

文章编号: 1000-5862(2015)01-0101-05

粉尘螨过敏原脂肪酶的表达、 纯化及生物信息学分析

幸 鹏¹, 刘玉琳², 喻海琼¹, 李 盟¹, 刘志刚¹, 刘晓宇^{1*}

(1. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060;

2. 南昌大学医学院免疫学教研室, 江西 南昌 330006)

摘要: 为克隆原核表达并纯化出粉尘螨过敏原脂肪酶蛋白, 鉴定其免疫学活性, 并分析其分子特征. 通过重组成粉尘螨新过敏原脂肪酶基因, 与 pET-28a 载体连接后转化大肠埃希菌 *E. coli* Top10, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达重组新过敏原脂肪酶蛋白; 经镍柱亲和层析纯化出粉尘螨重组脂肪酶蛋白, 用 Western Blot、ELISA 方法检测其免疫原性. 用生物信息学软件预测其理化性质、二级结构, 并构建分子进化树. 成功表达纯化出高纯度的粉尘螨重组脂肪酶蛋白, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果显示表达重组产物分子质量约为 40 kDa, 与理论值一致. 纯化后的表达产物经 Western blot 印迹检测有明显条带显示. 信息学分析显示蛋白二级结构由 α 螺旋 (16.38%)、延伸主链 (18.93%)、无规则卷曲 (64.69%) 组成. 成功原核表达出粉尘螨过敏原脂肪酶蛋白, 并纯化获得较高纯度及较强免疫学活性的重组脂肪酶蛋白, 为尘螨过敏性疾病的特异性诊断和免疫治疗奠定理论基础.

关键词: 粉尘螨; 过敏原; 重组脂肪酶; 生物信息学分析

中图分类号: R 392.11 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.01.19

0 引言

近年来, 过敏性疾病诸如过敏性鼻炎、哮喘等发病率逐年升高, 成为全球关注的公众卫生学问题. 其中尘螨是室内主要的过敏原, 过敏体质者吸入其排泄物与死亡残体后可诱发 I 型变态反应^[1-2], 尘螨过敏原是过敏性哮喘的主要诱因, 虽然各个国家之间有地域差异, 但是在北美、南美、欧洲、东南亚和澳大利亚的人口密集地有 85% 的哮喘患者对尘螨过敏^[3]. 现阶段对尘螨过敏性疾病的治疗主要是采用尘螨粗体液进行脱敏治疗, 虽然尘螨粗体液治疗有一定效果, 但是其成分比较复杂^[4], 而不同过敏患者对尘螨各组分过敏原的敏感性不一样, 粗体液的脱敏治疗难以实现标准化. 因此, 对尘螨各组分过敏原的分离、纯化及鉴定以实现特异性诊断与治疗的研究也越来越重要. 自从 Chapman 首次报道用凝胶过滤等方法分离出屋尘螨主要过敏原 Der p1 (屋尘螨 I 类过敏原) 以来, 人们已从尘螨中分离出至少

有 24 种过敏原^[5-6]. 本文在前期对粉尘螨基因组、转录组大规模测序和生物信息学分析的基础上, 发现粉尘螨脂肪酶是潜在的过敏原. 故本文对粉尘螨过敏原脂肪酶蛋白进行了克隆、表达及纯化, 通过 Western Blot、ELISA 检测其免疫活性, 并对其进行信息学分析.

1 材料与方法

1.1 材料

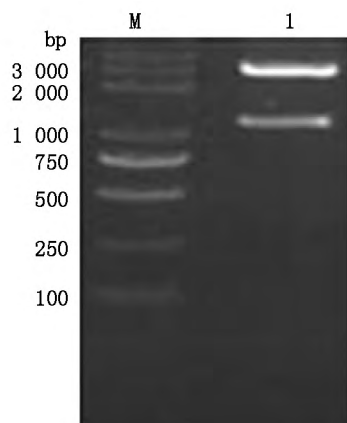
质粒载体 pET-28a、限制性内切酶 Eco R I 和 Bam H I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa), 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的链霉亲和素和生物素标记的鼠抗人 IgE 抗体均购自美国 Southern Biotech 公司, 大肠埃希菌 BL21 (DE3) 由深圳大学过敏反应与免疫学研究所提供, Ni-NAT matrix 柱购自美国 GE 公司, Amersham Pharmacia Biotech 公司, 超微量分光光度计 BioTek 购于广州云星科学仪器有限公司, 尘螨患者血清取

收稿日期: 2014-08-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31328014, 31400786), 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台项目 (2012gjhz0009), 深圳市科技计划国际科技合作项目 (GJHZ20130408174112021), 深圳市科技计划基础研究项目 (JCYJ20130329110735981, JCYJ20120613173233810) 和深圳市南山区研发项目 (KC2012JSYB0003A) 资助.

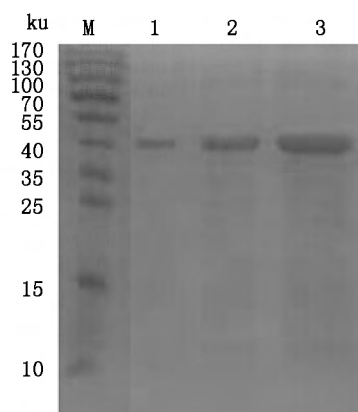
通信作者: 刘晓宇 (1986-), 男, 江西南昌人, 助教, 硕士, 主要从事过敏反应与免疫学基础研究.

理论分子质量相符(见图 3) 将纯化的过敏原重组蛋白收集,测蛋白浓度分装后于 -80°C 保存备用.



M: DNA 标准品; 1: 重组质粒 pET28a-粉尘螨脂肪酶的双酶切.

图 2 重组质粒 pET28a-粉尘螨脂肪酶的双酶切鉴定



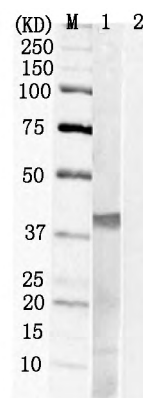
M: 蛋白分子质量标准; 1、2、3: 亲和层析后高纯度不同浓度的粉尘螨重组脂肪酶蛋白.

图 3 粉尘螨重组脂肪酶在大肠杆菌中的表达纯化

2.4 粉尘重组脂肪酶免疫原性的鉴定

2.4.1 Western Blot 将该重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,选用 20 例粉尘螨过敏患者阳性混合血清做一抗进行 Western Blot,最后 ECL 显色,结果显示(见图 4):在约 40 ku 处可见一条清晰的条带,而一抗用健康人血清的阴性对照组见无相应条带显示,说明该原核表达纯化的粉尘螨脂肪酶蛋白能够与粉尘螨过敏患者阳性血清中的特异性 IgE 结合,所获得的重组蛋白具有良好的免疫原性.

2.4.2 ELISA 以粉尘螨重组脂肪酶蛋白包被,于 4°C 封闭过夜,尘螨过敏患者血清做一抗,健康人血清做阴性对照,HRP 标记的 IgE 为二抗,TMB 显色, H_2SO_4 终止反应,在酶标仪上读取 OD_{450} . 结果显示(见图 5):粉尘螨过敏组血清的 OD 值约是健康人血清对照组的 6 倍,说明重组脂肪酶蛋白能够与粉尘螨过敏患者的血清中特异性的 IgE 结合,所获得的重组蛋白具有良好的免疫原性.



M: 蛋白分子质量标准; 1: 患者血清免疫条带; 2: 健康人血清条带.

图 4 重组脂肪酶蛋白的 Western Blot 检测

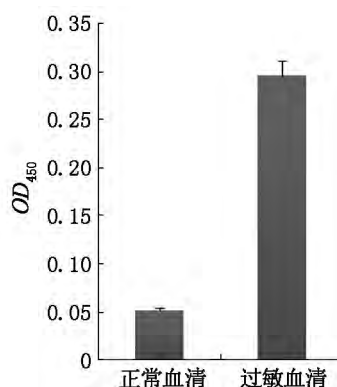


图 5 重组脂肪酶的 ELISA 检测

2.5 粉尘螨脂肪酶蛋白的信息学分析

2.5.1 粉尘螨脂肪酶蛋白的理化性质及二级结构预测 ProtParam 分析显示其分子量为 39 374.0 Da, 等电点为 6.12, 推导算出的不稳定系数(Instability index)为 36.99, 表明此蛋白性质稳定. 脂肪系数为 69.75, 其总平均亲水性(Grand average of hydropathicity)值为 -0.322 , 表明其为疏水性蛋白. TMHMM 在线分析重组蛋白的跨膜区, 结果显示粉尘螨脂肪酶无跨膜区, 蛋白全部在膜外. 将推导得到的氨基酸序列输入 HNN 分析, 提示其二级结构中 α 螺旋占 16.38%, β 延伸主链占 18.93%, 无规则卷曲占 64.69% (见图 6).

2.5.2 粉尘螨脂肪酶抗原表位预测 应用 ABCpred Prediction 对脂肪酶的抗原表位预测, 结果显示该蛋白存在多个潜在的抗原表位位点, 可能的蛋白质抗原表位区域有 36 ~ 51, 44 ~ 59, 81 ~ 96, 107 ~ 122, 131 ~ 146, 146 ~ 161, 189 ~ 204, 234 ~ 249, 257 ~ 272, 268 ~ 283, 279 ~ 291, 294 ~ 309, 305 ~ 320.

2.5.3 序列比对及分子进化树分析 将推导出的粉尘螨脂肪酶氨基酸序列输入 NCBI 网站进行 Blastp 比对分析, 筛选热带无爪螨 (*Blomia tropicalis*)、肩板硬蜱 (*Ixodes scapularis*)、捕食螨 (*Metaseiulus occidentalis*)、囊舌虫 (*Saccoglossus kowa-*

levskii)、人头虱(*Pediculus humanus corporis*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*)、山松甲虫(*Dendroctonus ponderosae*)、蚤状(*Daphnia pulex*)、山猪(*Sus scrofa*)等同源序列以 Fasta 格式输出后用

MEGA5.1 和 Clustalx1.83 软件构建分子进化树(见图 7) 结果显示粉尘螨与热带无爪螨(基因登录号 AAQ24554.1)、肩板硬蜱(基因登录号 XP_002414267.1)亲缘关系比较近。

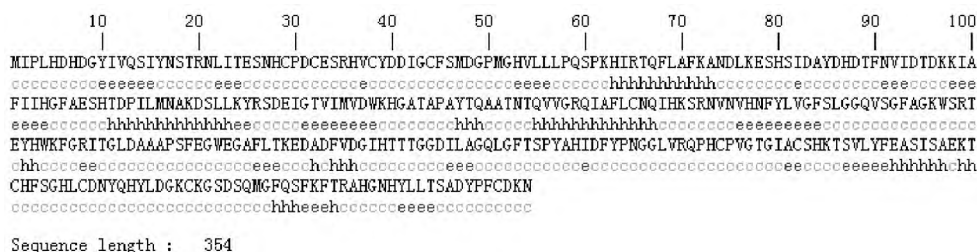


图 6 粉尘螨脂肪酶蛋白的二级结构预测

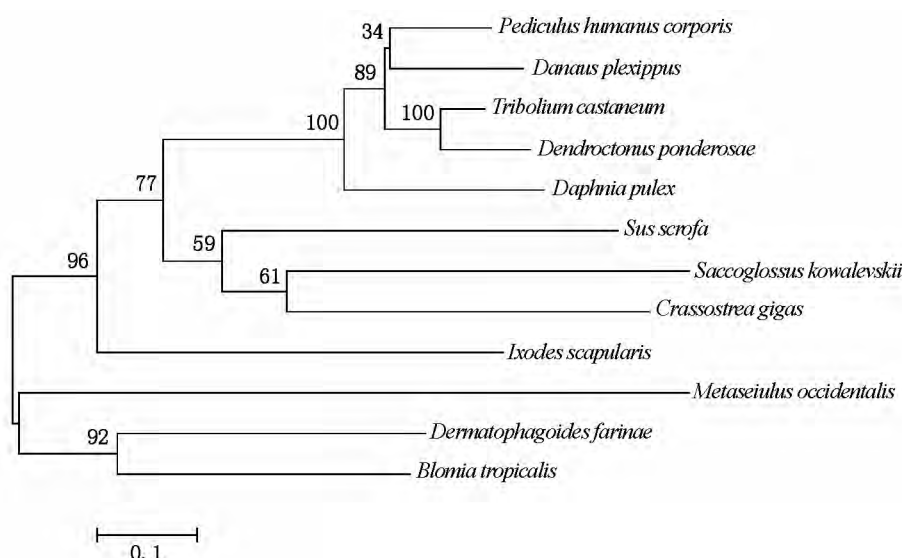


图 7 粉尘螨脂肪酶及其同源序列分子进化树

3 讨论

随着过敏性鼻炎、过敏性哮喘等过敏性疾病发病率的逐年升高,对尘螨、花粉、食物等过敏原的研究也越来越受到研究学者的重视。其中屋尘螨、粉尘螨是人类室内最重要的过敏原,Western Blot 结果显示粉尘螨过敏原的分子质量为 11 ~ 100 kDa^[7],在粉尘螨体内检测到的过敏原有 24 种^[8],其中 Der f1 和 Der f2 是最主要的过敏原。

脂肪酶在生物体内控制着消化、吸收、脂肪重建和脂蛋白代谢等过程;在工业上由猪胰腺提取的 α -淀粉酶、脂肪酶被广泛用来制作含蛋白酶的洗涤剂以提高其清洁能力,然而有研究报导脂肪酶也是一种过敏原,能引起在以脂肪酶为原料的制药业、食品工业、洗涤剂制造业的工人发生职业性哮喘^[9-10]。目前尚未有粉尘螨脂肪酶作为过敏原的相关报道。对于尘螨过敏,传统上采用尘螨粗提液对患者进行脱

敏治疗,但由于粗提液成分复杂,很容易引起副作用,因此需要特异性的尘螨过敏原用于标准化尘螨疫苗的免疫治疗^[11-13]。

本文在实验室对粉尘螨基因组和转录组测序和生物信息学分析的基础上,对粉尘螨脂肪酶的基因进行了克隆,并构建了高效原核表达载体,大量表达并纯化出纯度较高的粉尘螨脂肪酶蛋白。将尘螨过敏患者的血清作一抗分别进行 ELISA 和 Western-blot 其结果显示:重组的粉尘螨脂肪酶蛋白能和尘螨过敏患者血清中的 IgE 特异性结合,由此说明该重组粉尘螨脂肪酶具有良好的免疫原性。生物信息学分析表明,粉尘螨脂肪酶是一种等电点为 6.12、脂肪系数为 69.75、分子量是 40 kD 性质稳定的疏水性蛋白;在进化上,该蛋白与热带无爪螨、肩板硬蜱的脂肪酶蛋白亲缘关系比较近。本研究构建的原核高效表达载体,纯化出的粉尘螨脂肪酶蛋白具有良好的免疫原性,对重组尘螨过敏原诊断试剂和疫苗的研制奠定理论基础。

4 参考文献

- [1] 刘晓宇,张强,吉坤,等. 粉尘螨疫苗免疫治疗过敏性鼻炎小鼠鼻黏膜的电镜观摩 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2011 35(5): 532-535.
- [2] Masashi Suzuki, Yoshimasa Tanaka, Seigo Korematsu, et al. Crystal structure and some properties of a major house dust mite allergen, Derf 2 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2006 339(2): 679-686.
- [3] Wayne R Thomas, Belinda J Hales, Wendy-Anne Smith. House dust mite allergens in asthma and allergy [J]. Trends in Molecular Medicine 2010 16(7): 321-328.
- [4] Susanne Vrtala, Hans Huber, Wayne R Thomas. Recombinant house dust mite allergens [J]. Methods 2014 66(1): 67-74.
- [5] 刘晓宇,吉坤美,高波,等. 屋尘螨重组过敏原 Der p2 的表达、纯化及免疫学活性鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报 2009 25(8): 764-767.
- [6] 李钟鸣,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.
- [7] 李维中,王月明,吴莹莹,等. 粉尘螨第 16 类过敏原的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定 [J]. 南昌大学学报: 医学版 2013 53(12): 7-10.
- [8] Eric Weber Ph D, Shirley Hunter Ph D, Kim Stedman B S, et al. Identification, characterization and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs [J]. Jallergy Clin Immunol 2003 112(1): 79-86.
- [9] Seung Youp Shin, Gyu Young Hur, Young Min Ye, et al. A case of occupational rhinitis caused by porcine pancreatic extract developing into occupational asthma [J]. J Korean Med Sci 2008 23(2): 347-349.
- [10] Brant, Hole, Cannon, et al. Occupational asthma caused by cellulase and lipase in the detergent industry [J]. Occup Environ Med 2004 61: 793-795.
- [11] Yu Hui, Ling Li, Jun Qian, et al. Efficacy analysis of three-year subcutaneous SQ-standardized specific immunotherapy in house dust mite allergic children with asthma [J]. Experimental and Therapeutic Medicine 2014 7(3): 630-634.
- [12] Kyoung Yong Jeong, Jae-Hyun Lee, Eun-Jin Kim, et al. Current status of standardization of inhalant allergen extracts in Korea [J]. Allergy Asthma Immunol Res 2014; 6(3): 196-200.
- [13] Bozek A, Ignasiak B, Filipowska B, et al. House dust mite sublingual immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled study in elderly patients with allergic rhinitis [J]. Clinical & Experimental Allergy 2012 43(2): 242-248.

Prokaryotic Expression, Purification and Bioinformatics of Lipase, Arecombinant Allergen of Dust Mite

XING Peng¹, LIU Yulin², YU Haiqiong¹, LI Meng¹, LIU Zhigang, LIU Xiaoyu^{1*}

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

2. Immunology Department of Nanchang University Medical School, Nanchang Jiangxi 330006, China)

Abstract: To clone, express and purify of dust mite (lipase), test its immunogenicity and analysis of its structure and function. Synthesize the lipase gene of dust mite, link it to the pET-28a vector and the recombinant plasmid was transfected into *E. coli* Top10 and IPTG induces the expression of lipase protein. The protein was purified by nickel-affinity chromatography and its immunological identification was analyzed by Western blot and ELISA. Bioinformatics software were used to predict physicochemical properties, secondary structure and to construct its molecular phylogenetic tree. High purify recombinant lipase protein of dust mite was successful expressed purified. SDS-PAGE results showed that the expression of recombinant allergen was about 40 kDa. After chromatography, the recombinant allergen could band with the serum IgE from patients with asthma in Western Blot. Its secondary structure contained an alpha helix (16.38%), extended strand (18.93%) and random coil (64.69%). The success of prokaryotic expression and of dust mite allergen (lipase) and purified with high purity and strong immunological activity of the recombinant lipase protein. It can lay the foundation for the special diagnosis of allergic diseases.

Key words: dust mites; allergen; recombination lipase; bioinformatics analysis

(责任编辑: 刘显亮)