

两种链格孢霉变应原提取方法的比较

曹乃清, 张宏誉*, 杨秀云, 高鲁芳

(山东大学 附属省立医院变态反应门诊, 济南 250021)

摘要: 目的 比较传统方法和新方法对链格孢霉变应原浸出液蛋白质含量、组分及生物活性的影响。方法 将经空气曝皿获得、中国科学院鉴定为链格孢霉的菌株于26℃恒温下培养4周, 取12份5g湿重的菌苔, 6份用传统方法(风干, 高速粉碎机粉碎后, 搅拌提取), 6份采用新方法(液氮研磨+超声破碎, 再搅拌提取)提取蛋白质; 然后用改良的Bradford法进行蛋白质含量测定; SDS-PAGE分析两种方法提取的蛋白质组分的差别, 放射性变应原吸附(RAST)抑制试验比较两者间变应原生物活性的差异。结果 传统方法和新方法提取的蛋白质含量分别为(0.205±0.019)和(0.532±0.023)g/ml, 所得变应原的50%抑制率分别为5.96和1.25μg/ml。结论 两种提取方法中, 新方法能够得到较高的蛋白质含量及更多的蛋白质组分, 对于低丰度蛋白的获得及生物学活性即效价的提高具有十分重要的意义。

关键词: 传统方法; 新方法; 链格孢霉变应原浸出液; 生物活性; 放射性变应原吸附抑制试验

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-8705(2009)01-0021-04

Comparison of Novel and Traditional Methods for *Alternaria Alternata* Allergen Extract Production

CAO Nai-qing, ZHANG Hong-yu*, YANG Xiu-yun, GAO Lu-fang

(Department of Allergy, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

Objective To investigate the influence of novel and traditional methods on the extract production of *Alternaria alternata*. **Methods** *Alternaria alternata* was collected from the air and identified by Chinese Academy of Sciences, cultured under 26℃ for four weeks. Twelve 5g fresh molds, six extracted by traditional method (wind dry, disintegrated by high-speed disintegrator), another six by novel method (liquid nitrogen+ultrasonic); protein concentration was determined by Bradford assay, its residual proteins were analyzed by SDS-PAGE, and bioactive potency were tested by RAST inhibition. **Results** The concentration of protein extractions were (0.205±0.019) and (0.532±0.023) g/ml respectively. From SDS-PAGE, we gained the most component in the extraction by novel method; from RAST, 50% inhibition were 5.96 and 1.25 μg/ml respectively. **Conclusion** Novel method was more production than traditional method.

Key words: traditional method; novel method; *Alternaria alternata* extracts; bioactivity; RAST inhibition

Chin J Allergy Clin Immunol, 2009, 3(1):021-024

近年来发现, 链格孢霉 (*Alternaria alternata*) 是一种常见的、极为重要的吸入性变应原, 与支气管

* 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; # 通信作者 电话: 010-65296341, 电子邮件: zhy1941@yahoo.com.cn

哮喘、变应性鼻炎的关系十分密切^[1]；传统的链格孢霉变应原提取方法蛋白质含量较少，效价不高；为了探索一种有效的提取方法，本研究比较传统方法与新方法对链格孢霉变应原浸出液蛋白质含量、组分及生物学活性的影响，为该变应原浸出液的制备、分析、标准化和纯化奠定一定的基础。

材料和方法

菌种获得与培养

在北京协和医院门诊楼顶层用琼脂葡萄糖平皿进行曝皿3分钟，置于26℃恒温下培养3天，将生长出来的菌落逐一分离提纯，置于26℃恒温下培养6天，将菌落形态及镜下鉴定为链格孢霉的真菌送交中国科学院微生物所进行鉴定；将鉴定的链格孢霉进行培养，培养条件为26℃、4周，培养基含葡萄糖200g，蛋白胨100g，氯化钠50g，溶于10000ml水中^[2]。

链格孢霉变应原浸出液的制备

传统方法^[2]：取5g湿重的菌苔，置于生物安全柜内风干30分钟，用高速粉碎机粉碎成粉末状，将粉末倒入50ml干净的烧杯中，加入Coca's液10ml，置于冰水浴中反复搅拌24小时，然后倒入50毫升的离心管中，4℃低温下以35000g的转速离心15分钟，取上清，置-80℃冰箱中保存备用。

新方法：取5g湿重的菌苔，在液氮浴中进行反复研磨直至菌苔呈粉末状，将粉末转入50ml干净的离心管中，加入Coca's液10ml，用超声破碎机进行超声破碎，超声7.0秒，停7.0秒，功率为35%，时间为10分钟，将液体转入干净的50毫升烧杯中，置于冰水浴中反复搅拌24小时，余下步骤同传统方法。

重复上述传统方法与新方法步骤5次，得到12批不同的上清液。

链格孢霉变应原浸出液蛋白质含量测定

将上述两种方法得到的12批变应原浸出液样品，按改良的Bradford蛋白质定量试剂盒操作说明进行蛋白质含量测定。

链格孢霉变应原浸出液蛋白质组分分离

采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对12批变应原浸出液进行蛋白质组分分离。

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)购自Bio-Rad公司，四甲基乙二胺(TEMED)、低相对分子质量Marker、十二烷基磺酸钠(SDS)购自日本Nacalai Tesque公司。

设备：3KD离心式超滤管(北京华美公司)、Biofuge Stratus型离心机(Heraeus Germany)、78-2型双向磁力加热搅拌器(江苏省金坛市)、4711-45/vcx750型超声波细胞破碎仪(Cole-parluer America)、FS系列高速粉碎机(江苏省无锡市)、微型垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

操作程序：从2种变应原浸出液中分别取5ml用3KD离心式超滤管进行超滤浓缩至1ml，各取100μl，尽快加入等体积的2×SDS凝胶加样缓冲液，将样品置于沸水浴中加热3分钟，取适量待检样品进行SDS-PAGE。条件如下：积层胶80V，30分钟；分离胶120V，1小时；完毕后，取出凝胶，用考马斯亮蓝R-250进行染色4小时以上，用适量脱色液进行脱色24小时，其间更换脱色液4次，直至凝胶背景褪色，蛋白条带清晰。取已知相对分子质量的蛋白质Marker作为阳性分子量标准。

链格孢霉变应原生物活性检测

采用放射性变应原吸附(radioallergosorbent test, RAST)抑制试验^[3]进行链格孢霉变应原生物活性检测。

材料：链格孢霉变应原CAP、供绘制标准曲线的标准血清、酶标二抗、底物(4-甲基伞桂-β-半乳糖苷)、终止液及其附属液(均购自瑞典Phadia公司)、阳性混合血清(20例链格孢霉过敏患者血清混合而成)、阴性混合血清(10例非链格孢霉过敏患者血清混合而成)。

仪器：采用Phadia的UniCAP100变应原检测系统。

操作方法：将2种提取方法所得到的链格孢霉变应原浸出液进行 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 和 10^{-1} 稀释，共得到10种不同的稀释液；取10支Eppendoff管，每管加入阳性混合血清100μl及各种不同的链格孢霉变应原浸出液稀释液100μl，在4℃条件下孵育12小时；取阳性混合血清和阴性混合血清各100μl，分别加入Eppendoff管中，再加入Coca's液100μl，在4℃条件下孵育12小时；按UniCAP

100 变应原检测系统提供的 RAST 方法对阳性对照、抑制后的阳性血清、阴性对照及供绘制标准曲线的标准血清进行链格孢霉 sIgE 测定, 记录其光密度 (OD) 值。

数据处理:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{RAST} \text{ (阳性对照-OD}_{\text{阴性对照}}) - (\text{OD}_{\text{抑制后阳性血清}} - \text{OD}_{\text{阴性对照}})}{\text{OD}_{\text{阳性对照}} - \text{OD}_{\text{阴性对照}}} \times 100\%$$

统计学处理

计数资料的比较采用方差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。sIgE 光密度 (OD) 值采用线性趋势/多条直线回归比较。

结 果

两种方法提取的蛋白质含量比较

Bradford 测定结果显示, 传统方法和新方法提取的蛋白质含量分别为 (0.205 ± 0.019) 和 (0.532 ± 0.023) g/ml, 两种方法比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 新方法能够得到较高的蛋白质含量。

两种方法提取的蛋白质组分比较

SDS-PAGE 显示, 新方法比传统方法可得到更多的蛋白质组分 (图 1)。

两种方法变应原生物学活性检测结果

5 个不同稀释度 RAST 抑制率测定结果经线性趋势/多条直线回归分析, 显示两种提取方法的链格孢霉变应原生物学活性无明显差异 ($P = 0.106$); 达到 50% 抑制率时, 变应原的蛋白质浓度传统方法为 $5.96 \mu\text{g/ml}$, 新方法为 $1.25 \mu\text{g/ml}$ (图 2)。

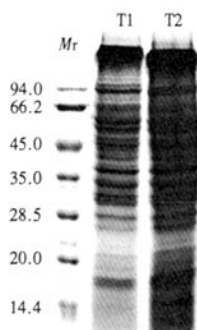


图 1 SDS-PAGE 结果

Fig 1 Result of SDS-PAGE

T₁: 传统方法; T₂: 新方法; Mr: 相对分子质量

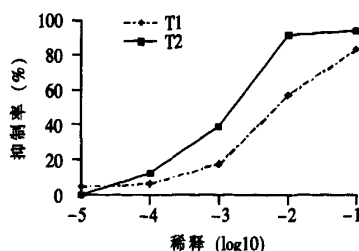


图 2 链格孢霉变应原特异性 IgE 的抑制曲线

Fig 2 Inhibition of *Alternaria*-specific IgE

T₁: 传统方法; T₂: 新方法

讨 论

近年来, 变态反应性疾病, 如变应性鼻炎和哮喘的发病率和死亡率仍呈逐渐上升的趋势, 尤其在儿童中上升迅速, 特别是城市化后, 这可能与暴露于室内外的变应原等因素有关^[4]。在众多的变应原中, 链格孢霉是长期以来, 被认为引起呼吸道过敏反应的最常见变应原之一^[5]。世界上许多地方的调查均显示, 真菌致敏极为常见, 尤其是在哮喘患者中。在美国进行的流行病学调查显示, 儿童哮喘和鼻炎的发病率与室内真菌水平呈正相关^[6]; 在希腊进行的调查显示, 患有特应性疾病的患者中约 20%~30% 对真菌孢子过敏, 其中链格孢霉占 9.8%^[7]; 在意大利所进行的调查显示, 接近 13% 的哮喘患者对链格孢霉过敏^[8]。随着变态反应学的迅猛发展, 人们对变态反应性疾病的认识越来越充分, 治疗方法亦趋于完善, 脱敏治疗已被广大医务工作者和患者所接受。但采用传统的提取方法变应原蛋白质含量甚微, 不能达到标准化且效价不一致。为了探索一种有效的链格孢霉变应原提取方法, 本研究采用液氮中研磨+超声破碎法, 并同时采用传统方法进行链格孢霉变应原提取, 对 2 种变应原浸出液进行蛋白质定量、组分及生物学活性比较, 为链格孢霉变应原浸出液的制备、标准化、纯化奠定了一定的基础。

真菌是有细胞壁的微生物, 含有丰富的几丁质和纤维素, 因此用温和的条件进行细胞破碎, 虽可保持蛋白质的天然状态, 但蛋白质从细胞上的脱落效果欠佳; 为了尽可能得到较高的蛋白质含量, 本研究采用剧烈的条件, 即机械方法进行提取; 在极

低温度下,链格孢霉的细胞壁变得十分脆弱,轻微外力作用即容易破碎,且低温易保持蛋白质的天然性质,液氮能使链格孢霉降温至-180℃左右,超声波在液体中传播产生剧烈扰动作用,使颗粒产生很大的加速度,从而互相碰撞或与器壁互相碰撞而击碎。本新方法在液氮浴中,用研钵研磨菌苔20分钟至粉末状,再加上超声破碎,从而能够达到有效的蛋白质提取。而在传统方法中,风干和高速粉碎这两个过程可能会引起变应原的丢失及变性,因此蛋白质含量明显低于新方法。从SDS-PAGE结果看,2种提取方法中以新方法能够得到更多的蛋白质组分,对于低丰度蛋白的获得具有一定的意义。

变应原效价指所有致敏蛋白活性的总和(即变应原中任何分子所能结合特异性IgE分子表位的总和),RAST抑制试验是体外评估变应原相对效价的主要技术^[9]。本研究所进行的RAST抑制试验表明,2种提取方法所得到的不同稀释度变应原浸出液的抑制率,经线性趋势/多条直线回归比较后,其斜率和截距均无明显差别,无统计学意义,提示2种变应原浸出液含有相同或相近的致敏组分,分析原因可能是变应原浸出液中变应原的成分复杂多样,不会因一种成分的变化而影响整个生物活性。当样本RAST抑制线接近平行、斜率差异无显著性时,可以进行50%抑制率比较,变应原的抗原性越强,其抑制作用也就越强,达到50%抑制率所需要的变应原的量也就越少^[10]。本分析结果显示,新方法达到50%抑制率时,所需要变应原的量明显少于传统方法,说明该方法所得到的变应原的抗原性较强。

蛋白质提取方法很多,每一种方法各具有不同的优势和特点,针对某一种组织和细胞而言,均能探索到一种行之有效的提取方法,上述2种链格孢霉变应原提取方法中,新方法因具有能够得到较高蛋白质含量、较多蛋白质组分及较大的生物活性,因此是一种比传统方法更为有效的链格孢霉蛋白提取方法。

参 考 文 献

- [1] Ahn BH, Park YH, Shin SH. Mouse model of *Aspergillus* and *Alternaria* induced Rhinosinusitis [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2008, epub ahead of print.
- [2] 乔秉善. 变态反应实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [3] Ventura MT, Tummolo RA, Di Leo E, *et al.* Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex* [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2008, 18:253-259.
- [4] Lieberman A. Explosion of mold cases in homes, workplaces and occupational medicine practices. Presented at the 21st Annual Symposium on Man and His Environment in Health and Disease [R]. Dallas, Texas, 2003.
- [5] Marks GB, Bush RK. It's blowing in the wind: new insights into thunderstorm-related asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120:530-532.
- [6] Stark PC, Celedon JC, Chew GL, *et al.* Fungal levels in the home and allergic rhinitis by 5 years of age [J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113:1405-1409.
- [7] Gioulekas D, Damialis A, Papakosta D, *et al.* Allergenic fungi spore records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki-Greece [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2004, 14: 225-231.
- [8] Verini M, Rossi N, Verrotti A, *et al.* Sensitization to environmental antigens in asthmatic children from a central Italian area [J]. *Sci Total Environ*, 2001, 270: 63-69.
- [9] 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.
- [10] 吕相征, 刘秀梅. 转基因食品的致敏性评估 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15:238-244.

(2008-12-31 收稿)