

· 工艺与制剂 ·

粉尘螨 1 类变应原的酶解工艺优化及其过敏原性检测

李秋雨,姜玉新,李朝品*

(皖南医学院医学寄生虫学教研室,安徽 芜湖 241002)

[摘要] 目的:优化粉尘螨 1 类变应原 proDer f 1 的酶解条件及探讨酶解产物的变应原性。方法:以水解度为指标,采用正交试验考察木瓜蛋白酶和胰蛋白酶水解 proDer f 1 蛋白的最佳工艺;采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测酶解产物的过敏原性。结果:温度是影响 proDer f 1 蛋白水解效果的主要因素,其中木瓜蛋白酶最佳水解条件为 pH 6.5,温度 60 ℃,水解时间 4 h,酶用量 4 000 U·g⁻¹;胰蛋白酶最佳水解条件为 pH 8.0,温度 45 ℃,水解时间 4 h,酶用量 5 000 U·g⁻¹;ELISA 检测表明与 proDer f 1 变应原相比,木瓜蛋白酶水解产物和胰蛋白酶水解产物的过敏原性均显著减低,且胰蛋白酶水解产物的过敏原性较木瓜蛋白酶水解产物的过敏原性低。结论:优选的粉尘螨 1 类变应原 proDer f 1 蛋白的酶解工艺可行,且变应原酶解后,过敏原性有不同程度减低,尤以胰酶水解产物变化最为显著。

[关键词] proDer f 1 蛋白;过敏原;蛋白酶水解;酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0008-05

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Technology for Dust Mite Group 1 Allergen and Its Allergenic Detection

LI Qiu-yu, JIANG Yu-xin, LI Chao-pin*

(Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzymatic hydrolysis conditions of proDer f 1, and investigate allergenicity of enzymatic hydrolysate. **Method:** With hydrolysis degree as index, optimum hydrolysis technology of proDer f 1 was investigated by orthogonal test using papain and trypsin; Allergenicity of enzymatic hydrolysate was tested by ELISA. **Result:** Temperature was main factor affecting hydrolysis effect of proDer f 1, optimal hydrolysis conditions of proDer f 1 digested by papain were as follows: pH 6.5, temperature 60 ℃, hydrolysis time 4 h, the amount of papain 4 000 U·g⁻¹; Optimum hydrolysis conditions of trypsin was pH 8.0, temperature 45 ℃, hydrolysis time 4 h, the amount of enzyme 5 000 U·g⁻¹. Compared with proDer f 1 allergen, ELISA analysis showed that allergens were reduced significantly of papain hydrolysate and trypsin hydrolysate, allergen of trypsin hydrolysate was lower than papain hydrolysate. **Conclusion:** Optimized enzymatic hydrolysis process of proDer f 1 protein was feasible, and after enzymatic hydrolysis of allergen, there was different degrees reduction of allergenicity, especially change of trypsin hydrolysate had the most significant.

[Key words] proDer f 1 protein; allergen; protease hydrolysis; ELISA

粉尘螨是最常见、最主要的吸入性变应原,由尘螨感染导致的 I 型变态反应性疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎和过敏性胃肠炎等。目前各种变态反应性疾病呈逐年上升趋势^[1],已成为

[收稿日期] 20120624(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30872367;81172790)

[第一作者] 李秋雨,硕士,从事分子生物学与变态反应研究,Tel:18255366518,E-mail:LIQIUYU7557@163.com

[通讯作者] *李朝品,博士,教授,从事分子病原生物学研究,Tel:0553-3932587,E-mail:epli001@126.com

全球性健康问题^[2]。因此,粉尘螨在变态反应性疾病中的地位逐渐被重视,在已知的约30种变应原成分中,粉尘螨1类变应原是其最主要的致敏成分,具有很强的过敏原性^[3],约91%螨过敏患者的血清中含有1类变应原IgE抗体^[4]。有研究表明酶解变应原可破坏其B细胞表位(构象表位),从而影响其变应原性^[5]。目前有关粉尘螨1类变应原进行酶解工艺及其过敏原性的影响尚未见报道。本试验以木瓜蛋白酶、胰蛋白酶为例,利用正交试验优选其对粉尘螨1类变应原ProDer f1蛋白的酶解工艺,间接酶联免疫吸附试验检测水解产物的过敏原性消减程度,为大规模制备可用于治疗过敏性疾病(哮喘)的低变应原性、高免疫原性的肽疫苗提供参考。

1 材料

粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)过敏原重组质粒pET28a(+)-proDer f1(本实验室保存),蛋白纯化试剂盒His-Band Purification Kit(Novagen公司),HRP羊抗人IgG、HRP羊抗人IgE(Sigma公司),IPTG、木瓜蛋白酶(papain,500 U·mg⁻¹)、胰蛋白酶(trypsin,250 U·mg⁻¹)均购自Solarbio公司,其他试剂均为分析纯。

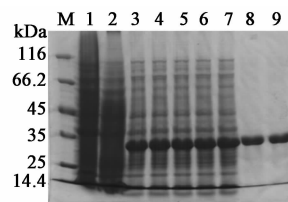
LDZX-50FA型立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),DHG90A(101AS)型数显不锈钢鼓风干燥箱(上海索谱仪器有限公司),SHZ-82A型数显气浴振荡器(江苏荣华仪器制造有限公司),GHX-9270B型隔水式电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司),SW-CJ-2A型超净台(吴江市新长城空调净化有限公司),BG-verMINI型迷你垂直电泳仪(美国BAYGENE公司),G:BOX系列荧光凝胶成像系统(SYNGENE公司),BG-stirrer1DB型磁力搅拌器(美国BAYGENE公司),JY96-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司),ZD-9556水平摇床(上海康华生化仪器厂),HH-2型数显恒温水浴锅(江苏荣华仪器制造有限公司),PB-10型精密pH计(德国Sartorius公司),BS224S型电子分析天平(德国Sartorius公司),DK-1型可调式封闭电炉(金坛鑫鑫厂),DW-HL388型超低温冰箱(中科美菱),6K15型高速离心机(德国Sigma离心机公司),ELx800型酶标仪(美国伯爵仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 proDer f1蛋白的诱导表达及鉴定 将重组质粒pET28a(+)-proDer f1转化到感受态大肠杆菌BL21(DE3)中,涂于含Kan+抗性的LB固体培养

基上,置于37℃恒温培养箱中培养。用灭菌牙签挑取分离良好的单个新鲜阳性克隆菌落接种至含有Kan+(50 mg·L⁻¹)的LB液体培养基中,37℃恒温振荡器中培养过夜(200 r·min⁻¹),取上述培养过夜的阳性菌液(1:50)置入LB/Kan+液体培养基中,37℃恒温振荡器中培养至A值为0.6左右(200 r·min⁻¹),加入0.4 mmol·L⁻¹的IPTG,诱导蛋白表达。5 h后取1.5 mL菌液,于4℃离心1 min(转速13 000 r·min⁻¹),收集菌体沉淀,沉淀中加入50 μL双蒸水和等量2×SDS-PAGE上样缓冲液,使沉淀充分悬浮,煮沸10 min,置于冰水中3~5 min,取20 μL上样进行电泳来检测蛋白表达情况。

2.2 proDer f1蛋白的纯化及鉴定 按上述方法大剂量诱导表达proDer f1蛋白,于4℃离心20 min(转速9 000 r·min⁻¹),收集500 mL表达目标蛋白的大肠杆菌菌体沉淀,反复冻融或超声破菌于30 mL破菌缓冲液(300 mmol·L⁻¹ KCl,50 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄,5 mmol·L⁻¹ Imidazole,6 mol·L⁻¹ 尿素)中。于4℃离心30 min(转速13 000 r·min⁻¹),取上清至一干净管中。将上清液上样于预先平衡好的Ni-NTA柱(10倍柱体积破菌缓冲液平衡),上样速度0.5 mL·min⁻¹。上样完毕后,使用20倍柱体积洗杂缓冲液(300 mmol·L⁻¹ KCl,50 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄,10 mmol·L⁻¹ Imidazole,6 mol·L⁻¹ 尿素)将杂蛋白从纯化柱洗去,如果杂蛋白太多可加大洗杂缓冲液的体积。洗杂结束后,流出液A₂₈₀应<0.02,此时使用10倍柱体积洗脱缓冲液将目标蛋白洗脱下来(250 mmol·L⁻¹ Imidazole),收集洗脱液,取样进行SDS-PAGE电泳分析,对目标蛋白进行透析和浓缩,备用。经考马斯亮蓝染色,结果显示阳性克隆菌株在35KD左右处出现1条新的蛋白质表达条带,蛋白分子量与预计值相符(图1)。大量诱导表达融合蛋白经Ni柱纯化后,获得单一条带的proDer f1蛋白。

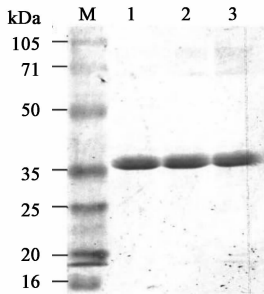


M. 蛋白质分子量标准;1. 空菌株 *E. coli* BL21;2. 未诱导的pET28a(+)-proDer f1;3~7. IPTG诱导表达后的未纯化pET28a(+)-proDer f1;8~9. IPTG诱导表达后纯化的proDer f1

图1 proDer f1蛋白诱导表达和纯化后的SDS-PAGE分析

2.3 纯化产物的western blot分析 纯化的融合蛋

白经 SDS-PAGE 电泳后,将凝胶上的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上,用含 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h 后,加入粉尘螨过敏病人血清(一抗), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h;室温下用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体(二抗), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,室温下用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min;用 PBS 洗涤 1 次(5 min);用二氨基联苯胺(DAB)底物液显色。出现条带后加入终止液终止反应,拍照。采用 DAB 显色,结果在相对分子量 35 KD 处出现目标条带,说明粉尘螨过敏病人血清 IgE 抗体可识别分离纯化的 proDer f 1(图 2)。



M. 蛋白质分子量标准;1-3. Der f 1 多克隆抗体对 pET28a(+)-proDer f 1 表达产物的识别

图 2 Western blot 鉴定纯化的重组 proDer f 1 蛋白

2.4 总氮含量的测定 蛋白质含量的测定方法采用 GB/T5009.5-2003 食品中蛋白质的测定。

2.5 水解度的测定 采用甲醛滴定法^[6]。

2.6 蛋白酶水解纯化

2.6.1 木瓜蛋白酶水解 proDer f 1 蛋白

2.6.1.1 pH 考察 在固定水解温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 水解时间 3 h, 酶用量 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 的条件下, 改变 pH 进行水解, 水解后, 将反应体系置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 沸水中加热 10 min 使酶灭活, 检测水解产物。结果木瓜蛋白酶在 pH 6.5 时水解度最大, 之后随 pH 升高, 酶活性反而降低。故确定木瓜蛋白酶水解 pH 6.5(图 3)。

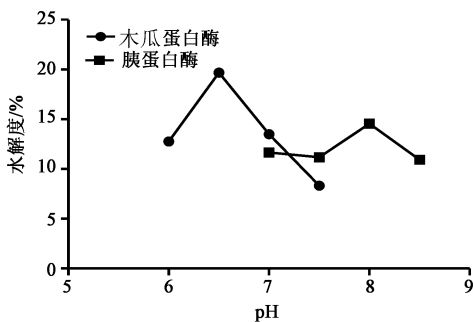


图 3 pH 对水解度的影响

2.6.1.2 水解温度考察 在固定 pH 6.5, 水解时间 3 h, 酶用量 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 的条件下, 改变水解温度

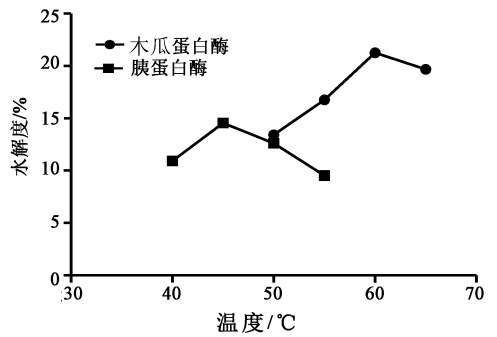


图 4 温度对水解度的影响

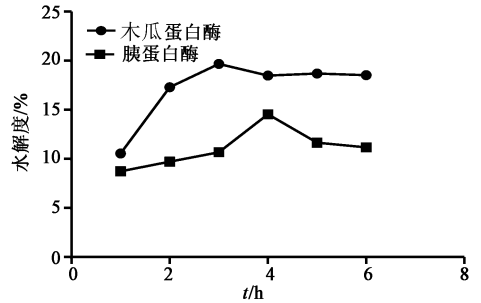


图 5 时间对水解度的影响

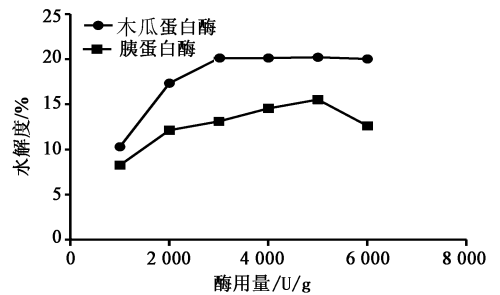


图 6 酶用量对水解度的影响

进行水解。结果 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 时水解度最大(图 4)。

2.6.1.3 水解时间考察 在固定 pH 6.5, 水解温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 酶用量 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 的条件下, 改变水解时间进行水解。结果 3 h 时水解度最大, 随后水解逐渐下降(图 5)。

2.6.1.4 酶用量考察 在固定 pH 6.5, 水解温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 水解时间 3 h 的条件下, 改变酶用量进行水解。结果酶用量为 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 水解度达最大(图 6)。

2.6.2 胰蛋白酶水解 proDer f 1 蛋白

2.6.2.1 pH 考察 在固定水解温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 水解时间 4 h, 酶用量 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 的条件下, 改变 pH 进行水解, 结果确定最适 pH 8.0(图 3)。

2.6.2.2 水解温度考察 固定 pH 8.0, 水解时间 4 h, 酶用量 $5000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 改变水解温度进行水解, 结果确定水解温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (图 4)。

2.6.2.3 水解时间考察 固定 pH 8.0, 水解温度

45 ℃,酶用量 5 000 U·g⁻¹,改变水解时间进行水解,结果确定最佳水解时间为 4 h(图 5)。

2.6.2.4 酶用量考察 在固定 pH 8.0,水解温度 45 ℃,水解时间 4 h 的条件下,改变酶用量进行水解,结果确定最佳酶用量为 5 000 U·g⁻¹。

按上述最佳的 pH、温度、时间和酶用量对 proDer f 1 蛋白进行水解,结果表明木瓜蛋白酶、胰蛋白酶的水解度分别为 24.41%,14.12%。

2.7 正交试验设计

2.7.1 木瓜蛋白酶酶解工艺优选 在单因素试验基础上,确定木瓜蛋白酶的酶解 pH 6.5,选取水解温度、水解时间、酶用量为考察因素,按 L₉(3³) 正交表对酶解工艺条件进行优化,采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 木瓜蛋白酶对粉尘螨 1 类变应原 proDer f 1 酶解工艺正交试验因素水平

水平	A 水解温度/℃	B 水解时间/h	C 酶用量 /×10 ³ ·U·g ⁻¹
1	55	2	2
2	60	3	3
3	65	4	4

表 2 木瓜蛋白酶对粉尘螨 1 类变应原 proDer f 1 酶解工艺正交试验安排

No.	A	B	C	水解度/%
1	3	3	1	18.32
2	1	2	3	16.58
3	3	1	3	19.48
4	1	3	2	15.42
5	2	3	3	24.87
6	3	2	2	19.69
7	2	2	1	21.42
8	2	1	2	20.45
9	1	1	1	12.14
K ₁	16.46	18.70	18.84	
K ₂	23.12	21.58	21.86	
K ₃	25.89	22.26	24.45	
R	9.43	3.56	5.61	

结果表明,水解温度对酶解工艺有极显著影响,酶用量、时间则有显著影响,确定木瓜蛋白酶的最佳酶解工艺条件为温度 60 ℃,酶用量 4 000 U·g⁻¹,水解时间 4 h。按最佳工艺条件进行 3 次验证试验,结果水解度分别为 25.63%,26.42%,25.30%,略高

表 3 木瓜蛋白酶方差分析

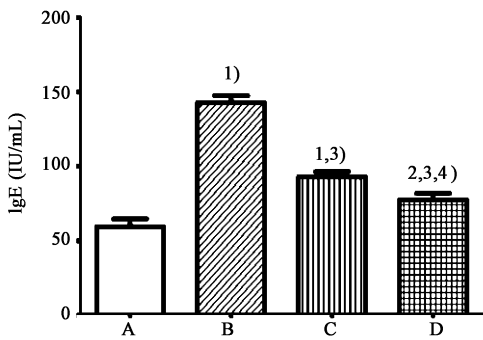
方差来源	SS	f	MS	F	P
A	86.061	2	43.030	266.368	<0.01
B	8.356	2	4.178	25.862	<0.05
C	13.809	2	6.905	42.741	<0.05
D(误差)	0.323	2	0.162	1	

注: F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99。

于最适水解条件的 24.41%。

2.7.2 胰蛋白酶酶解工艺优选 在单因素试验基础上,确定 pH 8.0,按 2.8.1 项下方法对胰蛋白酶的酶解工艺条件进行优化。结果表明酶用量、温度、时间对酶解工艺的影响均具有显著差异,其中酶用量对工艺影响最大,其次是温度、时间;确定最佳酶解工艺条件为温度 45 ℃,酶用量 5 000 U·g⁻¹,水解时间 4 h。按最佳工艺条件进行 3 次验证试验,结果水解度分别为 15.36%,16.15%,15.03%,略高于最适水解条件的 14.12%。

2.8 间接酶联免疫吸附法检测水解产物 在对水解后的 proDer f 1 蛋白水解产物过敏性消减程度进行检测时,用未水解 proDer f 1 蛋白作为阳性对照,用正常人血清作为一抗作为阴性对照。包被抗原时为减小误差每 6 孔作为 1 组,每板有 1 组做空白,在酶标板中每孔加入 10 g·L⁻¹ 抗原 100 μL,4 ℃ 放置过夜,用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,在滤纸上拍干后每孔加入封闭液(含 1 g·mL⁻¹ BSA 的 PBST) 200 μL,37 ℃ 水浴 2 h。封闭结束后,同样用洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min,拍干后每孔加一抗(含 1 g·mL⁻¹ BSA 的 PBST 将粉尘螨过敏原血清稀释 20 倍) 100 μL,37 ℃ 水浴 2 h 后洗涤,拍干后每孔加入 HRP 羊抗人 IgE 37 ℃ 水浴 2 h 后洗涤,拍干后每孔加入邻苯二胺底物液 100 μL,室温放置 15 min,每孔加入 50 μL 终止液(2 mol·L⁻¹ H₂SO₄),于 450 nm 波长处测定其 A_{450nm} 值。分别以按上述最佳酶解条件用 2 种酶对 proDer f 1 蛋白进行酶解获得的产物为抗原,对螨过敏性哮喘病人血清进行 ELISA 测定特异性 IgE 抗体水平,结果见图 7。说明与阴性对照 A 组(健康人血清)相比,阳性对照 B 组(哮喘病人血清组)和 C 组(木瓜蛋白酶酶切 proDer f 1 的产物)的 IgE 水平显著升高(P < 0.01);D 组(胰蛋白酶酶切 proDer f 1 的产物)的 IgE 水平亦升高(P < 0.05)。与 B 组(阳性对照组)相比,C,D 组的 IgE 水平则明显下降(P < 0.01),而与 C 组相比,D 组的 IgE 水平亦降低(P < 0.05)。



A. 阴性对照;B. 阳性对照;C. 木瓜蛋白酶酶切 proDer f 1 的产物;
D. 胰蛋白酶酶切 proDer f 1 的产物

注:与 A 组相比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与 B 组相比
³⁾ $P < 0.01$;与 C 组相比⁴⁾ $P < 0.05$ 。

图 7 血清中特异性 IgE 抗体水平

3 讨论

试验中 ELISA 验证水解产物生物活性多肽的过敏原性较 proDer f 1 蛋白的过敏原性明显减低,表明木瓜蛋白酶和胰蛋白酶酶解 proDer f 1 蛋白可一定程度上消除其原有的过敏原性。近些年来,酶水解蛋白质领域的研究已成为热点,尤其是生物活性肽领域^[7-8]。如 Fukudome 等^[9]发现通过嗜热菌蛋白酶进一步水解小麦面筋可产生强阿片肽活性的物质。目前已从酪蛋白^[9]、乳清蛋白^[10]、大豆蛋白^[11]、美洲大蠊醇提取物^[12]、水产蛋白^[13]、猪皮^[14]等的酶解产物中制得一系列功能各异的生物活性肽。本试验通过木瓜蛋白酶、胰蛋白酶酶切 proDer f 1 蛋白获得的低变应原性的多肽库,为粉尘螨 1 类变应原 proDer f 1 蛋白水解的研究提供一些新思路。目前本课题组正对获得的 proDer f 1 蛋白水解产物进行分离纯化及其生物学功能研究,以期为临床治疗过敏性疾病(如过敏性哮喘)所需的低变应原性、高免疫原性的肽疫苗奠定基础。

[参考文献]

[1] Segundo G R, Sopelete M C, Terra S A, et al. Diversity of allergen exposure: implications for the efficacy of environmental control [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2009, 75(2): 311.

[2] Arlian L G, Platts-Mills T A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107 (3suppl): 406.

[3] Thomas W R, Smith W A, Hales B J. The allergenic specificities of the house dust mite [J]. Chang Gung Med J, 2004, 27(8): 563.

[4] Pittner G, Vrtala S, Thomas W R, et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(4): 597.

[5] 吴海明, 胡志和, 王丽娟. 凡纳滨对虾主要过敏原鉴定及酶法消减计数的研究 [J]. 食品科学, 2010, 31 (17): 272.

[6] 王岁楼, 祝红蕾, 张栋. 小麦蛋白酶解制备活性多肽的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 388.

[7] Geha R S. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy hypersensitivity [J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(6): 603.

[8] Fukudome S, Yoshikawa M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization [J]. FEBS Lett, 1992, 296(1): 107.

[9] 陈新峰, 王君虹, 洪狄俊, 等. 木瓜蛋白酶水解制备酪蛋白肽工艺条件的研究 [J]. 浙江农业学报, 2008, 20(2): 123.

[10] 包怡红, 徐思源. 复合酶解乳清蛋白制备降血压肽的研究 [J]. 中国乳品工业, 2007, 35(7): 25.

[11] 班玉凤, 朱海峰, 孙明珠. Alcalase 水解大豆蛋白制备大豆蛋白寡肽的研究 [J]. 现代食品科技, 2007, 23 (11): 51.

[12] 罗廷顺, 马芳芳, 高孟婷, 等. 美洲大蠊醇提取物的木瓜蛋白酶酶解工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 15.

[13] 郑惠娜, 章超桦, 曹文红. 海洋蛋白酶解制备生物活性肽的研究进展 [J]. 水产科学, 2008, 27(7): 370.

[14] 张路, 代龙, 杨田义, 等. 酶解法从猪皮中提取胶原的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 8.

[责任编辑 全燕]