

文章编号: 1000-5862(2015)02-0166-05

粉尘螨 Der f14 基因克隆与分子特征的分析

万 倩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, 广东 深圳 518060;)

摘要: 从纯培养的粉尘螨中, 根据本课题组前期合成的尘螨基因序列, 将扩增的 Der f14 分别克隆到 pUC57 载体中, 经扩增后用 SmaI 双酶切将目的片段连接到 pET-28a 表达载体上得到重组质粒 pET28a-Der f14。在线软件 ExPaSy、NCBI 网站对测序结果进行分析。分析结果表明: 获得的 Der f14 cDNA 全长为 5 013 bp, 编码蛋白由 1 666 个氨基酸组成。粉尘螨 Der f14 与屋尘螨序列比对同源性达 95%, 信号肽序列存在 1~18 个氨基酸, 二级结构是由 α 螺旋(35.83%)、延伸链(17.17%)、无规则区(47%) 组成。目的蛋白是一种卵黄蛋白原。

关键词: 粉尘螨 Derf14; 克隆; 生物信息学; 进化树

中图分类号: R 384.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.02.11

0 引言

变态反应性疾病一般分为 4 型, 其中最常见的是 I 型即速发型变态反应也就是通常所说的过敏性疾病^[1], Voorhorst 等^[2] 早在 1964 年就发现尘螨及其代谢物是室内主要的过敏原, 可引起多种过敏性疾病。粉尘螨在家居灰尘中普遍存在, 是变态反应学研究最重要的变应原之一。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^[3-5]。Der f14 是比较重要的一组尘螨过敏原。该组组分由 A. Fujikawa^[6] 首先从粉尘螨的 cDNA 文库中筛选出。M. J. Epton^[7] 等报道该过敏原抗原性很强, 其降解产物致敏性更强。另外, 不同地区变应原的种类有其自身的基因多态性, 不同地区同一种变应原可能存在一定差异, 国内关于 Der f14 鲜有报道。本文通过克隆其尘螨变应原 Der f14 的 cDNA 序列, 对于进一步的重组变应原、了解国内外变应原的差别有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 样品与主要试剂

从深圳大学校园里收集大量粉尘螨进行人工纯

培养。OMEGA 质粒提取试剂盒购自北京鸿跃创新科技有限公司, 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, PCR 仪(MJ Research PTC-100) 购自美国 MJ 公司。

原核表达载体 pET-28a 购自 Novagen 公司, 大肠埃希菌(*E. coli*) BL₂₁ 为本研究室保存。pUC57 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 聚合酶等购自 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒购自华科公司。

1.2 方法

1.2.1 粉尘螨总 RNA 的提取 由本课题组前期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下: 上游引物 5'-CCCCGGTACTCTAACAAGCGAGAAAACA-3'; 下游引物 5'-CCCCGGTCAGTTGTCTTCGACGATGAAA-3'。在引物上、下游添加 SmaI 酶切位点(下划线处), 挑取干净的活粉尘螨约 500 只, 经液氮浸泡研磨后, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 操作按试剂说明书进行。

1.2.2 Der f14 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

收稿日期: 2014-09-10

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项目(2012gjh0009), 深圳市国际科技合作(GJHZ20130408174112021) 和深圳市科技计划基础研究重点(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, 主要从事免疫学和生化与分子生物学研究。

Taq 0.25 μL ; dNTP Mixture 4 μL ; 上下游引物各 2 μL , cDNA 为模板 1 μL ; 加去离子水至 50 μL . PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 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 将扩增的产物回收纯化与 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 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜从 LB 平板上挑选白色菌落放入含氨苄霉素(加 Amp) 的 LB 培养液中扩大培养, 碱裂解法提取质粒再用 SmaI 双酶切鉴定 pUC57-Der f14 重组子. 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 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h 进行连接转化至 *E. coli* BL₂₁, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取单个菌落提取质粒后双酶切鉴定阳性克隆.

1.3 生物信息学分析

将原始测序结果 5' 和 3' 端的酶切位点去除后, 与参考序列比对, 用 NCBI 网站在线软件分析其 ORF, 用 Translate Tool 推导其氨基酸序列, 用 ProtParam Tools 预测其理化性质, ProtScale 预测其亲水性, 用 Signal P3.0 分析其信号肽序列, 用 GOR 软件预测其二级结构, InterProScan 进行结构域分析. 用 SMART 软件对结构域的分析. 用 MEGA5 工具包来构建系统进化树.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

Der f14 片段经琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在大约 5 000 bp 处出现特异性的条带, 其大小与 Der f14 基因的预期理论值参考序列大小一致(见图 1).

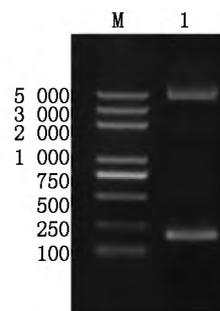
2.2 重组载体的双酶切和测序鉴定

重组的克隆载体和表达载体经 SmaI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分析表明, 预期位置出现了特异性条带, 结果表明: 插入的 Der f14 基因片段大小约为 5 013 bp, 同预期理论大小相同(见图 2 和图 3).

2.3 Der f14 氨基酸序列生物信息学分析

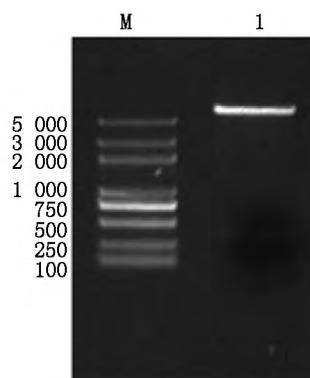
用 ProtParam Tools 软件分析粉尘螨 Der f14 其氨基酸数量为 1 666, 其分子量是 191 420.9, 等电点 Ph 为 7.87, 其分子式是 $\text{C}_{8\,440}\text{H}_{13\,429}\text{N}_{2\,353}\text{O}_{2\,580}\text{S}_{71}$, 原子总数为 27 873. 估计其蛋白质半衰期在哺乳动物网织红细胞体外是 30 h, 酵母菌体外 >20 h, 大肠

杆菌体外 >10 h. 不稳定指数是 38, 证明此蛋白质是稳定的. 脂溶指数为 78.88.



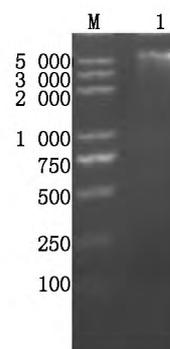
泳道 M: DNA 分子量标准(DL 2 000); 泳道 1: Der f 14 基因 PCR 产物.

图 1 Der f 14 电泳产物图



泳道 M: DNA 标志物; 泳道 1: pUC57-Der f14 质粒经 SmaI 双酶切.

图 2 pUC57-Der f 14 质粒的 SmaI 双酶切电泳图



泳道 M: DNA 标志物; 泳道 1: pET28a-Der f14 质粒经 SmaI 双酶切.

图 3 pET28a-Der f14 质粒的 SmaI 双酶切鉴定

用 ProtScale 软件预测其亲水性氨基酸亲水性指数(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.648, 说明是亲水性物质. 用 Signal IP 软件分析其信号肽序列(见图 4), 图 4 表明信号肽序列存在 1~18 个氨基酸, 其氨基酸序列的切割位点在 18~19, 成熟蛋白启动位置是在 19. 其去除信号肽, 其编码蛋白活性成分由 1 648 个残基组成. 用 Ki-

nasePhos 软件预测此氨基酸有 107 个丝氨酸激酶、磷酸化位点. 82 个苏氨酸激酶、70 个酪氨酸激酶、1 组氨酸激酶

MRLFALLFTA... (A long sequence of amino acid single-letter codes, including M, R, L, F, A, L, L, F, T, A, C, L, L, G, L, G, Q, A, Q, H, C, T, V, A, C, P, N, S, I, P, Q, L, I, N, P, K, A, Q, S, T, Y, V, Y, T, L, D, A, K, T, V, L, T, P, R, D, S, Q, K, V, T, I, K, A, D, E, A, V, I, A, I, V, etc.)

图 4 粉尘螨过敏原 Derf 14 推导的氨基酸序列

用 SMART 软件分析出脂蛋白 N-端区域的序列是在 36 ~ 563 个氨基酸位置. 转化生长因子 β 家族序列在 11 ~ 74 个氨基酸位置. 生物羧化酶 C 端区域 42 ~ 113 个氨基酸位置. 拓扑异构酶 II 在 128 ~ 559 个氨基酸位置. 亮氨酸核糖核酸酶抑制区域在 179 ~ 204 个位置. 与锌指关联区域在 214 ~ 361 个氨基酸位置. 用 InterProScan 软件分析氨基酸序列的功能位点分析其第 37 ~ 236、265 ~ 537 个氨基酸具有卵黄蛋白原作用. 用 GOR 软件预测其氨基酸序列的二级结构由 α 螺旋(35. 83%)、延伸链(17. 17%)、无规则区(47% β 转角 0%) 组成.

2.4 序列的同源性分析

将测序所得序列通过 NCBI 中的 BLAST 进行序列比对, 将所得克隆推导出的氨基酸序列与已知基因的氨基酸序列进行比对, 分析其序列同源性. 结果

显示粉尘螨 Der f14 与梅氏嗜霉螨序列比对同源性达 95% 与屋尘螨同源性达 95% 结果见图 5.

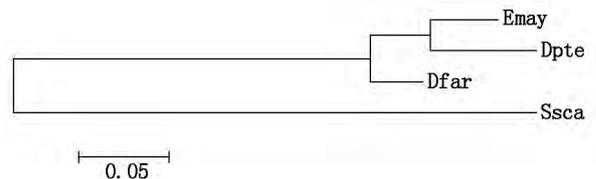


图 5 尘螨变原 Der f14 与报道的不同物种的分子进化树

3 结论

尘螨引起的过敏反应是人类最常见的变态反应, 但是目前没有理想的治疗方法. 临床上主要用尘螨粗浸液法体内体外诊断及其特异性免疫治疗, 但因尘螨粗浸液成分复杂, 治疗过程中极易受到有毒

物质和病原微生物的污染^[5],会产生副作用如不可逆的气道痉挛、过敏反应。同时尘螨变应原粗提浸液中含有多种成分,是免疫治疗必需的佐剂成分^[7]。因此,进一步探讨变应原各组分的分子生物学、免疫学特性,研制既安全又高效的新型变应原疫苗具有重要意义。

粉尘螨是人类常见的吸入性致敏原。本实验研究的 Der f14 是重要的尘螨过敏原,该组组分由 A. Fujikawa 首先从粉尘螨的 cDNA 文库中筛选出,验证该蛋白质分子质量为 177 kDa,又叫 M-177 蛋白或 Mag3 蛋白,本实验克隆出的蛋白与 Mag3 蛋白序列对比同源性达 99%。存在于粉尘螨提取液中,定位于尘螨胃肠道、食管周围组织及其它他内脏器官,虽然其致敏的强度比 Der f2 低,但在哮喘患者的致敏过程中发挥作用。进一步研究发现该过敏原对蛋白酶敏感,仅在新鲜的粉尘螨提取液中存在,降解后的产物致敏性更强。此类蛋白质疏水亲脂,主要存在于血液和淋巴的脂质转运颗粒中,很难溶解于水相提取液,所以提示脂质可增强此类过敏原免疫原性。它们也能诱导较高 IgE 反应性。因此,Der f14 与 Der p14 是一组非常重要的过敏原,本实验通过合成的基因进行了克隆载体 SmaI 双酶切鉴定,证实已克隆到了正确的目的基因片段,为未来的蛋白表达和免疫测定奠定了基础,有待进一步深入研究。

随着基因芯片、基因组和蛋白质芯片技术迅猛发展,生物信息学分析已成为变态反应学研究的重要手段。尤其是用于表位研究和变应原结构研究^[8-12]。生物信息学通过基因序列可预测其相应蛋白质的结构和功能。本研究通过对 Der f14 测序结果的生物信息学分析到 Der f14 的 cDNA 有 5 013 bp,编码 1 666 个氨基酸,其中包含一个 18 氨基酸残基的信号肽,1~18 个氨基酸为其信号肽区域,PI 为 7.87。进一步分析显示其二级结构包括 α -螺旋 35.83%、延伸主链 17.17% 和无规卷曲 47%。 α -螺旋是指氨基酸链形成螺旋状 4 个氨基酸螺旋成 1 周,在 Der f14 二级结构占有绝对优势,与 IgE 抗体结合反应中发挥重要作用,因此有必要开展针对其二级结构的后续研究^[10]。

螨虫属于节肢动物门蛛形纲蜱螨亚纲的一类体型微小的动物,从屋尘中检出的螨类多达 100 种以上,隶属于前气门亚目、无气门亚目、隐气门亚目和中气门亚目。常见种类有屋尘螨、热带无爪螨、粉尘螨^[13-14]。本研究显示屋尘螨和粉尘螨相比,屋尘螨与梅氏嗜霉螨进化比较近。这 3 种物种与疥螨进化得比较远。通过对尘螨基因的分析,揭示了该家族成员的结构功能位点的保守性,虽然还没能找到与螨类中相关基因的一一对应关系,但从中可以找出相

关线索,相信对螨类基因功能结构的进一步了解,可为螨类起源与进化提供新的视点,并将有助于蜱螨亚纲相关同源基因的研究。

4 参考文献

- [1] 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): 889-892.
- [2] Voorhorst, Spijksma. Is a mite (dermatophagoides sp) the producer of the house-dust allergen? [J] Allerg Asthma (Leipzig), 1964, 10: 329-334.
- [3] 刘志刚,刘瑞涛,赖彻,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.
- [4] 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.
- [5] 李忠鸣,邱玉兰,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.
- [6] Fujikawa A, Uchida K. Altered antigenicity of M-177, a 177-kDa allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*, in stored extract [J]. Clin Exp Allergy, 1998; 28(12): 1549-1558.
- [7] Epton M J, Dilworth R J. High-molecular-weight allergens of the house dust mite: an apolipoprotein-like cDNA has sequence identity with the major M-177 allergen and the IgE-binding peptide fragments Mag1 and Mag3 [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 120(3): 185-191.
- [8] 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.
- [9] Brusic V, Petrovsky N. Bioinformatics for characterisation of allergens allergenicity and allergic crossreactivity [J]. Trends Immunol, 2003, 24(5): 225-228.
- [10] 周鹰,孙金霞. 粉尘螨变应原第 10 组分基因克隆表达及生物信息学分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(10): 877-881.
- [11] Brusic V, Petrovsky N, Gendei S M, et al. Computational tools for the study of allergens [J]. Allergy, 2003, 58(11): 1083-1092.
- [12] Song Juanjuan, Li Li, Liu Zhigang, et al. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding tropomyosin in *Sinonovacula constricta* [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(2): 315-321.
- [13] Thomas W R, Smith W A, Hales B J. The allergenic specificities of the house dust mite [J]. Chang Gung Med J, 2004, 27(8): 563-569.
- [14] Alian L G, Morgan M S. Biology, ecology and prevalence of dust mite [J]. Immunol Allergy Clin N Am, 2003, 23: 443-468.

The Cloning and Bioinformatics Analysis of Der f14 Gene from the *Dermatophagoide Farinae*

WAN Qian¹ ,ZHONG Zhengrong¹ ,LIU Zhigang^{2*}

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

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

Abstract: Genes sequence which have been synthesized from the pure culture of dust mites according to the earlier stage of our research group. The Der f14 gene fragment was amplified and cloned into pUC57 vector ,and then sub-cloned into the expression vector pET with restriction enzyme. The recombinant plasmid pET28a-Der f14 was constructed. Then the sequencing result was analyzed by software in ExPaSy ,and NCBI web. Results show that the opening reading frame(ORF) of Der f14 was obtained and was 5013 bp in full length. The protein encoded by this sequence was deduced to be consisted with 1 666 amino acids. Similarity of the amino acid sequence of the group 14 allergens were 95% between *dermatophagoides farinae* and *dermatophagoides pteronyssinu*. one signal peptide from 1 to 18 position. The secondary structure was composed of alpha helix(35. 83%) extended strand(17. 17%) and random coil(47%) . The gene of target protein encode a kind of vitellogenin.

Key words: *dermatophagoides farinae*; der f14; bioinformatics; clone; evolution tree

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 144 页)

The Statistical Specification of the Q - Matrix ——an Integration of EFA and Q - Matrix Validation Method

WANG Wenyi¹ ,SONG Lihong² ,DING Shuliang¹

(1. College of Computer Information Engineering ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China;

2. Elementary Educational College ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330027 ,China)

Abstract: The vast majority of the existing statistical methods to specify the Q -matrix do rely on the draft Q -matrix constructed by the subject matter experts or the researches. Based on previous related research ,the authors consider the estimation problem of the Q -matrix under the condition of without having the draft Q -matrix. In particular ,they introduce a Q -matrix identification approach which integrates exploratory factor analysis (EFA) with Q -matrix validation method. The results of a simulation study show that the initial Q -matrix can be correctly explored with high recovery rate using the EFA and the validation methods.

Key words: the Q -matrix; exploratory method; confirmatory method; model fit index; classification accuracy index

(责任编辑: 冉小晓)