

花生过敏原 iso-Ara h 3 的克隆、表达和免疫学鉴定

钟海峰^{1,2}, 马三梅¹, 王永飞¹, 邹泽红², 陶爱林^{2,*}

¹暨南大学生物工程学系, 广州 510632; ²广州医学院第二附属医院过敏反应实验室, 广州 510260

摘要: 采用 Touchdown PCR 技术从花生 cDNA 中克隆到花生的过敏原 iso-Ara h 3 基因, 并进行重组蛋白表达, 再用 Western blot 技术鉴定重组蛋白过敏原性。结果显示, 构建的 pET44a-iso-Ara h 3 重组菌能表达 iso-Ara h 3 蛋白。用 8 例花生过敏的阳性血清鉴定表明, 重组的 iso-Ara h 3 蛋白血清 IgE 识别率为 12.5%, 是一种低过敏原性的过敏原蛋白。

关键词: 花生; 过敏原; 基因克隆; iso-Ara h 3 基因; 过敏原性

Cloning, Expression and Immunological Characterization of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Allergen Gene iso-Ara h 3

ZHONG Hai-Feng^{1,2}, MA San-Mei¹, WANG Yong-Fei¹, ZOU Ze-Hong², TAO Ai-Lin^{2,*}

¹Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²The Allergy Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

Abstract: The peanut (*Arachis hypogaea*) allergen gene iso-Ara h 3 was cloned from the peanut cDNA by using Touchdown PCR. The recombinant iso-Ara h 3 protein was expressed in prokaryotic expression vector. And then the antigenicity of recombinant iso-Ara h 3 proteins was identified by Western blot. The result showed that the recombinant plasmid pET44a-iso-Ara h 3 was efficient and the recombinant iso-Ara h 3 was recognized by 12.5% of peanut allergic patients. It was concluded that the iso-Ara h 3 allergen exhibited lower allergenicity than other peanut allergens.

Key words: peanut (*Arachis hypogaea*); allergen; gene cloning; iso-Ara h 3 gene; allergenicity

花生是一种营养丰富的蛋白质资源,也是世界粮农组织(FAO)报道的八大类食物过敏原之一(Warner 1999; Poms 等 2004)。众多的研究表明,花生过敏对人有生命危险性(Gowland 2001; Al-Muhsen 等 2003)、低剂量致敏性和持久性(Marshall 2001; Poms 等 2004)等特点。迄今已发现的花生过敏原蛋白中, Ara h 1 和 Ara h 2 是最主要的过敏原,能被 90% 的患者血清 IgE 识别(Viquez 等 2003; van Wijk 等 2004)。Ara h 3 也是一种主要的花生过敏原,能被 45%~54% 的患者血清 IgE 识别(Rabjohn 等 1999; Viquez 等 2004)。重组 Ara h 3 蛋白具有 4 个线性 IgE 结合表位,改变表位上的特殊氨基酸能显著降低 IgE 的结合(Rabjohn 等 1999)。iso-Ara h 3 是近年发现的 Ara h 3 的一个亚型,它与 Ara h 3 在核苷酸水平上约有 73% 的序列同源性,而在氨基酸水平上的同源性约为 67%。iso-Ara h 3 比 Ara h 3 有更低的过敏原性(Kang 和 Gallo 2007)。本文采用 Touchdown PCR 技术从花生 cDNA 中克隆花生过敏原 iso-Ara h 3 的编码基因,获得 2 个克隆,分别命名为 PN32-8 和 PN32-20,

并构建表达载体进行原核表达获得 iso-Ara h 3 重组蛋白,同时用 8 例花生过敏阳性血清对重组 iso-Ara h 3 进行免疫学鉴定。

材料与方法

花生(*Arachis hypogaea* L.)品种‘粤油 14 号’由广东省农科院作物研究所周桂元先生惠赠。病人血清来自广州医学院第二附属医院过敏反应科,本研究全部试验在广州医学院第二附属医院过敏反应实验室完成。

大肠杆菌 JM109 及 Rosetta gami 2、T4 DNA 连接酶及 pGEM-T 载体系统购自 Promega 公司。表达载体 pET44a 购自 Novagen 公司。

根据 GenBank 公布的 iso-Ara h 3 (登录号为 DQ855115)序列,利用 Omega 软件自行设计 PCR 引

收稿 2009-05-31 修定 2009-09-11

资助 国家自然科学基金(30771240)和广东省科技计划(2005B33801002)。

* 通讯作者(E-mail: AerobiologiaTao@163.com; Tel: 020-34153520)。

物,并由上海博尚生物技术有限公司合成,用于基因克隆和表达载体构建。引物序列如下:PF, 5' TAGGATCCATGGCCAAGCTTCTTGC 3' (下划线标示 *Bam*HI 酶切位点); PR, 5' AACTGCAGTTAT-TAAGCCACCTCCCTCATAG 3' (下划线标示 *Pst*I 酶切位点)。

RNA提取试剂盒及PCR产物回收纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; PCR 试剂盒、Taq 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTPs、RNase 抑制剂、IPTG、X-gal及DL2000 DNA Marker等购自上海生工生物工程技术有限公司; 琼脂糖、蛋白胨、酵母以及 SYBR Green 荧光染料等购自基因公司。

RNA提取采用RNeasy Mini Kit试剂盒离心柱(QIAGEN),按照说明书指导进行。cDNA 第一链的合成采用Protoscript试剂盒(New England Biolabs)按照说明书指导合成。具体操作按照报道的程序进行(陶爱林和何韶衡 2004; Tao 和 He 2005)。

PCR 采用 25 μ L 反应体系,所得到的 cDNA 母液稀释 50 倍后取 5 μ L 作为模版, 2.5 μ L 10× 缓冲液(成分为: 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 为 8.3 的 Tris-HCl、500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2), 2 μ L dNTPs (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)混合物, 上、下游引物各 1 μ L, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶, 13.3 μ L 灭菌双蒸水。混匀后于 iCycler 582BR 型 PCR 扩增仪(BIO-RAD)上进行扩增。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 70.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 10 s, 从 70.5~68.5 $^{\circ}\text{C}$, 每降 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 循环 1 次, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 沉浸。每 20 μ L 的 PCR 产物加 1 μ L SYBR Green 荧光染料混匀后,在 1.5% 琼脂糖凝胶上以 5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 恒压电泳 1 h。电泳结束后于凝胶成像系统上进行凝胶成像及条带分析。

PCR 结束后,按 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒(QIAGEN)要求切胶回收目的片段条带。回收的目的片段与 Promega 公司 pGEM-Teasy 载体按指定的实验方法连接 16 h,之后转化大肠杆菌 JM109。

经蓝白斑及菌落 PCR 筛选 TA 克隆阳性转化子,挑选出阳性菌落分别命名为 PN32-8 和 PN32-20,送上海博尚生物技术有限公司进行测序分析,并利用序列相似性分析软件 Clustal X (1.83)对序列进行多重比对分析。

构建 pET44a-*iso-Ara h 3* 表达载体时,挑取阳

性克隆菌落提取质粒,进行 *Bam*HI 和 *Pst*I 双酶切,经 1.5% 琼脂糖电泳后,回收带有酶切位点的目的片段,与 pET44a 载体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接 16 h 后转化大肠杆菌 Rosetta gami 2,并用菌落 PCR 与 *Bam*HI、*Pst*I 双酶切鉴定表达载体构建成功与否。经菌落 PCR 与双酶切鉴定后,挑取阳性克隆诱导表达 *iso-Ara h 3* 外源基因。

诱导表达 *iso-Ara h 3* 外源基因时,取经证实的阳性表达克隆接种于含 0.4% 葡萄糖、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亮氨酸、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 3.0~3.5 h (OD_{600} 为 0.5~0.7),加入 IPTG 进行诱导表达, IPTG 的终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,以研讨最佳的诱导表达条件。37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 4 h 后收获菌液。同时设立未经诱导的空白对照,用 SDS-PAGE 筛选能够表达外源基因的单克隆菌落。

表达蛋白重组菌裂解后进行 SDS-PAGE 电泳,用半干转膜法把 PAGE 胶中的蛋白转移到甲醇活化的 PVDF 膜上。转膜结束后,用 PBST (PBS 含 0.02% Tween-20)洗膜 2 次,每次 5 min,然后将膜置于 5% 脱脂奶粉中于室温下封闭 2 h, PBST 洗膜 2 次,每次 5 min; 花生过敏阳性血清作为一抗用 PBST 稀释后在室温下孵育膜 2 h, PBST 洗膜 3 次,每次 5 min; 加入经 PBST 稀释(1:1 000)的过氧化物酶标记的抗人 IgE 抗体,室温下孵育 1.5 h,再分别用 PBST 与 TBS 各洗膜 2 次,每次 5 min; 最后将膜置于含 H_2O_2 的 DAB (3,3'-二氨基联苯胺)溶液中显色,双蒸水洗涤终止显色,结果拍照保存。

实验结果

1 花生 RNA 的提取和 *iso-Ara h 3* 基因的获得

提取花生的 RNA 后,取 10 μ L 产物进行 0.8% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳。从电泳结果中可以看到, 28S 和 18S 两条主带明显以及 28S rRNA 条带的亮度是 18S rRNA 的 2 倍,说明 RNA 样品比较完整,没有发生明显的降解,可用于后续的实验(图 1-a)。取 RNA 经逆转录获得 cDNA 后用作模板,经 Touchdown PCR 扩增后,取 20 μ L 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,在 1 500 bp 左右出现清晰的亮带(图 1-b),后续的实验鉴定证实为目的基因。

2 菌落阳性 TA 克隆的 PCR 筛选

将 PCR 产物电泳回收后经 TA 克隆,蓝白斑筛

选后挑取白色菌落, 进行菌落 PCR, 所得产物经琼脂糖凝胶电泳显示于 1 500 bp 左右出现亮带(图 2), 初步证实目标片段已经插入 TA 载体。

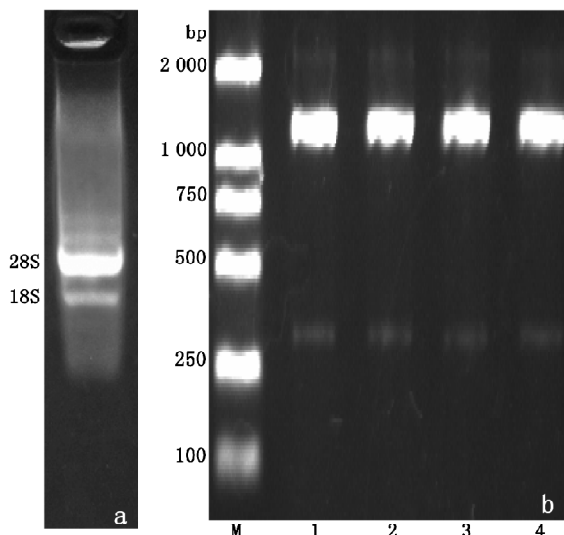


图 1 目的基因的克隆

Fig.1 The target gene cloning

a: RNA 提取; b: *iso-Ara h 3* 编码基因扩增。M: DL2000 DNA marker; 1~4: 扩增的目的片段。

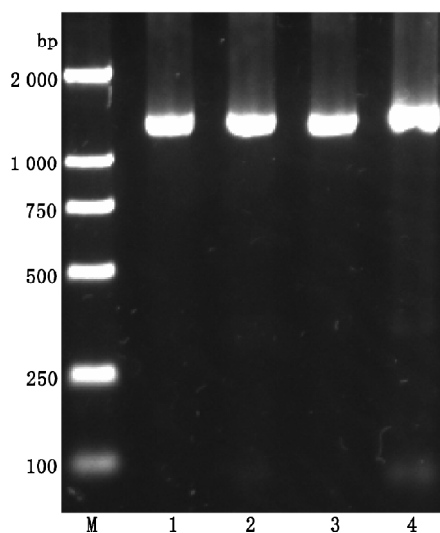


图 2 *iso-Ara h 3* TA 克隆的菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Colony PCR screening of positive clones of pGEM-T-*iso-Ara h 3*

M: DL2000 DNA marker; 1~4: 阳性菌落扩增条带。

3 序列测定与分析

选取菌落中 PCR 分析后的阳性克隆送测序公司测序, 并将所得两组克隆序列结果 PN32-8 和

PN32-20 与 GenBank 数据库中 *iso-Ara h 3* 序列(登录号为 DQ855115)进行比对, 结果(图 3)表明, PN32-8 突变碱基导致第 253 位的苯丙氨酸变成亮氨酸; 而 PN32-20 突变碱基导致第 48 位的丝氨酸变成脯氨酸, 第 253 位的苯丙氨酸变成亮氨酸。

4 表达载体构建后的鉴定

构建好的 pET44a-*iso-Ara h 3* 表达载体用 *Bam*HI、*Pst*I 进行双酶切反应, 同时挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定。从图 4-a 中可以看出, 与未酶切质粒相比, 双酶切后电泳均有 2 条带, 分别为目的条带和载体条带; 而质粒水平 PCR 也能扩增出约 1500 bp 的目的片段。这表明, 表达载体构建成功, 可以转化表达宿主菌进行蛋白表达。

5 *iso-Ara h 3* 外源基因的诱导表达

如图 5 所示, *iso-Ara h 3* 在 Rosetta gami 2 中得到诱导表达。与未诱导相比, 除 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的条带稍弱以外, 其余浓度 IPTG 诱导均有较好的目的条带(如箭头所示), 且诱导的条带并无明显差异。

6 *iso-Ara h 3* 蛋白表达的免疫学鉴定分析

用 8 例确诊的花生过敏阳性血清对重组获得的 *iso-Ara h 3* 蛋白进行免疫学鉴定, 结果(图 6)显示, 8 例血清中, 只有第 3 例能与重组 *iso-Ara h 3* 蛋白发生特异性 IgE 结合反应(箭头指示的结合条带位置), 结合率为 12.5%。

讨 论

Ara h 3 是花生中的一种主要过敏原, 并已得到广泛研究。早期从花生中分离鉴定的 *Ara h 3* 蛋白的分子量约为 14 kDa (Eigenmann 等 1996; Burks 等 1998); 而经 SDS-PAGE 分离及 N 端测序, 发现 *Ara h 3* 是一个具有 IgE 结合特性、分子量约为 60 kDa 的蛋白(Rabjohn 等 1999)。 *iso-Ara h 3* 是近年来新发现的花生过敏原, 属于 11S 球蛋白家族, 与该家族中的不同物种来源的过敏原有较高的序列同源性。它与 *Ara h 3* 相比, 无论是在基因水平上还是在氨基酸水平上二者均有很高的同源性。但是, *iso-Ara h 3* 缺少 *Ara h 3* 中的第 4 个 IgE 结合表位, 因此, 其过敏原性比 *Ara h 3* 低(Kang 和 Gallo 2007)。Kang 和 Gallo (2007)报道的 *iso-Ara h 3* 由 510 个氨基酸残基构成, 而从 GenBank 数据库中检索到的序列则由 512 个氨基酸残基组成。比较后发现, Kang

	1	48	80
DQ855115	MAKLALSILCFVLVLGASSVTRQGGEEENCQFQRLNAQRPNDRIEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTLRRNAL		
PN32-8	*****S*****		
PN32-20	*****P*****		
	81		160
DQ855115	RRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIFPGCPSTYEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQDSHQKVHRFDEGLIAV		
PN32-8	*****		
PN32-20	*****		
	161		240
DQ855115	PTGVAFWMYNDEDTDVVTLSDTSSIHNQLDQFPRFYLGNQEQEFLRYQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI		
PN32-8	*****		
PN32-20	*****		
	241	253	320
DQ855115	FSGFAQEFLOHAFQVDRQTVENLRGENEREQGAIVTKGGLRILSPDEEDESRSPPSRREEFDEDRSPQQRGKYDEN		
PN32-8	*****_*****		
PN32-20	*****_******		
	321		400
DQ855115	RRGYKNGIETICSASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSVNELDLPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTIVVA		
PN32-8	*****		
PN32-20	*****		
	401		480
DQ855115	LNGRAHVQVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENIEYLAFKTDSPSIANLAGENSIIDNLPEEVVANSY		
PN32-8	*****		
PN32-20	*****		
	481	512	
DQ855115	RLPREQARQLKNNPFKFFVPPFDHQMREVA		
PN32-8	*****		
PN32-20	*****		

图3 PN32-8 和 PN32-20 与 DQ855115 的氨基酸序列比对
 Fig.3 Amino acid sequence alignment of PN32-8, PN32-20 and DQ855115
 *表示相同序列。

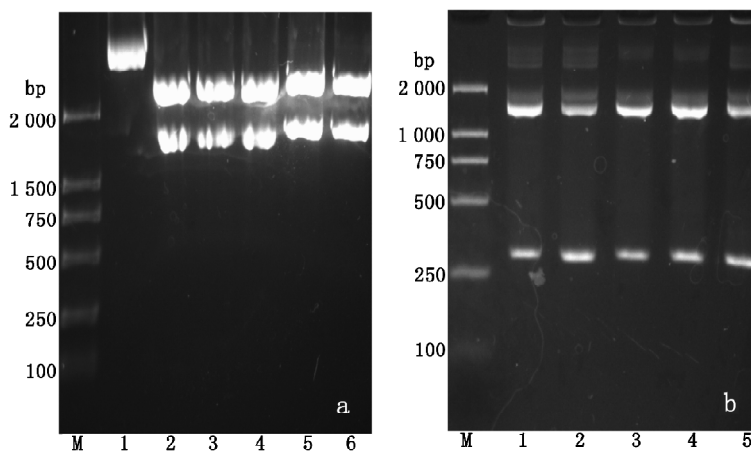


图4 表达载体的构建和鉴定

Fig.4 Confirmation of the protein expression construct

a: pET44a-iso-Ara h 3 的 *Bam*HI、*Pst*I 双酶切图。M: DL2000 DNA marker; 1: 未酶切质粒; 2~6: 双酶切质粒。b: 质粒水平 PCR。M: DL2000 DNA marker; 1~5: 扩增片段。

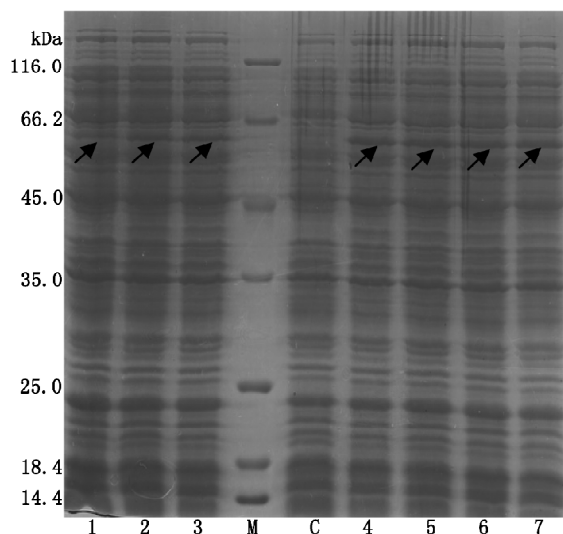


图5 不同浓度IPTG下pET44a-iso-Ara h 3的诱导表达
Fig.5 The expression of pET44a-iso-Ara h 3 induced by IPTG of different concentrations

M: 蛋白质分子量标准; C: 未诱导对照; 1~7: 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导。箭头所示为目的条带。

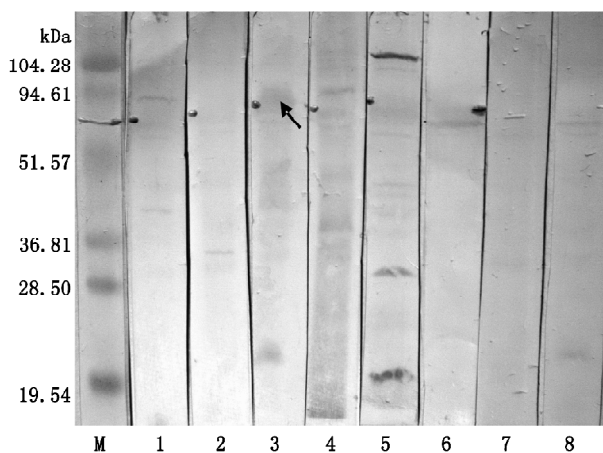


图6 重组 iso-Ara h 3 蛋白的免疫学鉴定
Fig.6 Immunological identification of recombinant protein iso-Ara h 3

M: Bio-Rad 预染蛋白分子量标准; 1~8: 8例花生过敏性血清。

和 Gallo (2007)克隆的序列缺少N末端的2个氨基酸残基M和K。我们克隆得到 iso-Ara h 3 的两个同源基因, 其编码蛋白存在2处微观不均一性 (microheterogeneity), 重组表达该蛋白后, 经免疫印迹实验显示, 它的血清IgE识别率为12.5%, 比文献报道的Ara h 3的45%~54%血清IgE识别率低

(Rabjohn 等 1999; Viquez 等 2004), 具有低过敏原性。因此可以对 iso-Ara h 3 进一步改造, 获得更低过敏原性的重组蛋白, 用于置换其他豆科植物物种中11S球蛋白过敏原蛋白, 以避免接触强过敏原而引发严重的过敏反应。

总之, 通过优化PCR条件, 我们从花生cDNA池中扩增到 iso-Ara h 3 的两个克隆, 同时进行了重组蛋白表达, 并用花生过敏性血清对重组蛋白进行鉴定, 发现重组蛋白 iso-Ara h 3 是一种低过敏原性的过敏原。

参考文献

- 陶爱林, 何韶衡 (2004). 豚草花粉泛过敏原同源基因克隆与序列分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 24 (3): 169~173
- Al-Muhsen S, Clarke AE, Kagan RS (2003). Peanut allergy: an overview. CMAJ, 168 (10): 1279~1285
- Burks W, Sampson HA, Bannon GA (1998). Peanut allergens. Allergy, 53 (8): 725~730
- Eigenmann PA, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA (1996). Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. J Allergy Clin Immunol, 98 (5): 969~978
- Gowland MH (2001). Food allergen avoidance—the patient's viewpoint. Allergy, 56 (suppl 67): 117~120
- Kang IH, Gallo M (2007). Cloning and characterization of a novel peanut allergen Ara h 3 isoform displaying potentially decreased allergenicity. Plant Sci, 172 (2): 345~353
- Marshall H (2001). 20% of sufferers could outgrow peanut allergy. Trends Immunol, 22 (4): 183
- Poms RE, Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. Food Addit Contam, 21 (1): 1~31
- Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA (1999). Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. J Clin Invest, 103 (4): 532~542
- Tao AL, He SH (2005). Cloning, expression, and characterization of pollen allergens from *Humulus scandens* (Lour) Merr and *Ambrosia artemisiifolia* L. Acta Pharmacol Sin, 26 (10): 1225~1232
- van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LM (2004). Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. Clin Exp Allergy, 34 (9): 1422~1428
- Viquez OM, Konan KN, Dodo HW (2003). Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. Mol Immunol, 40 (9): 565~571
- Viquez OM, Konan KN, Dodo HW (2004). Genomic organization of peanut allergen gene, Ara h 3. Mol Immunol, 41 (12): 1235~1240
- Warner JO (1999). Peanut allergy: a major public health issue. Pediatr Allergy Immunol, 10 (1): 14~20