

火菇素蛋白的免疫印迹检测*

周凯松 吕鹏 薛久刚 张晗星 陈畅 张长铠**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 从金针菇子实体浸提液中提取了抗癌活性物质火菇素, 将纯化的火菇素用 Freund 佐剂乳化后注射到新西兰白兔体内, 经数次加强免疫后采血并分离了抗血清, 并以抗血清为探针建立了火菇素蛋白的免疫印迹法定性检测方法。应用免疫学方法检测金针菇菌丝体和子实体, 结果显示, 只在金针菇子实体中发现与火菇素抗体相结合的抗原信号。

关键词: 火菇素, 金针菇, 免疫检测

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0010-04

DETECTION OF FLAMMULIN WITH IMMUNOBLOT

ZHOU Kai-Song LV Peng XUE Jiu-Gang ZHANG Han-Xing
CHEN Chang ZHANG Chang-Kai**

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: Flammulin, an anti-tumor protein, was purified from the aqueous extract of basidiomes of *Flammulina Velutipes*. Purified flammulin emulsified with Freund's adjuvant was injected subcutaneously into New Zealand white rabbits. After several immune enhancements, these animals were bled and sera were separated. Antiserum against flammulin in Western blots were applied to determine if flammulin be present in the liquid state culture or fruiting body. The result showed that anti-flammulin serum could recognize the aqueous extract of fruiting body in SDS-PAGE gels under the reducing conditions, no flammulin was detected in mycelia of *Flammulina Velutipes*.

Key words: Flammulin, *Flammulina velutipes*, Immunoblot

火菇素是从金针菇子实体中分离出的一种具有抗癌活性的简单蛋白^[1], 对实验动

* 教育部博士点基金资助项目 (No. 2000042212)

** 联系人

收稿日期: 2002-12-26, 修回日期: 2003-05-02

物移植肿瘤的抑瘤作用实验的研究表明,火菇素对小鼠肉瘤 S_{100} 和艾氏腹水瘤有明显的抑制作用。在火菇素的作用下,肿瘤细胞发生了明显的病理变化:细胞的有丝分裂受到抑制,在细胞核、细胞质中形成空泡,使细胞膨胀破裂,最终导致细胞溶解。毒性实验表明无任何毒副作用^[2]。

同一般的酶相比,由于火菇素蛋白缺乏一种简单、快速、灵敏、高特异性的定性检测方法,限制了对它的进一步研究和利用。抗体探针又称蛋白质探针能和与之相对应的抗原蛋白发生特异结合。利用火菇素纯蛋白免疫家兔制备了火菇素的抗血清,并通过酶联免疫学方法建立灵敏度高、稳定性好、安全可靠的火菇素蛋白质定性检测方法。对火菇素蛋白的鉴定工作有着重要的意义。

与固体菌种相比,液体发酵具有生产周期短、菌丝发育点多,接种后菌丝蔓延迅速、菌龄整齐、生长不受季节的限制等优点,越来越多的生物活性物质从菌丝体中分离得到^[3],但是子实体中是否存在有火菇素蛋白是考虑以金针菇菌丝体代替子实体为原料进行火菇素蛋白的分离首要解决的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

金针菇子实体:青州食用菌研究所提供;菌种:金针菇 FV088, 山东大学微生物技术国家重点实验室菌种室保存;实验动物:纯种雄性健康新西兰白兔,6个月左右、体重 2-5 kg, 山东省实验动物中心提供;层析用凝胶 (DEAE-Sephadex 和 CM-Sephadex)、PVDF (聚偏二氟乙烯)膜购自 Pharmacia 公司;SDS-PAGE 标准蛋白、Freund 佐剂、琼脂糖、HRP (辣根过氧化物酶) 羊抗兔 IgG、4-氯-1-萘酚为 Sigma 公司产品;其它化学试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 火菇素蛋白的分离纯化:选取 2 Kg 金针菇风干子实体洗净切碎,用 5% 冰乙酸酸化水浸提过夜,过滤,于滤液中加硫酸铵至终浓度 66%,离心弃上清,沉淀经透析脱盐加入预冷的乙醇至终浓度 50% (V/V), -20℃ 下沉淀,离心,上清中再加入预冷的乙醇至终浓度 75% (V/V), -20℃ 下沉淀,离心,沉淀用 0.02 mol/L 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液 (pH6.6) 透析平衡后,上 DEAE-Sephadex 离子交换层析柱 (1.3 cm × 15 cm),收集穿过峰,穿过峰经聚乙二醇浓缩后,用 0.02 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液 (pH7.8) 平衡后,过 CM-Sephadex 离子交换层析柱,以相同的缓冲液洗脱洗去穿过峰,改用 NaCl 梯度 (0~1.0 mol/L) 洗脱,流速为 14 mL/h,部分收集每管 2.4 mL,收集目的洗脱峰,蛋白质定量按 Lowry^[4] 等人的方法进行,以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。活性检测按 Komatsu N 等人的方法进行体外抑瘤实验确定^[1]。

1.2.2 火菇素多克隆抗血清的制备与 IgG 的分离纯化:取 2 mL 的弗氏完全佐剂加到 2 mL 溶于 PBS 的纯化火菇素抗原 (1~2 mg/mL) 中,使之乳化。将兔固定,剪去所要注射区域 (后肢、四足、背部、肩关节、髌关节等部位皮下) 的兔毛,用 70% 酒精消毒,分别注射 0.5 mL 左右的抗原乳剂。四周后,用 1 mL 混溶于弗氏不完全佐剂的抗原乳液 (1:1) 对兔进行加强免疫注射,操作步骤同上,初次加强免疫后 2 周,再进行加强免疫注射。放血收集抗血清,以原浓度 (1~2 mg/mL) 蛋白作抗原,经琼脂双向扩散检测效价。

取 5 mL 兔血清加 5 mL 生理盐水,滴加 10 mL 饱和硫酸铵溶液,4℃ 过夜,冷冻离心,再用 50% 饱和度的硫酸铵洗涤沉淀 2 次。取上述粗提液,置 0.01 mol/L, pH7.4 磷

酸盐缓冲液中，透析平衡。用相同缓冲液平衡纤维素 DE-52 层析柱 (1.3 cm × 15 cm)，加入蛋白溶液，用 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液洗出第一蛋白质峰，改用 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 0.05 mol/L 氯化钠溶液洗脱。洗脱速度为 1 mL /min，分步收集，测 280 nm 处的光吸收值。

1.2.3 金针菇菌丝体的培养：500 mL 摇瓶装入 150 mL 培养基 (5.0% 玉米粉，2.0% 麸皮，0.1% KH₂PO₄，0.05% MgSO₄·7H₂O)，接入 1~2 块活化菌丝，在旋转式摇床上于 32℃ 培养 6 d，收获菌丝体。

1.2.4 新鲜金针菇子实体的培养：瓶径 3.5 cm 的菌种瓶或罐头瓶装培养料 (78% 棉籽壳，20% 麸皮，1% 糖，1% 碳酸钙)，接种孔塞满菌种，接种后，立即移至培养室，20℃ 培养 22 d，待菌丝长到瓶底后，去掉瓶口上的棉花塞，去除老菌种后用报纸覆盖瓶口，每天在报纸上喷水 2~3 次，保持报纸湿润，20 d 后，收获新鲜金针菇子实体。

1.2.5 Western 印迹法测定火菇素蛋白：样品处理：取金针菇子实体、菌丝体少量，分别用液氮磨碎后，于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.8) 中研磨至匀浆，取 20 μL 匀浆加入 5 μL 5 × 电泳上样缓冲液，混匀、煮沸 5~10 min 后，离心、取上清电泳，阳性对照为风干子实体分离纯化的火菇素蛋白。

SDS-PAGE 按 Laemmli^[5] 的方法进行，电泳条件：分离胶 12%，浓缩胶 5%，恒流 20 mA。电泳结束后，用 Bio-Rad 微型转移电泳装置将蛋白电转印到 PVDF 膜，电转移条件：4℃，恒流 200 mA，湿法转移 3 h。转印到膜上的蛋白标准用考马斯亮蓝染色。待测样品进行 Western blotting：(1) PVDF 膜置于封闭液中封闭 1 h，封闭液组成：Tris 缓冲液 (TBS) 含 5% 脱脂奶粉；(2) 加入纯化的火菇素抗体 (1:100 稀释) 室温孵育 2 h；(3) 洗涤：TBS，共 3 次，每次 5 min；(4) 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:300 稀释) 室温孵育 1~2 h；(5) 洗涤同前；(6) 用 HRP 底物 4-氯-1-萘酚显色。

2 结果与讨论

2.1 火菇素的分离纯化与抗血清的制备

CM-Sephadex-C-50 柱层析结果见图 1，峰 IV 为具有活性的目的蛋白峰，由 SDS-PAGE 结果 (图 2) 可知，分离的火菇素蛋白已达到电泳纯。

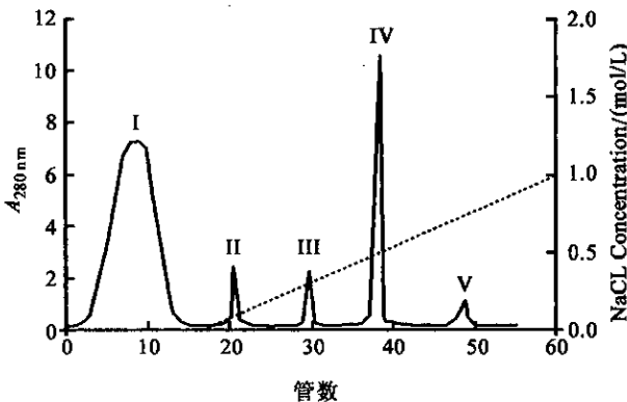


图 1 火菇素 CM-Sephadex-C-50 柱层析结果

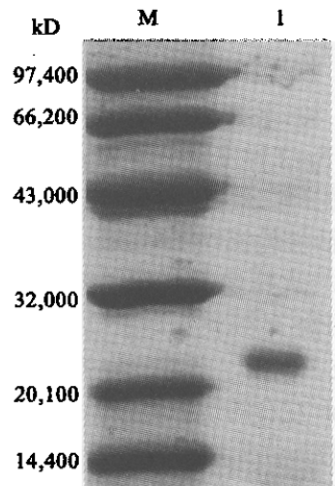


图 2 纯化火菇素的 SDS-PAGE 结果
M SDS-PAGE 低分子量标准，
I 火菇素蛋白

将纯化的火菇素蛋白免疫纯种白兔, 经过2~3次加强免疫后, 采集兔血, 分离抗血清, 应用免疫双扩散法对血清中的特异性抗体进行滴度测定, 其抗血清效价一般稳定在1:32~1:64之间(图略)。由于IgG类在免疫球蛋白中约占75%~80%, 分离纯化IgG对增强免疫检测的特异性、去除假阳性干扰有着重要的意义。DE-52柱层析分离得到的两蛋白质峰均为IgG(图略), 是不同亚类。上样量为5 mL血清时, 可得IgG约为30~40 mg。

2.2 金针菇子实体与菌丝体含火菇素的免疫印迹检测

待测样品的免疫印迹结果见图3, 新鲜的金针菇子实体匀浆物经SDS-PAGE、电转移、免疫检测, 可见一条明显的阳性反应条带, 而金针菇菌丝体培养物的匀浆液没有检测到阳性反应的火菇素抗原。

免疫印迹是新近发展起来的一项技术, 最初由Burrige K首先提出^[6]。它将凝胶电泳的分辨力和免疫化学检测的特异性融为一体。为检测样品中是否存在蛋白抗原提供了一种可靠的方法。该法鉴定蛋白质的原理是根据被检测蛋白能与特异性抗体结合的特性。影响免疫印迹成败的一个主要因素是抗原分子中可被抗体识别的表位性质。多数高分辨力的凝胶电泳技术涉及抗原样品的变性, 只有那些能识别耐变性表位的抗体可与抗原结合。大部分多克隆抗血清中或多或少地含有这种抗体, 所以免疫印迹实验中常选用多克隆抗体。相反, 许多单克隆抗体不能与变性抗原反应, 因为它识别的表位依赖于抗原蛋白正确折叠所形成的三维空间构象。

本研究利用免疫球蛋白抗体能特异地同辣根过氧化物酶一起结合到一级抗体上的特点, 再与磷酸酶底物4-氯-1-萘酚显色而予以检测, 这种方法能检测到200~500 pg抗原信号, 而且简单方便不需要昂贵的仪器。利用这种方法, 我们建立了火菇素蛋白的免疫印迹定性检测技术, 并且对金针菇子实体和菌丝体样品进行鉴定, 在金针菇的子实体中检测到了与火菇素抗体相结合的抗原信号, 而在其相应的发酵产物菌丝体中没有检测到火菇素蛋白的存在, 这表明火菇素作为一种菌体蛋白可能是金针菇的营养菌丝体分化为实体后形成的, 这为火菇素纯化原料来源的选择提供了实验基础。

参考文献

- [1] Komatsu N, Terakawa H, Nakanishi K. *J Antibiotics*, Ser A, 1963, **16**: 139~143.
- [2] Watanabe Y, Nakanishi K, Komatsu N. *Bull Chem Soc Japan*, 1964, **37**: 747~750.
- [3] Ikekawa, T, Maruyama, H Miyano T, *et al.* *J Cancer Res*, 1985, **76**: 142~148.
- [4] Lowry O H, Rosebrough N J. *Bio Chem*, 1951, **193**: 265~275.
- [5] Laemmli UK. *Nature*, 1970, **227**: 680~685.
- [6] Burrige K. *Pro Natl Acad Sci*, 1976, **73**: 4475~4476.

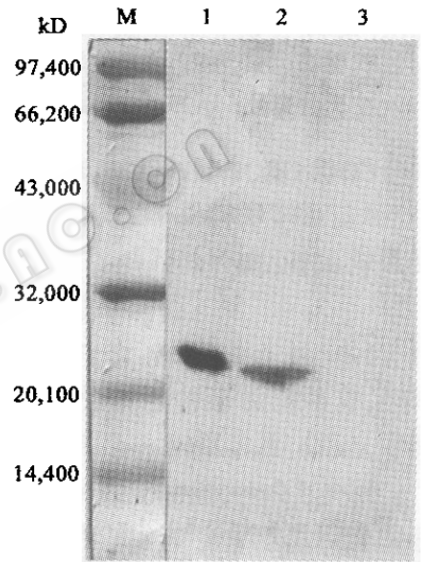


图3 火菇素蛋白的免疫印迹
1 纯化火菇素蛋白, 2 子实体样品, 3 菌丝体样品, M SDS-PAGE 低分子量标准