

文章编号: 1000-5862(2014)05-0485-04

尘螨肠道微生物蛋白核苷二磷酸激酶的 克隆、表达及纯化

杨小猛¹, 王俊轶^{1,2}, 陈 涛¹, 刘志刚^{1,3}, 杨平常^{1,3*}

(1. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060;

2. 泸州医学院附属医院呼吸内科, 四川 泸州 646000;

3. 深圳市过敏反应与免疫学重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要: 根据 GenBank 中 NDP kinase 的基因序列, 采用生物信息学方法将其中稀有密码子改造为大肠埃希菌常用密码子并进行二级结构优化, 合成 NDP kinase 基因, 构建原核表达载体 pET28a-NDP kinase 并酶切鉴定其序列。在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导表达, 重组产物采用镍离子金属螯合亲和层析柱纯化。经密码子改造和二级结构优化后 NDP kinase 基因长度为 490 bp, 其编码蛋白理论分子量为 21.5 kDa, 重组表达载体经酶切鉴定与理论推测结果相符, 在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中该基因经 IPTG 诱导可高效表达, 纯化后的重组蛋白分子量约为 21.5 kDa, 其单一蛋白纯度达 95% 以上。本研究成功构建了尘螨肠道微生物蛋白核苷二磷酸激酶(NDP kinase) 基因的 pET28a 原核重组质粒, 为进一步研究 NDP kinase 在尘螨疫苗免疫治疗中的作用机理提供了基础。

关键词: 尘螨; 肠道微生物; 蛋白核苷二磷酸激酶

中图分类号: Q 938 **文献标志码:** A

0 引言

过敏性哮喘是常见的呼吸系统疾病, 其发病率和死亡率呈上升趋势^[1]。过敏性哮喘具有反复发作的特点, 严重影响患者的生活、工作和学习。在众多引起过敏性疾病的吸入性过敏原中, 尘螨是导致过敏性哮喘的最重要因素^[2-3]。多年来国内外学者对于天然尘螨疫苗免疫治疗作用机制的研究主要集中在尘螨抗原本身^[4-5], 既往研究发现尘螨浸出液和尘螨体内含有微生物成分^[6], 本实验室前期研究^[7-8]也发现标准化天然尘螨疫苗含有微生物蛋白成分, 而这些微生物蛋白成分在天然尘螨疫苗特异性免疫治疗机制中有何作用目前尚不清楚。本实验室对美国 NIH 标准化天然尘螨疫苗进行质谱分析发现其中含有金黄色酿脓葡萄球菌奥里斯亚种 n315 株的核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinase, NDP kinase) 成分。本研究采用基因工程技术成功表达并纯化出重组 NDP kinase, 为进一步研究 NDP kinase 在天然尘螨疫苗免疫治疗中的作用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和表达载体 大肠埃希菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 由呼吸疾病国家重点实验室深圳大学变态反应分室提供, 原核表达载体 pET28a 购于美国 GE 公司。

1.1.2 试剂 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 均购自 Fermentas 公司, Ex-Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 无内毒素质粒大抽提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 其他普通试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NDP kinase 基因合成和 PCR 扩增 根据 GenBank 中 NDP kinase 的基因序列, 将其中稀有密码子改造为大肠埃希菌常用密码子并进行二级结构优化, 送至上海生工生物工程公司合成 NDP kinase 基因, 合成基因的上下游分别加上 BamH I 和 EcoR

收稿日期: 2014-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(31328014, 81300028), 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台(2012gjhz0009) 和深圳市科技计划基础研究(JCYJ20120613100657482) 资助项目。

通信作者: 杨平常(1957-), 男, 湖南人, 教授, 博士生导师, 主要从事病原生物学及免疫学研究。

I 酶切位点与保护碱基. 利用 PrimerPremier5.0 软件设计该基因特异性引物, 上游引物为 5'-CGG-GATCCCGATGGGCGAAAGCGTTG-3', 下游引物为 5'-CGGAATTCCGACGCGCACGCTTCTCG-3', 引物由上海生工生物工程公司合成. 以合成的 NDP kinase 基因为模板进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 31 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min. 电泳检测 PCR 产物并切胶回收.

1.2.2 原核重组表达载体的构建和鉴定 将上述所得 PCR 产物与原核表达载体 pET28a 分别用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 并用 T4 DNA 连接酶连接 pET28a 酶切产物与目的基因片段, 得到重组表达质粒 pET28a-NDP kinase. 再将其转化入感受态 *E. coli* DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 37 °C 培养后挑取单菌落, PCR 扩增行琼脂糖凝胶电泳筛选阳性克隆菌落.

1.2.3 NDP kinase 的表达 上述鉴定正确的阳性质粒转化入感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑选抗氨苄青霉素阳性菌落置于 20 mL LB 液体培养基中, 于 200 rpm \cdot min⁻¹, 37 °C 条件下摇床过夜培养. 然后将其倒入 1 L 新鲜灭菌的 LB 液体培养基(含 1:1 000 氨苄青霉素)中培养, 待细菌生长处于对数生长期(OD_{600} = 0.4 ~ 0.6), 取 1 mL 菌液作为诱导前对照, 再加入终浓度为 0.5 mmol \cdot L⁻¹ 的诱导剂 IPTG, 置于 30 °C 摇床诱导表达 3.5 h, 诱导结束取 1 mL 菌液, 分别将诱导前后样品 4 °C 离心弃上清, 沉淀各自置于 100 μ L 1 \times PBS 中重悬, 分别加入 25 μ L 的 5 \times 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液并混匀, 煮沸 10 min, 各取 10 μ L 上样进行 SDS-PAGE 分析, 检测 NDP kinase 重组蛋白的表达情况.

1.2.4 NDP kinase 蛋白的可溶性分析 取 1 mL 诱导后菌液离心弃掉上清液, 沉淀重悬于 1 \times PBS, 冰浴超声破碎 20 min 后离心, 分别收集沉淀和上清液. 沉淀用 1 mL 去离子水清洗后离心弃上清, 再重悬于 100 μ L 去离子水中. 分别取 100 μ L 破碎离心得到的上清和重悬于去离子水的沉淀, 加入 25 μ L 的 5 \times 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液并混匀, 煮沸 10 min, 各取 10 μ L 上样检测表达产物的可溶性.

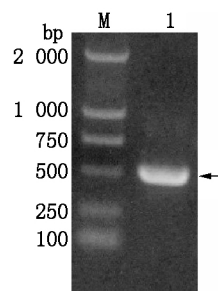
1.2.5 NDP kinase 蛋白的纯化 使用镍离子金属螯合亲和层析柱纯化. 简易操作步骤如下: 将表达菌液 4 °C 离心弃上清, 沉淀用 NTA-0 平衡液(Tris-HCl: 2.422 g, NaCl: 29.220 g, 甘油: 100 mL, pH 值为 8.0)重悬, 冰浴超声破碎后 4 °C 高速离心收集上清

液. NTA-0 平衡液平衡亲和层析柱, 1 mL \cdot min⁻¹ 速度上样, 上样完毕后用 1 \times PBS 洗出杂蛋白, 再分别用 20、60、200 和 500 mmol \cdot L⁻¹ 咪唑洗脱层析柱并分管收集各洗脱液样品, 进行 SDS-PAGE 分析.

2 结果

2.1 NDP kinase 基因 PCR 扩增结果

以 NDP kinase 基因作为模板, 使用特异性引物进行 PCR 得到的产物经琼脂糖凝胶电泳, 可见一约 490 bp 的条带, 大小与理论预计值相符结果见图 1.

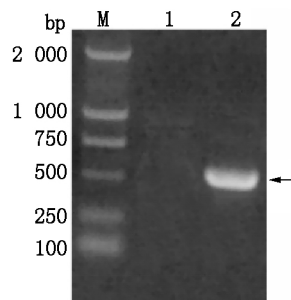


M: DNA 标志物 DL 2 000; 1: NDP kinase 目的基因.

图 1 NDP kinase 基因的 PCR 扩增结果

2.2 重组克隆的筛选和鉴定

将双酶切得到的 PCR 片段与载体 pET28a 片段连接, 构建 pET28a-NDP kinase 重组质粒并转入大肠埃希菌 *E. coli* DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板培养, 挑取单个菌落经 PCR 扩增目的基因筛选单克隆阳性菌结果见图 2.



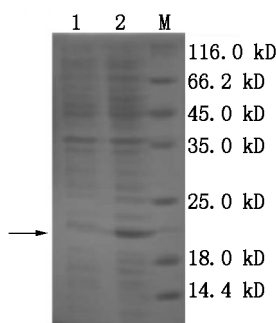
M: DNA 标志物 DL 2 000; 1: 阴性对照; 2: 阳性克隆.

图 2 菌落 PCR 鉴定阳性克隆菌

2.3 NDP kinase 的诱导表达和可溶性鉴定

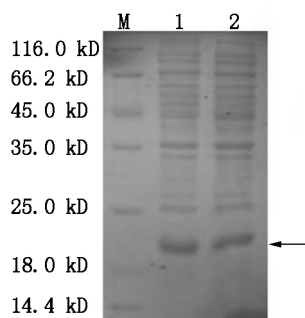
将 pET28a-NDP kinase 重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 扩增培养阳性菌株, 加入 0.5 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 30 °C 诱导 3.5 h, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示约在 21.5 kD 处有外源蛋白条带(见图 3), 与理论值相符, 其中标签大小为 5.0 kD, NDP kinase 蛋白约为 16.5 kD. 表达产物经

冰浴超声破碎后,分别收集沉淀和上清进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示目的蛋白在超声破碎上清和超声破碎沉淀中均有表达,说明目的蛋白既有可溶性表达,也有包涵体形成(见图4)。



M: 蛋白质标志物; 1: 无 IPTG 诱导; 2: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导。

图3 NDP kinase 蛋白的诱导表达结果

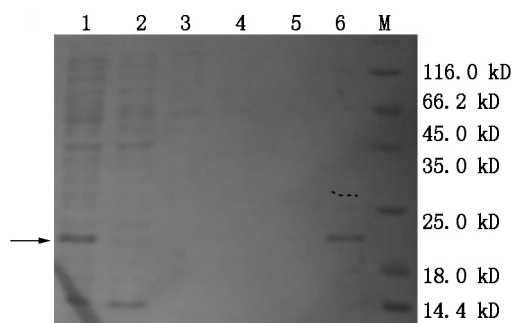


M: 蛋白质标志物; 1: 超声破碎沉淀; 2: 超声破碎上清。

图4 NDP kinase 蛋白的可溶性鉴定结果

2.4 NDP kinase 的纯化

重组 NDP kinase 带有 His 标签,可以采用镍离子金属螯合亲和层析柱纯化表达产物,依次使用 PBS、20、60、200 和 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱并收集目的蛋白后进行 SDS-PAGE 电泳分析,检测发现 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液约在 21.5 kD 处有单一特异性蛋白条带出现,为纯化的目的蛋白(见图5)。



M: 蛋白质标志物; 1: 全菌蛋白; 2: PBS 洗脱液; 3: $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液; 4: $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液; 5: $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液; 6: $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液。

图5 NDP kinase 蛋白纯化的 SDS-PAGE 结果

3 讨论

变态反应性疾病是当今世界性的重大卫生问题,严重危害人类健康。世界各国变态反应性疾病总发病率已达 15% ~ 30%, 并且全球发病率和死亡率逐年上升^[1]。此类疾病主要包括过敏性哮喘、过敏性皮炎和过敏性鼻炎等。特别是过敏性哮喘,目前世界上有近 3 亿人受哮喘困扰;而我国就有多达 3 000 万余,其中小儿超过 1 000 万人。过敏性疾病已经严重影响了人们的生活质量,严重的过敏性哮喘等病甚至成为潜在的致死性疾病。过敏性哮喘的发生与室内过敏原暴露密切相关,其中尘螨是最常见也是最重要的室内吸入性变应原^[9-10]。尘螨是世界性分布的重要变应原,室内主要分布在卧具、沙发、底面及空调滤网等处^[11],其分泌物、排泄物及尸体的降解产物等以粉尘为载体飞扬于空气中,过敏体质者吸入后诱发 I 型变态反应,从而引起哮喘、过敏性鼻炎、异位性皮炎和荨麻疹等多种过敏性疾病。

标准化尘螨疫苗特异性免疫治疗(SIT)是目前惟一能改变过敏性疾病进程的治疗方法,能阻止症状的恶化和防止对新过敏原产生变态反应^[12]。随着对过敏性疾病发病机制的进一步认识以及对特异性免疫治疗机制的深入研究,世界卫生组织(WHO)在 1998 年公布《WHO 有关免疫治疗的指导文件》中指出,标准化变应原疫苗特异性免疫治疗是目前针对变态反应性疾病的惟一病因治疗方法,鼓励应用和发展标准化的变应原疫苗。尘螨疫苗主要分为标准化尘螨疫苗和基因工程重组疫苗,目前临床上广泛用于治疗过敏性哮喘的尘螨疫苗主要还是标准化天然疫苗,这是一种天然尘螨变应原的提取液,成分比较复杂,除去尘螨自身变应原以外还存在其他蛋白成分。多年来国内外学者对于天然尘螨疫苗免疫治疗作用机制的研究都集中于尘螨抗原本身^[4-5]。既往研究发现尘螨浸出液和尘螨体内含有微生物成分^[6],本实验室前期研究也发现约占尘螨大部分体腔的消化道中存在众多微生物,对标准化天然尘螨疫苗成分分析也显示其中含有微生物蛋白成分,而这些微生物蛋白成分是否在天然尘螨疫苗特异性免疫治疗机制中发挥作用目前却并不清楚。

本实验室在对美国 NIH 标准化天然尘螨疫苗进行质谱分析过程中,发现疫苗中含有源自金黄色葡萄球菌奥里斯亚种 n315 株的 NDP kinase 成分。本研究通过构建 pET28a-NDP kinase 原核表达载体,实现了其在大肠埃希菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中的高效表达,由于重组目的蛋白带有 His

标签,因此可以通过镍离子金属螯合亲和层析技术进行纯化.本研究建立了 NDP kinase 原核表达和纯化方法,为进一步研究其在标准化天然尘螨疫苗特异性免疫治疗机制中的作用奠定了基础.

4 参考文献

- [1] Celano M P ,Holsey C N ,Kobrynski L J. Home-based family intervention for low-income children with asthma: a randomized controlled pilot study [J]. J Fam Psychol , 2012 26(2) : 171-178.
- [2] Macchiaverni P ,Rekima A ,Turfkruyer M ,et al. Respiratory allergen from house dust mite is present in human milk and primes for allergic sensitization in a mouse model of asthma [J]. Allergy 2014 69(3) : 395-398.
- [3] Kim J H ,Cheong H S ,Park J S ,et al. A genome-wide association study of total serum and mite-specific IgEs in asthma patients [J]. PLoS One 2013 8(8) : e71958.
- [4] Moed H ,Gerth van Wijk R ,Hendriks R W ,et al. Evaluation of clinical and immunological responses: a 2-year follow-up study in children with allergic rhinitis due to house dust mite [J]. Mediators Inflamm 2013 2013: 345217.
- [5] Moingeon P ,Batard T ,Nony E ,et al. Quality control of house dust mite extracts for allergen immunotherapy [J]. Int Arch Allergy Immunol 2013 161(3) : 285-286.
- [6] Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy [J]. ISRN Allergy 2013 2013: 735031.
- [7] 万 倩 ,陈献雄 ,孙新 ,等. 粉尘螨 Der f4 基因的克隆和蛋白分子特征分析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2014 38(3) : 319-323.
- [8] 刘晓宇 ,张强 ,吉坤美 ,等. 粉尘螨疫苗免疫治疗过敏性鼻炎小鼠鼻黏膜的电镜观察 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2011 35(5) : 532-536.
- [9] Aarif O Eifan ,Moises A Calderon ,Stephen R Durham. Allergen immunotherapy for house dust mite: clinical efficacy and immunological mechanisms in allergic rhinitis and asthma [J]. Expert Opin Biol Ther 2013 13(11) : 1543-1556.
- [10] 陈艳丽 ,徐小玲 ,张婧 ,等. 不同地区变应性鼻炎患者吸入性变应原的分布研究 [J]. 河北医药 2012 34(5) : 754-755.
- [11] 马忠校 ,刘晓宇 ,杨小猛 ,等. 空气净化器降低室内尘螨过敏原含量及其免疫反应性的实验研究 [J]. 中国人兽共患病学报 2013 29(2) : 133-137.
- [12] Eifan A O ,Akkoc T ,Yildiz A ,et al. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial [J]. Clin Exp Allergy 2010 40(6) : 922-932.

Cloning ,Expression and Purification of Intestinal Microflora Protein Nucleoside Diphosphate Kinase in Dust Mites

YANG Xiao-meng¹ ,WANG Jun-yi^{1 2} ,CHEN Tao¹ ,LIU Zhi-gang^{1 3} ,YANG Ping-chang^{1 3*}

(1. Allergy and Immunology Institute ,Shenzhen University ,Shenzhen Guangdong 518060 ,China;

2. The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College ,Luzhou Sichuan 646000 ,China;

3. Allergy and Immunology Institute of Shenzhen ,Shenzhen Guangdong 518060 ,China)

Abstract: To research the cloning ,expression and purification of intestinal microflora protein Nucleoside diphosphate kinase(NDP kinase) in dust mites. The gene order of NDP kinase was obtained from the GenBank; the rare codon in the gene was changed to the commonly used codon of *Escherichia coli* (*E. coli*) and the secondary structure was optimized by means of bioinformatics. Then the DNA sequence was synthesized and its prokaryotic expression vector pET28a-NDP kinase was constructed. The vector was guided into *E. coli* BL21(DE3) and expressed induced by IPTG. Finally ,the recombinant protein was purified by means of Ni-NTA affinity column. The gene length of the reformed and optimized NDP kinase was 490 bp and the theoretic molecular mass of the coding protein was about 21 kDa. The enzyme identification of the recombinant vector agreed with the theoretic value. Soluble NDP kinase could be expressed efficiently in *E. coli* BL21(DE3) by IPTG. The molecular mass of purified recombinant protein was about 21 kDa. The prokaryotic expression vector pET28a-NDP kinase was constructed successfully in our research. Efficient expression and soluble NDP kinase could be used to research the role of NDP kinase in dust mite vaccine immunotherapy.

Key words: dust mite; intestinal microflora; nucleoside diphosphate kinase

(责任编辑: 刘显亮)