

文章编号: 1000-5862(2014)03-0319-05

粉尘螨 Der f4 基因的克隆和蛋白分子特征分析

万倩¹, 陈献雄², 孙新¹, 钟政荣^{1*}, 刘志刚^{2*}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院检验科, 安徽 蚌埠 233000;

2. 深圳大学医学院过敏反应和免疫学研究所, 广州 深圳 518060)

摘要: 从深圳地区采集粉尘螨纯培养, 提取总 RNA 根据香港中文大学合成的尘螨基因序列并设计的引物, RT-PCR 扩增出 Der f4 基因, 克隆到 pUC57 载体后测序和进行生物信息学分析. 将该目的基因克隆到 pET-28a 表达载体上得到重组质粒 pET-28a-Der f4. 用生物软件分析尘螨变应原 Der f4 序列. RT-PCR 获得目的基因 Der f4 cDNA 全长为 1 593 bp. 推测编码蛋白由 526 个氨基酸组成. 生物信息学分析表明, Der f4 具有多种磷酸化位点, 含有信号肽, 为疏水性蛋白, 包含淀粉酶抑制剂功能结构域. 获得 Der f4 基因全长, 其编码的细胞外疏水性蛋白可能具有淀粉酶抑制剂活性.

关键词: 粉尘螨 Der f4; 生物信息学; 克隆

中图分类号: R 384.4

文献标志码: A

0 引言

变态反应性疾病一直危害人们的健康, 尘螨在全世界都有分布. 我国约 1% ~ 4% 的人群患有以上病症^[1]. 尘螨中粉尘螨 *Dermatophagoides farinae* 和屋尘螨 *Dermatophagoides pteronyssinus* 是最常见的吸入性变应原, 这 2 种螨的分布和生长环境有所不同^[2-5]. 粉尘螨在家居灰尘中普遍存在, 是引起人过敏的最主要的过敏原, 也是变态反应学研究最重要变应原之一^[6]. 粉尘螨抗原主要存在于螨体及其代谢产物中, 由于接触、食入和吸入引起临床上较多发的过敏性鼻炎及过敏性哮喘等变态反应性疾病, 日益受到人们重视. 对于常见的尘螨变应原, 国内曾经报道过使用凝胶过滤、聚丙烯酰胺凝胶电泳、单克隆抗体层析等方法分离纯化粉尘螨 Der f4 等变应原^[7-8]. 崔玉宝等^[9]曾报道使用 RT-PCR 的方法克隆出粉尘螨内 cDNA 序列分析, 关于尘螨变应原 Der f4 的 cDNA 序列未见文献报道. 克隆其 cDNA 序列对于了解尘螨变应原的差别, 进一步重组表达变应原等有重要意义.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和样品

从深圳大学学生公寓室内根据形态特征分离获得粉尘螨, 然后进行人工纯培养. 原核表达载体 pET-28a 购自 Novagen 公司, 大肠埃希菌 (*E. coli*) BL₂₁ 为本研究室平培养. Tag 聚合酶、pUC57 载体、限制性内切酶 BamHI、AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司. RNA 提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒购自 Qiagen 公司. PCR 仪 (MJ Research PTC-100) 购自美国 MJ 公司, 恒温摇床 (Forma Scientific) 购自美国 Thermo 公司, 凝胶成像系统购自法国 Vilber Lourmat 公司.

1.2 方法

1.2.1 粉尘螨总 RNA 的提取 由香港中文大学和深圳大学医学院合作合成的尘螨基因序列并设计的引物, 由深圳生物工程有限公司合成, 如上游引物 5'-GGATCCATGCTGCCAAAATTCTTTTAA-3'; 下游引物 5'-GAATTCCTTAGCTCTCAACACGTGCGCC-3'. 在引物上、下游分别添加 EcoRI 和 BamHI 酶切位点.

收稿日期: 2013-12-04

基金项目: 国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究基金(31328014), 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: 刘志刚(1959-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学、过敏反应学研究;

钟政荣(1972-), 男, 安徽无为, 副教授, 博士, 主要从事病原生物感染与免疫学研究.

(下划线处)解剖镜下挑取粉尘螨约 700 只,加液氮研磨后用提取总 RNA 操作按试剂说明书进行。

1.2.2 Der f4 全长 cDNA 合成 以提取的总 RNA 为模板,逆转录 cDNA,进行 PCR 扩增反应。反应体系如下(50 μ L): 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L; TaKaRa Ex Taq 0.25 μ L; dNTP Mixture 4 μ L; 上下游引物各 2 μ L, cDNA 为模板 1 μ L; 加去离子水至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 35 个循环,PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳验证并拍照。

1.2.3 重组质粒构建及酶切鉴定 将上述 PCR 产物与 pUC57 连接后,热转化至 *E. coli* Top10 中,涂布于含氨苄霉素(100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,从 LB 平板上挑选白色菌落放入含氨苄霉素的 LB 培养液中扩大培养,提取质粒。用 EcoRI 和 BamH I 双酶切鉴定,重组质粒,委托华大基因工程(深圳)有限公司进行序列,测序正确后进一步将酶切产物与 pET-28a 表达载体 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h 进行连接转化至 *E. coli* BL₂₁,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单个菌落,提取质粒后双酶切鉴定。

1.3 生物信息学分析

将原始测序结果与参考序列比对,用 NCBI 网站在线软件分析其 ORF,用 ProtParam Tools 预测其理化性质,用 Translate Tool 推导其氨基酸序列,用 KinasePhos 软件预测磷酸化位点。ProtScale 预测其亲水性,用 TMHMM 进行跨膜区分析,用 Signal P3.0 分析其信号肽序列,NetNES 1.1 Server 分析其核输出信号,用 GOR410 软件预测其二级结构,Inter-ProScan 进行结构域分析,用 MEGA5 工具包来构建系统进化树。

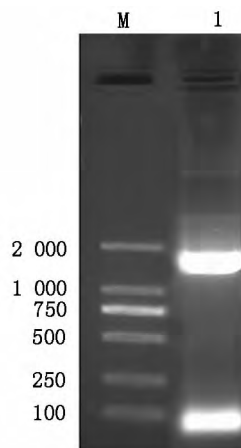
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

Der f4 片段经琼脂糖凝胶电泳结果显示,在大约 1 600 bp 处出现特异性的条带,其大小与 Der f4 基因的预期理论值参考序列大小一致(见图 1)。

2.2 重组载体的双酶切和测序鉴定

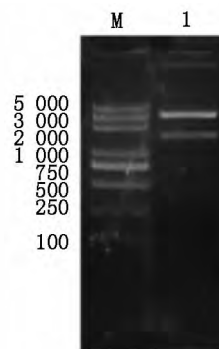
重组的克隆载体和表达载体经 EcoR I 和 BamH I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分析表明,在预期位置出现了特异性条带,表明 Der f4 基因片段与预期大小相一致(见图 2 和图 3)。



泳道 M: DNA 分子量标准(DL2000),

泳道 1: Der f4 基因 PCR 产物。

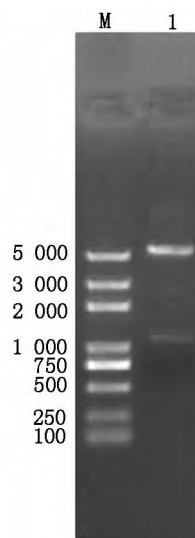
图 1 Der f4 电泳产物图



泳道 M: DNA 标志物,

泳道 1: pUC57-Der f4 质粒经 EcoR I /BamH I 双酶切。

图 2 pUC57-Der f4 质粒的 EcoRI/BamH I 双酶切电泳图



泳道 M: DNA 标志物,

泳道 1: pET28a-Der f4 质粒经 EcoR I /BamH I 双酶切。

图 3 pET28a-Der f4 质粒的 EcoRI/BamH I 双酶切鉴定

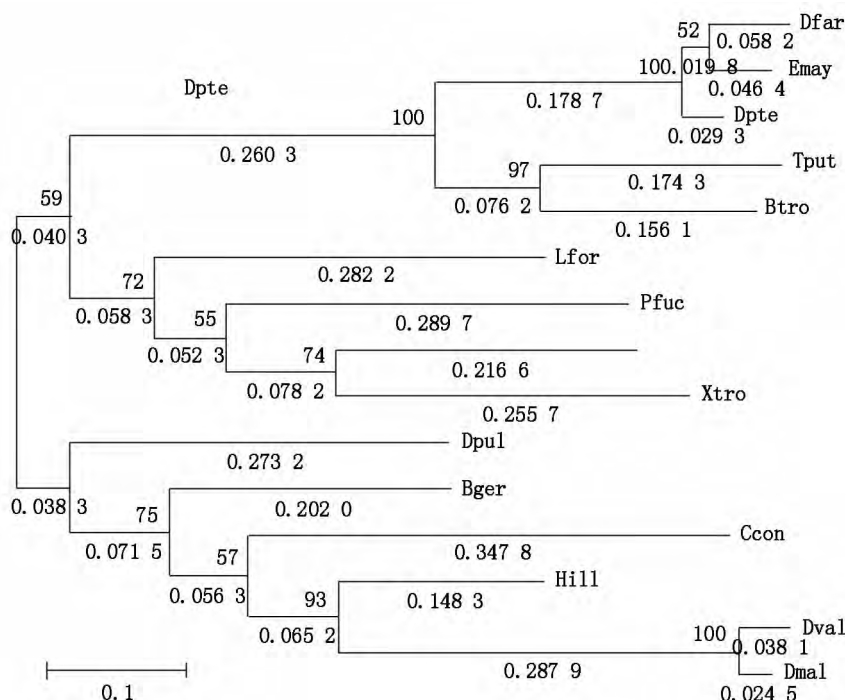
2.3 生物信息学分析

TMHMM 软件分析显示 Der f4 含有 1 个跨膜螺旋区. 磷酸化位点预测结果表明 Der f4 含有 26 个丝氨酸激酶、19 个苏氨酸激酶、24 个酪氨酸激酶、1 组氨酸激酶磷酸化位点. 氨基酸亲水性指数表明其为疏水性蛋白. Signal IP 软件分析信号肽序列在 1 ~ 23 位氨基酸. 该变应原 N 端第 10 位异亮氨酸, 第 13 位亮氨酸, 第 14 位苏氨酸, 第 15、19 位亮氨酸, 第 20 位苯丙氨酸有明显信号核输出信号. 其氨基酸序列的二级结构 α 螺旋有 138 个, 占 26.24% β 转角 30 个占 5.7%. 延伸链有 114 个, 占 21.67%. 无规则

曲有 244 个, 占 46.39%. InterProScan 软件分析氨基酸序列的功能位点分析其第 29 ~ 526 个氨基酸具有淀粉酶作用, 第 426 ~ 524 个氨基酸具有糖基水解酶催化域.

2.4 同源性分析

分析显示此粉尘螨 Der f4 与梅氏嗜霉螨、屋尘螨、腐酪食螨、热带无爪螨的 Der f4 同源性分别为 99%、95%、97%、96%. 进化树显示, 尘螨 Der f4 与梅氏嗜霉螨、屋尘螨、腐酪食螨、热带无爪螨、石蜈蚣、文昌鱼、珠母贝属、非洲爪蟾属的同源蛋白关系较近(见图 4).



注: Dfar 粉尘螨, Emay 梅氏嗜霉螨, Dpte 屋尘螨, Tput 腐酪食螨, Btro 热带无爪螨, Lfor 石蜈蚣, Bflo 文昌鱼, Pfuc 珠母贝属, Xtro 非洲爪蟾属, Dpul 蚤状蚤, Ccon 盘绒茧蜂属, Hill 黑水虻, Bger 德国蟑螂, Dmal、Dval 果蝇.

图 4 不同物种报道的与尘螨变应原 Der f4 分子进化树

3 讨论

近几十年来, 全球变态反应性疾病的发病率逐年升高, 此类疾病成为危害人类健康的主要问题之一. 全球过敏性疾病发病率约为 15% ~ 30%, 其中我国过敏性哮喘患者约 1 500 万, 过敏性鼻炎患者超过 5 000 万. 美国的一项调查显示, 83.7% 以上哮喘患者对尘螨过敏. 我国临床上对尘螨过敏的占所有过敏性疾病患者 71.3% 以上^[10]. 如何防治尘螨过敏导致的变态反应性疾病是需要迫切解决的任务之一.

尘螨变应原的组成成分超过 30 种, 其中主要变应原已制备单克隆抗体, 且大部分变应原所具有的酶学性质也已被阐明^[11]. 尘螨变应原 Der f4 基因的克隆未见文献报道, 本文利用基因工程技术 RT-PCR 的方法克隆了深圳地区粉尘螨 Der f4 基因, 谢建云等^[8]使用 20% ~ 50% 饱和硫酸铵分级沉淀法、凝胶层析、PAGE 制备电泳等相结合的方法来纯化天然变应原 Der f4^[5], 由于天然变应原提取液的组分非常复杂, 恒定其组分非常困难, 且容易受外源性有毒物质、病原微生物的污染, 影响其重复性与安全性. 而重组变应原疫苗具有无外源性污染、纯度高、易标准化的优势, 临床上已有用于免疫治疗^[9]. 因

此,利用基因重组的方法制备变应原的研究成为当今变态反应性疾病的研究热点之一,无疑为变应性疾病的诊断与治疗起到重要作用,这将为今后进行具有区域特色的粉尘螨分子疫苗的研究奠定基础。

生物信息学是通过基因序列可预测其相应蛋白质结构和功能的重要工具^[10]。用生物信息学软件对变应原基因及其编码蛋白质结构和功能进行预测,可指导实验室研究,快速准确地鉴定变应原的性质如变应原性、免疫原性、交叉反应性^[11]。本文通过运用 ExPASy 数据库及其尘螨的氨基酸序列,对它的氨基酸理化参数分析、蛋白质亲疏水性分析、翻译后修饰位点预测等。F. R. Lake 等^[15-16]和 G. A. Stewart 等^[17-18]证实尘螨 4 类变应原具有淀粉酶抑制剂的活性。本文通过 RT-PCR 方法扩增粉尘螨变应原 Derf4 编码基因,测序结果表明其第 29~526 个氨基酸具有淀粉酶作用,说明成功合成了目的基因。

分子进化遗传分析(molecular evolutionary genetics analysis,MEGA)工具包结果提示粉尘螨与果蝇进化关系最远,与梅氏嗜霉螨进化关系最近。此结论不太符合形态学分类:按照目前的分类系统,粉尘螨与屋尘螨同属于尘螨属,而梅氏嗜霉螨属于嗜霉螨属。传统观点认为蜘蛛、蝎、螨和蜱是节肢动物的一个群,同属于蛛形纲,螨类与蜈蚣(节肢动物门多足纲)、文昌鱼(脊索动物门头索动物亚门头索纲)、珠母贝属(软体动物门双壳纲)、非洲爪蟾属(脊索动物门头索动物亚门两栖纲)进化关系较近,果蝇属于昆虫纲,螨类属于蛛形纲,二者均属于节肢动物门,但是粉尘螨与果蝇的进化关系却是最远。与现在螨类形态学与氨基酸序列分类不太符合,导致该现象的原因尚待进一步探讨^[19]。

4 参考文献

- [1] 崔玉宝,周鹏.尘螨变应原 Der f2 基因克隆及序列分析[J].第四军医大学学报,2008,29(1):9-12.
- [2] 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.
- [3] 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腔粘膜的电镜观察[J].江西师范大学学报:自然科学版,2011,35(5):532-536.
- [4] 李忠鸣,鄢玉兰,刘志刚.粉尘螨 Der f15 的基因克隆与其表达载体的构建[J].江西师范大学学报:自然科学版,2013,37(2):159-161.
- [5] 江鑫,姜玉新.粉尘螨 I 类变应原成熟肽基因的克隆和生物信息学分析[J].热带医学杂志,2008,8(9):889-892.
- [6] Thomas W R,Smith W A,Hales B J,et al. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens [J]. Int Arch Allergy Immunol,2002,129(1):1-18.
- [7] 钟建敏,温廷恒.粉尘螨变应原的提纯及物理化学特征鉴定[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1993,11(3):204-206.
- [8] 谢建云,温廷恒.粉尘螨 Der f4 变应原的提纯及其淀粉酶活性分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1996,14(2):119-123.
- [9] 刘良,周鹰.尘螨变应原 Der p2 基因克隆及其原核表达[J].中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(4):320-323.
- [10] 蔡成郁,白羽,刘志刚,等.粉尘螨 3 类变应原基因的克隆、表达、纯化与变应原性鉴定[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2007,25(1):22-26.
- [11] Thomas W R. Mite allergens group I-VII. A catalogue of enzymes [J]. Clin Exp Allergy,1993,23:350.
- [12] 朱永峰,刘志刚,高波.粉尘螨 Der f18 变应原的克隆表达、纯化及免疫学特性鉴定[J].寄生虫与医学昆虫学报,2008,15(3):162-166.
- [13] 崔玉宝,周鹰.粉尘螨变应原第 6 组分全长 cDNA 克隆及生物信息学分析[J].中国免疫学杂志,2009,25(7):641-645.
- [14] 杨朝晖,周鹰.粉尘螨变应原第 3 组分全长基因克隆及其结构功能分析[J].免疫学杂志,2010,26(3):278-279.
- [15] Lake F R,Ward L D,Simpson R J,et al. House dust mite derived amylase: allergenicity and physicochemical Characterization [J]. J Allergy Clin Immunol,1991,87(6):1035-1042.
- [16] Lake F R,Ward L D,Simpson R J,et al. Allergenicity and physicochemical Characterization of house dust derived amylase [J]. Int Arch Allergy Immunol,1991,94(1/2/3/4):357-358.
- [17] Stewart G A,Lake F R,Thomson P J. Faecally derived hydrolitic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*; physicochemical characterisation of potential allergens [J]. Int Arch Allergy Immunol,1991,95(213):248-256.
- [18] Stewart G A,Bird C H,Krska K D,et al. A comparative study of allergenic and potentially allergenic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*,*D. farinae* and *Euroglyphus maynei* [J]. Exp Appl Acarol,1992,16(1/2):165-180.
- [19] 牛莉娜,周鹰.尘螨变应原 Der f1 核酸序列测定及其分子进化分析[J].现代生物医学进展,2007,7(7):999-1001.

The Cloning and Bioinformatics Analysis of Der f4 Gene from the *Dermatophagoide farinae*

WAN Qian¹, CHEN Xian-xiong², SUN Xin¹, ZHONG Zheng-rong^{1*}, LIU Zhi-gang^{2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233000, China;

2. Allergy and Immunology Institute, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518600, China)

Abstract: RNA was extracted from Shenzhen area and the full-length of Der f4 gene was amplified by RT-PCR with the primers designed according to previous sequence published in Hong Kong chinese university. The target gene was cloned into pUC57 plasmid and sequenced. Der f4 gene was recombined into pET-28a expression vector following sequencing identification. And then Der f4 protein was characterized by bioinformatics software. The opening reading frame (ORF) of Der f4 was obtained by RT-PCR and was 1 593 bp in full length. The protein encoded by this sequence was deduced to be consisted with 526 amino acids. Bioinformatics analysis of Der f4 which proved to be hydrophobic proteins associated with amylase inhibitors function. Structure domain contained signal peptide and multiple phosphorylation site. The full-length cDNA for Der f4 obtained, which should encode a hydrophobic extracellular protein associated with inhibition of amylase.

Key words: *Dermatophagoide farinae*; Der f4; bioinformatics; clone

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 318 页)

The Effects of CMQ on Growth of Colonial *Microcystis aeruginosa* and Its Practical Application Perspective in the Control of Cyanobacterial Blooms

ZHAO Yang¹, YE Xing-lin^{1,2}, YANG Qin¹, LIU Wei-sheng¹, PENG Yi-yuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Functional Small Organic Molecules, Ministry of Education and College of Life Science, Jiangxi Normal University,

Nanchang Jiangxi 330022, China; 2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332005, China)

Abstract: Along with increasing eutrophication in recent years, massive cyanobacterial blooms have become a severe environmental problem in freshwaters worldwide. Therefore, developing an effective method to control the cyanobacterial bloom is essential to guarantee the water quality security and to recover the aquatic ecosystem. Quinazoline derivatives, endowed with a broad spectrum of biological activities and therapeutic properties, had a potential ability to inhibit the growth of *Microcystis* and control the cyanobacterial blooms. In this study, it was shown that CMQ could intensely inhibit the growth of *M. aeruginosa* groups at the concentration of higher than $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of CMQ, with EC_{50} for 4 d as $1.93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The change of colony morphology and volume size in *Microcystis aeruginosa* also suggested that CMQ could break down the *M. aeruginosa* colonies and cause the smaller size of *Microcystis* colonies, and led to obvious settlement of these colonies. Based on the results that CMQ had exhibited efficient antialgal activities, it is further implicated that CMQ have a practical application perspective in the control of cyanobacterial blooms.

Key words: CMQ; cell; groups; *Microcystis*; cyanobacterial blooms

(责任编辑: 刘显亮)