

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。本研究为临床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,临床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,为临床上该过敏性疾病的

^{*} 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入 -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约有 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。

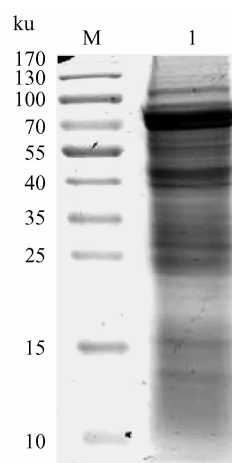


图 1 东亚飞蝗蛋白粗提液 SDS-PAGE 结果

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

选用临床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

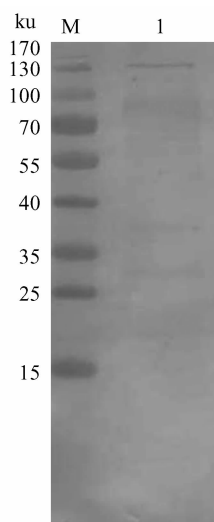


图 2 东亚飞蝗过敏原免疫印迹鉴定图

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。

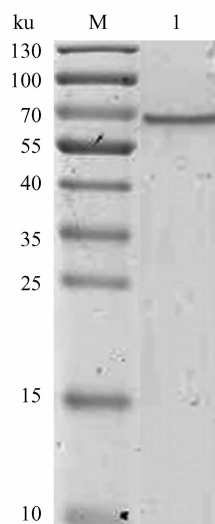


图 4 凝胶过滤层析后取 1 号峰液进行 SDS-PAGE

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。

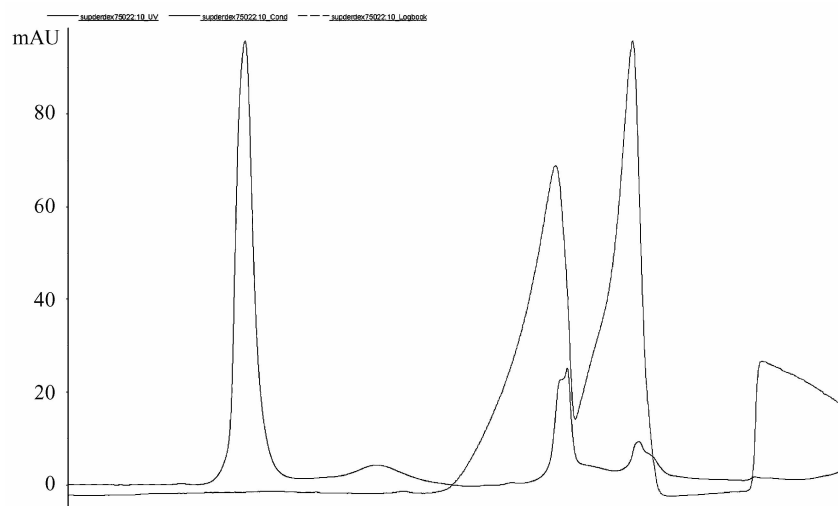


图 3 Superdex 75 凝胶过滤层析纯化峰型图

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

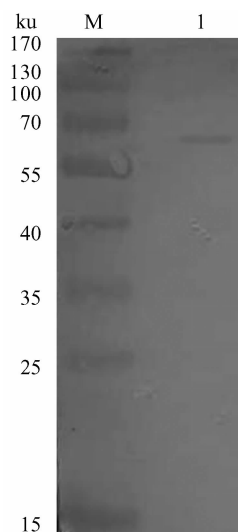


图5 蝗虫蛋白纯化后的蛋白免疫印迹图

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,主要临床症状为头晕、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. *江苏调味品*, 70(3):4—5.