

东亚飞蝗主要过敏原的分析、鉴定与纯化 *

陈义昆¹ 邬玉兰² 刘志刚^{1,2 **}

(1. 深圳大学生命科学学院 深圳 518060; 2. 深圳大学医学院 深圳 518060)

摘要 通过十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 的蛋白质组分并测定其分子量, 收集过敏病人血清, 采用免疫印迹 (Western—blotting) 法鉴定其过敏原成分, 通过凝胶过滤层析对东亚飞蝗过敏原进行分离纯化。结果表明: 东亚飞蝗蛋白粗提液条带大概有 30 条左右, 其中主带大约有 10 条, 相对分子量约为 13、15、25、28、40、45、55、70、100、110 ku, 其中蛋白含量最丰富的约在 70 ku 左右。免疫印迹结果显示, 蝗虫过敏条带主要有 5 条, 相对分子量分别约为 19、29、38、70、130 ku。通过凝胶过滤层析对东亚飞蝗过敏原进行分离纯化, 得到了一个高纯度相对分子质量约为 70 ku 东亚飞蝗过敏原, 并且发现了一个相对分子质量约为 130 ku 的蝗虫新过敏原。本研究为临幊上蝗虫食物变态反应性疾病的诊断和治疗奠定基础。

关键词 东亚飞蝗, 过敏原, 离子交换层析, 免疫印迹

Purification and identification of allergens in *Locusta migratoria manilensis*

CHEN Yi-Kun¹ WU Yu-Lan² LIU Zhi-Gang^{1,2 **}

(1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Proteins from *Locusta migratoria manilensis* were isolated by SDS—polyacrylamide gel electrophoresis (SDS—PAGE) and identified by Western—blotting using sera from patients allergic to locusts. Allergens from *L. m. manilensis* were purified by gel filtration chromatography. About 30 protein bands were separated by SDS—PAGE, ten of which were major bands. The proteins, whose molecular weights (MW) were 70 ku, could bind with specific IgE from the sera of locust-allergic patients, thereby identifying them as specific allergens of *L. m. manilensis*. We identified the primary allergens, whose molecular masses were 19, 29, 38, 70 and 130 ku, by Western-blotting. These results may provide a basis for the diagnosis and immunotherapy of allergic reactions to locusts.

Key words *Locusta migratoria manilensis*, allergen, gel filtration chromatography, Western-blotting

过敏性疾病是人类的常见病、多发病 (Ruffilli and Bonini, 1997), 被世界卫生组织列为 21 世纪重点防治的三大疾病之一, 是当前世界性的重大卫生学问题 (陈文超等, 2005), 世界各国过敏反应性疾病的总发病率高达 10% ~ 30%, 此类型疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎和食物过敏等 (Johanson, 2000)。引起过敏性疾病的过敏原主要有两大类: 一是吸人性过敏原, 如尘螨、花粉、蟑螂和兽羽毛等; 二是食人性过敏原, 如蛋、奶、鱼、

虾和贝等。在我国食人性过敏中对鱼、虾、贝类等过敏者最多, 共占 36% (吕相征和刘秀梅, 2005)。

东亚飞蝗味美如虾, 营养价值和药用价值极高, 是老少皆宜的绿色安全食品, 临幊上时常有人食用东亚飞蝗后引起过敏反应, 如过敏性肠炎、荨麻疹等 (郝玉珍, 2001), 对其过敏严重影响人们的生活质量。目前国内外尚未见有关东亚飞蝗过敏原研究的相关报道, 本文旨在对东亚飞蝗过敏原进行分离、鉴定与纯化, 为临幊上该过敏性疾病的

* 资助项目: 国家 863 计划(2006AA10Z236)、深圳市科技计划项目。

** 通讯作者, E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-28, 接受日期: 2011-12-16

特异性诊断和进一步开展分子生物学方面的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用东亚飞蝗由中国农业科学院植物保护研究所提供,在液氮下研磨后整体匀浆提取蛋白。昆虫过敏病人的阳性血清来自深圳市儿童医院。生物素标记羊抗人 IgE 抗体购于 KPL 公司,链霉亲和素 - HRP 购于 Vector 公司,其他常用试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 东亚飞蝗粗蛋白的提取 将样品在液氮下研磨后,用丙酮浸泡放入4℃冰箱中去脂2 d,其间冰浴中换丙酮5次,待脱脂的丙酮澄清后倒掉丙酮并在通风橱中风干。按每克样品加入20 mL PBS 进行蛋白提取,4℃磁力搅拌24 h。提完后用冷冻离心机在15 000 r/min,4℃条件下离心20 min,上清液即为蝗虫过敏原粗提液。取上清液用PBS液透析(透析带截流范围为6~8 ku)2 d,期间换液5次。透析完后,取50 μL进行SDS-PAGE电泳,剩余的样品经冷冻干燥后放人-80℃冰箱保存。

1.2.2 东亚飞蝗过敏原的分离 采用不连续SDS-PAGE体系分离粗提液中蛋白质组分并测定分子量。分离胶12%、浓缩胶5%,上样浓度2 mg/mL,120 V,电泳1.5 h,考马斯亮蓝R250染色液染色15 min,然后脱色,用凝胶成像及分析系统拍照并分析分子量。

1.2.3 东亚飞蝗过敏原免疫学特性鉴定 电泳完取出SDS-PAGE凝胶,按凝胶的大小剪取NC膜,将胶和膜放入电转缓冲液中平衡20 min后,在300 mA恒压下,于4℃冰浴中电转1.5 h。取下转完的膜于2%的牛血清白蛋白(BSA)溶液中4℃封闭过夜;于1:5倍稀释的过敏病人的阳性血清37℃孵育2 h;加入经TBST稀释(1:2 000)生物素标记的羊抗人IgE抗体,37℃孵育2 h;再加入经链霉亲和素稀释缓冲液(1:2 000)的HRP标记的链霉亲和素,37℃孵育1.5 h;以上每个步骤进行完后都用TBST清洗3次(5 min/次)。DAB试剂盒显色分析。

1.2.4 东亚飞蝗过敏原的分离纯化与鉴定 将

收集的蛋白用Superdex 75凝胶过滤层析柱纯化,以Tris缓冲液充分平衡系统进样,收集较大的峰液进行SDS-PAGE电泳,并通过免疫印迹鉴定纯化后蛋白的免疫活性。

2 结果与分析

2.1 东亚飞蝗蛋白粗提液 SDS-PAGE 结果

如图1所示,东亚飞蝗蛋白粗提液条带大概有30条左右,其中主带大约有10条,分子量大约为13、15、25、29、38、45、55、70、100、110、130 ku,其中蛋白含量最丰富的在70 ku左右。

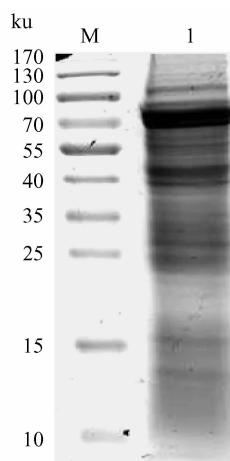


图1 东亚飞蝗蛋白粗提液 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE of total protein in crude extract from *Locusta migratoria manilensis*

M: 蛋白标志物; 1: 东亚飞蝗蛋白粗提液。

M: standard molecular weight markers

1: SDS-PAGE analysis of *Locusta*

migratoria manilensis protein extract.

2.2 东亚飞蝗蛋白粗提液免疫印迹结果

选用临幊上对昆虫过敏患者的阳性混合血清为一抗进行免疫印迹(Western-blotting)鉴定。结果显示(图2),蝗虫过敏条带主要有5条,分子量分别为19、29、38、70、130 ku。

2.3 东亚飞蝗过敏原的分离纯化

2.3.1 东亚飞蝗过敏原的凝胶过滤层析 用20 mmol的Tris-HCl缓冲液平衡经Superdex 75凝胶过滤层析纯化的蝗虫过敏原粗浸液。结果如图3所示,主要有5个蛋白峰。

2.3.2 SDS-PAGE 和 Western-blotting 进行检测

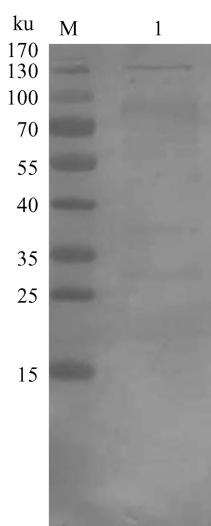


图 2 东亚飞蝗过敏原免疫印迹鉴定图

Fig. 2 Identification of *Locusta migratoria manilensis* allergens by Western-blotting analysis

M: 蛋白标志物；1: 过敏患者混合血清免疫印迹条带。
M: standard molecular weight markers; 1: IgE immunoblots of sera from *Locusta migratoria manilensis* patients.

取较大的 1 号峰进行 SDS-PAGE 电泳, 分子量大小在 70 ku, 纯度 95% 以上, 结果如图 4 所示。

Western-blotting 结果表明, 过敏患者血清在约 Mr70 000 处有一条明显的条带(图 5), 由此说明经凝胶过滤层析纯化出来的 1 号峰是蝗虫的主要过敏原, 分子量在 70 ku。

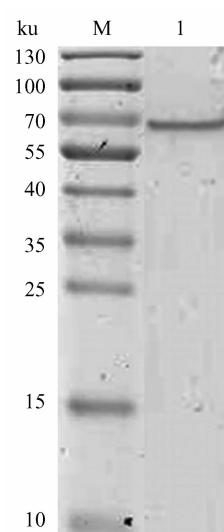


图 4 凝胶过滤层析后取 1 号峰液进行 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the products of gel filtration chromatography (Coomassie brilliant blue stain)

M: 蛋白标志物；1: 第 1 号峰的蛋白带。
M: standard molecular weight markers;
1: SDS-PAGE of peak I.

3 讨论

由于蝗虫广泛用于食用领域, 不但是各种禽畜的优良饲料, 而且具有很好的药用价值。目前, 蝗虫的资源化利用正在全国蓬勃发展, 蝗虫正愈来愈成为资源昆虫界的一朵奇葩。随着餐桌上的蝗虫食品越来越多, 对其过敏的人群也越来越多。

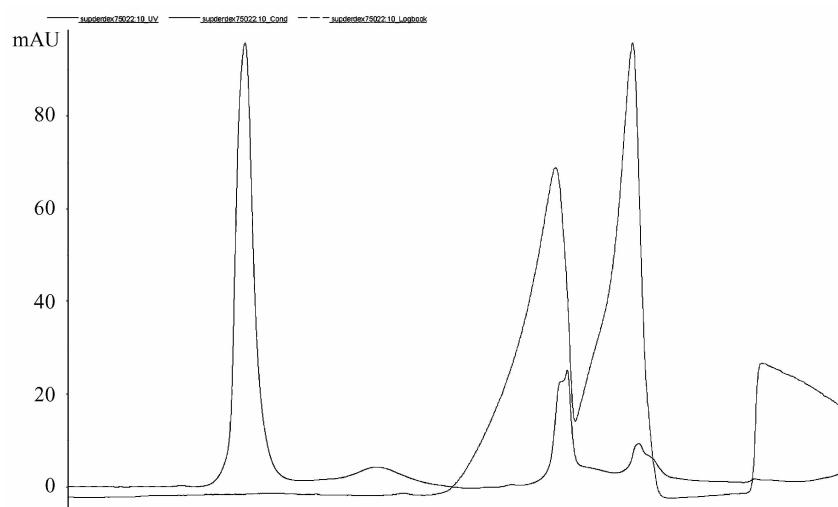


图 3 Superdex 75 凝胶过滤层析纯化峰型图

Fig. 3 Purification of total protein by Superdex 75 size exclusion chromatography

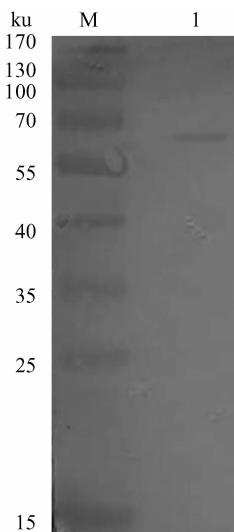


图 5 蝗虫蛋白纯化后的蛋白免疫印迹图

Fig. 5 Western-blotting analysis of purified
Locusta migratoria manilensis protein

M: 蛋白标志物; 1: 第 1 号峰的免疫印迹条带。

M: standard molecular weight markers;

1: Western-blotting of peak I.

随着人们生活水平的提高,食物过敏越来越受到重视。根据流行病学调查,在美国约有 2%~2.5% 的人(600 万~700 万)产生过食物过敏,婴幼儿发病率约为 4%~6%,儿童约为 1%~2%,成年人食物过敏比例比婴幼儿低,但仍为 1%~2%(咸军,2001)。近几年,我国就有很多病例报道食用蝗虫食品过敏的现象。那翠莲和张琪琳(1994)就报道了 6 例食蝗虫过敏的患者,主要临床病状为头晕、头痛、恶心、呕吐、上腹痛、心悸、四肢无力、麻木及皮肤搔痒。李瑛等(2000)也曾报道过 1 例因食蝗虫引发急性喉水肿过敏性皮疹。蝗虫体内有一种异体蛋白,是一种特异性的过敏原,有过敏体质的人,在食用蝗虫后因蝗虫体内的异种蛋白,引起全身速发变态反应,发生过敏,常见的症状有偏头痛,哮喘,严重的还可能休克,甚至危及生命。在国外,Tee 等(1988)就对蝗虫引起的过敏现象进行了研究,通过免疫印迹鉴定出了分子量为 68、66、54、43、37、29 和 18 ku 的过敏原。而 2005 年 Lopata 等从蝗虫的翅膀中发现了一个 70 ku 的新过敏原。对于蝗虫过敏原蛋白的深入系统的研究,以及过敏原蛋白的分子生物学方面的研究,在国内外尚属空白。

本文的研究显示东亚飞蝗蛋白粗提液条带大

概有 30 条左右,其中主带大约有 10 条,相对分子量约为 13、15、25、29、38、45、55、70、100、110、130 ku,其中蛋白含量最丰富的约在 70 ku 左右。收集过敏病人血清,采用免疫印迹法分析其过敏原成分,发现蝗虫过敏条带主要有 5 条,相对分子量分别约为 19、29、38、70、130 ku。与 Tee 等(1988)研究报道相比较,本实验研究结果发现了一个相对分子质量约为 130 ku 的蝗虫新过敏原,但是没有发现相对分子质量约为 66、54 与 43 ku 的过敏原蛋白,其他蛋白基本吻合。这一结果表明东亚飞蝗可能存在地域差异。通过凝胶过滤层析对东亚飞蝗过敏原进行分离纯化,得到了一个高纯度相对分子质量约为 70 ku 东亚飞蝗过敏原。本研究首次在国内对蝗虫过敏原进行基础研究,为蝗虫过敏性疾病的特异性诊断及治疗提供理论及技术支持。

参考文献(References)

- Johanson SH, 2000. Prevention of allergy and asthma. *Allergy*, 55:1069—1088.
- Lopata AL, Fenemore B, Jeebhay MF, Gäde G, Potter PC, 2005. Occupational allergy in laboratory workers caused by the African migratory grasshopper *Locusta migratoria*. *Allergy*, 60(2):200—205.
- Ruffilli A, Bonini S, 1997. Susceptibility genes for allergy and asthma. *Allergy*, 52:256—273.
- Tee RD, Gordon DJ, Hawkins ER, Nunn AJ, Lacey J, Venables KM, Cooter RJ, McCaffery AR, Newman Taylor AJ, 1988. Occupational allergy to locusts: an investigation of the sources of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 81(3):517—525.
- 陈文超,陈红庆,郭英,陈瑛,2005.幽门螺杆菌 cag 致病岛的研究现状.热带医学杂志,5(1):114—117.
- 郝玉珍,2001.食蝗虫致过敏性休克 1 例报告.医学文选,20(6):906—906.
- 李瑛,朱爱华,田翠英,2000.蝗虫过敏引起急性喉水肿 1 例报告.华北煤炭医学院学报,2(6):602.
- 吕相征,刘秀梅,2005.健康人群食物过敏状况的初步调查.中国食品卫生杂志,17(2):119—120.
- 那翠莲,张琪琳,1994.食蝗虫过敏 6 例报告.牡丹江医学院学报,15(2):67.
- 咸军,2001.食品过敏原对食品安全性的影响.江苏调味副食品,70(3):4—5.