

镰孢体外抗原的电泳及免疫印渍分析*

甘志波

(华中农业大学食品微生物研究室 武汉 430070)

Marquardt R R

(曼尼托巴大学动物系 加拿大)

摘 要 用 SDS-PAGE 及免疫印渍法分析了三种镰孢的体外抗原(exoantigen)和菌丝体可溶性蛋白质的部分特性,并研究了培养基对体外蛋白质含量的影响。结果表明,在电泳分析中,三种镰孢体外抗原及菌丝体可溶性蛋白质均具有各自菌种的特征,可作为菌种分类鉴定的重要指标。免疫印渍分析显示,体外抗原更适于用作免疫分类鉴定的指标,因为用体外抗原免疫动物所产生的抗体的特异性比菌丝体可溶性蛋白质要好。三种镰孢的体外抗原的抗体与种间菌株均有程度不等的交叉反应,但却不与谷物发生任何交叉反应,可用于谷物中镰孢的快速检测。在镰孢体外抗原中,能刺激机体产生抗体的抗原分子量在 28000 以上。葡萄糖酵母膏培养基比蔗糖硫酸铵培养基更适于体外抗原的产生。

关键词 体外抗原,镰孢,SDS-PAGE,免疫印渍分析

真菌的免疫检测由于其具有快速、灵敏及特异等优点而广被重视,已建立了曲霉、青霉、根霉、毛霉等的免疫分析方法^[1~4]。然而,这些分析中的多数只具有属的特异性,甚至有些霉菌,如交链孢霉的抗体,能与在分类上不相关联的其它菌发生交叉反应^[5],从而影响了免疫检测法在实际中的应用。抗原的血清学特异性主要由其本身的特性所决定,因而,对抗原多种特性的研究将有助于提高免疫分析中的特异性。

体外抗原具有很好的抗原性且具有较好的种、属特异性^[1],其中的蛋白质组分在其免疫原性中起着重要的作用^[6]。作者以三种镰孢菌株作为研究对象,研究了体外抗原及菌丝体可溶性蛋白质的电泳特性,用免疫印渍法分析了其交叉反应谱带,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

禾本科镰孢 *Fusarium graminearum* 60309,拟分枝孢镰孢 *Fusarium sporotrichioides* 48019 和早熟禾镰孢 *Fusarium poae* 60338,均购自美国模式培养物保藏中心(ATCC)。黄灰青霉 *Penicillium aurantiogriseum*,黄曲霉 *Aspergillus flavus* 为 Marquardt 教授研究室保藏种。

* 本研究在加拿大曼尼托巴大学 Marquardt 教授研究室中完成。

本文于 1995 年 3 月 23 日收到。

1.2 培养基

1.2.1 蔗糖硫酸铵液体培养基(%): 蔗糖 3.0, K_2HPO_4 0.1, KCl 0.05, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, pH 7.0~7.2.

1.2.2 葡萄糖酵母粉液体培养基(%): 葡萄糖 1.0, 酵母粉 1.0.

1.3 化学试剂和仪器

酵母粉(Becton Dickison), 葡萄糖(Becton Dickison), $(NH_4)_2SO_4$ (Fisher), 用于电泳及免疫印渍的试剂购自 Bio-Rad 公司, 硝酸纤维素膜(Bio-Rad), 碱性磷酸酶酶标免疫抗鸡二抗(Jackson Immuno-research Laboratory Inc.), 蛋白质银染试剂盒(Bio-Rad), 研究中所用其他试剂均购自 Sigma 化学公司。

Mini-Protein II 电泳槽(Bio-Rad), 半干转移电泳仪(Bio-Rad), 高速冷冻离心机(Beckman)。

1.4 体外抗原的制备方法

将上述菌株分别接种于装有 200ml 液体葡萄糖酵母粉培养基的 500ml 三角瓶中, 于 29℃ 下培养两周。将培养物用二层 Whatman 一号滤纸过滤, 收集含体外抗原的滤液, 冷冻干燥, 于 -20℃ 下保存。

取 5g 冻干样品溶于 20ml PBS ($NaCl$ 8g, KCl 0.2g, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1.15g, KH_2PO_4 0.2g, pH 7.3) 液中, 离心 ($10000 \times g$ 30min, 4℃) 去杂质, 所得上清液装入排阻分子量为 12000~14000 的透析袋中, 置于去离子水中电磁搅拌透析。然后, 用 Minicon-B15 浓缩器 (Amicon, Inc.) 对透析后的样品液进行浓缩。对浓缩液进行离心 ($20000 \times g$ 30min, 4℃) 去杂质, 上清液作为体外抗原样品液。

1.5 菌丝体可溶性蛋白质的制备

取洗净培养液冻干后的菌丝体 0.05g 于 2ml PBS 液中, 高速均质 ($20000r/min$) 3~5min, 于 4℃ 下以 $20000 \times g$ 离心 30min。上清液作为菌丝体可溶性蛋白质样品液。

蛋白质含量的测定采用 Bradford 法^[7]。

1.6 谷物 PBS 抽提液

分别加 100ml 无菌 PBS 于 50g 无污染谷物粉末样品 (小麦、大麦、玉米) 中, 剧烈振荡 1.5h, 于 4℃ 下离心 ($20000 \times g$) 30min。收集上清液作为谷物可溶性蛋白质样品。测定蛋白质含量用 Bradford 法。

1.7 免疫及抗体制备

免疫前, 分别从 24 只产蛋鸡抽取血样, 制备血清作为抗体阴性对照。将通过 $0.22\mu m$ 无菌滤膜除菌的体外抗原样品和菌丝体可溶性蛋白质样品调整蛋白质浓度为 $2mg/ml$, 分别取 1ml 与等量的福氏完全佐剂充分混均, 用于第 1 次注射, 其后的加强针改用福氏不完全佐剂。共 6 种抗原每种抗原以多点方式注射 4 只鸡胸肌内, 共计 24 只鸡。此后每两周注射 1 次, 共计 3 次。第 3 次注射后的第 7d 取血样, 用 ELISA 法^[8]测定血清中的抗体滴度。本研究选用代号为 $S_1, P_3, G_3, Sm_1, Pm_3, Gm_3$ 的抗血清用于以下研究。

1.8 SDS-PAGE 和免疫印渍分析

体外抗原及菌丝体可溶性蛋白质用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印渍法进行分析, 其方法见参考文献[9], 及 Bio-Rad 的该方法操作指南。

2 结果和讨论

2.1 培养基对体外抗原中蛋白质含量的影响

体外抗原中主要的抗原成份是蛋白质^[4,6]。因而,蛋白质含量的多少直接关系到体外抗原的得率。培养基即是影响其得率的主要因素之一。本实验采用蔗糖硫酸铵培养基及葡萄糖酵母粉培养基培养镰孢,观察其产胞外蛋白质的能力,用 Bradford 法测定样品中的蛋白质含量,以未接种的培养基作对照。结果(表 1)表明,半合成的葡萄糖酵母粉培养基比合成的蔗糖硫酸铵培养基更适于镰孢胞外蛋白质的形成。其原因可能是酵母抽提物中丰富的氮源和生长素等天然有机物有利于菌丝体的生长和蛋白质的合成。

表 1 培养基对体外蛋白质含量的影响

Table 1 Effect of media on the concentration of exoproteins

菌种 Cultures	冻干样品中蛋白质含量 c(Protein)/mg·g ⁻¹	
	蔗糖硫酸铵	葡萄糖酵母粉
	AS	YD
<i>F. sporotrichioides</i>	0.15	2.47
<i>F. poae</i>	0.23	2.09
<i>F. graminearum</i>	0.10	2.51

注: AS. Ammonia sulfate, sucrose medium.

YD. Yeast extract, dextrose medium.

2.2 SDS-PAGE

分别将 3 种体外抗原及 3 种菌丝体可溶性蛋白质电泳样品液加入 4%~20% 梯度胶的样品槽中,恒压电泳。用银染试剂盒(Bio-Rad)染色,其结果见图版 I-1。从蛋白质谱带看,三种镰孢无论是体外抗原还是菌丝体可溶性蛋白质均具有各自的特征,因而可作为菌种分类鉴定的重要指标之一。比较体外抗原和菌丝体可溶性蛋白质带(S 与 Sm, P 与 Pm, G 与 Gm)可知,体外抗原蛋白质与其相应的菌丝体可溶性蛋白质在组成上并不完全相同,有体外抗原所特有的蛋白带存在。

体外抗原之间(S, P, G)也各有其特征带,可望用于免疫动物,产生种特异性的抗体,从而有利于丝状真菌的免疫鉴定。由谱带色泽深浅可知,*Fusarium graminearum* (G)的体外抗原中大部分的分子量在 34000 之下,*F. poae* (P)的多数也是如此,而 *F. sporotrichioides* (S)的体外抗原各组分的量则较均匀,其分子量在 7200~79000 之间,分子量在 26000~30000 之间者除外。

2.3 免疫印渍法分析

2.3.1 体外抗原抗体及菌丝体可溶性蛋白质抗体的属间交叉反应的免疫印渍法分析:将青霉、曲霉及镰孢体外抗原用 4%~20% Mini-protein II ready gel (Bio-Rad)分离后,用半干转移仪将其转移至硝酸纤维素膜上,按 Bio-Rad 蛋白质印渍法操作手册所列方法进行免疫显色^[10],结果如图版 I-2 所示。比较体外抗原抗体(P₁)和菌丝体可溶性蛋白质抗

体(Pm₃)与青霉、曲霉的交叉反应带可知,体外抗原抗体的特异性(图版 I-2a)比菌丝体可溶性蛋白质抗体(图版 I-2b)要好,这一结论也被 ELISA 数据(另文发表)所证实。也就是说,体外抗原更适于用作丝状真菌免疫分类的指标。

2.3.2 体外抗原抗体的种间交叉反应的免疫印渍法分析:图版 I-3 的结果表明,三种菌株体外抗原的抗体(S₁、P₃、G₃)与种间菌株反应均具有程度不等的交叉带出现,说明他们有许多共同的抗原决定簇,*F. poae*与*F. graminearum*似乎显得亲缘关系更近(图版 I-3b, 3c),因而他们相互间的交叉反应带更多,而与*F. sporotrichioides*的交叉带则较少。总的来说,此研究所用的抗体不具有种的特异性,而是属特异性的,因而可用作样品中镰孢属的免疫检测。

2.3.3 体外抗原抗体与谷物 PBS 抽提物的交叉反应的免疫印渍法分析:分析结果表明,三种镰孢体外抗原的抗体均不与谷物样品(小麦、玉米、大麦)的 PBS 抽提物发生任何交叉反应,即免疫显色后不显示任何交叉带(图略)。因此,可将此三种抗体用于谷物中镰孢的快速检测,从而保证谷物的品质。

参 考 文 献

- [1] Kaufman H, Standard P G. *Ann Rev Microbiol*, 1987, 41: 209~225.
- [2] Huppert M, Sun S H. *J Clin Microbiol*, 1978, 8: 346~348.
- [3] Morace G, Polonelli L. *J Clin. Microbiol*, 1981, 14: 237~240.
- [4] Lu Ping. The Development of Solid-phase Immunoassays for *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium aurantiogriseum* Storage Fungi. Winnipeg: The University of Manitoba Press, 1994.
- [5] Lin H H, Cousin M A. *J Food Sci*, 1987, 52: 1089~1096.
- [6] Hearn V M, Mackenzie D W R. *Mol Immunol*, 1980, 17: 1097~1103.
- [7] Bradford M M. *Anal Bioch*, 1976, 72: 248~254.
- [8] Harlow Ed, Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- [9] Laemmli U K. *Nature (London)*, 1970, 227: 680.

ANALYSIS OF EXOANTIGENS FROM *FUSARIUM* BY SDS-PAGE AND IMMUNOBLOTTING

Gan Zhibo

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University Wuhan 430070)

Marquardt R R

(Department of Animal Science, The University of Manitoba Winnipeg MB, R3T 2N2 Canada)

Abstract The partial characterization of exoantigens and mycelia soluble proteins from *Fusarium* were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. The results showed that all three exoantigens and three mycelia soluble proteins from *F. sporotrichioides*, *F. poae* and *F. graminearum* have their own patterns differed from each other in gel. Immunoblotting analy-

sis demonstrated that the exoantigens were more suitable for being used as an indicator for taxonomy because the specificity of antisera to exoantigens was better than that of antisera to mycelia soluble proteins. The antisera to exoantigens did not cross-react with extracts of *Fusarium* species. The molecular weight of immunodominant antigens from *Fusaria* is above 28000.

Key words Exoantigen, *Fusarium*, SDS-PAGE, Immunoblotting

图版说明

Explanation of plate

1. 离体蛋白质抗原及菌丝体可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 分析: Gm, Pm, Sm 分别为 *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* 的菌丝体可溶性蛋白质; G, P, S 分别为 *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* 的离体抗原; Sd 为分子量标准。2. 离体抗原抗体 (P_3) 和菌丝体可溶性蛋白质抗体 (Pm_3) 的属间交叉反应的免疫印渍分析: a. 离体抗原抗体与曲霉、青霉的交叉反应; b. 菌丝体可溶性蛋白质抗体与曲霉、青霉的交叉反应; P.a. *Penicillium aurantiogriseum*; A.f. *Aspergillus flavus*。3. 离体抗原抗体的种间交叉反应的免疫印渍分析: a. *F. sporotrichioides* 抗体与 *F. poae*, *F. graminearum* 的交叉反应; b. *F. poae* 抗体与 *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* 的交叉反应; c. *F. graminearum* 抗体与 *F. sporotrichioides*, *F. poae* 的交叉反应。

1. Analysis of exoantigens and mycelia soluble proteins by SDS-PAGE: Gm, Pm, Sm. Mycelia soluble proteins from *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* respectively; G, P, S. Exoantigens from *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* respectively; Sd. Standard of protein molecular weight. 2. Immunoblotting of cross-reactivities of antibody (P_3) to exoantigen and antibody (Pm_3) to mycelia soluble protein with other genera: a. Cross-reactivities of antibody (P_3) to exoantigen with *Penicillium* and *Aspergillus*; b. Cross-reactivities of antibody (Pm_3) to mycelia soluble protein with *Penicillium* and *Aspergillus*; P. a. *Penicillium aurantiogriseum*; A.f. *Aspergillus flavus*. 3. Immunoblotting of cross-reactivities of antibodies to exoantigens among species: a. Cross-reactivities of antibody to *F. sporotrichioides* with *F. poae* and *F. graminearum*; b. Cross-reactivities of antibody to *F. poae* with *F. sporotrichioides* and *F. graminearum*; c. Cross-reactivities of antibody to *F. graminearum* with *F. sporotrichioides* and *F. poae*.