封闭,置于摇床上室温孵育1 h。用添加了1%吐温-20的Tris缓冲液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤2次,每次静置5 min,加入以Western无蛋白一抗稀释液稀释的过敏患者血清4 mL(1:20稀释),在4℃下孵育过夜。TBST洗涤5次,加入以Western无蛋白二抗稀释液稀释的HRP标记山羊抗人IgE(1:8 000稀释),于摇床上室温孵育1 h。TBST洗涤5次,最后将ECL的A、B液等体积混合加至膜上,使膜全部浸润,室温避光反应20 s,用化学发光显影仪成像。

1.3.3 间接竞争免疫斑点印迹 NC膜按照1 cm×1 cm的小格拆剪,蒸馏水中浸泡5 min,静置晾干。样品4~7用纯水配制为1.0 mg/mL的溶液,取50 μL待测样品与50 μL牛奶过敏患儿血清(血清以1:50稀释),37℃下孵育1 h,每组加入50 μL蛋白质浓度为1.0 mg/mL的样品1,同时设置阳性组(50 μL样品1与50 μL 1:50稀释的血清)、阴性组(TBST代替竞争抗原和血清),37℃下孵育1 h;每组样品取5 μL点样于硝酸纤维素膜并静置晾干。将膜浸泡于Western无蛋白快速封闭液中封闭,置于摇床上室温孵育1 h。TBST洗涤5次,孵育二抗、显色、成像同1.3.2节方法。

1.3.4 间接ELISA 在96孔板上包被10 μg/mL的样品1及样品4~7,100 μL/孔,4℃过夜。次日每孔加入200 μL添加了1%吐温-20的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution with Tween 20, PBST)洗涤3次,每次静置5 min后在吸水纸上拍干。加入150 μL/孔1%的BSA(PBST稀释)封闭,于37℃孵育1 h。PBST洗涤3次。用0.1%BSA

(PBST稀释)稀释过敏血清(1:20稀释),100 μL/孔,37℃孵育2 h,PBST洗涤6次。加入100 μL/孔1:5 000稀释的HRP标记山羊抗人IgE,37℃孵育1 h,PBST洗涤6次。加入100 μL/孔的TMB显色液,37℃下避光放置15 min后,使用2 mol/L硫酸溶液终止显色反应,50 μL/孔。使用多功能酶标仪测定各孔在波长450 nm下的吸光值。

1.3.5 间接竞争ELISA 在96孔板上包被10 μg/mL的样品1,100 μL/孔,4℃过夜。封闭同1.3.4节的方法。用0.1%BSA(PBST稀释)稀释过敏血清(1:20稀释),各取50 μL 1.0 mg/mL的样品4~7与50 μL稀释血清于孔板外反应1 h后,加入孔中,37℃孵育2 h,PBST洗涤6次。孵育二抗、显色、吸光值测定同1.3.4节的方法。设置阴性孔(0.1%BSA代替竞争抗原和血清),阳性孔(0.1%BSA代替竞争抗原)。

1.4 数据处理

使用GraphPad Prism 5.01软件进行独立样本 t 检验分析和单因素方差分析,结果以“平均值±标准差”表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 直接免疫斑点印迹法结果分析

为了初步确定配方粉样品的致敏风险,利用直接免疫斑点印迹法检测样品中蛋白质与牛奶过敏患儿血清中抗体的结合性。试验结果如图1所示。与非过敏血清结果相比,34例血清样本均与样品1出现不同程度的免疫斑点,表明34例血清样本中均含有牛奶过敏原的抗体,均属于IgE介导的牛奶过敏反应。30例血清样本(除18号、26号、28号、29号)、25例血清样本(除9号、25号、26号、27号、28号、29号、30号、33号、34号)分别与样品2、样品3出现颜色深浅不同的免疫斑点,表明乳清蛋白是牛奶过敏患儿主要过敏原之一。34例血清样本中,33例(除32号)与样品4以及31例(除10号、12号、14号)与样品6中的蛋白出现结合反应,提示部分水解的乳清蛋白粉原料对于牛奶过敏患儿来说仍具有一定的致敏风险。此外,所有血清样本均不与样品5、样品7发生结合,提示深度水解的乳清蛋白粉的潜在致敏风险较低。

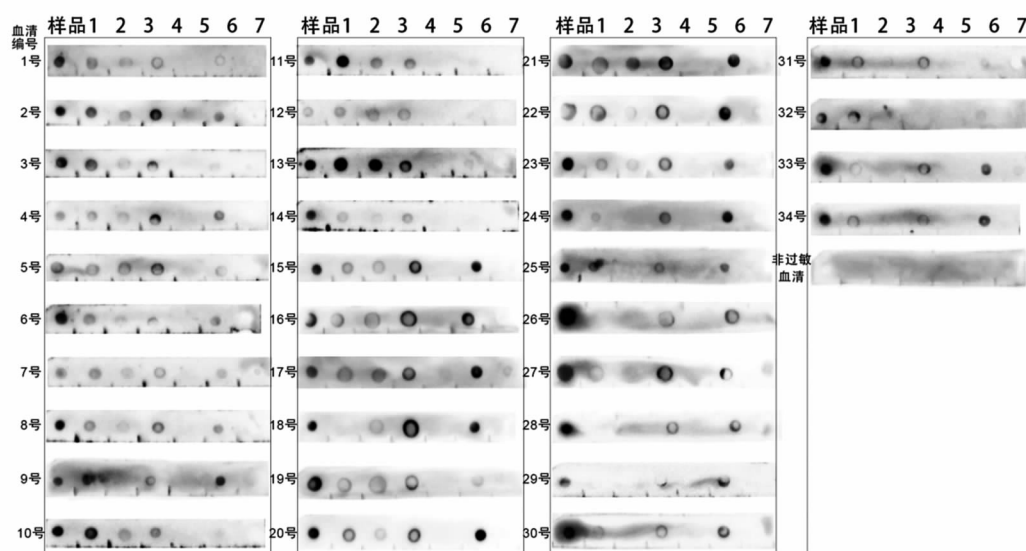


图1 直接免疫斑点印迹法评估配方粉样品与牛奶过敏患儿血清的结合能力

Fig.1 The binding capacity of infant formula and serum from CMA children using the direct Dot-immunobinding blot

2.2 间接竞争免疫斑点印迹法结果分析

理论上阳性对样品1会与其它样品竞争性结合牛奶过敏患儿血清中的抗体,其它样品的免疫反应性越高,血清中能与样品1中的过敏原结合的剩余抗体就减少,出现的印迹斑点颜色越浅。

由于可采集的婴幼儿血清量较少,本部分研究只选取了血清量较多的9号、15号和22号进行反应,结果如图2所示。3个血清样本与样品1均出现强结合,与样品4~7也出现了不同深浅的免疫斑点,其中样品5和样品7的深度更接近样品1阳性对照,表明深度水解乳清蛋白原料及配方粉致敏风险更低。

2.3 ELISA 结果分析

无论是直接还是间接竞争性免疫斑点印迹法都是基于肉眼观察免疫斑点的颜色深浅,为了能够对反应结果进行量化验证,本研究进一步使用间接和间接竞争性ELISA方法检测了牛奶过敏患儿血清(由9号、15号和22号患儿血清等体积混合)和配方粉样品的结合能力。

间接ELISA结果如图3所示,样品4~7的OD值均显著低于样品1($P<0.05$),其中样品4的OD值显著大于样品5($P<0.05$),样品6的OD值显著大于样品7($P<0.05$)。表明深度水解乳清蛋白

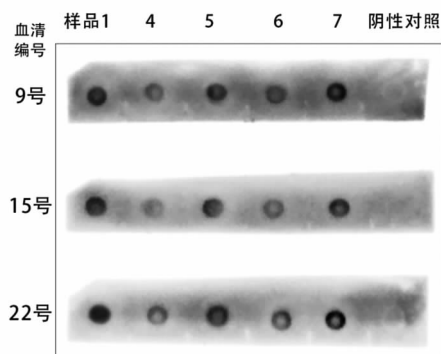
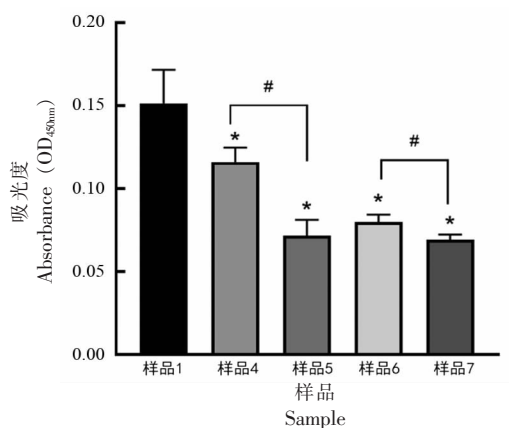


图2 间接竞争性免疫斑点印迹法评估配方粉样品与牛奶过敏患儿血清的结合能力

Fig.2 The binding capacity of infant formula and serum from CMA children using the indirect competitive Dot-immunobinding blot

的原料及配方粉的潜在致敏风险明显低于部分水解乳清蛋白的原料及配方粉。

间接竞争ELISA结果如图4所示,阴性对照、样品4和样品6的OD值均显著低于样品1($P<0.05$),样品5和样品7的OD值更接近阳性对样品1,且样品4的OD值和样品5的OD值存在显著性差异($P<0.05$),样品6和样品7之间存在显著性差异($P<0.05$)。此结果进一步验证了深度水解乳清蛋白的原料及配方粉的潜在致敏风险明



注:*. 与样品 1 的 OD 值相比存在显著性差异 ($P < 0.05$); #. 组间比较存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 3 间接 ELISA 法评价配方粉样品与牛奶过敏患儿血清的结合能力

Fig.3 The binding capacity of infant formula and serum from CMA children using the indirect ELISA

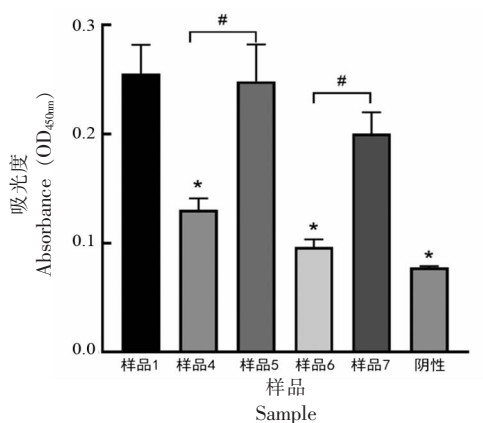


图 4 间接竞争 ELISA 验证配方粉样品与牛奶过敏患儿血清的结合能力

Fig.4 The binding capacity of infant formula and serum from CMA children using the indirect competitive ELISA

显低于部分水解乳清蛋白的原料及配方粉。

3 讨论

乳清蛋白是一类具有高营养价值的优质蛋白,广泛应用于乳制品生产中,主要包括 β -乳球蛋白(β -Lg)、 α -乳白蛋白(α -La)、牛血清白蛋白(BSA)和乳铁蛋白(LF)等成分^[21],其中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白被认为是最主要的过敏原,分别占牛奶总蛋白的 5%和 10%^[22]。牛奶过敏的诊断通

常基于临床病史和牛奶蛋白特异性 IgE (sIgE)水平或皮肤点刺试验^[23],大多数牛奶过敏是由 IgE 介导的 I 型速发型超敏反应,通常在摄入牛奶后几分钟内出现过敏症状^[24],其中,约 50%~70%的患者出现皮肤过敏症状,50%~60%的患者出现胃肠道症状,20%~30%的患者出现呼吸系统症状^[25-26]。据统计,市售部分水解乳清蛋白配方粉中,分子质量大于 6 ku 的肽含量占比达 18%以上^[27],依旧保留了诱导免疫反应的能力^[28]。本次研究也证实了这一观点,虽然对过敏原进行了酶水解,水解产物中依然存在有 IgE 结合能力的片段,不适合提供给牛奶过敏患儿。而深度水解配方粉,几乎所有肽的分子质量都在 3 ku 以下^[16],致敏风险很低。

血清学方法是通过待测蛋白与过敏患者血清中特异性 IgE 的结合能力来评价该蛋白的潜在免疫反应性,比体内评价方法更加方便和直接。此外,血清样本的用量对于利用过敏患者血清进行免疫反应性评价非常重要,婴幼儿过敏患者的血清更为珍贵。免疫斑点印迹法是一种简单方便的检测方法,用于评价粗裂解物或溶液中目标蛋白质。该方法利用硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜作为固相支持物,进行抗原-抗体反应的免疫学分析。由于使用固相支持物作为载体,每个配方粉样品的取样量仅为 5 μ L,降低了试验成本。此外,斑点的深浅可以直观地比较各样品之间的反应程度。由于无需通过 SDS-PAGE 进行蛋白分离,相比于 WB,其操作过程更加简单且耗时较短。ELISA 也是一种广泛使用的蛋白质检测方法,因特异性好,灵敏度高,常被用作食物致敏原的评价和定性、定量分析^[29]。虽然免疫斑点印迹法不对样品中的蛋白进行分离,只能确定血清与牛奶蛋白结合,无法确定具体与牛奶中哪种过敏原结合,然而从临床意义上看,与牛奶蛋白有结合就表明有引发过敏症状的可能。免疫斑点印迹法最大的优势之一是血清使用量少,本研究中直接免疫斑点印迹 7 组样品的血清使用量为 200 μ L/人,稀释后能使 NC 膜完全浸没,且稀释血清可回收重复利用;间接竞争免疫斑点印迹血清使用量为 1 μ L/人,而 ELISA 的血清使用量分别为 5 μ L/人和 2.5 μ L/人。因此对于血清较难获得的血清学研究,使用免疫斑点印迹法不失为更优策略。

通过直接免疫斑点印迹法可以清楚地观察到,34例血清样本均与市售普通牛奶粉产生了不同程度的免疫斑点,97.06%血清样本(33/34)与部分水解乳清蛋白粉原料,91.18%血清样本(31/34)与部分水解配方粉中的蛋白质出现结合反应,而均不与深度水解乳清蛋白粉原料或深度水解配方粉发生结合反应,故而认为与部分水解原料或配方粉相比,深度水解原料或配方粉的致敏风险更低,部分水解原料或配方粉对过敏患儿而言,仍可能诱发过敏症状。间接竞争免疫斑点印迹法结果同样验证了这一观点。

免疫斑点印迹的劣势是基于肉眼观察免疫斑点的颜色深浅,容易导致误判。间接ELISA和间接竞争ELISA是ELISA的两种常见形式。间接ELISA使用颜色反应或荧光信号,可以直观地观察结果,而特异性较低,抗体消耗多;间接竞争ELISA由于孵育竞争抗原和目标抗原,增加了操作时间和复杂性,而特异性高,抗体消耗少。本研究结合两种ELISA的优缺点,组合使用,对免疫斑点印迹结果进行验证,结果显示一致,确定了免疫斑点印迹方法的准确性与科学性,可用于受血清量限制的免疫反应性评价。

4 结论

免疫斑点印迹法是一种简单方便的免疫方法,本研究通过直接免疫斑点印迹初步鉴定样品的免疫反应性,继而采用间接竞争免疫斑点印迹法,评估样品的致敏风险,最后采用ELISA对免疫斑点印迹结果进行验证,证明了免疫斑点印迹法可以作为血清学指标,为利用较难获取的婴幼儿过敏患儿血清初步评估乳蛋白产品免疫反应性提供了新思路。其次,本研究基于未有一例患儿血清与深度水解配方粉样品产生结合,认为深度水解配方粉可用于0~2岁牛奶过敏患儿管理。

参 考 文 献

- [1] TANG M L K, MULLINS R J. Food allergy: Is prevalence increasing?[J]. *Internal Medicine Journal*, 2017, 47(3): 256-261.
- [2] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 41-58.
- [3] 赵京. 中国儿童食物过敏现状[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2019, 13(4): 271-275.
ZHAO J. Current situation of food allergy among children in China[J]. *Chinese Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019, 13(4): 271-275.
- [4] FENG H, CHEN Y, CHEN H B, et al. A methodology of epidemiologic study in the general population focusing on food allergy—china, 2020[J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(34): 749-755.
- [5] World Health Organization. Risk assessment of food allergens Part 1: Review and validation of Codex alimentarius priority allergen list through risk assessment[R]. Geneva: WHO, 2021.
- [6] MARTIN C R, LING P R, BLACKBURN G L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula[J]. *Nutrients*, 2016, 8(5): 279.
- [7] BOYCE J A, ASSAAD A, BURKS A W, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the united states: Summary of the niaid-sponsored expert panel report[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2011, 64(1): 175-192.
- [8] HOCHWALLNER H, SCHULMEISTER U, SWOBODA I, et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention[J]. *Methods*, 2014, 66(1): 22-33.
- [9] ZEPEDA-ORTEGA B, GOH A, XEPAPADAKI P, et al. Strategies and future opportunities for the prevention, diagnosis, and management of cow milk allergy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 608372.
- [10] SCHOEMAKER A A, SPRIKKELMAN A B, GRIMSHAW K E, et al. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children - EuroPrevall birth cohort[J]. *Allergy*, 2015, 70(8): 963-972.
- [11] SACKESEN C. Epidemiology of cow's milk allergy: Has it changed?[J]. *Clinical and Translational Allergy*, 2011, 1(1): 50.
- [12] VANDENPLAS Y, BHATIA J, SHAMIR R, et al.

- Hydrolyzed formulas for allergy prevention[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2014, 58(5): 549–552.
- [13] VANDENPLAS Y, SALVATORE S. Infant formula with partially hydrolyzed proteins in functional gastrointestinal disorders [J]. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 2016, 86: 29–37.
- [14] YANG Q Y, LIN Q, CHEN K N, et al. The effect of preventive use of hydrolyzed protein formula milk on gastrointestinal diseases and physical development of premature infants: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(47): e23398.
- [15] ULUG S K, JAHANDIDEH F, WU J P. Novel technologies for the production of bioactive peptides [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 108: 27–39.
- [16] NUTTEN S. Proteins, peptides and amino acids: Role in infant nutrition [J]. *Nestle Nutr Inst Workshop*, 2016, 86: 1–10.
- [17] GOLKAR A, MILANI J M, VASILJEVIC T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(1): 159–172.
- [18] DE ALMEIDA C R R. Leche de camello: Características y perspectivas para uso en clínica [J]. *Revista Chilena de Nutrición*, 2011, 38(2): 211–218. DE ALMEIDA C R R. Camel milk: Characteristics and prospects for clinical application [J]. *Chilean Nutritional Journal*, 2011, 38(2): 211–218.
- [19] CHRISTIANSEN D, MACINNIS M J, ZACHAREWICZ E, et al. A fast, reliable and sample-sparing method to identify fibre types of single muscle fibres [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6473.
- [20] CITARTAN M. Aptamers as the powerhouse of dot blot assays [J]. *Talanta*, 2021, 232: 122436.
- [21] MEHRA R, KUMAR H, KUMAR N, et al. Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 87: 104760.
- [22] WAL J M. Cow's milk proteins/allergens [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2002, 89(6): 3–10.
- [23] AYATS-VIDAL R, VALDESOIRO-NAVARRETE L, GARCIA-GONZALEZ M, et al. Predictors of a positive oral food challenge to cow's milk in children sensitized to cow's milk [J]. *Allergologia et Immunopathologia*, 2020, 48(6): 568–575.
- [24] WALSH J, MEYER R, SHAH N, et al. Differentiating milk allergy (IgE and non-IgE mediated) from lactose intolerance: Understanding the underlying mechanisms and presentations [J]. *The British Journal of General Practice: the Journal of the Royal College of General Practitioners*, 2016, 66(649): e609–e611.
- [25] HOST A, HALKEN S. Cow's milk allergy: Where have we come from and where are we going? [J]. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 2014, 14(1): 2–8.
- [26] KATZ Y, RAJUAN N, GOLDBERG M R, et al. Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 126(1): 77–82.
- [27] BUSINCO L D S, EINARSSON R, GIAMPIETRO P G, et al. Hydrolysed cow's milk formulae [J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 1993, 4(3): 101–111.
- [28] VANDENPLAS Y, DE GREEF E, ALLAR STUDY G. Extensive protein hydrolysate formula effectively reduces regurgitation in infants with positive and negative challenge tests for cow's milk allergy [J]. *Acta Paediatrica*, 2014, 103(6): 243–250.
- [29] 傅玲琳, 王彦波. 食物过敏: 从致敏机理到控制策略 [J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 1–19. FU L L, WANG Y B. Food allergy: From sensitization mechanism to control strategy [J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 1–19.

Detection of the Immunoreaction of Hydrolyzed Milk Protein in Infant Formula Using Dot-immunobinding Blot Assess

Sun Lijuan¹, Han Shiwen¹, Zeng Binghui¹, Duan Sufang², Tu Zhenhua³, Li Fang², Che Huilian^{1*}

(¹College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083

²Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Inner Mongolia Dairy Technology Research Institute Co., Ltd., Hohhot 010110

³China National Research Institute of Food & Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing 100015)

Abstract Objective: Cow's milk allergy (CMA) is the most common type of food allergy in infants and young children. Infants with milk allergy need to use low-allergenic hydrolyzed cow milk protein formula for the prevention and management. Although protein allergen levels can be reduced through enzymatic hydrolysis, depending on the type of enzymes used and the various filtering methods, residual antigenic epitopes can still cause food allergies. Therefore, the purpose of this work was to develop a quick and accurate method to assess the immunoreactivity of hydrolyzed cow's milk protein infant formula powder. Methods: Firstly, a direct dot-immunobinding blot assay was used to gauge the samples' immunoreactivity with serum samples from allergic children. Subsequently, an indirect competitive dot-immunobinding blot assay was utilized, using commercially available unhydrolyzed whole protein milk powder as a positive control and other milk product samples as competitive antigens, to evaluate the binding capacity of hydrolyzed milk protein infant powder to serum immunoglobulin E (IgE). Finally, direct, and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were also used to validate and confirm the results. Results: The study's findings demonstrated that partially hydrolyzed formula can still bind IgE to induce allergic reactions, while extensively hydrolyzed formula is not immunoreactive. This study provides a new approach for the preliminary evaluation of the allergenicity of milk protein products using limited serum samples from infants and young children with allergies.

Keywords cow's milk allergy; dot-immunobinding blot assay; enzyme linked immunosorbent assay; indirect and indirect competition; serum from allergic patient