

美洲大蠊 Per a7 基因的克隆、表达及免疫学鉴定

刘志刚, 何毅华, 吴海强, 朱永峰

(深圳大学生命科学学院, 广东深圳 518060)

摘要: 根据原肌球蛋白基因序列设计引物, 以我国南方地区美洲大蠊 *Periplaneta americana* RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增出 852 bp 的全长编码片段, 经序列分析发现该基因与 NCBI 公布的 Per a7 有 3 个核苷酸发生改变。将目的片段克隆到 pET24a(+) 表达载体中, 在大肠杆菌 BL21 Star 获得表达, 融合蛋白的分子量约为 33 kD。利用蟑螂过敏性患者血清对表达产物进行 Western blotting 检测, 出现明显的识别条带, 说明表达产物具有 IgE 结合活性。

关键词: 美洲大蠊; 变应原; 原肌球蛋白; Per a7 基因; 免疫鉴定

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)04-0330-05

Cloning, expression and immunological identification of Per a7 gene of the American cockroach, *Periplaneta americana*

LIU Zhi-Gang, HE Yi-Hua, WU Hai-Qiang, ZHU Yong-Feng (College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: An 852 bp cDNA fragment was amplified by RT-PCR from total mRNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (South China population) with a pair of primers that were designed according to the published tropomyosin gene. Sequence analysis indicated that three nucleotides changed in the gene compared with the reported Per a7 gene. The fragment was cloned into expression vector pET24a(+) and subsequently expressed in *E. coli* BL21 Star. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the expressed product was 33 kD. Western blotting indicated that the recombinant protein could combine with sera IgE from human individuals allergic to cockroach allergens.

Key words: *Periplaneta americana*; allergen; tropomyosin; Per a7 gene; immunological identification

自上世纪 60 年代 Bernton 和 Brown 首次报道蟑螂是一种潜在的变应原以来, 蟑螂在过敏性疾病发病中的作用受到越来越多的重视。蟑螂系全球性分布的昆虫, 其种类多达 3 500 种。在欧美国家, 德国小蠊 *Blattella germanica* 为优势种, 而在拉丁美洲国家、日本和台湾等地以美洲大蠊 *Periplaneta americana* 居多 (Arruda *et al.*, 1995)。赖乃揆等 (1992) 对广州地区进行了系统调查, 发现在我国南方以美洲大蠊为蟑螂优势品种 (约占 70% 左右)。室内常见的以美洲大蠊和德国小蠊为优势种 (张韶华等, 2001)。室内蟑螂对人类危害很大, 尤其在城市居民中, 蟑螂密度与哮喘发病之间存在明显相关 (王金德等, 2000)。

近 10 年来, 蟑螂的主要变应原已陆续被鉴定和克隆。Arruda 等 (1995) 利用蟑螂过敏病人血清从德

国小蠊 cDNA 文库中筛选出德国小蠊主要变应原 Bla g2、Bla g4、Bla g5 和 Bla g6; Wu 等 (1995) 从美洲大蠊克隆 Cr-p I 和 Cr-p II 等变应原。此外, 现已在美洲大蠊和德国小蠊之间发现了两类交叉抗原性成分, 一类是 Per a1 (又称 Cr-p II) 和 Bla g1, 另一类是 Per a7 和 Bla g7。前者的功能尚未清楚, 后者则属于原肌球蛋白家族 (Jeong *et al.*, 2003)。研究表明, 尘螨、甲壳类动物和蟑螂体内普遍存在原肌球蛋白, 这是这些物种间存在交叉反应的原因之一 (Daul *et al.*, 1994; Aki *et al.*, 1995)。

本研究克隆了美洲大蠊变应原 Per a7 基因, 在大肠杆菌中进行高效表达, 并对其进行纯化和免疫学鉴定, 为进一步开展 Per a7 重组变应原的临床诊断和免疫治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I, ExTaq DNA 聚合酶和 DNA 片段纯化试剂盒均为 TaKaRa 公司产品;硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品;生物素标记的抗人 IgE 抗体,HRP 标记的链霉亲和素购自 KPL 公司;其他试剂为分析纯产品。

1.2 质粒和菌株

pMD18-T 载体购于 TaKaRa 公司;原核表达载体 pET24a(+) 购自 Novagen 公司;大肠杆菌 *E. coli* Top10 和 BL21 Star 由本实验室保存。

1.3 血清

取自深圳市第一人民医院和深圳市第六人民医院过敏反应科。临床上选择对蟑螂皮试阳性的患者 30 例,收集阳性反应达 2 级或 2 级以上的患者血清,分装后低温保存。

1.4 PCR 引物

根据 GenBank 提供的 Tropomyosin 序列(登录号:Y14854)设计引物,扩增全长 Tropomyosin 开放阅读框,上游引物为 5'-gacatatggatgctatcaagaag-3',下游引物为 5'-tagcggccgcgtaaccagcaagttcgg-3',为便于 PCR 产物的克隆和表达,分别在两引物的 5'端引入 *Nde* I 和 *Not* I 的酶切位点。引物由上海博亚生物公司合成。

1.5 美洲大蠊总 RNA 的提取

美洲大蠊由深圳大学生命科学学院变态反应学和免疫学研究室纯培养。取美洲大蠊幼虫 1 只(重约 30 mg),使用 Qiagen 公司 RNeasy Mini Kit 进行总 RNA 的抽提。

1.6 RT-PCR 扩增及产物的克隆与鉴定

采用 Qiagen 公司的 Omniscript RT Kit,以 Oligo dT 为引物,总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA 第 1 链。取 4 μ L RT 反应产物为模板进行 PCR。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,接着 94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

将 PCR 扩增产物回收纯化,连接到 pMD18-T 载体上。将重组质粒转化克隆菌 *E. coli* Top10。通过含 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落(含重组质粒),提取质粒,用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切鉴定,然后送上海博亚生物公司进行 DNA 序列测定。

1.7 pET24a(+)表达质粒的构建

将含有 *Per a7* 基因的重组质粒 pMD18-T-*Per a7* 和原核表达载体 pET24a(+)分别用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切,回收目的片段并连接,转化克隆菌 *E. coli* Top10。用碱裂解法提取重组质粒,用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切鉴定后,再转化高效表达菌 *E. coli* BL21 Star 进行表达。

1.8 重组蛋白的表达与纯化

挑取单菌落培养过夜,按 2% 比例接种于 50 mL 含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至菌液的 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导表达 8 h。取 1 mL 菌液,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析。

离心收集剩余菌体,重悬于 5 mL PBS,超声波破菌。破菌液于 4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀。用包涵体洗涤液(1% Triton X-100,2 mol/L 尿素)洗涤 3 次,溶于 6 mol/L 的盐酸胍。在 AKTA 的 FPLC 上装好购于 Amersham 公司的 Hi-Trap 柱,按常规 Ni²⁺,用平衡缓冲液 A(6 mol/L 尿素,50 mmol/L PB,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)平衡层析柱,上样品,平衡至基线后,再用平衡缓冲液 A 和平衡缓冲液 B(50 mmol/L PB,300 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)按 100% 至 0 的梯度进行柱上复性,然后用洗脱液(50 mmol/L PB,300 mmol/L NaCl,200 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱,收集洗脱峰并透析去除咪唑。

1.9 表达产物的免疫学活性测定

Western blotting 检测。重组表达产物经 10% SDS-PAGE 分离,然后将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上(0.25 A,1 h),用含 20 g/L 小牛血清蛋白的 TBST 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;洗后与 1:5 稀释的蟑螂过敏病人阳性血清 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗后加入经 TBST 稀释(1:1 000)生物素标记的抗人 IgE 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗后,加入经 TBST 稀释(1:1 000)的 HRP 标记的链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;经充分洗涤后,将膜片放入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)底物溶液中,于室温振荡至褐色区带充分显现,膜放重蒸水中洗涤,终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增 *Per a7* 片段

以美洲大蠊提取总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 得到的产物,经琼脂糖凝胶电泳,可见一条约 850 bp

的条带 ,大小与理论预计值相符(图 1)。

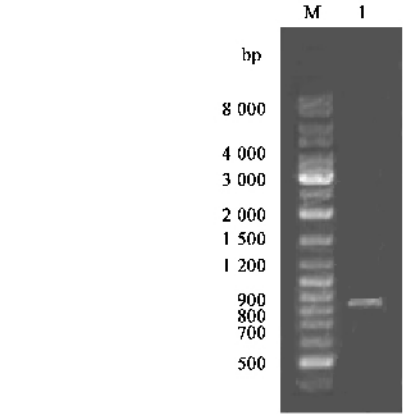


图 1 美洲大蠊 Per a7 的 RT-PCR
Fig.1 RT-PCR amplification of Per a7
M : DNA 梯度 DNA ladder ; 1 : Per a7.

2.2 Per a7 基因的克隆及鉴定

将回收后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上 ,转化克隆菌 *E. coli* Top10。挑取阳性克隆进行双酶切和 PCR 鉴定 ,将正确的克隆子进行测序。序列分析结果表明 ,所克隆序列的 ORF 为 852 bp ,编码 284 个氨基酸 ,与 NCBI 公布的 Per a7 基因有 99.6% 的同源性 ,有 3 个核苷酸不同(61c→t ,359c→t ,408a→g) 及 2 个氨基酸不同(R21→C ,A120→V)。

2.3 pET24a(+)表达载体的构建

将构建的重组表达质粒 pET24a(+)-Per a7 进行 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切分析 ,电泳结果显示一条约 850 bp 的条带 ,同预期大小相一致(图 2) ,说明目的基因成功地亚克隆入表达载体 pET24a(+)。所构建的重组质粒的表达产物带有六组氨酸标签 ,可用于蛋白的纯化和鉴定。

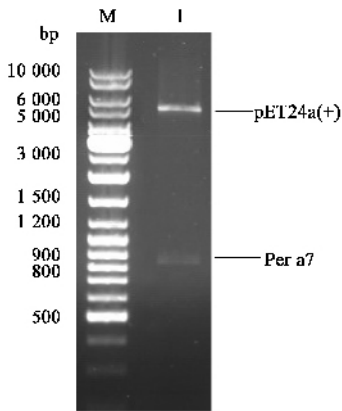


图 2 表达质粒 pET24a(+)Per a7 的 *Nde*I/*Not*I 双酶切鉴定
Fig.2 The restriction analysis for pET24a(+)Per a7 with *Nde* I and *Not* I
M : DNA 梯度 DNA ladder ; 1 : *Nde* I / *Not* I 双酶切后的表达质粒 pET24a(+)Per a7 digested with *Nde* I and *Not* I .

2.4 Per a7 重组蛋白的表达和纯化

含有 Per a7 的阳性克隆菌株经 IPTG 诱导 8 h 后 ,进行 SDS-PAGE ,结果显示在 33 kD 左右处有外源蛋白表达的条带出现 ,约占菌体总蛋白 34% ,蛋白分子量与预计值(33 kD)相符(图 3)。而未诱导的重组子不见此条带。利用 pET 载体的六组氨酸标签 ,采用 Ni^{2+} 柱亲和和层析的方法纯化重组蛋白 ,当用 200 mmol/L 的咪唑进行洗脱时 ,可观察到一尖锐的峰型出现 ,经 SDS-PAGE 检测 ,目的蛋白主要集中在此峰(图 4) ,蛋白浓度约为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

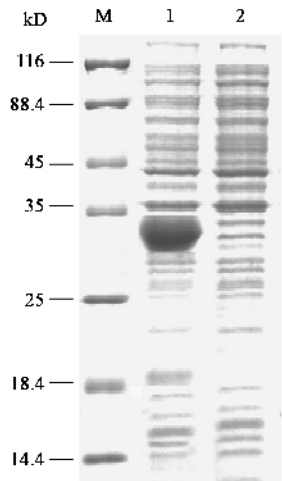


图 3 Per a7 重组蛋白的诱导表达
Fig. 3 Expression of recombinant Per a7 in *E. coli*
M : 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker ; 1 : IPTG 诱导后 Per a7 的表达 BL21 Star/pET24a(+)-Per a7 induced by IPTG ; 2 : 未经 IPTG 诱导的 Per a7 的表达 BL21 Star/pET24a(+)-Per a7 without induction.

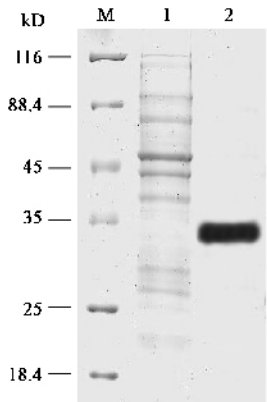


图 4 Per a7 重组蛋白的纯化
Fig. 4 FPLC purification of recombinant Per a7 using Ni^{2+} chelating affinity chromatography
M : 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker ; 1 : 穿透峰 Flow through ; 2 : 200 mmol/L 咪唑的洗脱峰 200 mmol/L imidazole for desorption.

2.5 重组蛋白的免疫原性测定

用蟑螂过敏病人的混合血清作为一抗进行的

Western blotting 试验 结果在约 33 kD 处有一明显的识别条带(图 5) ,对照组则没有 ,说明 Per a7 重组蛋白具有良好的 IgE 结合活性。

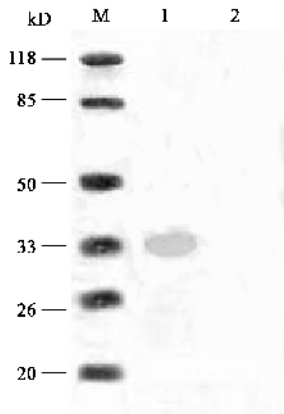


图 5 重组变应原的免疫印迹

Fig. 5 Western blotting analysis of pET24a(+)Per a7 expression products in *E. coli*

M : 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker ; 1 : IPTG 诱导 8 h 后的表达产物 Expression product after 8 h induction by IPTG ; 2 : IPTG 诱导前的表达产物 Expression product before IPTG induction .

3 讨论

已有研究证明蟑螂是主要的潜在吸入性变应原之一 ,与常见过敏性疾病如哮喘之间存在明显的关系 ,且在全世界范围内广泛分布 ,已对人类特别是城市居民造成了巨大的危害。但由于不同地区的昆虫有其种属特异性 ,而昆虫抗原(过敏原)碱基序列或氨基酸序列的不同可导致过敏原免疫原性的差异 ,故对临床上过敏性疾病患者免疫诊断或免疫治疗带来一定影响。为此 ,本课题组在构建美洲大蠊 cDNA 文库的基础上 ,克隆表达主要变应原 Cr p I(刘志刚等 2001 ,2002)和 Cr p II(何毅华等 ,2006) ,结果显示 ,我国南方美洲大蠊主要过敏原 Cr p I、Cr p II 与国外的相关报道有一定差异 ,同源性分别为 83% 和 95.9%。

Per a7 属于原肌球蛋白家族(Teong *et al.* , 2003) 。原肌球蛋白主要存在于肌细胞中 ,它在引起肌内收缩的肌动蛋白相关的钙调节系统中起重要作用(Juan *et al.* , 1999) 。本研究通过 RT-PCR 成功地克隆出我国南方美洲大蠊 Per a7 基因 ,经序列测定和分析表明 ,该克隆与 NCBI 公布的有 99.6% 的同源性 ,说明不同地区美洲大蠊存在地区差异性。所克隆的 Per a7 的理论分子量为 32 793 D ,含有 284 个氨基酸残基 ,无 N-糖基化位点 ,与尘螨和虾的原肌

球蛋白的同源性分别为 80% 和 84%。

我们采用 pET 载体进行目的蛋白与六组氨酸标签的融合表达 ,SDS-PAGE 分析表明重组蛋白在宿主大肠杆菌菌株 BL21 Star 中得到了高效表达 ,并且主要以包涵体的形式存在。通常包涵体蛋白纯化包括变性、洗脱和透析复性 3 个过程 ,透析复性耗时耗材 ,蛋白损失量大。因此 ,我们在纯化过程采用了柱上复性的方法 ,当复性梯度体积大于 30 mL ,流速控制在小于 0.3 mL/min 时 ,蛋白不会在柱内凝聚而使柱压增大 ,复性效果良好。Western blotting 表明重组的 Per a7 能与蟑螂过敏病人血清中的 IgE 结合 ,说明重组变应原具有过敏原性 ,为进一步开展过敏性疾病免疫诊断和治疗奠定了基础。

参 考 文 献(References)

Aki T , Kodama T , Fujikawa A , Miura K , Shigeta S , Wada T , Jyo T , Murooka Y , Oka S , Ono K , 1995. Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house mite , *Dermatophagoides farinae* . *J. Allergy Clin. Immunol.* , 96 : 74 - 83 .

Arruda LK , Vailes LD , Hayden ML , Benjamin DC , Chapman MD , 1995. Cloning of cockroach allergen , Bla g4 , identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses . *J. Biol. Chem.* , 270(52) : 31 196 - 31 201 .

Arruda LK , Vailes LD , Mann BJ , Shannon J , Fox JW , Vedvick TS , Hayden ML , Chapman MD , 1995. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen , Bla g2 . Sequence homology to the aspartic proteases . *J. Biol. Chem.* , 270(33) : 19 563 - 19 568 .

Daul CB , Slattey M , Reese G , Lehrer SB , 1994. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin . *Int. Arch. Allergy Immunol.* , 105 : 49 - 55 .

Gao B , Liu ZG , Su DM , Luo SW , 2004. Refolding of the cockroach allergen Cr-p I from inclusion bodies . *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica* , 11(2) : 96 - 99 . [高波 , 刘志刚 , 苏东明 , 罗时文 , 2004. 蟑螂若虫主要变应原 Cr-p I 包涵体的变复性研究 . 寄生虫学与医学昆虫学报 , 11(2) : 96 - 99]

He YH , Liu ZG , Xing M , Yang H , 2006. Cloning of Cr-p II gene from *Periplaneta americana* and construction of its prokaryotic expression plasmid . *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica* , 13(1) : 28 - 33 . [何毅华 , 刘志刚 , 邢苗 , 杨豪 , 2006. 美洲大蠊变应原 Cr-p II 基因的克隆、表达及结构预测 . 寄生虫与医学昆虫学报 , 13(1) : 28 - 33]

Jeong KY , Lee J , Lee IY , Ree HI , Hong CS , Yong TS , 2003. Allergenicity of recombinant Bla g 7 , German cockroach tropomyosin . *Allergy* , 58 : 1 059 - 1 063 .

Lai NK , He ZL , Zou ZH , 1992. Study on asthma induced by cockroach allergens . *Clin. J. Microbiol. Immunol.* , 12(Suppl.) : 34 - 36 . [赖乃揆 , 贺紫兰 , 邹泽红 , 1992. 蟑螂变应原诱发哮喘的研究 .

中华微生物学和免疫学杂志, 12(Suppl.): 34 – 36]

Liu ZG, Huang JL, Zhou ZW, Li JH, Yang H, 2002. Identification and isolation of the cDNA clones encoding the allergens of *Periplaneta americana* nymph. *Journal of Tropical Medicine*, 2(1): 32 – 35. [刘志刚, 黄炯烈, 周珍文, 李金生, 杨慧, 2002. 美洲大蠊若虫变应原的基因克隆及序列测定. 热带医学杂志, 2(1): 32 – 35]

Liu ZG, Huang JL, Zhu ZY, Zhou ZW, Liu YL, Gong SM, 2001. Construction and primary characterization of cDNA expression library of *Periplaneta americana* nymph. *Chin. J. Microbiol. Immunol.*, 21(S2): 4 – 6. [刘志刚, 黄炯烈, 朱振宇, 周珍文, 刘玉琳, 龚十妹, 2001. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定. 中

华微生物学和免疫学杂志, 21(S2): 4 – 6]

Wang JD, Xu YP, Cao LX, Yao SH, 2000. Comparison of cross-reactive antigenic components in *Periplaneta fuliginosa* and *Periplaneta americana*. *Shanghai Journal of Immunology*, 20(5): 295 – 298. [王金德, 许以平, 曹玲仙, 姚苏杭, 2000. 黑胸大蠊与美洲大蠊交叉抗原成分比较. 上海免疫学杂志, 20(5): 295 – 298]

Wu CH, Lee MF, Liao SC, 1995. Isolation and preliminary characterization of cDNA encoding American cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 96(3): 352 – 359.

(责任编辑: 黄玲巧)