

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2015.02.013

粉尘螨 Hsp60 基因的测序、克隆和原核表达

刘海娟,洪青,罗晓东,李小敏,丁雪,沈浩贤,陈代雄

摘要:目的 探索和发现粉尘螨新的变应原组分。**方法** 以粉尘螨热休克蛋白 60(Heat shock protein 60, Hsp60)为研究对象,用简并引物 PCR 方法扩增出其 cDNA 片段,并对该片段进行了序列测定和分析。同时,对该基因片段进行了克隆、原核表达。**结果与结论** 成功确定粉尘螨 Hsp60 基因片段 cDNA 序列;构建了 pET-28a(+) -Hsp60 重组质粒,并在 *E. coli* BL21 中得到高效表达。

关键词:粉尘螨;Hsp60;基因序列;原核表达

中图分类号:R384 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2015)02-0154-04

Dermatophagoides farinae Hsp60--DNA sequencing, cloning and prokaryotic expression

LIU Hai-juan, HONG Qing, LUO Xiao-dong, LI Xiao-min, DING Xue, SHEN Hao-xian, CHEN Dai-xiong

(Department of Pathogenic Biology and Immunology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

Abstract: We identified new *Dermatophagoides farinae* allergens by DNA sequencing, cloning and prokaryotic expression of Heat shock protein 60 (Hsp60) from *Dermatophagoides farinae*. With degenerate primer polymerase chain reaction (PCR) to amplify the *Dermatophagoides farinae* cDNA, the cDNA fragments of the Hsp60 were abundantly obtained. The cDNA sequence and amino acid sequence encoded by it were detected and analysed. Meanwhile, the Hsp60 gene fragment was cloned into the pet-28a vector and transformed into *E. coli* for prokaryotic expression of the Hsp60. In this study, the cDNA sequence of *Dermatophagoides farinae* Hsp60 successfully was determined first, and the Hsp60 expressed in *E. coli* BL21. Results of this research laid a foundation for further analysis and study of *Dermatophagoides farinae* Hsp60.

Keywords: *Dermatophagoides farinae*; Hsp60; gene sequence; prokaryotic expression

Supported by the grants from the Science Research Foundation from Department of Education of Guangdong Province (No. 2013KJCX0154)

Corresponding author: Chen Dai-xiong, Email: daixiongchen@hotmail.com

近年来变态反应性疾病的发病率呈不断上升趋势,它已成为全球关注的公共卫生问题^[1-4]。尘螨作为一种重要的吸入性变应原在变态反应性疾病的研究中极受重视^[5-8]。Voorhorst^[9]等在 1967 年的研究中就已证实粉尘螨和户尘螨可引起支气管哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎等多种变态反应性疾病,是室内主要过敏原。而尘螨中包含的引起变态反应的成分—尘螨变应原在研究中一直受到高度关注。并且,随着探索的深入,不断有新的尘螨变应原被识别和发现^[10-11],这极大地加深了人类对尘螨变应原的

认识,推动了尘螨过敏性疾病诊断、预防和治疗的进步。为探索和发现粉尘螨新的变应原组分,本课题组在既往研究^[12]的基础上,选择粉尘螨热休克蛋白 60(Heat shock protein 60, Hsp60)为研究对象,测定和分析了它的 cDNA 序列,并对该基因片段进行了克隆和原核表达。

1 材料与方法

1.1 粉尘螨 由本实验室培养繁殖,保存于 -80 °C。

1.2 主要材料与试剂 原核表达载体 pET-28a (+) 由本实验室保存。Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒(PrimeScript RT-PCR Kit)、EX Taq 酶、限制性内切酶 BamH I 和

广东省教育厅科技创新项目(No. 2013KJCX0154)资助

通讯作者:陈代雄,Email:daixiongchen@hotmail.com

作者单位:广州医科大学病原生物学与免疫学教研室,广州 510182

Xho I、T4 连接酶等购自 TaKaRa 公司(中国大连)。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化公司。

1.3 方法

1.3.1 粉尘螨总 RNA 的提取 取粉尘螨 300 只,加入 1mL Trizol 匀浆。RNA 的提取方法参照 Trizol Reagent 的说明书进行。

1.3.2 粉尘螨 cDNA 的合成及 PCR 扩增 按照 PrimeScript RT-PCR Kit 的说明书操作,以提取的 RNA 为模板逆转录合成 cDNA。根据与尘螨相近物种 Hsp60 蛋白的特征性和保守序列设计简并引物,上游引物为 5'-gAT GAACCCnATGGAyyT-nAArmGnggg-3',下游引物为 5'-agTCACCaAAtC-CNGGNCGYTTNAC—3'(引物由 Invitrogen 公司合成)。以 cDNA 为模板 PCR 扩增 Hsp60 基因片段,PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 45 s → 60 °C 45 s → 72 °C 90 s, 72 °C 10 min。其中 2—4 步,共进行 30 个循环。

1.3.3 测序及氨基酸序列分析 将上述扩增获得的 PCR 产物送往大连宝生物工程(TaKaRa)公司进行测序。将测序结果和由其编码的氨基酸序列用 BLAST 软件进行同源性分析,对氨基酸序列进行亲水性区域分析(<http://www.expasy.org/>)。根据 pET-28a(+)质粒的序列图谱,用 DNACLUB 软件确定酶切位点为 *Bam*H I、*Xho* I。

1.3.4 粉尘螨 Hsp60 基因片段的扩增 根据测序结果设计特异性引物,上游引物为 5'-CG GGATCCCCAATGGATTAAACGCGTATCGACAAAGCCGTACTGCCGTGTTGCCAGCTGCAGAAGCTGTCCAAG-3',下游引物为 5'-CGCTCGAGTCCTGGTGCCTTCACG-3'(下划线为酶切位点)。以上述 PCR 产物为模板

扩增 Hsp60 基因片段,PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 45 s → 56 °C 45 s → 72 °C 90 s, 72 °C 10 min,共进行 30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收。

1.3.5 粉尘螨 Hsp60 基因片段克隆 分别对 pET-28a(+)质粒和 PCR 产物进行 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,将酶切后的 Hsp60 基因片段用 T4 连接酶连接到 pET-28a(+)载体上。将连接产物转化进 *E. coli* DH5 α 中,挑取单菌落提取重组质粒,用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定。将鉴定后阳性的重组质粒转化入表达菌 *E. coli* BL21,用双酶切和 PCR 方法对转化后的质粒进行鉴定。

1.3.6 重组质粒的诱导表达与可溶性分析 将含 pET-28a(+)Hsp60 的菌液培养至对数生长期,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 °C,280 r/min,诱导培养 4 h。表达产物经 10% SDS-PAGE 观察表达情况。表达产物可溶性分析参照 Sambrook 等^[3]介绍的方法进行。

1.3.7 重组蛋白质谱分析 重组蛋白送广州辉俊生物科技有限公司进行质谱鉴定。

2 结 果

2.1 简并引物 PCR 扩增产物的测序及序列分析 简并引物 PCR 反应产物的大小约 520 bp,其 DNA 测序结果和由它编码的氨基酸序列(见图 1)经同源性分析,结果显示:DNA 序列与 *Achromobacter Xylosoxidans* 热休克蛋白 60 相似度为 86%,氨基酸序列与 *Advenella Kashmirensis* 热休克蛋白 60 的相似度为 93%。生物信息学分析显示:该蛋白序列中存在多个可能与免疫原性有关的亲水区域。

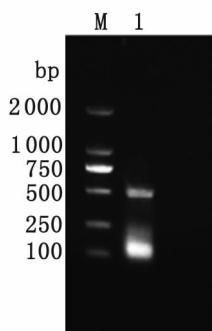
```
GATGAACCCAATGGATTAAACGCGTATCGACAAAGCCGTACTGCCGTGTTGCCAGCTGCAGAAGCTGTCCAAG
CCTTGCACCACAGCAAGGAAATGCCAGGTTGGTCCATTCCGCCAACAGCGATGCCCATCGACAAAATCATG
CCGACGCCATGGACAAAGTAGGCAAGGAAGGCAGTTATCACTGTTGAAGACGCCAGTCGCTCGACAACGAGCTTGACGT
GGTGAAGGCATGCAATTGACCGTGGCTACCTGTCGCCCTACTTCATCAACAACCCGACAAGCAGGTTCCGTACTG
GAAGACCCGTTGTTCTGATTTCGACAAGAAAATCAGCAACATCCGCGATCTGCTGCCCATCCTGGAACAGGTTGCCA
AGTCCAGCCGTCCTGCTGATCATTGCTGAAGACGTCGAGGGCGAAGGCCCTGGCTACGCTGGTTGTGAACAACATCCG
CGCATTCTGAAAACCACTGCCGTGAAGGCACCAAGGATTGGTACT
MNPMDFKRGIDKAVTAAVAELQKLSPKPTTSKEIAQVGSISANDASIDKIIADAMDKVGKEGVITVEDGKSLDNELDV
VEGMQFDRGYLSPYFINNPDKQVSVLEDPFLIFDKKISNIRDLLPILEQVAKSSRPLLIIAEDVEGEALATLVNNIR
GILKTTAVKAPFGD
```

图 1 Hsp60 的 cDNA 序列和编码的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and amino acid sequence of Hsp60

2.2 Hsp60 基因片段的 PCR 扩增 用含 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的特异性引物扩增 Hsp60 基因片

段,结果如图 2 所示,产物中可见大小基本相符的 DNA 扩增条带(理论值 520 bp)。

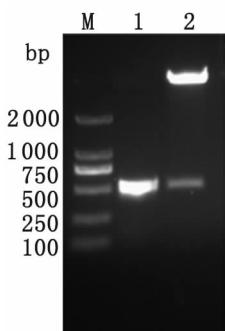


Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: PCR products.

图 2 粉尘螨 Hsp60 基因片段 PCR 结果

Fig. 2 PCR amplification of *Dermatophagoides farinae* Hsp60

2.3 基因克隆和重组质粒鉴定 将 PCR 产物双酶切后克隆到经酶切的质粒 pET-28a(+) 中, 重组子进行 PCR 和双酶切鉴定, 结果如图 3 所示, 可见大小相符的目的 DNA 条带。

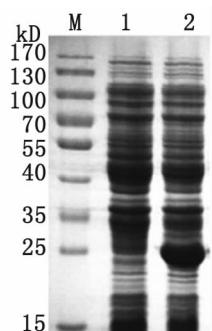


Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: PCR products of recombinant plasmid; Lane 2: Recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xba*I.

图 3 双酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid

2.4 重组质粒的诱导表达 如图 4 所示。pET-28a(+-Hsp60 可表达约 23 kD 大小的融合蛋白条带, 与推測值大小相符。

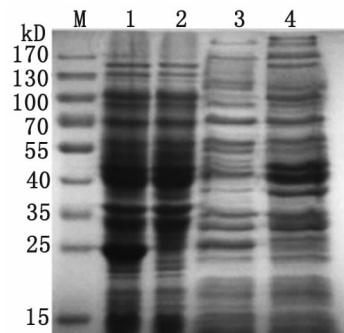


Lane M: Protein marker; Lane 1: Expression products of pET-28a(+-Hsp60); Lane 2: Expression products of pET-28a(+)-Hsp60.

图 4 pET-28a(+-Hsp60 表达产物的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 Expression of pET-28a(+-Hsp60

2.5 重组蛋白的可溶性分析 表达产物经 SDS-PAGE, 结果如图 5 所示: 重组蛋白在上清和沉淀中均有表达。



Lane M: Protein marker;

Lane 1: The insoluble expression products of pET-28a(+-Hsp60);

Lane 2: The insoluble expression products of pET-28a(+);

Lane 3: The soluble expression products of pET-28a(+-Hsp60);

Lane 4: The soluble expression products of pET-28a(+).

图 5 pET-28a(+-Hsp60 表达产物的可溶性分析

Fig. 5 Soluble analysis of pET-28a(+-Hsp60 expression product

2.6 重组蛋白质谱分析 质谱分析结果显示: 重组蛋白为 Hsp60。

3 讨 论

目前, 尘螨变应原的筛选方式通常是先建立尘螨 cDNA 文库, 然后以尘螨过敏病人血清为探针, 通过对 cDNA 文库的免疫学筛选来识别和发现新的尘螨变应原^[14]。本研究的前期工作是以尘螨过敏病人血清为探针, 通过免疫印迹方法对整个粉尘螨蛋白中的所有变应原组分同时进行筛选, 然后使用高通量的蛋白组学分析技术同时对反应蛋白条带中的多个蛋白质组分进行识别^[12]。在此基础上, 本研究选取其中的一个可能的变应原组分—Hsp60, 用分子生物学方法进行进一步的分析。研究结果显示: 利用简并引物扩增和 PCR 产物测序首次获得了粉尘螨 Hsp60 部分 cDNA 序列, 并通过基因克隆和大肠杆菌原核表达技术成功表达出粉尘螨 Hsp60 (片段) 重组蛋白。实践证明这是一种尘螨变应原分析和筛选的有效方法, 为新的尘螨变应原的发现提供了一种新的技术线路。

Hsp60 是热激蛋白的一种, 而热激蛋白是所有原核生物和真核生物在生长发育过程中或受到理化及病理因素刺激时, 机体内新合成或表达量增加的一组性质和作用基本相似的蛋白质。热激蛋白可被免疫系统识别, 参与抗原的加工和递呈^[15]; 同时, 有证据显示^[16-17]: 一些寄生虫的 HSPs 可诱导宿主产

生抗体,提示其是一种重要的抗原。且粉尘螨 Hsp70 已被证实可能是其新的变应原组分^[18]。因此,粉尘螨在宿主肺部寄生的过程中,其释放的 Hsp60 有可能诱导宿主产生免疫应答,甚至激发人体产生超敏反应。但目前还没有关于粉尘螨 Hsp60 及其变应原作用的报告。因此,本研究结果为对粉尘螨 Hsp60 进行进一步的分析和研究奠定了基础。

参考文献:

- [1]The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) [R]. Eur Respir J, 1998, 12: 315-335.
- [2]Franzese CB, Burkhalter NW. The patient with allergies[J]. Med Clin North Am, 2010, 94(5): 891-902.
- [3]Maziak W, Behrens T, Brasky TM, et al. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Result from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany[J]. Allergy, 2003, 58(7): 572-579.
- [4]Aas K, Aberg N, Achert C, et al. European allergy white paper Allergic disease as a public health problem in Europe [R]. Braine-1' Alleud: The UCB Institute of allergy, 1997: 116.
- [5]International Workshop Report. Dust mite allergens and asthma-a worldwide problem[R]. J Allergy Clin Immunol, 1989, 83: 416-427.
- [6]Arlian LG. Mites are ubiquitous: are mite allergens, too? [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000, 85(3): 161-163.
- [7]Custovic A, Simpson A, Woodcock A. Importance of indoor allergens in the induction of allergy and elicitation of allergic disease[J]. Allergy, 1998, 53(48 Suppl): 115-120.
- [8]Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease[J]. Allergy Clin Immunol, 2001, 107(Suppl 3): S406-413.
- [9]Voorhorst R, Spieksma FTM, Vanekamp MJ, et al. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with the house dust allerge[J]. J Allergy, 1967, 39: 325-328.
- [10]Bessot JC, Pauli G. Mite allergens: an overview[J]. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2011, 43(5): 141-156.
- [11]Bessot JC, Pauli G. House dust mites allergens[J]. Rev Mal Respir, 2011, 28(4): 475-495.
- [12]Chen DX, Zhou PK, Ran PX, et al. Screening and identification of dominant allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* [J]. China Trop Med, 2009, 9(2): 232-234. (in Chinese)
- 陈代雄,周平坤,冉丕鑫,等.屋尘螨和粉尘螨主要变应原的筛选和分析[J].中国热带医学,2009,9(2):232-234.
- [13]Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed, Beijing: Science Press, 2002: 1228-1255, 1723-1726. (in Chinese)
- 黄培堂,译.分子克隆实验指南[M].3 版.北京:科学出版社, 2002:1228-1255.
- [14]Puerta L, Caraballo L, Fernandez-Caldas E, et al. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a Blomia tropicalis allergen[J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(5 Pt 1): 932-937.
- [15]Young RA. Stress proteins and immunology[J]. Annual Rev Immunol, 1990, 8: 401-420.
- [16]Karamura HY, Hancock K, Rodrigues V, et al. *Schistosoma mansoni* heat shock protein 70 elicits an early humoral immune response in *S. mansoni* infected baboons[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002, 37(5): 711-716.
- [17]Zhang M, Hisaeda H, Kano S, et al. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria[J]. Microbes Infect, 2001, 3(5): 363-367.
- [18]Aki T, Fujikawa A, Wada T, et al. Cloning and expression of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: homology with human heat shock cognate proteins in the heat shock protein 70 family[J]. J Biochem, 1994, 115(3): 435-440.

收稿日期:2014-03-19;修回日期:2014-08-16