

双向电泳分析链格孢霉过敏原提取液的致敏蛋白组分

曹乃清 张宏誉

【摘要】 目的 利用双向电泳及其免疫印迹分析技术研究链格孢霉过敏原提取液的致敏组分。方法 对经空气曝皿获得,经形态学和分子生物学鉴定为链格孢霉的真菌进行 26℃ 恒温下培养 4 周,提取新鲜菌苔总蛋白后,用双向电泳技术进行蛋白质分离,免疫印迹技术分析链格孢霉过敏原提取液致敏蛋白组分。结果 链格孢霉过敏原提取液经双向电泳共发现 1450 ± 35 个蛋白点,双向免疫印迹分析发现 6 种过敏原组分,它们的相对分子质量(M_r)和等电点(PI)分别为:16.4 × 10³,PI 为 7.0~8.0;26 × 10³,PI 为 6.0~7.0;31 × 10³,PI 为 7.5~8.5;34 × 10³,PI 为 6.5~7.0;45 × 10³,PI 为 7.0~8.0;57 × 10³,PI 为 6.5~7.5。结论 双向电泳可用于链格孢霉过敏原提取液致敏蛋白组分的分析。

【关键词】 链格孢霉;过敏原;双向电泳;免疫印迹

Analysis of *Alternaria alternata* allergen by 2-dimensional electrophoresis CAO Nai-qing*, ZHANG Hong-yu. *Department of Allergy, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji-nan 250021, China

Corresponding author: ZHANG Hong-yu, Department of Allergy, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China. Email: zhy1941@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the components of *Alternaria alternata* allergen with two-dimensional electrophoresis. **Methods** The fungus was gotten from air, identified by morphology and molecular as *Alternaria alternata*, cultured under 26℃ for 4 weeks, extracted total protein of fresh molds, isolated with two-dimensional electrophoresis. And the components of allergen were analyzed with Western blot. **Results** Two-dimensional electrophoresis showed 1450 ± 35 protein spots. Six allergen components were found by two-dimensional electrophoresis Western blot. Their molecular weight and PI were as follows: 16.4 × 10³, PI 7.0-8.0; 26 × 10³, PI 6.0-7.0; 31 × 10³, PI 7.5-8.5; 34 × 10³, PI 6.5-7.0; 45 × 10³, PI 7.0-8.0; 57 × 10³, PI 6.5-7.5. **Conclusion** Two-dimensional electrophoresis could be used in analyzing allergen of *Alternaria alternata*.

【Key words】 *Alternaria alternata*; Allergen; Two-dimensional electrophoresis; Western blot

链格孢霉(*Alternaria alternata*)是一种常见的、重要的吸入性过敏原,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^[1]。据报道,患有重型哮喘(脆性哮喘)的病人较其他哮喘病人有一个更高的过敏程度,对他们的皮肤试验显示更高的真菌皮肤试验阳性率,尤其是链格孢霉^[2]。News-on 等^[3]和 Atkinson 等^[4]进行的研究显示,户外真菌孢子的浓度与哮喘的死亡率、住院率、呼吸道症状呈正相关,而与呼吸流速峰值呈负相关。重型哮喘同样与户内真菌暴露有关,许多病人自述每当进入潮

湿,尤其是那些有可见真菌生长的房间,病情就会加重;Zureik 等^[5]对 1312 个哮喘病人进行的皮肤试验显示,在重型哮喘患者中,对链格孢霉过敏原提取液的阳性率达到 26%。可见链格孢霉过敏与哮喘疾病的严重性、住院率等密切相关,同时还与气道重塑有关^[6-7],因此对链格孢霉过敏原的研究具有一定的社会和经济意义。

本研究经空气曝皿获取真菌,形态学及分子生物学鉴定为链格孢霉,用双向电泳技术对链格孢霉过敏原提取液进行蛋白分离,免疫印迹技术分析致敏蛋白成分,从而为该种真菌过敏原的质谱分析、重组和纯化奠定基础。

材料和方法

链格孢霉过敏原提取液的制备:取经空气曝皿

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2009.08.005

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院变态(过敏)反应科(曹乃清);100730 北京协和医院变态反应科(张宏誉)

通信作者:张宏誉, Email: zhy1941@yahoo.com.cn, 电话:010-65296340

获得,形态学和分子生物学鉴定为链格孢霉的真菌进行 26℃ 恒温下培养 4 周,获取新鲜菌苔 5 g,在液氮浴中研磨成粉末状,冰水浴中搅拌 24 h 后,离心取上清液;将上清液经三氯乙酸 (TCA)/丙酮沉淀后,加入样品裂解液,分装于 -80℃ 冰箱中保存。

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)、硫脲、CHARPS、ASB3-14 购自 Sigma 公司。超纯尿素购自 Promega 公司。IPG 干胶条 (PH3-10)、IPG 缓冲液、IPG 覆盖液购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。一抗:10 份链格孢霉特异性 IgE 阳性血清来自北京协和医院变态反应科实验室;二抗:中国医学科学院基础医学研究所的 HRP 标记的鼠抗人 IgE McAb。增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒 (北京天为时代科技有限公司)。

仪器:微型垂直电泳仪及电转装置 (美国 Bio-Rad 公司)。IPGphor、附件和循环水浴、直电泳仪 miniVE、双向电泳 (2-DE) 图像分析软件 ImageMaster 2D Elite 3.01 均为 Amersham Pharmacia Biotech 产品。

双向电泳:具体操作步骤如下:(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 Amersham Pharmacia Biotech 公司推荐的方法进行银染;(5)图像分析:银染后用 ImageScanner 光学扫描仪,在 256 色灰度和 300 dpi 的分辨率下,对凝胶进行扫描,利用 ImageMaster 2D Elite 3.01 进行凝胶点的检测 (spot detection)、背景消减 (background subtraction)、相对分子质量和等电点校正、归一化处理 (volume normalization) 分析蛋白图谱。

双向免疫印迹:具体操作步骤如下:(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,接通电源,限流 1 mA/cm²,时间为 1.5 h。(3)封闭:将 PVDF 膜转入可封接的塑料袋中,按 0.1 ml/cm² 的量加入封闭液,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,一旦蛋白点显色后,即终止反应。(7)扫描 PVDF 膜留取永久性记录。

结 果

1. 形态学鉴定:菌落在培养基上呈绒状,分生孢子梗分隔,分枝或不分枝,褐色,较短,可达 50 μm × (3~6) μm。分生孢子倒棒形或卵形,砖格状分隔,单个或成串地着生于孢梗的顶端,大小极不规则,通常 (30~36) μm × (14~15) μm,褐色至褐黑色,壁光滑或粗糙。



图 1 链格孢霉镜下形态 (×1000)

Fig 1. Morphology under microscope (×1000)

2. 链格孢霉过敏原提取液双向电泳结果 (图 2):链格孢霉过敏原提取液经双向电泳分析发现 1450 ± 35 个蛋白点。

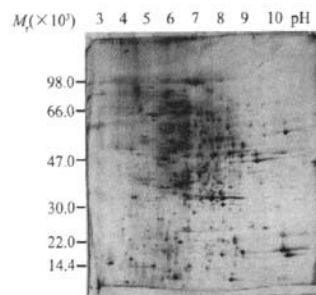


图 2 链格孢霉过敏原提取液双向电泳结果

Fig 2. 2-DE result of *Alternaria alternata* extraction

3. 2-DE 免疫印迹分析结果:如图 3 所示,2-DE 免疫印迹分析共发现 6 种有免疫活性的蛋白质,它们的相对分子质量 (M_r) 和等电点 (PI) 分别为: 16.4×10^3 , PI 为 7.0 ~ 8.0; 26×10^3 , PI 为 6.0 ~ 7.0; 31×10^3 , PI 为 7.5 ~ 8.5; 34×10^3 , PI 为 6.5 ~ 7.0; 45×10^3 , PI 为 7.0 ~ 8.0; 57×10^3 , PI 为 6.5 ~ 7.5。

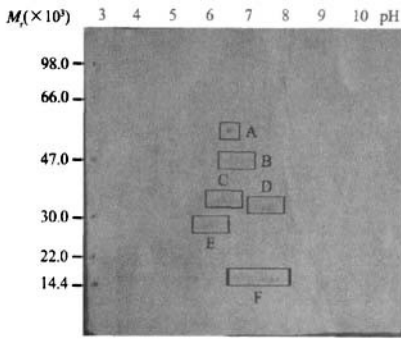


图 3 2-DE 免疫印迹分析结果

Fig 3. Result of two-dimensional Western blot

注:A: 57×10^3 , PI 为 6.5~7.5; B: 45×10^3 , PI 为 7.0~8.0; C: 34×10^3 , PI 为 6.5~7.0; D: 31×10^3 , PI 为 7.5~8.5; E: 26×10^3 , PI 为 6.0~7.0; F: 16.4×10^3 , PI 为 7.0~8.0

讨 论

蛋白质组技术是后基因时代的重要研究工具,它利用高分辨双向电泳对复杂组织进行蛋白质分离,到目前为止,2-DE 是蛋白质分离的黄金标准,由此可以分析生物样品的蛋白质成分,该技术协同质谱分析是正在出现的蛋白质组学领域的中心技术^[8]。通过多次 2-DE,可以得到生物实体蛋白质特征性状的图案,即指纹图谱,指纹图谱在分析方法上使用了各种手段,如高效液相色谱、气相色谱、红外色谱、毛细管电泳等来获得某些中药制剂的特征性图谱。孙劲旅等^[9]曾用双向电泳对户尘螨过敏原进行了指纹图谱的研究。在本研究中,我们通过 2-DE 对链格孢霉过敏原提取液的指纹图谱进行了初探,共发现 1450 ± 35 个蛋白点,为以后该种变应原的鉴定奠定了基础。

2-DE 免疫印迹分析中,共发现了 6 种不同相对分子质量及等电点的蛋白点,它们分别是 16.4×10^3 , PI 为 7.0~8.0; 26×10^3 , PI 为 6.0~7.0; 31×10^3 , PI 为 7.5~8.5; 34×10^3 , PI 为 6.5~7.0; 45×10^3 , PI 为 7.0~8.0; 57×10^3 , PI 为 6.5~7.5。与 <http://www.allergen.org> 报道相符的蛋白有 16.4×10^3 , 可能为 Alt a 1, 而 31×10^3 的蛋白可能为 Alt a 1 的二聚体; 26×10^3 蛋白与 Alt a 1 3

符, 45×10^3 蛋白与 Alt a 6 相符, 57×10^3 蛋白与 Alt a 4 相符, 尽管上述蛋白从相对分子质量上相符, 但是确证蛋白质的根本依据是蛋白质测序, 序列相同方可认定是同一种蛋白, 可以通过氨基酸测序来证实。同时在本试验中我们还发现了一种文献未能报道的蛋白, 即相对分子质量为 34×10^3 的蛋白, 该蛋白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, 需要通过氨基酸测序来进行证实, 文献已报道了 10 种链格孢霉致敏蛋白, 至少仍有 4 种在本项研究中没有被发现, 可能与采用的菌株、试验方法、样品的制备、被研究的人群有关。

参 考 文 献

- [1] 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. Dallas, Texas, 2003, 19-22.
- [2] Miles J, Cayton R, Ayres J. Atopic status in patients with brittle and non-brittle asthma; a case-control study. *Clint Exp Allergy*, 1995, 25(11): 1074-1082.
- [3] Newson R, Strachan D, Corden J, et al. Fungal and other spore counts as predictors of admissions for asthma in the Trent region. *Occup Environ Med*, 2000, 57(11): 786-792.
- [4] Atkinson RW, Strachan DP, Anderson HR, et al. Temporal associations between daily counts of fungal spores and asthma exacerbation. *Occup Environ Med*, 2006, 63(9): 580-590.
- [5] Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, et al. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma; cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ*, 2002, 325(7361): 411-415.
- [6] Van den brule S, Heymans J, Havaux X, et al. Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(2): 202-209.
- [7] Nelson HS. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(4): 676-684.
- [8] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社, 2004; 269-289.
- [9] 孙劲旅, 张宏誉, 应万涛, 等. 户尘螨过敏原指纹图谱研究. *中国医学科学院学报*, 2004, 24(4): 408.

(收稿日期:2009-02-03)