

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.006

花生主要变应原 Ara h2 的克隆及原核表达 *

董 慧 梁秉绍 黄艳梅 李 飞 陈吟霜 周珍文[△]

(广州医科大学 广州市妇女儿童医疗中心 广东 广州 510120)

摘要 目的:在原核载体中克隆、表达花生主要变应原 Ara h2,为其重组变应原应用研究奠定基础。**方法:**合成花生主要变应原 Ara h2 基因,设计特异性引物行 PCR 扩增,经 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切后与做相应酶切的 pET-28a 载体连接,转化大肠杆菌 BL21,提取质粒进行双酶切鉴定及测序分析,使用 IPTG 诱导融合蛋白表达,使用 Ara h2 特异性多克隆抗体对表达产物进行免疫印迹鉴定。**结果:**成功扩增了 Ara h2 基因,重组质粒双酶切见目的条带,基因测序显示 Ara h2 在正确开放阅读框中,基因长 423bp,编码 140 个氨基酸,预测的等电点为 5.3,分子量约 16660.17 Da,基因比对分析显示其与相关报道的核苷酸序列一致性达 100%。重组 pET-28a-Ara h2/BL21 经 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达可见重组融合蛋白在相应分子量大量表达,使用 Ara h2 多克隆抗体免疫印迹法能检测到目的蛋白。**结论:**成功克隆、表达了花生主要变应原 Ara h2,为其重组变应原应用研究奠定了基础。

关键词:花生;变应原;Ara h2;克隆;表达

中图分类号:Q78; R392.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)04-624-04

Cloning and Prokaryotic Expression of Peanut Major Allergen Ara h2*

DONG Hui, LIANG Bing-shao, HUANG Yan-mei, LI Fei, CHEN Yin-shuan, ZHOU Zhen-wen[△]

(Guangzhou Medical University, Guangzhou women and children's medical center, Guangzhou, Guangdong, 510120, China)

ABSTRACT Objective: To clone and express peanut major allergen Ara h2 in pET-28a expression plasmid, which make foundation for the recombinant peanut allergen application research. **Methods:** Peanut major allergen Ara h2 sequences were synthesized. The DNA fragment of Ara h2 was PCR amplified by designed specific primer, followed by *EcoR* I, *Hind* III digestion, and then ligated with pET-28a which was digested with the same enzymes. The recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 and identified by double enzyme digestion and sequence analysis. The expression of recombinant protein was induced by IPTG and confirmed by western-blot using Ara h2 specific multi-clone antibody. **Results:** Ara h2 gene with a length of 423bp was amplified, the recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion. Sequences analysis showed that Ara h2 was in the correct open reading frame, and the predicted molecular weight is 16660.17 Da with 140 amino acids. The sequence comparison analysis showed that it was identical to Ara h2 gene of peanut allergen in GenBank. The recombinant pET-28a-Ara h2/BL21 was induced by 0.6 mmol/L IPTG, the objective recombinant protein was observed by SDS-PAGE and identified by Western-blot which using multi-clone antibody. **Conclusions:** Peanut major allergen Ara h2 was cloned and expressed in prokaryotic system, which laid a foundation for its' application research.

Key words: Peanut; Allergen; Ara h2; Clone; Expression

Chinese Library Classification(CLC): Q78; R392.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-624-04

前言

食物过敏日渐增多,严重食物过敏会导致过敏性休克和死亡,为当今世界性的重大卫生学问题^[1]。由牛奶、鸡蛋、鱼、贝壳海产品、花生、大豆、坚果类和小麦引起的食物过敏占 90 %以上^[2,3]。美国 3 岁以下儿童食物过敏发生率为 6-8 %^[4],有关亚洲食物过敏的人群的研究较少,有报道显示我国重庆地区 0-2 岁儿童食物过敏的发生率为 7.3 %^[5]。

花生过敏可致咽喉水肿、急性严重哮喘、过敏性休克等,若不及时抢救有可能导致死亡^[6,7]。有别于其它食物过敏,花生过

敏具有终身性,严重影响过敏者的生活质量。

目前,临床上尚无安全有效的花生脱敏疫苗,花生粗浸液免疫治疗可取得一定的效果,但安全性值得担忧^[8]。国际过敏原命名委员会公布并命名了花生致敏蛋白有 13 种(Ara h1~Ara h13)^[9]。Ara h2 为花生主要变应原,约占花生总蛋白的 5.9 %-9.3 %,属于蓝豆蛋白家族^[10],能被 90 %的花生过敏者的血清识别^[11,12]。人体外模型研究表明 Ara h2 的致敏性强,低浓度的 Ara h2 即可激活致敏细胞引起过敏反应^[13]。我们前期建立了以益生菌枯草芽孢为载体口服疫苗递送系统^[14],本研究将在原核载体中克隆、表达花生 Ara h2 变应原,为后续重组枯草芽

* 基金项目:广东省自然科学基金项目(9151012001000009);广东省科技厅一般项目(2014A020212013)

作者简介:董慧(1989-),女,硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学,电话:18898533052, E-mail: donghuidong89@163.com

[△] 通讯作者:周珍文(1973-),男,硕士生导师,博士,主任检验师,研究方向:临床微生物与变态反应,电话:020-81330638,

E-mail: zzw6248@126.com

(收稿日期:2016-05-04 接受日期:2016-05-26)

抱新型花生脱敏疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 pET-28a 质粒载体本实验室保存, BL21 购于广州瑞舒生物有限公司。

1.1.2 试剂与仪器 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I、rTaq 酶、dNTP、DNA 纯化试剂盒、高纯度小量质粒提取试剂盒、DNA Marker、T4 DNA 连接酶购于 Takara 公司。琼脂粉、酵母粉、胰蛋白酶等购自 Oxoid(英国)。Tris-Hcl、丙烯酰胺、硝酸纤维素膜(NC膜)等购于鼎国生物公司。羊抗鼠 IgG 抗体购于 EarthOx 公司(美国)。DAB 显色剂购自武汉博士德生物工程有限公司。GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统(英国 Uvitec 公司)、BG-subMINI 型多用途水平电泳槽(北京百晶公司)、HF safe-1200 型生物安全柜(上海力申公司)、PCR 仪(德国 TPersonal 公司)及 Micro 17R 台式高速冷冻离心机(德国 Sorvall 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Ara h2 基因的扩增 根据 GenBank Ara h2 基因序列(FJ3110.1),设计特异性引物一对。Ara h2 P1:5'aagaattcATG-GCGAGGCAGCAGTG3'; P2:5'aaaaagcttTTAGTCTCTGTCTCTGCC3', 引物序列分别插入 *Eco*R I (GAATTC)、*Hind* III (AAGCTT)酶切位点,以合成的 Ara h2 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 热变性 4 min 后,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 15 min。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 Ara h2 克隆入 pET-28a 及其鉴定 PCR 产物纯化后进行 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切,与 pET28a 质粒(经 *Eco*R I、*Hind* III 酶切纯化)在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 °C 过夜连接,连接产物转化 *E.coli* BL21。筛选卡那霉素抗性的阳性单克隆菌落,增菌后抽提质粒进行双酶切及 PCR 鉴定。

1.2.3 Ara h2 的序列分析 将重组质粒菌采用双脱氧末端终止法在 ABI PRISM DNA 序列分析仪上测序(华大基因)。并进行 BLAST 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),分析其与 GenBank 中已知序列的同源性。

1.2.4 重组 Ara h2 的诱导表达及 western blot 将含有 pET28a-Ara h2 的 BL21 工程菌接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 震荡培养至 OD600 值为 0.5 左右,加终浓度 0.6 mmol/L IPTG,30 °C 震荡 5 h 诱导蛋白表达。4 °C 8000 r/min 离心 15 min,收集菌体,行 12% 的 SDS-PAGE,电转移至 NC 膜,用花生变应原多克隆抗体为一抗(1:500 稀释)4 °C 孵育过夜,羊抗鼠 IgG 为二抗(1:5000 稀释)室温孵育 2 h,DAB 显色液进行显色。

2 结果

2.1 Ara h2 基因的 PCR 扩增

以生物合成的 Ara h2 DNA 为模板,使用特异性引物 PCR 扩增 Ara h2 后,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳清晰可见约 423 bp 的条带,与预期目的片段大小一致(图 1)。

2.2 重组 pET-28a-Ara h2 质粒的双酶切鉴定

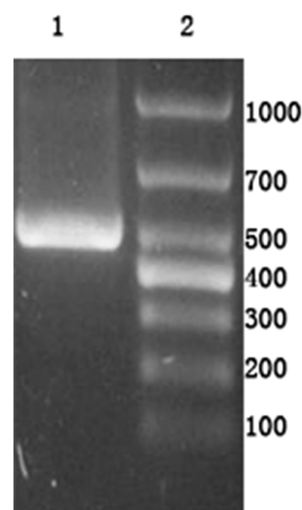


图 1 Ara h2 基因的 PCR 扩增

Fig.1 The PCR production of Ara h2

lane 1: Ara h2 PCR production

lane 2: DNA marker 1000

挑取连接产物接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上生长的单克隆菌落,增菌后抽提质粒,以重组的质粒为模板,用 Ara h2 特异性引物进行 PCR,可见与目的基因大小一致的产物条带(423 bp)。将筛选出的阳性的重组质粒进行 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切鉴定,切下约 423 bp 的 DNA 条带(图 2),与 Ara h2 片段大小一致。

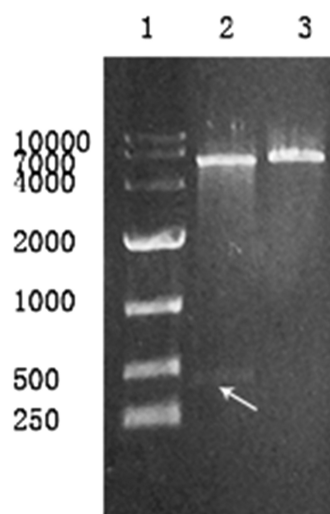


图 2 重组质粒 pET-28a-Ara h2 双酶切鉴定

Fig. 2 The identification of the recombinant pET-28a-Ara h2 by double enzyme digested

Lane 1: DNA marker DL10000

Lane 2: Recombinant pET-28a-Ara h2 digested by *Eco*R I、*Hind* III;

Lane 3: pET-28a digested by *Eco*R I、*Hind* III

2.3 阳性克隆的测序

测序显示,Ara h2 基因全长 423 bp, 预测分子量 16660.17 Da,等电点为 5.3,为弱酸性蛋白。与其序列与 GenBank Ara h2 (登录号:FJ713110.1)一致性达 99%。Ara h2 基因编码的 140 个氨基酸中,Gln、Arg 和 Glu 含量最高,分别为 16.4%、13.0% 和 10.0%。利用 GeneBank 数据库对 Ara h2 基因进行 BLAST

分析,与塞尔维亚(FJ713110.1)和美国(EF609641.1)的 Ara h2 基因同源性达 100 %,与国内广东的(AY722689.1)同源性达 100 %。与 Ara h6、Ara h7 基因同源性分别达 85 %和 76 %;与羽扇豆蛋白的蓝豆蛋白同源性达 71 %,与大豆 2 S 白蛋白前肽同源性达 82 %。

2.4 pET-28a-Ara h2 在 *E.coli* BL21 中的诱导表达

用不同 IPTG 浓度(0.1 mmol/L 至 1.0 mmol/L)对重组菌株进行诱导表达,当 IPTG 为 0.6 mmol/L,再增加 IPTG 的浓度,重组蛋白的表达量无明显变化,因此我们用 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导重组蛋白大量表达。pET-28a-Ara h2 转化菌表达产物经 12 %的 SDS-PAGE 显示相对分子质量(16.7 KDa 左右)可见重组蛋白(图 3)。而未诱导的 pET-28a-Ara h2 转化菌没有相对应的条带出现,说明可诱导重组蛋白表达(图 3)。同时,在 IPTG 的诱导下 pET-28a 空质粒转化菌不表达融合蛋白的(图3)。

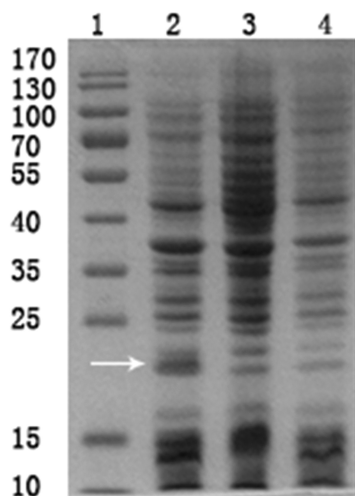


图 3 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白表达产物

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant Ara h2 in *E.coli* BL21

Lane 1: Prestained protein ladder;
Lane 2: pET-28a-Ara h2/BL21 induced;
Lane 3: pET-28a-Ara h2/BL21 uninduced;
Lane 4: pET-28a/BL21 induced

2.5 重组蛋白的 Western-blot 分析

使用 Ara h2 多克隆抗体对重组蛋白进行 Western-blot 分析,发现在分子质量约 16.7 KDa 处见到重组蛋白,而未加诱导剂的重组菌株则没有检测到目的蛋白,表明目的蛋白诱导表达成功,能被 Ara h2 特异性多克隆抗体识别,具反应原性(图 4)。

3 讨论

利用基因工程方法生产重组蛋白是制备食物过敏原的重要方法。分离纯化天然花生变应原成本高,步骤复杂,且蛋白纯度不高而存在其他非致敏蛋白和大分子,生产很难标准化。重组花生变应原可以大量生产,纯度高、安全性好,可用于变应原蛋白标准物的制备。随着分子生物学技术的进步,可应用基因工程的方法(如点突变等)对变应原序列进行修饰。使修饰的变应原去除 IgE 结合位点,并保留其免疫活性和降低过敏性。还可以将多种重组变应原组合来诊断和治疗变态反应。

花生过敏反应是 IgE 介导的 I 型超敏反应^[15]。Ara h2 是花

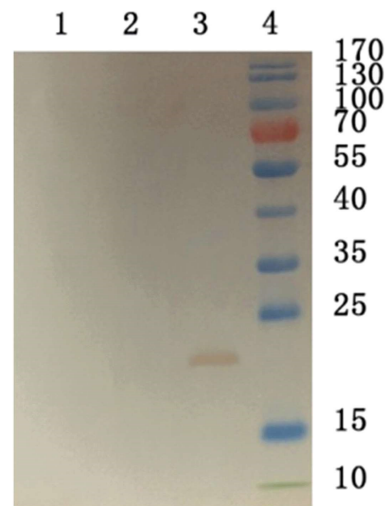


图 4 重组蛋白表达产物 Western-blot

Fig.4 Western-blot of recombinant Ara h2

Lane 1: pET-28a/BL21 induced;
Lane 2: pET-28a-Ara h2/BL21 uninduced;
Lane 3: pET-28a-Ara h2/BL21 induced;
Lane 4: Prestained protein ladder

生过敏最重要的变应原之一^[16,17],含有 10 个 IgE 结合位点,为弱酸性蛋白,可利用已知的等电点,通过亲和层析法分离纯化蛋白。Western-blot 结果显示重组变应原能被 Ara h2 特异性多克隆抗体识别,说明其具天然变应原的反应原性。

本实验顺利扩增出花生主要变应原 Ara h2 基因,双酶切后成功克隆入 pET-28a 载体,测序结果表明目的基因与 GenBank 中 Ara h2 基因一致性高达 99 %。基因比对分析可知 Ara h2 与不同花生种属间、羽扇豆蛋白和大豆蛋白具有较高的同源性;而不同国家不同地区 Ara h2 基因同源性可达 100 %,说明 Ara h2 基因一致性高且其核苷酸序列具有高度保守性,这就为花生的脱敏治疗研究提供了理论支撑。

口服纯化重组蛋白在胃肠道中不稳定,易被胃蛋白酶降解。我们前期成功构建了枯草芽孢载体系统^[14],后续我们将 Ara h2 表达于枯草芽孢表面,研制益生菌型花生脱敏疫苗。枯草芽孢安全、稳定,可耐受胃肠道的严苛环境,作为益生菌,能诱导 CD4⁺CD25⁺ Fox3⁺Treg 增加^[18,19]。我们将比较重组 Ara h2 蛋白、重组 Ara h2 枯草芽孢对花生致敏小鼠的脱敏效果,为重组 Ara h2 枯草芽孢脱敏疫苗的临床应用奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Cabrera C M, Urra J M. Food allergy and the oral immunotherapy approach[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2015, 63(1): 31-39
- [2] Patel B Y, Volcheck G W. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment[J]. Mayo Clin Proc, 2015, 90(10): 1411-1419
- [3] Bergmann M M, Caubet J C, Boguniewicz M, et al. Evaluation of food allergy in patients with atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013, 1(1): 22-28
- [4] Allen KJ, Hill DJ, Heine RG. Food allergy in childhood [J]. Med J Aust, 2006, 185 (7): 394-400
- [5] 陈静,黎海芪,廖艳,等.我国 3 城市 0-2 岁儿童食物过敏流行病学调查 [C]. 2011 中华医学会中国儿童保健学术年会 (上海), 2011:

50-56

Chen Jing, Li Hai-qi, Liao Yan, et al. Prevalence of food allergy in under 2 years of age of three cities in China [C]. Chinese Academy of Medical Science Society of the 2011 Annual Meeting of Chinese children's health (Shang Hai), 2011: 50-56

- [6] Patel, BY, GW. Volcheck, Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. Mayo Clin Proc, 2015, 90(10): 1411-1419
- [7] Marrs, T C Flohr, MR Perkin. Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): a phase 2 randomised controlled trial: a critical appraisal [J]. Br J Dermatol, 2015, 173(5): 1125-1129
- [8] Hong S J, Michael J G, Fehrer A, et al. Pepsin-digested peanut contains T-cell epitopes but no IgE epitopes [J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 104(2 Pt 1): 473-478
- [9] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2013.11.07, <http://www.allergen.org/>
- [10] Ratnaparkhe M B, Lee T H, Tan X, et al. Comparative and Evolutionary Analysis of Major Peanut Allergen Gene Families [J]. Genome Biol Evol, 2014, 6(9): 2468-2488
- [11] 蔡琴, 张文举, 陈沁. 花生过敏原 Ara h2.02 原核表达方法条件的研究[J]. 食品与机械, 2015, (02): 43-46
- Cai Qin, Zhang Wen-ju, Chen Qin. Studies on prokaryotic expression conditions of peanut allergen Ara h 2.02[J]. Food & Machinery, 2015, (02): 43-46
- [12] Mueller G A, Gosavi R A, Pomé s A, et al. Ara h2: crystal structure and IgE binding distinguish two subpopulations of peanut allergic patients by epitope diversity[J]. Allergy, 2011, 66(7): 878-885
- [13] Palmer G W, Dibbern D A, Burks A W, et al. Ara h 2 is greater than 50 times more potent than Ara h 1 in a functional assay of peanut protein allergenicity, a difference not appreciated with immunoblots [J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109: S300
- [14] Zhou ZW, Xia HM, Hu X, et al., Oral administration of a Bacillus subtilis spore-based vaccine expressing Clonorchis sinensis gumental protein 22.3 kDa confers protection against Clonorchis sinensis[J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1817-1825
- [15] Brown S J, Asai Y, Cordell H J, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3): 661-667
- [16] Joshi A A, Peczu M W, Kumar C V, et al. Ultrasensitive carbohydrate-peptide SPR imaging microarray for diagnosing IgE mediated peanut allergy[J]. Analyst, 2014, 139(22): 5728-5733
- [17] Koppelman S J, Wensing M, Ertmann M, et al. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(4): 583-590
- [18] 周珍文, 胡旭初, 邓秋连, 等. 枯草杆菌芽孢抵抗胃肠道环境的耐性评估[J]. 热带医学杂志, 2008(03): 235-237
- Zhou Zhen-wen, Hu Xu-chu, Deng Qiu-lian, et al. Resistance of bacillus subtilis spores against gastrointestinal tract environment [J]. Journal of Tropical Medical, 2008(03): 235-237
- [19] Zhou D, Zhu Y-H, Zhang W, et al. Oral administration of a select mixture of Bacillus probiotics generates Tr1 cells in weaned F4ab/acR pigs challenged with an F4+ ETEC/VTEC/EPEC strain[J]. Veterinary Research, 2015, 46(1): 95

(上接第 730 页)

- [17] Tang C, Luo D, Yang H, et al. Expression of SHP2 and related markers in non-small cell lung cancer: a tissue microarray study of 80 cases[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013, 21(5): 386-394
- [18] Gouyer V, Conti M, Devos P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmallcell lung carcinoma who undergo resection with curative intent[J]. Cancer, 2005, 103(8): 1676-1684
- [19] Pesta M, Kulda V, Kucera R, et al. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2011, 31 (11): 4031-4038
- [20] Zucker S, Drews M, Conner C, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP)[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2):1216-1222