

文章编号: 1000-5862(2013)02-0159-03

粉尘螨 Der f15 的基因克隆与其表达载体的构建

李钟鸣, 邬玉兰, 刘志刚*

(深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所 广东 深圳 518060)

摘要: 先挑取纯培养的粉尘螨, 提取总的 RNA, 后采用 RT-PCR 方法进行反转录出 cDNA. 由 cDNA 提取出目的基因进行片段扩增, 产物连接到 T 载体(pMD18-T). 经扩增后, 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 将目的基因分别连接到 pET28 和 pET32 的表达载体上, 得到重组质粒 pET28 和 pET32, 即粉尘螨的基因克隆与表达载体构建成功.

关键词: 粉尘螨; Der f15; 克隆; 载体构建

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

0 引言

尘螨主要包括屋尘螨和粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*), 是十分强烈的过敏原, 主要引发变态反应性疾病, 其中临床上最为常见多发的是过敏性哮喘和过敏性鼻炎等^[1-2]. 尘螨重要变应原广泛存在于自然界中, 以温暖湿润的气候条件尤多. 在日常生活中, 主要分布在室内卧具、沙发和地面织物, 以及大型空调滤网. 尘螨的分泌及排泄物可以以尘埃小颗粒的形式存在于空气中, 被过敏体质者吸入后, 可诱发过敏反应, 从而导致哮喘、过敏性鼻炎、荨麻疹等多种过敏性疾病的发生, 给人们日常生活造成不便和健康损失. 目前, 在人们已知的数十种尘螨中, 屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p) 以及粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*, Der f) 与过敏性疾病的关系最为密切. 早年, 由于现在建筑方式导致的室内环境改变引起尘螨的大量暴露, 被认为是导致特应性疾病在近 30 年的工业社会大量增多的原因. 屋尘螨和粉尘螨都可以对人或者家养犬产生 Ig E 特异性反应. 有些地理区域中这 2 类螨的分布有所不同, 但是人类 Ig E 抗体对于螨表现出明显的交叉反应且绝大多数个体是对 2 类螨都有此反应. 因此, 研究尘螨过敏原对保护人类的健康和维持正常的生活有重要意义.

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

pMD18-T 载体、pET28 载体、pET32 载体、LA-Taq 酶、限制性内切酶 EcoR I 与 Xho I、T4 连接酶、DNaseI 均购自 TaKaRa 公司.

1.2 粉尘螨总 RNA 的提取

采用本实验室纯培养的粉尘螨 300 只, 经液氮研磨后用 Qiagen 公司试剂盒进行总 RNA 的提取.

1.3 RT-PCR 扩增及其产物的扩增

采用非特异性引物进行 RT-PCR 的逆转录反应. 后继 PCR 反应引物反应用 Gene Tool 程序设计, 上游引物为 5'-CGAATTCATGAAAACCATATATG-CAATACTTA-3', 下游引物为 5'-GCTCGAGTTAT-TCGCCTATAGAAGTCAAT-3', 分别插入 EcoR I 和 Xho I 的酶切位点及保护性碱基. 引物由上海生工生物工程有限公司合成. PCR 反应参数为 95 °C 预变性 5 min, 接着 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 最后 72 °C 延伸 10 min. 将扩增产物回收纯化后连接至 T4 载体. 将重组质粒转化进克隆菌 *E. coli* Top10. 分别通过含 Amp、Kana 的 LB 平板进行抗氨苄和抗卡那筛选, 挑取白色菌落(含有重组质粒)进行 LB/Amp 培养. 碱裂解法提取质粒, 并用 EcoR I 和 Xho I 酶切鉴定. 再次测定该片段的 DNA 序列(由上海生

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家“863”计划(2006AA02A231) 国家自然科学基金(81071388) 广东省自然科学基金(04554) 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台项目(2012gjhz0009) 深圳市重点实验室组建项目(SW201110010) 深圳市科技计划基础研究重点项目(JCYJ20120613100657482) 和深圳市南山区一般研发课题(KC2012JSYB0003A) 资助项目.

通信作者: 刘志刚(1959-) 男 江西南昌人 教授 博士生导师 主要从事过敏性疾病过敏原的生化与分子生物学研究.

工生物工程有限公司完成)。

1.4 酶切及重组载体的构建

利用上述引物的酶切位点,将 PCR 扩增片段与原核表达载体 pET28 和 pET32 分别用 EcoR I 和 Xho I 酶切,并将所获得 Der f15 基因片段和 pET28 及 pET32 的酶切产物分别连接,构建重组表达质粒 pET28-Der f15、pET32-Der f15。以重组质粒转化 Top10 感受态大肠杆菌,扩增后提取质粒,再进行双酶切鉴定,克隆呈阳性,经测序鉴定后用于诱导表达(测序由上海生工生物工程有限公司完成)。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 RT-PCR 扩增

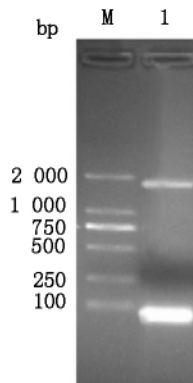
以纯培养的活粉尘螨提取的总 RNA 为模板,进行设计的特异性引物为上下游引物,然后再以反转录所得到的 cDNA 为模板扩增得到约为 1 700 bp 的片段,大小与预期相符,结果见图 1。

2.2 重组克隆载体 pMD18-T-Der f15 的构建及测序

克隆转化入感受态细胞 Top10 后,在含有 X-gal/IPTG 的 LB 平板上成功长出许多白色菌落,表明目的基因的 T-A 克隆和转化成功。挑取白色菌落(白色菌落为阳性克隆),通过 EcoR I 和 Xho I 酶切证实目的基因已成功转入 pMD18-T 载体中(见图 2)。克隆所得 DNA 片段经序列测序可知,该基因长度为 1 668 bp。

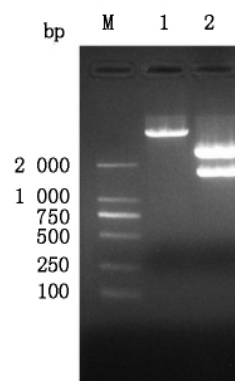
2.3 表达载体 pET-Der f15 的构建和酶切鉴定

将 Der f15 基因分别连接到 pET-28-(a) 和 pET-32-(a) 转入感受态 Top10 后,挑取阳性克隆,扩增培养后提取质粒,将所提取的重组质粒进行 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定,电泳结果显示出 Der f15 的 cDNA 长度基本一致的 DNA 片段,证明表达重组质粒 pET-Der f15 构建成功。结果见图 3。



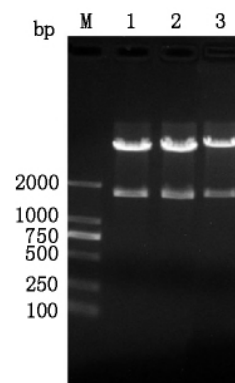
M: DNA 相对分子质量标准; 1: 扩增的 Der f15 基因。

图 1 目的基因的 RT-PCR 产物



M: DNA 相对分子质量标准; 1: pMD18-T-Der f15 质粒; 2: EcoR I/Xho I 双酶切 pMD18-T-Der f15 质粒。

图 2 pMD18-T-Der f15 重组质粒的 EcoR I/Xho I 双酶切鉴定



M: DNA 相对分子质量标准; 1: pET-Der f15 重组质粒; 2: EcoR I/Xho I 双酶切 pET28-Der f15 重组质粒; 3: EcoR I/Xho I 双酶切 pET32-Der f15 重组质粒。

图 3 pET-Der f15 重组质粒的 EcoR I/Xho I 双酶切验证

重组质粒 pET-Der f15 基因片段如图 4 所示。

>derf15

```
atgaaaaccatataatgcaatacttagtattatggcctgcattggcctt
atgaatgcatccatcaaacgagatcataatgattattcgaaaaatccgatgag
aatgtttgttatgttggaaatggctcgtatatacataaagttagccataca
ctatcgaaagatattgatccattcaagtgtacacatttaattgtatggttcgct
aaaattgatgaatacaatacacaaattcaagttttcgatcccttaccagatga
taaccataactcatgggaaaaacgtggttatgaacgtttcaacaacttgcgat
tgaagaatccagaatttaaccaccatgatttcacttgggtggttggatgaaggc
tcggaataatattccgatattggtgcaaatccacatattcgtaacaattcat
acaatcagttttggactttttgcaagaatacaagttcgacggtctagatttgg
attgggagtatcctggatctcgattgggttaaccgaaatcgataaacaataac
tattttggcttggtagagaacttaagacgcttttgaacctcatggctactt
gttgactgctgcagatatacaccaggttaagacaaaatcgaccgagcttatgata
tcaagaattgaacaaattgttcgattggatgaatgtcatgacatatgattac
cacggtggatgggaaaacttttacggtcacaatgtccggtgtataaacgacc
agatgaactgatgagttgcacacttacttcaatgtcaactacaccatgcact
attatttgaacaatgggtgccaccagagacaaattggtaattgggtgttcattc
tatggcgtgtgttgagcattgaagatcgaaacaaactcaacttggagatcc
agccaaaggcagctgcgccccaggtttcatttctggtgaagaagggtctctct
catatatagaattgtgtcaattgtttcaaaaagaagaatggcatatccaatac
gatgaatattacaatgtccatattggttacaatgataaaatctgggtcggtta
cgatgatctggccagtatatacatgcaagttggctttcttgaaagaattaggcg
ttctggtgtcatggtttggtcattggaaatgatgatttcaaggctcactgc
ggaccgaaataatccattgttgaacaaagttcataatattgattaatggcgatga
aaagaactctttcgaatgcattttgggtccaagtacaacgacaccaactccaa
cgacgacacccacaaccccgactacaacgcaacaactcttctcccaccacc
ccgacacaaaccccttctcccaccaccccgacacaaaccccttctcccaccac
accgacacaaactcttctcccaccacacacacacacacacacacacacacag
ccctacaacatcgacaccttgcgaacacgacgacgaacacacacacacacacac
ccaaaatatacaacctatgtcgatggacatcttatcaaatgttacaagggaag
tgatattccacatccaaccaatatacaaaaatttgggtctgtgaattgtta
attggtgggtgggtgtcatattatgcctgtccacgggacatttgggtgt
caagaaaaattgactgtataggcgaataa
```

图 4 粉尘螨 Der f15 的基因片段

3 讨论

近年来,虽然科学技术发展极快,但是临床上对尘螨过敏患者仍主要以尘螨粗浸液法进行体内外诊断和特异性免疫治疗。然而,天然变应原提取液成分复杂,极易受有毒物质和病原微生物的污染,人工饲养的尘螨提取方法更是十分复杂。由此可知,利用基因重组方法进行变应原的制备,将对变应性疾病的诊断和治疗起到重要作用,而重组变应原的研究成为当今变态反应性疾病的研究热点之一。

粉尘螨是人类常见的吸入性致敏原之一。目前所知的粉尘螨变应原有10多种。2000年,美国科学家在狗身上首次发现粉尘螨 Der f15 变应原,并对此进行了基因克隆、蛋白纯化和免疫组化及抗原定位的分析。本课题组研究发现粉尘螨 Der f15 变应原中含有554个氨基酸,蛋白质分子量约为87 kDa。有资料显示,Der f15 变应原主要存在于粉尘螨的外壳表面,而体内不含有这一变应原,它可以和约为95%的致敏患者血清的IgE发生反应。Der f15 过敏原表现出与几丁质酶的同源性(葡萄糖水解酶18家族)。

此外,韩国科学家也对室内尘螨进行了研究。认为粉尘螨 Der f15 过敏原还和从粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的围食膜蛋白表现出有限的同源性,且作为粉尘螨过敏原的IgE反应活性为70%。这一结果与2001年的美国科学家研究结果略有不同。

本实验通过提取粉尘螨的总RNA,利用自行设计的引物,通过RT-PCR成功地克隆了Der f15的基因,并且连接到了pMD18-T载体上,经EcoR I和Xho I双酶切和测序均证实已克隆到了正确的目的基因片段,且在实验后期将该片段连接到原核表达载体pET28和pET32上,为未来的蛋白表达和免疫

测定奠定了基础。

4 参考文献

- [1] 刘志刚,刘瑞涛,赖仞,等. 粉尘螨抗细菌活性物质的分离与鉴定[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2011,35(1):34-36.
- [2] 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粘膜的电镜观察[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2011,35(5):532-536.
- [3] Platts-Mills T A, Thomas W R, Aalberse R C, et al. Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop[J]. Allergy Clin Immunol, 1992, 89: 1046-1060.
- [4] 徐瑞霞,蒋鹤龄. 尘螨浸液治疗31例变态反应性疾病疗效观察[J]. 安徽预防医学杂志,1997,3(1):68-69.
- [5] Sporick R, Holgate S, Platts-Mills T, et al. Exposure to house dust mite allergen (Der p1) and the development of asthma in childhood N[J]. Engl J Med, 1990, 323: 502-507.
- [6] Sture G. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1995, 44(3/4):293-308.
- [7] 郝敏麒,徐军,钟南山. 华南地区粉尘螨主要变应原Der f2的cDNA克隆及序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2003,21(3):160-163.
- [8] McCall C, Hunter S, Stedman K, et al. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f15) for dog[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2001, 78: 231-247.
- [9] Kyoung Yong Jeong, Jung-Won Park, Chein-Soo Hong. House dust mite allergy in Korea: The most important inhalant allergen in current and future[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2012, 4(6):313-325.

Cloning and Vectorconstruction of Der f15 from House Dust Mite *Dermatophagoides Farina*

LI Zhong-ming, WU Yu-lan, LIU Zhi-gang*

(State Key Laboratory of Respiratory Disease for Allergy, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

Abstract: The living mites of south China area which had been identified and cultured were picked from which extracted the total RNA. RT-PCR technology were used to clone the gene and then connected it to the T vector (pMD18-T). After that, the expression vector (pET28 and pET32) was constructed for the new gene segment and were connect ed together.

Key words: dermatophagoides farina; Der f15; cloning; vectorconstruction

(责任编辑: 刘显亮)