

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00979

虾夷扇贝过敏原 tropomyosin 的克隆表达、纯化及免疫学鉴定

刘志刚¹ 邬玉兰¹ 吴淑勤² 石存斌² 夏皓玉¹ 陈丽斐¹

(1. 深圳大学过敏反应和免疫学研究所, 深圳 518060; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要: 从虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)肌肉中提取总 RNA, RT-PCR 克隆虾夷扇贝中变应原原肌球蛋白的全长基因, 根据序列设计带有酶切位点的特异性引物, 扩增扇贝 tropomyosin 的完整开放阅读框, 与 pET-28a 载体连接并转化大肠杆菌 *Escherichia. coli* BL21(DE3), 诱导表达后, Ni^{2+} 亲和层析柱纯化重组蛋白, Western-blot 检测其免疫学活性。经序列测定, 该基因含有长度为 855 bp 的开放阅读框, 编码 284 个氨基酸, 其在 GenBank 数据库中的登录号为 EU839640。SDS-PAGE 检测该重组变应原在大肠杆菌中高效表达 36 kD 的目的蛋白, 且重组变应原具有良好的 IgE 结合活性。研究获得了具有变应原活性的重组虾夷扇贝 tropomyosin, 为扇贝过敏性疾病的诊断和治疗奠定了基础。

关键词: 虾夷扇贝; 变应原; 原肌球蛋白; 表达纯化

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0979-05

变态反应性疾病被世界卫生组织(WHO)认为是当前世界性的重大卫生学问题, 世界各国变态反应性疾病的总发病率约为 10% - 20%^[1]。世界卫生组织将牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果和小麦, 这八类食品定为常见主要过敏食品。90%以上的过敏是由以上八类食品引起的。

软体动物同样能够引起 IgE 介导的过敏反应^[2], 但是目前关于软体动物致敏的临床报道和天然过敏原的研究相对较少。近年的研究表明, 原肌球蛋白为软体动物的主要过敏原, 且在鲍鱼、扇贝和贻贝中原肌球蛋白的核苷酸与氨基酸序列具有很高的相似性(>55%)^[3]。美国 1988 年和 1992 年两大医学学术杂志刊载了即时型食物过敏研究报告, 指出美国引起过敏的食物中, 水产品是其中重要的一类^[4,5]。中国预防医学科学院食品营养与安全中心的调查显示水产品是我国最重要的过敏原^[6]。

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)俗称元贝, 大型贝壳。闭壳肌可制作名贵的海产品-干贝。原产于日本和朝鲜, 现已引进我国, 并已在山东、辽宁等北方沿海进行人工养殖、增殖生产。虾夷扇贝营养

价值很高, 是高级宾馆及众多酒家的重要烹饪原料。

本研究选用我国常见的虾夷扇贝, 克隆和表达了其变应原 tropomyosin, 国内尚未见报道, 具有创新性。本研究将对虾夷扇贝过敏原的诊断和抗原的标准化提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

虾夷扇贝购自深圳人人乐超市。RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司; AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 BBI 公司; pMD18-T 载体、Ex-Taq 酶、限制性内切酶 *Nde* 和 *Xho*、T4 DNA 连接酶均购于 Takara 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶纯化试剂盒购于 OMEGA 公司。原核表达载体 pET-28a 及大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)均为 Invitrogen 公司。10 份对贝类过敏的患者血清由海口市人民医院提供并储存于-80℃备用。

1.2 方法

1.2.1 简并引物的设计 从 SWISS-PROT、TrEMBL 以及 NCBI 的数据库下载到 15 个动物性变应原

收稿日期: 2008-06-05; 修订日期: 2010-01-28

基金项目: 国家 863 计划(No.2006AA100308); 广东省科技重点专项(No.2003A3080502); 深圳市科技计划(No. 200326)资助

通讯作者: 刘志刚(1959—), 男, 汉族, 江西南昌人; 教授; 主要从事过敏原分子生物学研究。E-mail: LZG@szu.edu.cn

tropomyosin 的核酸序列。利用 CLUSTAL W 程序对这些序列进行同源性比对, 确定其保守区域。根据保守区域序列, 设计并合成简并引物(由上海生工合成):

Shanbei5a 5'-ATGGATGCTATCAAGAAGAA GATG-3'

Shanbei3a 5'-TTAGTA(A/T)CCAGC(A/C)ATC TC-3'

1.2.2 tropomyosin 变应原基因的 RT-PCR 扩增 取新鲜扇贝肉少许于液氮中充分研磨, 称取大约 100 mg, 转入 RNase Free 离心管中, 提取过程按照 Qiagen 公司试剂盒说明书进行。采用 BBI 公司 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit, 以总 RNA 为模板进行逆转录合成第一链。从合成的 cDNA 第一链产物中取 2 μ L 为模板进行 PCR 反应。引物采用 shanbei5a 和 shanbei3a。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3min 后用 Touchdown 方式进行扩增, 第一个循环为 94 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 5min, 此后每个循环的退火温度下降 1 $^{\circ}$ C, 当退火温度下降到 57 $^{\circ}$ C 时, 则以 94 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 5min 运行 30 个循环, 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 结束。电泳检测 PCR 产物, 并切胶回收。

1.2.3 序列分析 将测序所得序列通过 GeneBank 进行序列比对, 同时推导其相应氨基酸序列。利用在线程序 CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 将所得克隆与已知虾夷扇贝基因进行多序列比对, 分析其序列同源性。

1.2.4 构建重组表达质粒 在虾夷扇贝 Tropomyosin cDNA 的 5'和 3'末端通过 PCR 反应分别引入 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点, PCR 引物序列如下:

上游 5'-GAACATATGATGGATGCTATCAAGA AGAAGAT-3'(*Nde*)

下游 5'-GAACTCGAGTTAGTAACCAGCGAT CTCGG-3'(*Xho*)

回收 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上经测序无误后, 提取阳性菌落质粒, 所得质粒与原核表达载体 pET28a 分别进行 *Nde* 和 *Xho* 双酶切, 并将获得的基因片段与 pET28a 的酶切产物相互连接, 构建重组表达质粒。以重组质粒转化大肠杆菌 Top10, 菌落 PCR 鉴定, 提取阳性质粒, 进行双酶切鉴定, 阳性克隆经测序鉴定后转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)用于诱导表达。

1.2.5 表达和纯化重组虾夷扇贝 tropomyosin 挑取单菌落培养过夜, 按 5%比例接种于 1000 mL LB

培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养至菌液的 A_{600} 达到 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达过夜。离心收集菌体, 重悬于 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)。3 次冻融后超声波破菌。然后于 4 $^{\circ}$ C, 15000 r/min 离心 15min, 收集上清。装好 Chelating Sepharose 柱, 按常规上 Ni²⁺、用平衡缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, pH7.5)平衡层析柱, 上样品, 平衡至基线后, 用 200 mmol/L 咪唑洗脱, 收集洗脱峰, 对含目标蛋白的洗脱组分进行透析并冻干保存。

1.2.6 IgE 免疫印迹实验 重组虾夷扇贝 Tropomyosin 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转到硝酸纤维素膜上, 取下膜用 2%牛血清白蛋白(BSA) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜; 与 1: 5 稀释的过敏病人阳性血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h; 加入经 TBST(TBS/0.05% Tween-20)稀释(1: 3000)生物素标记的抗人 IgE 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h; 再加入经 TBST 稀释(1: 1000)的 HRP 标记的链霉亲和素, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h; 以上每个步骤进行完后都用 TBST 洗 3 次(5min/次)。将膜放入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)底物溶液中显现, 双蒸水洗涤终止显色反应, 观察结果。

2 结果

2.1 虾夷扇贝 tropomyosin 的克隆

提取的扇贝肉总 RNA 经反转录合成 cDNA 第一链, 然后以为此为模板, 用简并引物进行 PCR 扩增。扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳(图 1), 在 855 bp 左右有一亮带, 大小与理论预计值相符。回收 RT-

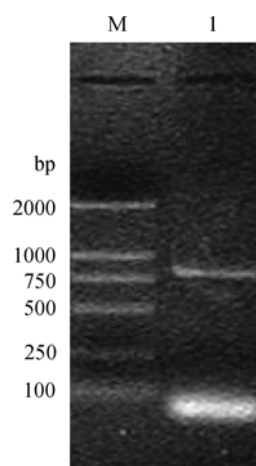


图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification
Lane M. DNA Standard Markers(100bp ladder); Lane 1. RT-PCR amplification with shanbei5a and shanbei3a as primers

PCR 产物并与 pMD18-T Vector 连接后转化 *E. coli* Top 10。挑取阳性菌落进行测序。

2.2 序列分析与同源性分析

克隆得到的虾夷扇贝 tropomyosin 由 855 个碱基组成(含终止密码子), 编码 284 个氨基酸, 其在 GenBank 数据库中的登录号为 EU839640。将克隆所得的基因序列利用 NCBI 中的 BLAST 程序进行序列同源性分析。结果显示: 本研究克隆的虾夷扇贝 tropomyosin(EU839640)与数据库中已知的虾夷扇贝 tropomyosin 同源性为 93%(AB050984), 与日本扇贝 tropomyosin 同源性为 93%(AB021681), 与栉孔扇贝 tropomyosin 同源性为 92%(AF216520), 与九孔鲍 tropomyosin 同源性为 70%(AF216518), 与光扁卷螺 tropomyosin 同源性为 71%(M85199)。

2.3 表达载体的构建及鉴定

提取经菌落 PCR 鉴定为阳性的重组表达质粒, 进行 *Nde* 和 *Xho* 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析(图 2)。载体片段约为 5 kb, 插入的虾夷扇贝 tropomyosin 片段 855 bp, 同预期的大小一致。对阳性克隆进行 DNA 序列测定, 以确保插入的片段准确无误。所构建的重组质粒包括虾夷扇贝 tropomyosin 的完整编码序列(包括起始密码子和终止密码子)。

2.4 表达纯化重组虾夷扇贝 tropomyosin

将鉴定为阳性的重组表达质粒转入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)进行诱导表达。37℃ 经 IPTG 诱导过夜获得重组的蛋白, SDS-PAGE 电泳分析显示在

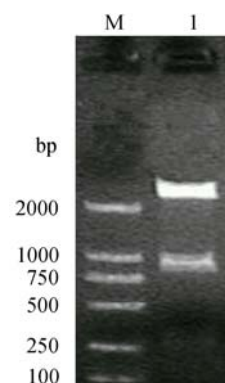


图 2 重组表达质粒 pET28a/tropomyosin 的双酶切鉴定
Fig. 2 Restriction enzymes digestion analysis of recombinant plasmid pET28a/tropomyosin
Lane M. DNA Standard Markers; Lane 1. pET28a/tropomyosin digested with *Nde*I and *Hind*

相对分子质量 36 kD 左右处有外源蛋白表达条带出现。采用 Ni 柱亲和层析的方法纯化重组蛋白, 当用 200 mmol/L 咪唑进行洗脱时, 出现了一个尖峰, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 此峰中含有大量高纯度目的蛋白(图 3)。

2.5 重组虾夷扇贝主要变应原 tropomyosin 的免疫学活性

取 10 份对贝类过敏的患者血清混合成的血清池对重组 tropomyosin 的免疫学活性进行检测, 免疫印迹的结果显示重组 tropomyosin 能与特异性 IgE 发生反应, 具有较好的免疫学活性(图 4)。

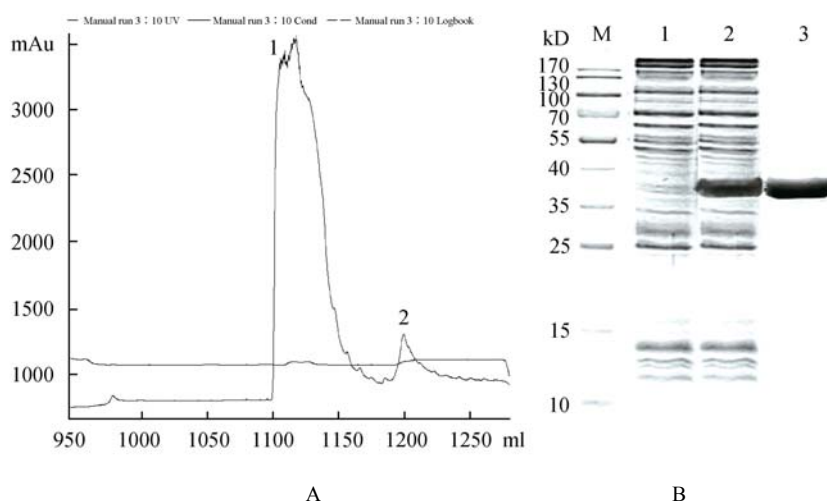


图 3 虾夷扇贝 tropomyosin 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

Fig. 3 Expression and purification of recombinant *Patinopecten yessoensis* tropomyosin

A. Elution profile; fraction A1. flow-through; fraction A2. 200 mmol/Limidazol wash; B. coomassie-stained SDS gel; Lane M. Protein molecular weight marker; Lane 1. Before induced; Lane 2. After induced; Lane 3. Purified recombinant tropomyosin

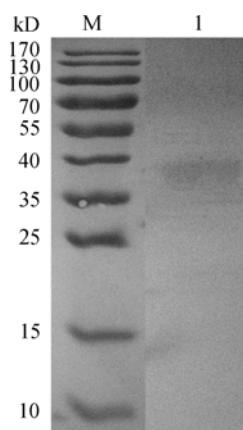


图 4 免疫印迹分析重组变应原

Fig. 4 Western blot analysis of recombinant *Patinopecten yessoensis* tropomyosin

Lane M. prestained protein marker; Lane I. recombinant tropomyosin reacted with positive serum

3 讨论

3.1 虾夷扇贝研究背景

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)原产于日本,目前已成为北方沿海地区一种重要的增养殖种类,具有很高的经济价值,同时也是目前海洋贝类育种研究的对象之一^[7]。贝类食品营养丰富,同时也是过敏性食物之一,它可引起各种超敏反应症状,累及皮肤、呼吸道和胃肠道。目前国外水产品过敏原的研究中,对虾的研究较为深入,但对贝类的研究较少。在国外已开展的对贝类海产品中过敏原组分鉴定研究中,发现在不同的贝类中的主要过敏性成分分子量为 36 kD 左右,已确定为原肌球蛋白,并对其 IgE 结合表位进行了分析^[8]。

3.2 Tropomyosin 的分子生物学研究

本研究利用分子克隆的方法,首先设计简并引物合成了目的基因,并通过重新设计特异性引物成功地目的基因连接到 T 载体上,经 *Nde* 和 *Xho* 双酶切及测序均证实已克隆到了正确的目的基因片段。并构建了重组质粒 tropomyosin/ pET28a(+), 测序后表明获得的基因序列与 GenBank 的其他虾夷扇贝的 tropomyosin 基因的同源性为 93% 左右。将重组质粒转化入 BL21 (DE3) 表达菌株, 经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳, 上清液出现一条 Mr 约 36 kD 的蛋白条带, 表明 tropomyosin 已于大肠杆菌 BL21 中成功表达。通过亲和层析获得纯度较高的蛋白, 并使用贝类过敏的病人血清进行 Western blot 实验, 结果

表明重组的 tropomyosin 能和贝类过敏病人血清中的 IgE 结合, 说明重组变应原具有免疫原性。

3.3 Tropomyosin 的生物信息学研究

本研究利用生物信息学方法对虾夷扇贝变应原 tropomyosin 进行同源性分析, 利用其高度保守区域设计并合成简并引物, 从中国南北沿海常见虾夷扇贝中成功克隆出一个新的虾夷扇贝 tropomyosin, 该基因由 855 个碱基组成(含终止子), 编码 284 个氨基酸。通过对其编码氨基酸序列的同源性分析发现和其他已知的虾夷扇贝的 tropomyosin 具有较高的同源性(约 93%), 提示不同地区的同一种变应原具有一定的区域特色。这可能是由于地域因素造成的, 也可能是由于该品种在人为改良等选择进化过程中形成的。

3.4 重组 tropomyosin 的利用价值

国外已经有关于虾夷扇贝主要变应原克隆的报道, 在 2001 年日本的 HASEGAWA 学者就克隆了虾夷扇贝的 tropomyosin^[9], 但国内对虾夷扇贝的重组变应原的研究还未见报道, 而且不同地区的物种的基因有多态性, 不同地区同一种变应原可能存在一定差异。因此, 本实验表达和纯化了虾夷扇贝的变应原 tropomyosin, 并且证实了重组 tropomyosin 具有和特异 IgE 结合的免疫学特性, 这将为虾夷扇贝过敏性疾病的特异性诊断及进一步的实验研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Menz G, Dolecek C, Schonheit U, *et al.* Serologic and skin test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the chief allergen of birch [J]. *Pneumologic*, 1996, **50**(9): 632—640
- [2] Carrillo T, de Castro F R, Cuevas M, *et al.* Allergy to limpet [J]. *Allergy*, 1991, **46**(7): 515—519
- [3] Chu K H, Wong S H, Leung P S C. Tropomyosin is the major allergen in mollusks: Reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity [J]. *Marine Biotechnology*, 2000, **2**(5): 499—509
- [4] Yunginger J W. Fatal food- induced anaphylaxis [J]. *Am. Med. Assoc.*, 1988, **260**(10): 1450—1452
- [5] Sampson H A, Mendelson L, Rosen J P. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents [J]. *N Engl J Med.*, 1992, **327**(6): 380—384
- [6] Lü X Z, Liu X M, Yang X G. Preliminary survey on status of food allergy in young Chinese students [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005, **17**(2): 119—121 [吕相征, 刘秀梅,

- 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 119—121]
- [7] Yang Q, Li Q, Yu R H, *et al.* Studies on the induction of haploid androgenesis in the Japanese scallop *Patinoprcten yessoensis* by ultraviolet irradiation [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 3(30): 360—362 [杨青, 李琪, 于瑞海, 等. 虾夷扇贝雄核发育单倍体的人工诱导研究. 水生生物学报, 2006, 3(30): 360—362]
- [8] Wild L G, Lehrer S B. Fish and shellfish allergy [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005, 5(1): 74
- [9] Yasushi HASEGAWA. Complete nucleotide sequences of cDNA encoding for tropomyosin isoforms from the catch muscles of scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Fisheries Sciences*, 2001, 67(5): 988—990

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF ALLERGEN TROPOMYOSIN FROM *PATINOPECTEN YESSOENSIS* AND IDENTIFICATION OF ITS ALLERGIC ACTIVITY

LIU Zhi-Gang¹, WU Yu-Lan¹, WU Shu-Qin², SHI Cun-Bin², XIA Hao-Yu¹ and CHEN Li-Fei¹

(1. Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060; 2. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380)

Abstract: This study was undertaken to clone, express and immunocharacterize the allergen tropomyosin from *Patinopecten yessoensis*. Bioinformatic method was used for the comparative analysis of numerous homologous animal food tropomyosin sequences. Conservative domains among the sequences were determined for degenerate primer designing. The RT-PCR was applied to clone the full-length allergen genes from *Patinopecten yessoensis* and the sequences were analyzed. The specific primers were designed. The complete coding cDNA sequence including the start and the stop codons of tropomyosin of *Patinopecten yessoensis* was subcloned into the expression vector pET 28a. Expression of the recombinant *Patinopecten yessoensis* tropomyosin was carried out in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and the purification of the recombinant protein was performed via affinity chromatography with Ni²⁺ coupled to sepharose. Protein from *E. coli* lysate and purified recombinant tropomyosin were analyzed by SDS-PAGE. IgE reactivity of recombinant *Patinopecten yessoensis* tropomyosin was investigated by Western-blotting. The cloned cDNA ORF sequence contained 855 bp and encoded 284 amino acids. The GenBank accession number of the clones was EU839640. Sequence analysis showed that this clone shared high identities with tropomyosin from *Patinopecten yessoensis*. Nucleotide and amino acid comparison showed that this protein was the *Patinopecten yessoensis* tropomyosin. The recombinant allergen tropomyosin was highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) with the molecular weight of about 36 kD under induction of IPTG and purified by 6-His-tag purification system. And the recombinant allergen was identified as its affinity to IgE antibodies from the scallop patient sera by Western blotting method. Immunoassay showed that the recombinant allergen has good IgE binding capacity. We obtained recombinant *Patinopecten yessoensis* tropomyosin with good allergenicity in this study, which would be used as a base for further study on *Patinopecten yessoensis* related allergy.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; Allergen; Tropomyosin; Cloning and expression