

文章编号: 1000-5862(2014)01-0026-04

葎草花粉主要过敏原的分离鉴定与纯化

李莹¹, 肖小军², 柴文成¹, 谢水祥³, 何韶衡¹, 杨平常^{1,2}, 刘志刚^{1,2*}

(1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 沈阳 121000; 2. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060;

3. 赣南医学院原生物学教研室, 江西 赣州 341000)

摘要: 采用液氮研磨法提取葎草花粉粗蛋白, 凝胶电泳(SDS-PAGE)分离粗提液蛋白组分并测定各组分的相对分子质量, 后经过离子交换层析法分离纯化几类主要的蛋白, 再用 western blotting 分别检测其与花粉过敏患者血清 IgE 结合情况, 鉴定每种主要蛋白质致敏原的致敏性. 分析了葎草花粉变应原成分及其变应原性、免疫原性, 并鉴定主要过敏原的致敏性. SDS-PAGE 凝胶电泳结果表明, 广泛的分布于 8 ~ 170 kDa 之间有主带 13 条, 次带 10 余条; western blotting 检测发现葎草花粉的致敏性较强, 与花粉过敏患者血清 IgE 结合能力较高. 离子交换层析出 4 种主要变应原蛋白, 其相对分子质量分别为 55, 16, 15 和 25 kDa, 其中结合能力最强的是 15 kDa 处蛋白条带. 葎草的主要过敏原为 55, 16, 15 和 25 kDa 蛋白质组分.

关键词: 葎草; 花粉变应原; 离子交换层析

中图分类号: R 593.1 **文献标志码:** A

0 引言

变态反应又称过敏反应, 其发生主要是由于人体对生活环境中某一或若干通常无害的物质的一种“不恰当”防御反应引起. 随着人们生活水平的不断提高, 各地过敏反应的发生率呈逐年上升的趋势. 在西方国家过敏反应性疾病发病率达到 30%^[1], 尤其在欧洲花粉过敏发生率达到了 40%^[2]. 由于花粉过敏症严重影响人们的正常生活, 自从 1819 年英国医生 John Bostock 首次报导花粉症以来, 人们对花粉过敏性疾病发病原因及治疗进行了大量的研究^[3].

葎草(*Humulus scandens* Lour.) 是桑科葎草属植物, 广泛分布于北半球的亚热带和温带以及亚洲诸多国家^[4]. 在我国除新疆和青海外, 其余各省区均有分布^[5]. 由于葎草分布广泛, 花粉量大, 在其花期季节过敏人群多难以避免出现不同的过敏症状. 有学者对上海全年气传花粉进行调查, 发现葎草是最主要的气传草本花粉, 而每年由葎草花粉过敏引起的过敏性鼻炎和哮喘患者数量在同地区其他花粉中数量最多^[6]. 因此, 查找出葎草的主要变应原, 鉴定

主要变应原的致敏性对以后研制脱敏疫苗具有较大的临床意义.

1 材料与方法

1.1 材料

葎草花粉采自辽宁省锦州市郊区; 花粉过敏患者血清由深圳大学过敏反应与免疫学研究所提供, 所用的血清来自于 10 个已经证实对葎草花粉过敏的患者.

1.2 主要仪器和设备

垂直电泳槽、转膜电泳槽(model 1 000/500)、DEAE-Cellulose DE-52 离子交换层析柱、快速蛋白液相层析系统(FPLC); 丙烯酰胺(Acr)、亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(AP)、生物素标记的 IgE 二抗、硝酸纤维素膜(Gelman laboratory)、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Kirkegaard & Perry Laboratories)等.

1.3 花粉粗提液的提取

取新鲜葎草花粉 1.0 g 置于液氮中充分研磨破

收稿日期: 2013-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(811160129, 81302553), 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台项目(2012gjhz0009)和深圳市科技计划国际科技合作(GJHZ20130408174112021)资助项目.

通信作者: 刘志刚(1959-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事过敏性疾病过敏原的生化与分子生物学研究.

碎,用丙酮4℃浸泡3h去脂,过滤纸去丙酮4℃风干;以1:20的比例加入预冷PBS缓冲液4℃搅拌过夜;混合液分装于1.5 mL EP管4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上清,将上清过0.45 μm滤膜,冷冻干燥储存。

1.4 花粉粗提液进行 SDS-PAGE

采用 SDS-PAGE 体系分离粗提液中蛋白质组分并测定其相对分子质量。分离胶 12%, 浓缩胶 15%, 考马斯亮蓝 R-250 染色 0.5 h, 加脱色液脱色 2.0 h, 后用凝胶成像及分析系统拍照并分析其相对分子质量。

1.5 花粉粗变应原的免疫学特性鉴定

采用 Western-blotting 方法配合 10 份葎草花粉过敏患者的混合血清,对花粉变应原进行免疫学特性的鉴定。具体步骤如下: SDS-PAGE 后取出凝胶,凝胶与硝酸纤维膜固定于电转夹 4℃,300 mA 恒流下电转 50 min;取出纤维膜,TBS 清洗 3 次,每次 2~3 min;3% BSA-TBS 4℃封闭 12.0 h(过夜);TBS 清洗 3 次后 TBST 清洗 3 次,每次 2~3 min;1% BSA-TBST 与花粉过敏患者混合血清 5:1 比率混合,室温孵育 3.0 h;1% TBST 清洗 3 次,1% BSA-TBST 与二抗 2 000:1 比率混合,室温孵育 3.0 h;1% TBST 清洗 3 次,1% BSA-TBST 与 HRP 5 000:1 比率混合,室温孵育 1.5 h。TBST 与 TBS 分别清洗 3 次,每次 2~3 min;3,3'-二氨基联苯胺显色 5 min,拍照保存。

1.6 粗提液的离子交换层析与检测

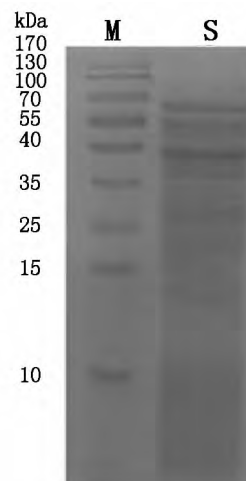
葎草花粉粗提液装截留相对分子质量为 3 500 透析袋,在 0.02 mol·L⁻¹(pH 值为 7.2)的 Tris-HCl 缓冲液透析过夜,过 0.45 μm 滤膜,在快速液相层析系统下,用 DEAE-Cellulose DE-52 离子交换层析柱进行纯化分离。以 pH 值为 7.2 的 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液平衡层析柱;上粗蛋白样,用 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl 洗脱液洗脱,见峰接蛋白;冻干所接个峰蛋白,通过 SDS-PAGE、Western blotting 分析样品,确定各峰收集液中蛋白的免疫活性部分。

2 结果

2.1 葎草花粉粗浸液的 SDS-PAGE 电泳

葎草花粉的电泳结果发现有 30 余条的蛋白条带,其中在 35~70 kDa 区间蛋白含量最丰富,有主

带 13 条,分别是 60,55,53,52,40,39,38.5,36,35,31,30,29 和 22 kDa,余下在 170~8 kDa 之间约有 10 余条次带。其 SDS-PAGE 电泳结果见图 1。



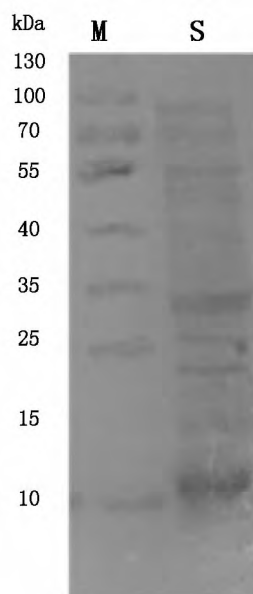
M: Standard molecular weight markers;

S: SDS-PAGE analysis of *Humulus scandens* Lour pollen extract.

图1 花粉粗提液 SDS-PAGE 图

2.2 花粉特异性变应原鉴定

用过敏患者的阳性血清进行免疫印迹,对花粉粗浸液中的变应原进行鉴定。葎草花粉提取液中可与过敏性病人血清 IgE 结合反应阳性的蛋白广泛分布于 100~10 kDa 之间,其中,主要阳性反应蛋白条带分布于 55,16 和 12,25 kDa,余下分布于 130~15 kDa 之间约有 10 余条弱反应条带(见图 2)。



M: Standard molecular weight markers;

S: IgE immunoblots of sera from 10 *Humulus scandens* Lour pollen allergic patients.

图2 葎草花粉免疫印迹图谱

2.3 花粉变应原的纯化

2.3.1 花粉变应原的离子交换层析 用对 DE-52 离子交换层析缓冲液充分透析的花粉粗浸液上柱. 葎草花粉主要有 8 个蛋白峰, 主峰为 II ~ VII, 如图 3 所示.

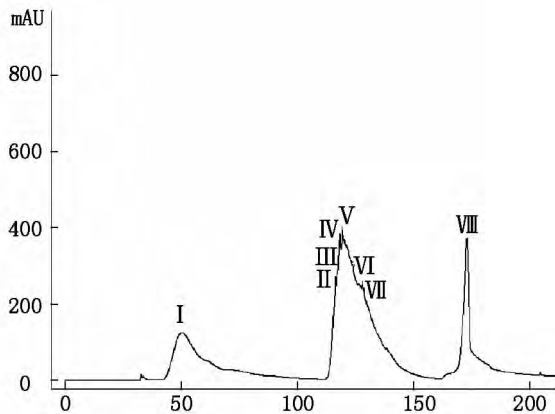


图3 葎草花粉粗提液离子交换层析图

2.3.2 葎草花粉变应原 DE-52 离子交换 SDS-PAGE 将 DE-25 离子交换纯化蛋白按峰进行加样 SDS-PAGE 结果如图 4 所示.

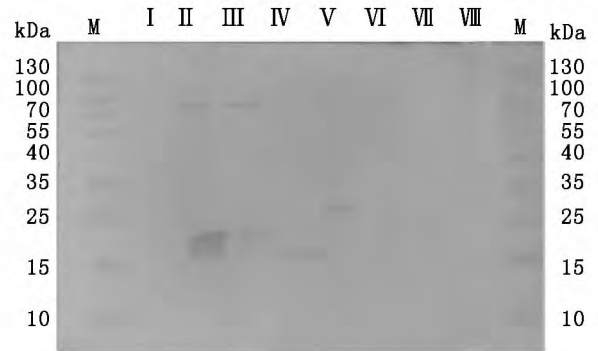


M: Standard molecular weight markers; I ~ VIII SDS-PAGE analysis of every peak eluted protein of *Humulus scandens* Lour pollen extract.

图4 葎草花粉变应原 DE-52 离子交换 SDS-PAGE

2.3.3 用花粉过敏患者血清进行免疫印迹检测 (Western-blotting) 对图 4 所纯化的花粉个峰进行的变应原进行免疫活性鉴定 结果如图 5 所示.

图 4、图 5 检测结果表明, 葎草粗提液离子交换层析后蛋白主要分布在 I ~ VIII 峰. 葎草粗提蛋白与花粉过敏患者的血清 IgE 结合, 主要的过敏患者结合反应阳性的蛋白质在 II、III、IV、V 峰, 其中, II、III 峰结合反应阳性结果比较相似, 蛋白质分子质量大约为 55 和 16 kDa. IV 峰蛋白结合反应阳性结果蛋白主要约为 15 kDa, V 峰结合反应阳性蛋白则约为 25 kDa.



M: Standard molecular weight markers; I ~ VIII Western-blotting of every peak eluted protein of *Humulus scandens* Lour pollen extract.

图5 纯化葎草花粉蛋白免疫印迹图

3 讨论

花粉过敏性疾病是一种严重危害人们健康的常见病. 研究表明, 该病的产生往往与花粉中的某些多糖和蛋白有关^[7]. 葎草 (*Humulus scandens* Lour) 花粉变应原最主要的致敏成分也是蛋白质. 由于葎草分布广泛、花粉量大, 在其开花季节会引起大范围的过敏人群过敏. 在 1995 年的气传花粉过敏原的调查中, 我国大部分地区空气中葎草花粉的含量仅次于蒿草. 有报道指出, 近 10 年来, 仅北京地区空气中花粉含量大幅度增高^[8]. 而由于花粉过敏而导致的门诊哮喘患者在花粉季节大幅度增高^[9]. 宋微微等^[10]总结了 2001—2010 年在沈阳地区沈阳军区总医院门诊变态反应病例, 在引起过敏性疾病的主要过敏原中, 葎草所占比率为 1.95%. 每到葎草开花季节会引起大范围过敏人群产生哮喘、鼻炎等变态反应性疾病, 且发病率高, 严重影响该地区的过敏人群的健康和正常生活.

本研究所采用葎草花期采集花粉进行分离、鉴定与纯化, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳发现有葎草花粉有 30 余条的蛋白条带, 其中在 35 ~ 70 kDa 区间蛋白含量最丰富, 有主带 13 条, 相对分子质量分别是 60, 39, 38.5, 36, 35, 31, 30, 29 和 22 kDa 等, 余下在 170 ~ 8 kDa 之间约有 10 余条次带. 这与立冬栋等^[1]研究结果相似, 葎草花粉在 10 ~ 20 kDa 的蛋白质种类最多, 其次为 20 ~ 30 kDa. 免疫印迹结果显示, 天然的葎草花粉变应原有约 20 余种, 纯化出来的葎草花粉变应原于相对分子质量约为 55 和 15, 25 kDa 与葎草花粉过敏患者血清结合为阳性, 其中相对分子质量为 15 kDa 处蛋白条带阳性结合显色最明显, 致敏性最强, 与孙秀珍等^[11]报道的葎草花粉过敏原中 8 种蛋白为主要蛋

白致敏成分基本吻合 23.2 kDa 和 11.8 kDa 和 H. S. Park 等^[12]在 2001 年对 *Humulus japonicus* 研究发现 相对分子质量为 10 kDa 的葎草花粉变应原能够与 72% 的花粉过敏患者血清结合的结果较相似, 吻合度较高(见图 2、图 5)。这个发现为临床用天然纯化的葎草花粉过敏性疾病的诊断奠定了一定的理论基础, 也为治疗葎草花粉过敏的患者提供了一定的实验依据。相对于人工合成的葎草花粉蛋白, 天然纯化的葎草花粉蛋白变应原更接近花粉过敏患者的致敏过程, 用天然纯化的蛋白作为免疫疫苗, 更形象模拟了天然诱发过敏过程, 使患者产生的免疫耐受直接来自天然致敏物质。

但是由于本实验的蛋白是粗纯, 不能够更进一步说明葎草花粉过敏患者具体对哪种蛋白过敏, 所以还需要更进一步改进纯化技术, 争取具体到某种致敏原蛋白, 以便更加系统科学地治疗葎草花粉过敏性疾病, 缩短临床治疗时间, 为葎草花粉过敏患者带来福音。

4 参考文献

- [1] 贾云秀, 郭淑香. 免疫治疗儿童花粉症 9 例 [J]. 佳木斯医学院学报, 1992, 15(2): 13.
- [2] Amato I G D, Cecchi L, Bonini S, et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe [J]. Allergy 2007, 62(9): 976-990.
- [3] 姚敏. 热带植物花粉过敏原的研究进展 [J]. 中国热带医学 2009, 9(7): 1370-1371, 1392.
- [4] 何韶衡, 刘志刚. 基础过敏反应学 [M]. 北京: 科学出版社 2009: 3-950.
- [5] 李东栋, 何韶衡, 陶爱林. 中国武汉地区葎草花粉变应原蛋白质组分的双向电泳分析 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 58-62.
- [6] 孙立英, 郭胤仕, 王怡玮, 等. 上海中心城区气传花粉的研究 [C]//成都: 中华医学会 2011 年全国变态反应学术会论文汇编 2011: 9-13.
- [7] 杨汝斌, 刘玲. 花粉变应原研究现状 [J]. 医学综述, 2010, 16(3): 327-329.
- [8] 何海娟, 王良录, 张宏誉. 北京城区空气中花粉分析 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志 2008, 2(3): 179-183.
- [9] Durham S R. Allergen immunotherapy: 100 years on [J]. Clin Exp Allergy 2011, 41(9): 1171.
- [10] 宋薇薇, 林小平, 柴若楠, 等. 2001—2010 年沈阳军区总医院变态反应门诊病例分析 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志 2012, 6(3): 215-217.
- [11] 孙秀珍, 李雅莉, 张蕾, 等. 葎草花粉变应原研究 [J]. 中华微生物和免疫学杂志 2001, 21(增刊): 21-25.
- [12] Park H S, Nahm D H, Kim H Y, et al. Clinical and immunologic changes after allergen immunotherapy with Hop Japanese pollen [J]. Ann Allergy Asthma Immunol 2001, 86(4): 444-448.

The Characterization for the Antigenic Properties of Pollen Allergens in *Humulus scandens* Lour

LI Ying¹, XIAO Xiao-jun², CHAI Wen-shu¹, XIE Shui-xiang³, HE Shao-heng¹, YANG Ping-chang^{1, 2}, LIU Zhi-gang^{1, 2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Shengyang Liaoning 121000, China;

2. Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China;

3. Department of Pathogenic Biology, Ganna Medical College, Ganzhou Jiangxi 341000, China)

Abstract: To characterize and purify the pollen allergens isolated from *Humulus scandens* Lour, identified the allergenicity of these main allergen. The pollen of *Humulus scandens* Lour were grinded in liquid nitrogen to extract the total protein, analyzed total protein with SDS-PAGE, detected the proteins' allergenicity with western-blotting. Ion-exchange chromatography with DE-52 was used for the purification of the antigens. For the pollen extract of *Humulus scandens* Lour, 30 protein bands were detected in SDS-PAGE. Among them, weights between 8 and 170 kDa has 13 main proteins, more than 10 kinds of secondary proteins. Four of these protein bands, with a molecular weight of 55 kDa, 16 kDa and 15 kDa, 25 kDa, showed immunoreactivity with IgE in the sera from patients with allergy to pollen of *Humulus scandens* Lour. Pollen allergens from *Humulus scandens* Lour were purified and characterized. The result will provide a theoretical foundation for the diagnosis and treatment of allergy to the pollen allergens from *Humulus scandens* Lour.

Key words: *Humulus scandens* Lour; pollen allergen; ion-exchange chromatography

(责任编辑: 刘显亮)