

应用双向电泳和免疫印迹技术分析 软叶针葵花粉变应原*

刘硕¹ 孟光¹ 郑琳麟² 李春林¹ 谢伟伟¹ 龙绮¹

[摘要] 目的:采用双向电泳和免疫印迹技术对软叶针葵花粉提取液蛋白质组分进行分析,寻找软叶针葵花粉的主要变应原。方法:提取软叶针葵花粉变应原,应用双向电泳(2-DE)结合免疫印迹技术,获得相应的电泳图谱和免疫印迹图谱。结果:软叶针葵花粉蛋白提取液经双向电泳后,用考马斯亮蓝染色,得到的电泳图显示约有 601 个主要蛋白斑点。分子量(Mr)分布约 20~130 kD;等电点(pI)主要集中在 4.0~8.0。免疫印迹分析结果显示,阳性组与对照组的差异蛋白点数约为 19 个。结论:双向电泳联合免疫印迹技术对软叶针葵花粉提取液蛋白质组分分析,可寻找到其主要变应原,并可进一步用于变应原致敏组分的研究。

[关键词] 软叶针葵花粉;变应原;双向电泳;免疫印迹

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.11.010

[中图分类号] R756.21 **[文献标志码]** A

Analysis on the total allergens of phoenix roebelenii pollen with two dimensional electrophoresis followed by immunoblotting

LIU Shuo¹ MENG Guang¹ ZHENG Linlin² LI Chunlin¹ XIE Weiwei¹ LONG Qi¹

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Haikou People's Hospital, Haikou, 570208, China; ²Central Laboratory of Haikou People's Hospital)

Corresponding author: XIE Weiwei, E-mail: 1066156813@qq.com

Abstract Objective: To investigate allergen extract and to seek the main allergens of phoenix roebelenii pollen by the technology of two dimensional electrophoresis(2-DE)in protein analysis and immunoblotting. **Method:** Phoenix roebelenii pollen allergen extract was prepared with routine method, 2-DE combined with immunoblotting assay(Western Blotting), laser imagescanning, 2-DE gel analysis software were used to analyzing its protein components. **Result:** About 601 soluble proteins spots were revealed in coomassie-stained gels. Most of the proteins had a molecular weight (Mr) of 20 to 130 kD, and an isoelectric point(pI) value of 4.0 to 8.0. Immunoblotting of 2-DE were showed and there were 19 specific antigen spots, compared with the controls. **Conclusion:** 2-DE is a good method in protein analysis of ephemeroptera allergen extract, and it is useful in seeking main allergens and further research for allergic components.

Key words phoenix roebelenii pollens; allergens; two dimensional electrophoresis; Western blotting

软叶针葵为棕榈科软叶针葵属的热带植物,在海南省被大量用于城市绿化,每年 2~5 月份为花季,花粉量大,在授粉季节可引起过敏。在海口市人民医院耳鼻咽喉头颈外科门诊就诊的变应性鼻炎(AR)患者中,对软叶针葵花粉过敏的患者众多,故认为有必要对软叶针葵花粉变应原进行相关研究。

花粉是重要的吸入性过敏原,其吸入后被鼻腔分泌物消化,释放多种具有较强致敏性蛋白^[1]。花粉变应原蛋白质的分离和鉴定一直是变应性疾病

基础研究的重点之一,目前在国内外对软叶针葵花粉变应原蛋白质的研究甚少,因此本研究对海南软叶针葵花粉变应原中的蛋白质组分进行了分析,获得了完整、高清晰度的软叶针葵花粉蛋白质双向电泳图谱,结合免疫印迹技术,更加直接地反映了软叶针葵花粉的致敏蛋白,从而为获得单一的变应原并为其以后的标准化工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

于软叶针葵盛花期采集软叶针葵花粉,过 60 目样品筛,除去杂质,−80℃ 冰箱保存。软叶针葵植株的鉴定参考《中国气传花粉和植物彩色图谱》。

1.2 主要试剂及仪器

尿素、硫脲购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,二硫苏糖醇(DTT)购自 Amresco;碘乙酰胺 IAA 购于 BIO-RAD;PMSF、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸等购自 Sigma;丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81160129);海南省自然科学基金资助项目(No:30871;811145);海南省国际科技合作重点计划项目(No:2012-GH010);海口市重点科技计划项目[No:海科立 2007-0080 号;海科工信立(2012)72 号];海南省卫生厅科研项目(No:琼卫 2007-79)

¹ 海口市人民医院耳鼻咽喉头颈外科(海口,570208)

² 海口市人民医院中心实验室

通信作者:谢伟伟, E-mail: 1066156813@qq.com

(SDS)、IPG 干胶条(24 cm,pH4-7)及相应平衡溶液购自 GE 公司;硝酸纤维素(NC)膜购自美国 Life Science 公司;ECL 化学发光试剂盒购自北京康为世纪公司。其他试剂为国产分析纯。主要的实验仪器及应用软件:等电聚焦系统(GE ETTAN IPGPHOR3),垂直电泳系统(GE ETTAN DALTsix),双向电泳凝胶图像分析系统 ImageMaster 2D platinum 5.0(GE)。

1.3 软叶针葵花粉变应原总蛋白质的提取

取软叶针葵花粉约 0.5 g,液氮研磨后加入裂解液(2 mol/L 硫脲,7 mol/L 尿素,4% CHAPS)转入 1.5 ml 离心管,离心条件 4℃,12 000 r/min,20 min,取上清液。对获得的上清液进行超声处理,以破碎核酸,之后再离心,4℃,12 000 r/min,20 min,取离心后的上清液。将上清液分装成 3 管,每管约 250 μ l,每管再加入 1 ml 预冷丙酮,-20℃ 沉淀过夜。沉淀完成后于 4℃,12 000 r/min,离心 20 min,弃清液后,固体部分自然干燥,即可得到实验所需的蛋白质团块,-80℃ 保存备用。

1.4 双向电泳

1.4.1 IPG 胶条的水化 取 1 200 μ g 软叶针葵花粉总蛋白与水化液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,1% DTT,1% IPG Buffer,0.001% 溴酚蓝)混匀,上样总体积为 460 μ l。从冰箱取出 IPG 胶条,室温下复温 10 min。吸取样品溶液加到已调水平的水化盘槽中,取出胶条,从酸性端(有字端)开始撕下覆盖膜,胶面朝下放入水化盘的槽中,操作过程要避免产生气泡,胶面与样品溶液完全接触。放好胶条后再加入 1.2 ml 矿物油于支持膜上,调节室内温度为 20℃,胶条水化过夜(10~12 h)。

1.4.2 第一向等电聚焦 开机预冷,在等电聚焦盘中加入矿物油(每条泳道加入 6 ml)。取出水化好的 IPG 胶条并吸干胶条上残余的矿物油,将胶条放入等电聚焦盘中,胶面朝上。剪好滤纸垫片,每个垫片用 75 μ l Milli Q 水润湿,将垫片放在 IPG 胶条两端,边缘与胶面边缘对齐,装上电极板,选择胶条数量后开始进行等电聚焦。聚焦的条件为 500V,1.0 h;1000 V,1.0 h;8 000 V,3.0 h;8 000 V,2.4 h。聚焦完毕后如不直接进行后续试验,则将胶条保存于-70℃ 待用。

1.4.3 胶条的平衡 将等电聚焦后的胶条恢复至室温,置于平衡溶液 I(6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCL,20% 甘油,2% DTT)中平衡 10 min 后转入立即平衡溶液 II(6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCL,20% 甘油,135 mmol/L 碘乙酰胺)中平衡 10 min。将平衡后的胶条在 TGS(Tris-Glycine-SDS pH8.8)电泳缓冲液中漂洗 30 s 后用于第二向垂直电泳分析。

1.4.4 第二向垂直电泳 平衡后的胶条转移至垂直电泳板上方,用含痕量溴酚蓝 0.1% 的琼脂糖封闭。SDS-PAGE 凝胶的制备为 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶。电泳缓冲液为 TGS,电泳条件为 16 mA,30 min;24 mA,5~6 h。

1.5 凝胶的染色

电泳完毕后,取出凝胶置于约 300 ml 染色液中(0.25% 考马斯亮蓝 R250,45.4% 甲醇,9.2% 冰醋酸),在摇床上室温下染色至少 30 min。后转入 500 ml 甲醇脱色液(5.0% 甲醇,7.5% 冰醋酸)脱色 4~6 h 或过夜。

1.6 免疫印迹检测

参照免疫印迹标准操作规程,将蛋白质点转移至 NC 膜,转移条件:200 mA/gel,2 h;电转移后将 NC 膜放置于含 5% 脱脂奶粉封闭液中,平放在摇床上,4℃ 封闭过夜。弃封闭液,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 1:10 稀释的一抗(实验组用封闭液稀释软叶针葵花粉 AR 患者混合血清,对照组用封闭液稀释正常人血清),37℃ 孵育 2 h。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。再加入 HRP 标记的 1:4000 的羊抗人 IgE 二抗(用封闭液稀释),37℃ 孵育 1 h。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入配制好的增强化学发光(ECL)底物液,X 片曝光,暗室显影,定影,洗片。

1.7 图像扫描和分析

用 Image scanner 对完成考马斯亮蓝染色的双向电泳凝胶进行扫描,且采用图像分析软件对扫描获得的图像进行强度校正、点检测、背景消减和点匹配等分析。

2 结果

2.1 双向电泳凝胶蛋白图谱分析

从 2D 胶可见,软叶针葵花粉蛋白质得到了较好的分离,大部分蛋白点独立而且清晰,蛋白点集中分布在 pH 偏中性,分子量 20~130 kDa,其中 55 kDa 附近的蛋白质点分布集中,且丰度高。软叶针葵花粉蛋白的 2 D 胶分离结果经过扫描、ImageMasters6.0 分析,共检测到 601 个蛋白点。

2.2 软叶针葵花粉变应原免疫印迹图谱

Western blotting 检测结果显示,阳性组和对照组比较,特异性变应原蛋白点约 19 个(阳性组的一抗为对软叶针葵花粉过敏的患者血清,对照组的一抗为正常人血清,图 2),阳性组独有的变应原蛋白点在图中用编号 1~19 显示(图 3)。

3 讨论

在发达国家,有 15%~30% 的人对花粉过敏^[2];我国花粉症患者已逾 1 000 万人,城市居民发病率为 0.9% 左右,流行区可达 5%,随着城区绿化品种的丰富,花粉过敏症患者有增加的趋势^[3]。

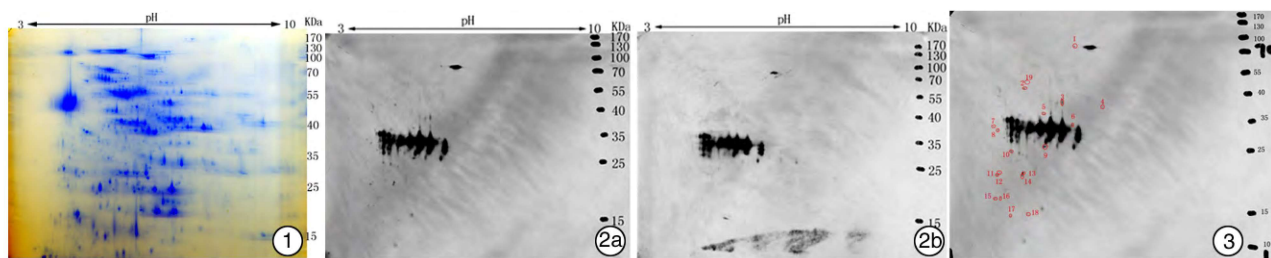


图1 软叶针葵花粉蛋白的双向电泳图谱(考马斯亮蓝 R250 染色); 图2 软叶针葵花粉变应原免疫印迹图谱 2a:阳性组一抗为软叶针葵花粉过敏患者血清;2b:对照组一抗为正常人血清; 图3 阳性结果中独有的蛋白质点(编号1~19)

海南省处于亚热带,全年气候炎热湿润,花木常开,AR患病率也是居高不下。在海口市人民医院就诊的2054例AR患者中,软叶针葵花粉变应原点刺阳性所占比例达67.38%,可见软叶针葵花粉为海南省重要变应原^[4]。花粉变应原的成分包括脂肪、多糖和蛋白质等,但其中最主要的致敏成分为蛋白质^[5]。本研究用双向电泳技术对软叶针葵花粉变应原蛋白质进行分析,以探明其致敏成分。首先进行等电聚焦(IEF Isoelectric focusing),蛋白质因等电点不同而进行分离;紧接着进行第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,即依据蛋白质分子量的不同进行分离,蛋白质样品经双向电泳分离后在胶上呈现独立的蛋白点。随后使用到免疫印迹技术,经双向电泳成功分离的蛋白质被转印到一张硝化纤维素膜(NC膜)上,然后通过将该膜与过敏患者与正常人血清共同孵育、标记并检测变应原蛋白。

本实验首先通过2D分离了花粉的总蛋白,软叶针葵花粉共分离得到了601个蛋白点。与单纯的SDS-PAGE分离结果相比,得到的是独立的蛋白质点,其分子量和pI更加直观和准确,可以对软叶针葵花粉的蛋白总体分布有明确的认识。本研究中获得的高分辨率双向电泳图谱是我国软叶针葵花粉变应原蛋白质第1张完整的蛋白质图谱,国外亦未见报道。同时,结合免疫标记技术,利用过敏患者的血清与正常对照组血清对花粉蛋白质进行免疫印迹筛选,利用图像分析系统ImageMaster 2D platinum 5.0(GE)将2DE-WB的曝光图片与2-DE胶进行比对,显示软叶针葵花粉变应原有19个特异性的蛋白质点,从图上看这19个点主要集中在偏酸性端。我们在实验中也发现,免疫印迹的点与考染胶上点有一定的差异性,分析原因可能与蛋白质提取方法、2D胶染色方法的选择、蛋白质点的免疫原性等方面有关。实验采用的软叶针葵花粉提取变应原总蛋白时因为花粉有花粉壁的存在,有一些壁内蛋白质难以溶解在提取液中。Zhu等(2003)报道考染的检测下限为0.2~0.5 g,有一些低丰度的蛋白质在考染胶上就难以着色;另一方面推测可能与蛋白质与染料结合的亲和力有关,即有些蛋白虽然与染料结合的亲和力不强,在2-DE凝

胶图谱上未显出明显的蛋白斑点,但蛋白质的含量未必少;另外,有一些蛋白质含量较低,但是免疫原性较强,因此在免疫印迹图谱上可以表现出很强的免疫原性。在本实验双向电泳和免疫印迹中,出现了一些蛋白点成串的现象,分析原因为:大多数情况下是同一个蛋白质的不同剪切体或者是家族蛋白,植物样本和肌肉样本常见;斑点成串,也有可能是样本的杂质比较多。

AR的治疗方法主要有避免接触变应原,药物治疗和变应原特异性免疫治疗(allergen specific-immuno therapy, SIT)等,其中SIT被认为是唯一有可能通过免疫调节机制改变AR自然进程的治疗方式^[6]。过去由于技术原因,SIT多采用天然提取的变应原,临床应用难以精确剂量,治疗效果也难以符合标准,而基于双向电泳的蛋白质组学技术可以对变应原蛋白质进行分析,有助于对致敏蛋白质进行纯化和标准化,并最终获得重组的标准变应原应用于临床实践中。

参考文献

- [1] MANDHANE S N, SHAH J H, THENNATI R. Allergic rhinitis: An update on disease, present treatments and future prospects[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11:1646-1662.
- [2] HEDLIN G. The role of immunotherapy in pediatric allergic disease[J]. Curr Opin Pediatr, 1995, 7: 676-682.
- [3] 顾瑞金. 过敏性疾病[M]. 北京:中国协和医科大学联合出版社,1998:67-68.
- [4] 李春林,谢伟伟,刘硕,等. 海南省软叶针葵花粉致AR的临床研究[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2015, 22(10):520-522.
- [5] TINGHINO R, TWARDOSZ A, BARLETTA B, et al. Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109: 314-320.
- [6] DURHAM S R, WALKER S M, VARGA E M, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy[J]. N Engl J Med, 1999, 341: 468-475.

(收稿日期:2016-01-22)