

上海春季大气颗粒物中致敏悬铃木花粉蛋白的分布特征

赵慧¹, 彭加仙¹, 洪强², 张红莉², 王伟倩³, 王青耀³,
谭正莹¹, 周树敏², 张卫², 吕森林¹

(1. 上海大学环境与化学工程学院, 上海 200444; 2. 上海大学生命科学学院, 上海 200444;
3. 日本埼玉大学大学院理工学研究科, 埼玉 338-8570)

摘要: 选择上海大气颗粒物中悬铃木致敏花粉蛋白 Pla a3 为研究对象, 利用生物工程手段表达 Pla a3 蛋白, 并利用该致敏蛋白免疫大鼠, 制备出单一致敏原的抗体. 通过酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 检测分析上海大气颗粒物中 Pla a3 的分布特征. 结果表明: 颗粒物中总蛋白质量浓度在 $<1.1\ \mu\text{m}$ 的粒径段内最高, 为 $2.5\sim 3.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$; Pla a3 蛋白主要分布在 $>7.0\ \mu\text{m}$ 的粒径段内, 其平均质量浓度为 $7.5\ \text{pg}/\text{m}^3$, 但在 $<1.1\ \mu\text{m}$ 粒径段内的质量浓度最低. 在上述分析结果基础上, 将进一步探讨颗粒物中主要有害组分与致敏蛋白分布之间的关系.

关键词: 大气颗粒物; 致敏蛋白 Pla a3; 酶联免疫吸附测定法; 粒径分布

中图分类号: X 820

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2019)04-0544-06

Distributions of allergenic platanus pollen protein in the ambient particulates in the spring of Shanghai

ZHAO Hui¹, PENG Jiaxian¹, HONG Qiang², ZHANG Hongli², WANG Weiqian³,
WANG Qingyao³, TAN Zhengying¹, ZHOU Shumin², ZHANG Wei², LÜ Senlin¹

(1. School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

2. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

3. School of Science and Engineering, Saitama University, Saitama 338-8570, Japan)

Abstract: The allergenic pollen protein Pla a3 in Shanghai atmospheric particulate matter was selected as the research aim. Pla a3 protein from platanus pollen was expressed by biological engineering. Then rats were immunized and special antibody was prepared from the rat serum. The distribution of Pla a3 protein in Shanghai atmospheric particulate matter was measured and analyzed by making use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Research results showed that total protein content in particulate matter was the highest in the particles with size diameter less than $1.1\ \mu\text{m}$. Its mass concentration is $2.5\sim 3.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$. The Pla a3 protein in particulate matters was found mainly in particles

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21477073, 41511140096)

通信作者: 吕森林(1966—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为大气环境科学. E-mail: senlinlv@staff.shu.edu.cn

with size diameter larger than $7.0\text{ }\mu\text{m}$, with average mass level was 7.5 pg/m^3 . Mass level of Pla a3 protein with size diameter less than $1.1\text{ }\mu\text{m}$ was the least. Based on the research data collected, the connection between allergenic protein and toxic composition in the ambient particles will be further explored.

Key words: atmospheric particulate matter; allergenic protein Pla a3; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); size distribution

近年来,随着城市绿化面积的增加和植物种类的增多,人群中花粉过敏的就诊率也在逐年递增.花粉症的发病率升高,已成为全球性的问题.在国内,花粉症患者在人群中的发病率约为 $0.5\%\sim 1.0\%$,最高的发病地区可达 5% ^[1].研究表明,花粉是诱发季节性过敏性鼻炎和哮喘的主要原因^[2].在外部因素的作用下,花粉内部的细颗粒物(subpollen particles, SPPs)会被释放出来^[3],长期悬浮在环境中,成为 $\text{PM}_{2.5}$ 的一部分,对人群健康产生影响.资料显示,悬铃木属植物花粉是我国主要的致敏花粉^[4],其致敏蛋白主要包括Pla a1, Pla a2和Pla a3,其中Pla a3属于非特异性的糖蛋白脂质转移蛋白^[5-7].作为城市道路景观树,悬铃木在上海市分布广泛,其花粉已经成为上海市春季主要的致敏原^[8-9].本工作选择上海大气颗粒物中致敏悬铃木花粉蛋白Pla a3为研究对象,利用生物工程手段表达Pla a3蛋白,并使用该致敏蛋白免疫大鼠,获取单一致敏原的抗体,利用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),检测分析上海市大气颗粒物中Pla a3蛋白的分布特征.这一研究工作不仅可以为今后进一步制备单抗及基因工程生产花粉变应原奠定基础,提高过敏性哮喘病的诊治水平,还可以为上海城镇绿化植物的合理选择和配置提供重要的参考依据.

1 材料与方法

1.1 大气颗粒物采集

本工作采集了上海2017年春季的大气颗粒物,使用日本柴田公司SIBATA五级大流量采样器采集大气颗粒物.采集前,将石英膜在马弗炉($450\text{ }^{\circ}\text{C}$)中焙烧4 h,在恒温恒湿箱中以 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度和50%湿度条件放置24 h,用电子天平准确称重,然后用干净的铝箔纸包裹,放置在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存^[10].采样地点在上海大学宝山校区南门,采样高度为1.5 m,每次采样周期为48 h.采样器能将大气中的颗粒物根据空气动力学直径分别采集到5张石英滤膜上,工作流速为 566 L/min ,五级的切割粒径分别为 >7.0 , $3.3\sim 7.0$, $2.0\sim 3.3$, $1.1\sim 2.0$, $<1.1\text{ }\mu\text{m}$.采样结束后,滤膜用铝箔纸包裹好,恒温恒湿24 h后称重,然后密封包装于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中冷冻保存,以待分析测试.

1.2 抗体制备

克隆悬铃木花粉变应原蛋白Pla a3的编码序列(coding sequence, CDS),构建到原核表达载体Pet-32a中并转化大肠杆菌Rosetta菌株,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下经异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导表达蛋白,并进行纯化.利用纯化后的Pla a3重组蛋白免疫注射SD大鼠,然后利用悬铃木花粉浸取液混合Pla a3重组蛋白对大鼠进行雾化处理^[11-12].最后,获取致敏大鼠血清并对其中所含抗体的特异性及其效价进行鉴定.鉴定结果显示,本工作获得了特异性良好、高效价的IgE抗体,可用于后续检测分析上海大气颗粒物中悬铃木花粉致敏蛋白Pla a3的分布特征.

1.3 总蛋白测定

本工作采用BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,上海翊圣生物科技有限公司,中国)测定大气颗粒物中的总蛋白质量浓度.二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)是目前应用比较广

泛的蛋白质浓度测定方法. 基于双缩脲反应, 即在碱性条件下蛋白质将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ , 产生一种紫蓝色复合物, 在 562 nm 处有高的吸光值. 该反应物的量与蛋白质浓度成正比. 具体操作步骤如下.

步骤 1 预处理: 取 1/8 采集颗粒物的滤膜, 用 6 mL 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 浸泡 6 h; 将所得溶液在 4 °C, 5 000 r/min 条件下离心 20 min, 然后经 0.45 μm 过滤器过滤^[13]后; 再用真空浓缩仪 (Eppendorf AG, 德国) 浓缩滤液到 2 mL, -20 °C 保存备用.

步骤 2 比色皿检测: 各取 0.1 mL 标准品和待测样品加入反应管中, 每管加入 2.0 mL BCA 工作液, 混匀, 37 °C 孵育 30 min.

步骤 3 冷却至室温, 在分光光度计上进行检测. 设定波长为 562 nm, 在 10 min 内对所有样品读数.

1.4 ELISA

ELISA 是指利用抗原与抗体的特异反应, 将待测物与酶连接, 然后通过酶与底物产生颜色反应, 用于抗原与抗体结合状况的定量测定. 具体操作步骤如下.

步骤 1 预处理: 取 1/8 采集颗粒物的滤膜, 用 6 mL 的 PBS 缓冲液浸泡 6 h; 将所得溶液在 4 °C, 5 000 r/min 条件下离心 20 min, 然后经 0.45 μm 过滤器过滤后; 再用真空浓缩仪浓缩滤液到 2 mL, -20 °C 保存备用.

步骤 2 包被: 取 96 微孔板, 每个反应孔中加 100 μL 待测样品浓缩液 (重复 3 个孔), 4 °C 避光孵育 16 h, 以空白膜提取液为空白对照. 孵育结束后用 PBST 洗涤液 (加入 0.5% Tween-20 的 PBS 溶液) 冲洗 3 次, 每次 5 min.

步骤 3 封闭: 每孔加 5% 的脱脂奶粉溶液, 注满后 37 °C 静置 1.5 h 后洗涤, 洗涤条件同步步骤 2.

步骤 4 孵育一抗: 加 100 μL 大鼠血清 (1:50), 37 °C 避光孵育 1.5 h 后洗涤, 洗涤条件同步步骤 2.

步骤 5 孵育酶标二抗: 加 100 μL 过氧化物酶标记的 IgE 二抗 (1:10 000), 37 °C 避光孵育 1 h 后洗涤, 洗涤条件同步步骤 2.

步骤 6 加底物显色液: 加入 TMB 底物显色液 200 μL , 37 °C 避光孵育 20 min.

步骤 7 终止反应: 加 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应. 利用酶标仪检测 OD_{450} 吸收值, 通过对比标准曲线估算被测样品中变应原蛋白的质量浓度.

2 结果与讨论

2.1 上海春季大气颗粒物的粒径分布

由图 1 可以看出, 2017 年春季采样期间, 粒径 $>7 \mu\text{m}$ 的大气颗粒物的质量浓度为 60~65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 在 3.3~7.0, 2.0~3.3, 1.1~2.0 μm 的 3 个粒径段的大气颗粒物的质量浓度较为接近, 粒径 $<1.1 \mu\text{m}$ 的大气颗粒物的质量浓度为 35~55 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. 与上海市环境保护局发布的空气质量月报相比 (<http://www.sepb.gov.cn/fa/cms/xxgk//AC46/AC4602000/2017/05/96124.htm>), $\text{PM}_{2.5}$ 的质量浓度大体一致, 但是粗颗粒的浓度有明显变化, 其中本研究样品中粗颗粒物的比例较高. 这可能是因为本次采样为地表采样, 受到了地表扬尘的影响. 在 >7.0 , 3.3~7.0, 2.0~3.3 μm 这 3 个较大粒径段内的颗粒物质量浓度在四月都有所升高, 但是 1.1~2.0, $<1.1 \mu\text{m}$ 小粒径段内的颗粒物质量浓度并没有升高. 这可能是由于四月份有一次沙尘天气, 导致了空气中粗颗粒物的增加^[14]. 同时这也说明细颗粒物是上海主要的大气污染物, 这与本课

题组以往的研究结果相符^[15-16].

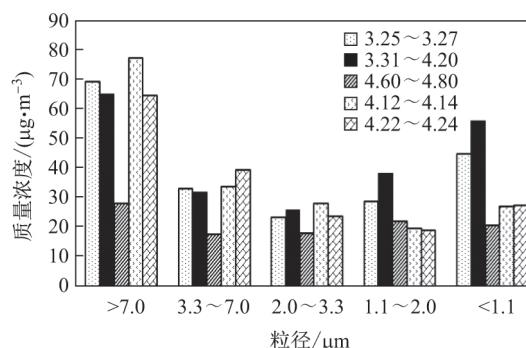


图 1 2017 年上海春季大气颗粒物样品的质量浓度

Fig. 1 Mass concentrations of atmospheric particulate matter in the spring of Shanghai, 2017

2.2 大气颗粒物中总蛋白的粒径分布

从图2中可以看出,在粒径最小(<1.1 μm)的颗粒物中,总蛋白的平均质量浓度为2.5~3.0 μg/m³,且在整个采样期内总蛋白的质量浓度最大值为4.8 μg/m³.由图1和2可以计算得到:总蛋白占大气颗粒物的2.5%~5.6%;所有粒径段的总蛋白的平均质量浓度为6.26 μg/m³,颗粒物的平均质量浓度为176.38 μg/m³.因此,总蛋白质量浓度在颗粒物中的平均比例为3.55%.而且2017年4月6日所采集到的样品中的总蛋白主要集中在>7.0 μm 粒径段.这可能与当日的天气情况有关,因为降雨而导致细颗粒中的蛋白质量浓度偏低.Kang等^[17]的研究发现,合肥地区的PM₁₀中,总蛋白来源主要有花粉、霉菌、细菌、真菌、孢子、昆虫粪便、皮屑等,平均质量浓度为11.42 μg/m³,且蛋白质量浓度与降水量呈反比关系.本研究中总蛋白质量浓度及其日变化同样符合这一规律.

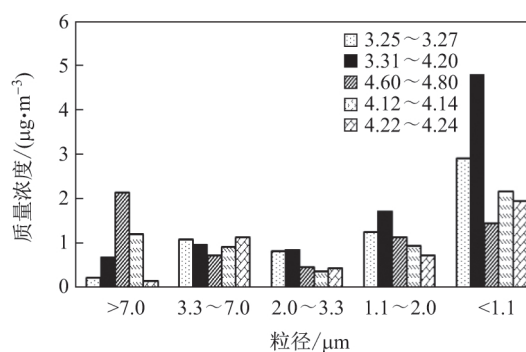


图 2 大气颗粒物中总蛋白的粒径分布

Fig. 2 Size distributions of the total protein in atmospheric particulate matter

2.3 大气颗粒物中致敏蛋白 Pla a3 的粒径分布

本研究采用标准曲线法定量大气颗粒物中致敏蛋白 Pla a3 的质量浓度.每次实验都以相同的纯化的 rPla a3 蛋白为标样,以 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000 pg/mL 质量浓度梯度绘制标准曲线,以此来测定颗粒物内 Pla a3 的质量浓度.由图3可见:大气颗粒物中的致敏蛋白 Pla a3 主要集中在>7.0 μm 的粒径段内,其平均质量浓度为7.5 pg/m³,而且在此粒径段内,呈现先增多后降低的时间变化趋势,与悬铃木的花期相吻合;在3.3~7.0, 2.0~3.3, 1.1~

2.0 μm 这 3 个粒径段内, Pla a3 蛋白的质量浓度相差不大, 约为 1.8 pg/m^3 ; 在 $<1.1 \mu\text{m}$ 的粒径段内, Pla a3 蛋白的质量浓度最低, 约为 0.5 pg/m^3 . 由图 2 和 3 计算得到, Pla a3 蛋白占总蛋白的 0.14%~0.29%. Fernández-González 等^[18]的研究结果显示, 在西班牙奥伦塞市的大气中发现了悬铃木花粉致敏蛋白 Pla a1 的存在, 而在 2013 年 3 月 28 日检测到的 Pla a1 蛋白的日最大质量浓度为 1.2 ng/m^3 . 同时该研究还发现, 大气中 Pla a1 致敏蛋白的质量浓度与当地的平均温度和最高温度成正相关, 与相对湿度呈负相关. 而在本工作中, 检测到大气中致敏蛋白 Pla a3 的日平均质量浓度为 15 pg/m^3 , 远低于致敏蛋白 Pla a1 的质量浓度. 这可能是因为悬铃木花粉中 Pla a3 蛋白的表达量远低于 Pla a1 蛋白的表达量. 通过建立甄别大气中 Pla a3 致敏蛋白的质量生物学模型, 测定大气中 Pla a3 致敏蛋白的质量浓度水平, 可以为预防花粉症及过敏性哮喘病提供一定的数据支持.

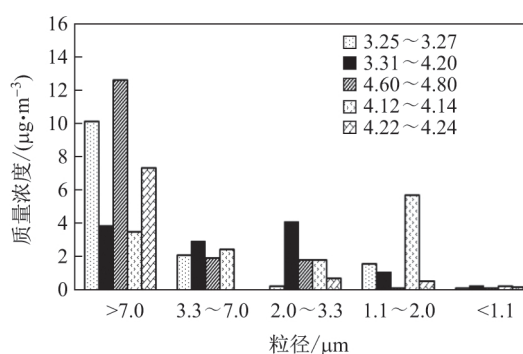


图 3 大气颗粒物中致敏蛋白 Pla a3 的粒径分布

Fig. 3 Size distributions of Pla a3 protein in atmospheric particulate matter

3 结 论

(1) 采样期间, 大气颗粒物中的总蛋白主要集中在 $<1.1 \mu\text{m}$ 的粒径段, 总蛋白质量浓度约为 2.5~3.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. 颗粒物中的致敏蛋白 Pla a3 主要集中在 $>7.0 \mu\text{m}$ 的粒径段, 平均质量浓度为 8.7 pg/m^3 , 其时间变化趋势与悬铃木在花期释放特征相吻合.

(2) 在总蛋白集中分布的粒径段 ($<1.1 \mu\text{m}$) 内, 致敏蛋白 Pla a3 的质量浓度最低. 这可能是因为细颗粒物中含有更多孢子、真菌等生物, 贡献了其蛋白. 对于细颗粒物中其他致敏蛋白的分布特征, 还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] D'AMATO G, LICCARDI G. The increasing trend of seasonal respiratory allergy in urban areas [J]. Allergy, 2002, 57(71): 35.
- [2] HASHIGUCHI K, TANG T H, TSUBAKI S, et al. Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (Ohio Chamber) [J]. Allergology International, 2007, 56(2): 125-130.
- [3] BACSI A, CHOUDHURY B N, SUR S, et al. Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2006, 118(4): 844-850.
- [4] 程晟, 余咏梅, 阮标. 中国主要城市气传花粉植物种类与分布 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2015(2): 136-141.

- [5] ASTURIAS J A, IBARROLA I, ERASO E, et al. The major *Platanus acerifolia* pollen allergen Pla a1 has sequence homology to invertase inhibitors [J]. Clinical & Experimental Allergy Journal of the British Society for Allergy & Clinical Immunology, 2003, 33(7): 978.
- [6] IBARROLA I, ARILLA M C, MARTINEZ A, et al. Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a2) from *Platanus acerifolia* pollen [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2004, 113(6): 1185-91.
- [7] LAUER I, MIGUELMONCIN M S, ABEL T, et al. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Prup3 [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2007, 37(2): 261.
- [8] CHEN Z, YANG Y, CHEN X, et al. Characterization of two pollen allergens of the London plane tree in Shanghai [J]. Iranian Journal of Allergy Asthma & Immunology, 2015, 14(2): 139.
- [9] 辛嘉楠, 欧阳志云, 郑华, 等. 城市化加剧花粉过敏症的机制研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(10): 833-836.
- [10] 王强翔, 谭正莹, 赵慧, 等. 宣威肺癌高发区燃煤排放颗粒物中铁的价态及其氧化性 [J]. 环境科学, 2017, 38(6): 2273-2279.
- [11] 陈小东, 陈臻, 张尚权, 等. 梧桐花粉致敏大鼠动物模型的建立及特异性抗体检测 [J]. 中国细胞生物学学报, 2004, 26(5): 523-525.
- [12] 邢锐, 齐名, 姚凯, 等. 二球悬铃木花粉主要变应原蛋白编码基因克隆的制备 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2006, 26(12): 1150-1154.
- [13] FRANZE T, WELLER M G, REINHARD N A, et al. Protein nitration by polluted air [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(6): 1673.
- [14] LEE B K, JUN N Y, LEE H K. Comparison of particulate matter characteristics before, during, and after Asian dust events in Incheon and Ulsan, Korea [J]. Atmospheric Environment, 2004, 38(11): 1535-1545.
- [15] LÜ S L, YI F, HAO X J, et al. Physicochemical properties and ability to generate free radicals of ambient coarse, fine, and ultrafine particles in the atmosphere of Xuanwei, China, an area of high lung cancer incidence [J]. Atmospheric Environment, 2014, 97: 519-528.
- [16] 吕森林, 王青耀, 吴明红, 等. 城区飞散致敏花粉与大气细/超细颗粒物的协同生物效应研究 [J]. 环境科学, 2010, 31(9): 2260-2266.
- [17] KANG H, XIE Z, HU Q. Ambient protein concentration in PM10 in Hefei, central China [J]. Atmospheric Environment, 2012, 54(5): 73-79.
- [18] FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M, GUEDES A, ABREU I, et al. Pla a-1 aeroallergen immunodetection related to the airborne platanus pollen content [J]. Science Total Environment, 2013, 463: 855-860.