

文章编号: 1001-6325(2010)12-1334-02

链格孢霉过敏原提取液的致敏蛋白组分

曹乃清¹, 张宏眷^{2*}

(1. 山东大学附属省立医院 变态反应门诊, 山东 济南 250021; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 变态反应科, 北京 100730)

中图分类号: R 446.62 文献标志码: A

长期以来, 链格孢霉(*Alternaria alternata*)被认为是引起呼吸道变态反应性疾病的重要过敏原之一, 与哮喘患者的呼吸骤停相关^[1], 因此对它的研究具有十分重要的临床意义。本研究采用免疫印迹技术分析了链格孢霉过敏原提取液的致敏蛋白成分, 从而为该过敏原的质谱分析、重组和纯化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂: 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)(Bio-Rad公司); 四甲基乙二胺(TEMED)、低分子量 Marker、十二烷基磺酸钠(SDS)、硫脲、CHARPS、ASB-14(Sigma公司); 超纯尿素(Promega公司), IPG干胶条(pH 3~10)、IPG缓冲液、IPG覆盖液(Amersham Pharmacia Biotech公司)。一抗: 10份链格孢霉特异性 IgE 阳性血清(北京协和医院变态反应科实验室); 二抗: HRP 标记的鼠抗人 IgE McAb(中国医学科学院基础医学研究所); 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(北京天为时代科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 链格孢霉过敏原提取液的制备: 取经空气曝皿、中科院鉴定、26℃恒温下培养的链格孢霉菌苔5g, 液氮浴中研磨, 冰水浴搅拌提取24h后, 离心(4℃, 35 000 × g/min)、浓缩制成适于单向电泳及单向免疫印迹的提取液; 取适量上述提取液经 TCA/丙酮沉淀后, 加入样品裂解液(6 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 2% ASB-14, DDW 定容至 5 mL) 制成适于进行双向电泳的过敏原提取液。

1.2.2 SDS-PAGE: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 5%的浓缩胶, 12%的分离胶, 浓缩胶中电泳电压60 V 30 min, 分离胶中电泳电压为100 V 1 h; 胶进行考马斯亮蓝染色, 扫描留取图像。

1.2.3 双向电泳: (1) 第一向固相 pH 梯度等电聚焦; (2) 平衡; (3) 第二向垂直平板 SDS-PAGE; (4) 染色, 按照 Amer-

sham Pharmacia 公司推荐的方法进行银染; (5) 图象分析, 银染后用 ImageScanner 光学扫描仪进行扫描。

1.2.4 免疫印迹: (1) 免疫印迹前的准备工作, 将与胶大小相同的 PVDF 膜浸泡在甲醇中 20 s, 用去离子水润湿, 放入转移缓冲液中浸泡 5 min。取同样大小的滤纸 6 张浸泡于转移缓冲液中。(2) 转膜, 依次按顺序铺放滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸, 接通电源, 限流 1 mA/cm², 时间为 1.5 h。(3) 封闭, 将 PVDF 膜转入塑料袋中, 按 0.1 mL/cm² 的量加入封闭液, 封口, 在摇床上轻微摇晃封闭 2 h。(4) 一抗反应和洗膜, 将 PVDF 膜置于浅托盘中, 按 0.2 mL/cm² 的量加入 1:2 稀释度的混合阳性血清, 摇床轻摇下室温反应 2 h; 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。(5) 二抗反应和洗膜, 按 0.2 mL/cm² 的量加入辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgE 单克隆抗体, 摇床轻摇下室温反应 1 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。(6) 显色反应, 按 0.1 mL/cm² 的量加入增强型 HRP-DAB 底物显色试剂, 待蛋白点显色后, 即终止反应。(7) 扫描 PVDF 膜留取永久性记录。

2 结果

2.1 链格孢霉过敏原免疫印迹结果分析: 10 例链格孢霉过敏患者的免疫印迹检测均有阳性反应区带出现(表 1), 反应区带变化多样, 表明链格孢霉过敏原提取液含有多种致敏成分, 而对照组无链格孢霉过敏的患者血清呈阴性反应, 无反应区带出现。

2.2 双向电泳免疫印迹分析结果: 双向电泳免疫印迹分析共发现 6 种有免疫活性的蛋白质, 它们的分子质量和等电点如下: 16.4 ku, pI 为 7~8 之间; 26 ku, pI 为 6~7; 31 ku, pI 为 7.5~8.5; 34 ku, pI 为 6.5~7.0; 45 ku, pI 为 7.0~8.0; 57 ku, pI 为 6.5~7.5 之间。

3 讨论

链格孢霉与支气管哮喘尤其是重型哮喘、过敏性鼻炎的关系十分密切^[2]; 因此对链格孢霉过敏原的研究具有深远的

收稿日期: 2010-01-05 修回日期: 2010-04-29

* 通信作者(corresponding author): zhy1941@yahoo.com.cn

表1 10例患者免疫印迹结果
Table 1 Results of immunoblot for ten patients

patient	positive protein strip (ku)	number of positive protein strip
1	92, 87, 67, 53, 22	5
2	92, 87, 67, 53, 45, 22	6
3	22	1
4	22	1
5	92, 22	2
6	92, 53	2
7	92, 67, 53	3
8	22	1
9	92, 53, 45, 26	4
10	>7	>7

社会和经济意义。

检测过敏原活性的实验包括 RAST 抑制实验、白细胞组胺释放实验、酶联免疫吸附实验及免疫印迹实验 (immunoblot) 等, 因免疫印迹实验能够提供被研究过敏原的生物化学

信息诸如分子量等, 而被广泛应用于变应原的研究。目前已报道的链格孢霉致敏组分有^[3]: Alt a 1 (16.4 ku)、Alt a 4 (57 ku)、Alt a 5 (11 ku)、Alt a 6 (45 ku)、Alt a 7 (22 ku)、Alt a 10 (53 ku)、Alt a 12 (11 ku) 和 Alt a 13 (26 ku)。

本研究通过对链格孢霉提取液的 SDS-PAGE 免疫印迹分析, 共发现至少 7 条蛋白条带能与链格孢霉特异性 IgE 结合, 说明链格孢霉提取液中含有多种致敏蛋白组分, 其中有 4 种致敏组分即 53 ku、45 ku、26 ku 和 22 ku 与上述报道^[3]相吻合; 双向电泳免疫印迹分析中, 共发现了 6 种不同等电点及分子质量的蛋白点, 其中 16.4 ku 的蛋白可能为 Alt a 1, 而 31 ku 的可能为 Alt a 1 的二聚体; 26 ku 蛋白与 Alt a 13 相符, 45 ku 与 Alt a 6 相符, 57 ku 与 Alt a 4 相符, 而 34 ku 的致敏蛋白组分是文献未报道的, 可能为其他已知蛋白的多聚体, 亦可能为一种新的未被发现的蛋白, 需通过氨基酸测序来进行证实。文献已报道了 8 种已知分子质量的链格孢霉致敏蛋白, 至少仍有 2 种在本项研究中未被发现, 我们认为可能与所采用的实验方法、原料、不同的菌株、不同的培养条件以及研究对象不同有关。

参考文献:

- [1] Horner WE, Armstrong M, El-Dahr J, *et al.* Prevalence of IgE reactivities in mold-allergic subjects to commercially available fungal enzymes [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2008, 29:629-635.
- [2] Horner WE, Armstrong M, El-Dahr J, *et al.* Prevalence of IgE reactivities in mold-allergic subjects to commercially available fungal enzymes [J]. *Anergy Asthma Proc*, 2008, 29:629-635.
- [3] Hedayati MT, Arabzadehmoghadam A, Hajheydari Z. Specific IgE against *Alternaria alternata* in atopic dermatitis and asthma patients [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2009, 13:187-191.

中国科技核心期刊

《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管, 中华医学会主办, 是中国科技论文统计源期刊, 中国科技核心期刊。半月刊, 全年出刊 24 期, 定价 672 元, 国内刊号 CN 11-9147/R, 邮发代号 80-728, 以电子版、纸版导读同时面向全国公开出版发行, 被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

本刊 2011 年上半年刊出重点栏目分别为: 耳鼻咽喉、口腔颌面部肿瘤; 泌尿生殖系肿瘤; 儿童心脑血管病; 乳腺肿瘤; 脊柱及关节疾病; 内镜在消化系统疾病中的应用; 呼吸系统肿瘤; 内分泌及代谢疾病; 肠内及肠外营养; 高血压及并发症; 肝胆肿瘤; 危重症的处理; 等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱: 北京市 100035-50 信箱 编辑部 收

邮编: 100035

投稿电子邮箱: Lcdactor@163.com

电话: 010-62219211

传真: 010-62222508

网址: www.clinicmed.net