

蛔虫过敏原ABA-1融合基因在大肠杆菌中的表达及鉴定****◆

于超生¹, 文忠¹, 邹泽红², 陈惠芳², 陶爱林²

Expression and identification of chimeric protein truncated from *Ascaris* allergen ABA-1

Yu Chao-sheng¹, Wen Zhong¹, Zou Ze-hong², Chen Hui-fang², Tao Ai-lin²

Abstract

BACKGROUND: Serious allergic reaction could be caused by *Ascaris* anaphylactogen ABA-1 protein (*Ascaris* Body fluid allergen 1).

OBJECTIVE: To express the chimeric protein truncated from *Ascaris* major allergen ABA-1 in *Escherichia coli*.

METHODS: The chimeric gene, obtained from GeneBank and Protein Database and named as BAA hereafter, was constructed by tailoring the coding fragments of *Ascaris* main allergen ABA-1, i.e., ABA-1B1, ABA-1A2 and ABA-1A1. The fusion gene BAA was synthesized and cloned into expression vector PET-44a, and transformed into *Escherichia coli* JM109 with the method of KCM. When the plasmid was confirmed by double restriction enzymatic digestive test with *Nde* I and *Pst* I and DNA sequencing, it was transformed into *Escherichia coli* RosettaBlue™ step by step. The produced chimeric protein BAA was purified by nickel ion affinity chromatography, followed by identification by Western Blot and protein sequencing.

RESULTS AND CONCLUSION: Chimeric protein was inducibly expressed in *Escherichia coli*, with the production up to 40% of the total protein. Protein purity could reach about 90% after purification. Western Blot showed a specific band at 45 000, and amino acid sequencing identified that the 15 N-terminal amino acids were identical to the target protein. The chimeric protein has been efficiently expressed in *Escherichia coli*.

Yu CS, Wen Z, Zou ZH, Chen HF, Tao AL. Expression and identification of chimeric protein truncated from *Ascaris* allergen ABA-1. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(20): 3679-3682. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 利用蛔虫基因融合技术, 可将过敏原 ABA-1 的主要基因进行融合。

目的: 利用大肠杆菌表达系统重组表达蛔虫主要过敏原 ABA-1 融合蛋白。

方法: 从 Gene Bank 和 Protein Database 中获取蛔虫主要过敏原 ABA-1 基因和蛋白序列, 选定其中的 ABA-1B1, ABA-1A2 与 ABA-1A1 基因重组为融合基因 BAA, 经密码子优化后, 全基因合成目的基因 BAA 并构建于表达载体 PET-44a 上, 经 KCM 法转化入大肠杆菌 JM109 中进行克隆, PET-44a/BAA 经 *Nde* I 和 *Pst* I 双酶切及 DNA 测序正确后, 转化入大肠杆菌 RosettaBlue™ 中, 经 IPTG 诱导表达。表达蛋白经 Ni 柱亲和层析纯化后, 通过 Western blot 和氨基酸测序鉴定目的蛋白。结果与结论: 大肠杆菌的融合蛋白 BAA 表达量约占总蛋白的 40%, 纯化后蛋白纯度可达 90% 左右。Western Blot 结果显示在相对分子质量 45 000 处可见一特异目的条带, 氨基酸测序显示 N 端 15 个氨基酸与目的蛋白完全相同。结果证实, 融合蛋白 BAA 在大肠杆菌中得到高效的表达。

关键词: 蛔虫; 过敏原; ABA-1; 密码子优化; 组织构建
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.20.017

于超生, 文忠, 邹泽红, 陈惠芳, 陶爱林. 蛔虫过敏原 ABA-1 融合基因在大肠杆菌中的表达及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3679-3682. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

蛔虫过敏原 ABA-1 (*Ascaris* Body fluid allergen 1) 蛋白是蛔虫体液的主要成分^[1], 主要包括 ABA-1A1, ABA-1A2, ABA-1A3, ABA-1A4 及 ABA-1B1 共 5 种蛋白, 其在蛔虫的整个生长周期中都有分泌, 主要作用是为结合和转运脂类物质, 为蛔虫提供营养物质蛔虫^[2-3]。ABA-1 蛋白可以致敏机体, 引起速发型超敏反应, 包括哮喘、过敏性鼻炎等一系列过敏性疾病^[4-5]。同时, ABA-1 蛋白还可调节机体的免疫系统, 从而改变过敏性疾病的自然进程^[6-7], 但这一结论目前还存在争议^[8]。

以往对于 ABA-1 蛋白的研究主要集中在蛔

虫体液的整体研究, 或是只对其中的一个蛋白如 ABA-1A1 进行研究, 而不能更好的说明 ABA-1 蛋白整体功能和作用, 且需大量的人力物力和原材料。

鉴于此, 实验选定蛔虫 ABA-1 基因中 3 个主要基因 ABA-1A1, ABA-1A2 与 ABA-1B1, 经密码子优化后, 通过全基因合成法将 3 个基因融合, 试图利用原核表达系统高效表达融合蛋白, 并通过免疫印迹和氨基酸测序鉴定目的蛋白。

1 材料和方法

设计: 基因学体外实验。

时间及地点: 于 2009-05/2010-06 在广州医学院第二附属医院/过敏反应与临床免疫重

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China; ²Academic Key Laboratory of Allergy and Clinical Immunity, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

Yu Chao-sheng★, Studying for master's degree, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China ycs_9982@163.com

Wen Zhong, Doctor, Professor, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China wenzhong60@163.com

Yu Chao-sheng and Wen Zhong contributed equally to this paper.

Correspondence to: Tao Ai-lin, Doctor, Professor, Master's supervisor, Academic Key Laboratory of Allergy and Clinical Immunity, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China AerobiologiaTao@163.com

Supported by: Great Project from the Major Program of National Science and Technology of China, No. 2008ZX08011-005*; Key Project from the Major Program of National Science and Technology of China, No. 2009ZX08011-004B*; the National Natural Science Foundation of China, No. 30771240*; Program for Educational & Scientific Innovation Team of Guangzhou City, No. B94118*

Received: 2011-02-26
Accepted: 2011-04-09

¹ 南方医科大学珠江医院耳鼻喉-头颈外科, 广东省广州市, 510282;
² 广州医学院第二附属医院过敏反应与临床免疫重点实验室, 呼吸疾病国家重点实验室, 广东省广州市 510260

于超生★, 男, 1982年生, 山东省泰安市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事耳鼻喉-头颈外科的临床研究工作。
yys_9982@163.com

并列第一作者: 文忠, 男, 1960年生, 博士, 2000年中南大学毕业, 湖南省常德市人, 汉族, 教授, 主要从事头颈肿瘤基础与临床及鼻科学实验与临床研究。
wenzhong60@163.com

通讯作者: 陶爱林, 博士, 教授, 广州医学院第二附属医院过敏反应与临床免疫重点实验室, 呼吸疾病国家重点实验室, 广东省广州市, 510260
Aerobiologia@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2011)20-03679-04

收稿日期: 2011-02-26
修回日期: 2011-04-09
(20110226016/WJ-Z)

点实验室完成。

材料:

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
蛔虫融合基因 ABA-1	上海博尚生物公司合成
T4DNA 连接酶、pET-44a 表达载体	美国 Promega 公司
克隆宿主大肠杆菌 JM109、表达宿主大肠杆菌 RosettaBlue™	美国 Novagen 公司
Nde I 酶、Pst I 酶、IPTG	大连宝生物公司
FPLC 蛋白纯化仪	美国 Amersham 公司
镍柱填料	德国 Merck 公司

方法:

目的基因的设计与合成: 从 GeneBank 和 Protein database 中查找已知的蛔虫主要过敏原 ABA-1 的全序列基因和氨基酸序列, 根据大肠杆菌密码子偏爱性将蛔虫主要过敏原 ABA-1 基因中的 ABA-1B2, ABA-1A1 及 ABA-1A2 进行基因融合及密码子优化^[9], 大肠杆菌密码子使用频率参考 Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)。

在不改变氨基酸序列的基础上, 使所有密码子尽可能采用最优密码子, 然后利用 DNASTar 分析软件, 对 mRNA 的二级结构进行局部调整, 使其更有利于翻译, 并在基因两端加上 Nde I 和 Pst I 两个酶切位点, 融合基因命名为 BAA, 并送上海博尚生物公司合成, 融合基因 BAA 大小为 1 200 bp。

BAA 基因表达载体的构建: 新合成的融合基因 BAA 片段在 PBH 载体上, 保存在 1.5 mL 甘油菌 JM109 中, 氨苄青霉素(Amp)抗性 LB 平板筛选后, 取单菌落接种至含有 Amp 的 LB 液体培养基(质量浓度 10 g/L 胰化蛋白胨、5 g/L 酵母提取物和 10 g/L NaCl)中 37 °C 震荡培养 12 h 后, 提取含有 BAA 基因的 PBH 质粒, 经 Nde I 和 Pst I 双酶切后, 回收融合基因 BAA 片段, 并与带有 6 个组氨酸标签的 pET-44a 载体通过 T4 DNA 连接酶于 4 °C 连接过夜, 然后经 KCM(0.5 mol/L KCl, 0.15 mol/L CaCl₂, 0.25 mol/L MgCl₂)法将重组质粒转化入大肠杆菌 JM109, 经 Amp 抗性 LB 平板筛选后, 挑选阳性菌落 LB 液体培养基培养过夜后提取 pET-44a-BAA 质粒, 37 °C 行 Nde I 和 Pst I 双酶切 4 h, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后^[10], 进行 DNA 测序。通过 Amp 抗性 LB 平板筛选和经双酶切鉴定正确后, 进行 DNA 测序。

BAA 融合蛋白的表达及检测: 取测序正确的带有目的基因重组质粒的 pET-44a-BAA 大肠杆菌 RosettaBlue™ 接种至含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 8 h 后, 按 1% 的接种量接种到新鲜的 LB 液体培养基中培养 100 min, 吸光度值在 0.6~0.7 之间, 然后加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导剂, 于 37 °C 振荡培养 3 h 左右, 取 1.5 mL 菌液离心收集菌体, 与上样缓冲液[质量浓度 20 g/L SDS、体积分数 50% 甘油、62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、20 mL/L β-巯基乙醇、0.1 g/L 溴酚蓝、30 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA]充分混合, 煮沸并充分离心, 取上清进行 12% SDS-PAGE 电泳鉴定^[11]。

BAA 融合蛋白的纯化条件探索: 按照上述方法, 诱导表达 2 L 菌液, 离心收集并称量菌体, 在每克湿菌中加入 5 mL LEW 缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, pH 7.5), 再加入终浓度为 1 g/L 溶菌酶, 冰上振荡 30 min, 冰上超声破碎(强度 50%, 超声 10 s, 停 15 s)10 min, 离心后取上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 电泳, 分析结果表明, 表达产物主要存在于上清中。

实验在蛋白非变性(缓冲液中未加入 6 mol/L 的尿素)和变性(缓冲液中加入 6 mol/L 的尿素)2 种条件下, 按 Merck 产品说明书要求, 分别对目的蛋白进行 Ni 柱亲和和层析纯化^[12], 并用 12% SDS-PAGE 电泳检测纯化后的蛋白。

BAA 融合蛋白的 Western blot 分析: 纯化的融合蛋白 BAA 经 12% SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上^[11], 用含脱脂奶粉的 PBST 缓冲液(质量浓度 8 g/L NaCl, 0.28 g/L KCl, 0.28 g/L Na₂HPO₄, 2.98 g/L Na₂HPO₄•12 H₂O, pH 7.4, 体积分数 0.1% Tween-20)室温封闭 2 h 后, 清洗条带数次后加入 25% 的蛔虫过敏患者的血清, 4 °C 孵育过夜后, 室温下用 PBST 在脱色摇床上洗 3 次后加入 1/1 000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgE 抗体, 室温孵育 3 h, 再用 PBST 及 PBS 在脱色摇床上充分洗涤后, 用二氨基联苯胺(DAB)底物液显色, 检测融合蛋白 BAA。

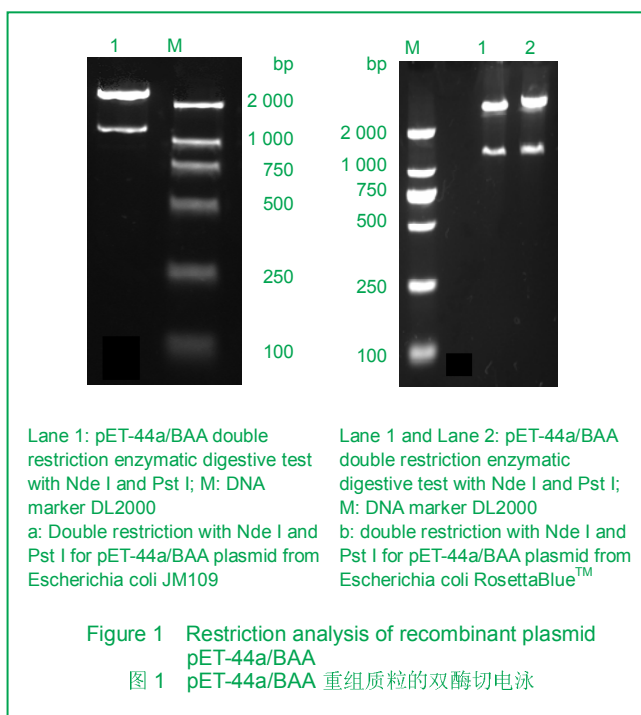
BAA 融合蛋白的氨基酸序列测定: 纯化的融合蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后, 经 CAPS 转移缓冲液(CAPS 22.13 g, 加去离子水至 900 mL, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 11.0)将凝胶上的蛋白质电转移至 PVDF 膜上, 用去离子水漂洗 PVDF 膜数次, 然后进行考马斯亮蓝染色 40 s, 用甲醇乙酸溶液及去离子水充分洗涤, 待干燥

后剪下待测序目的条带, 送上海中科新生命生物科技有限公司测序。

主要观察指标: ①融合基因的蛋白表达情况。②目的蛋白的纯化、Western blot检测及N-端氨基酸测序结果。

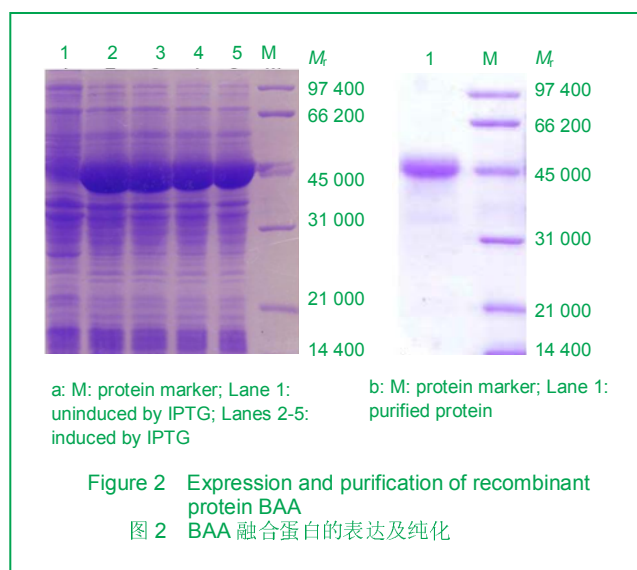
2 结果

2.1 重组表达载体构建和鉴定结果 构建pET-44a-BAA后用限制性内切酶*Nde* I 和*Pst* I 对重组质粒进双酶切鉴定, 得到线性pET-44a质粒和1 200 bp 目的条带片段, 见图1。

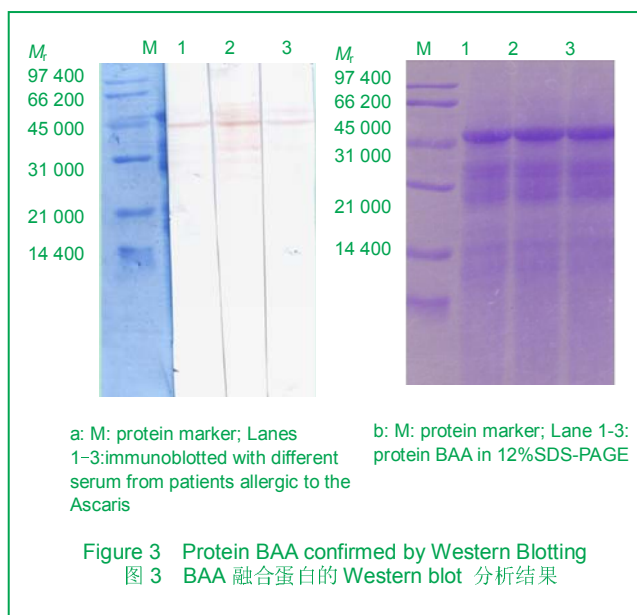


结果表明目的基因已经成功构建到pET-44a载体中。测序的结果与原始序列同源性为100%, 可进行下一步的原核表达。

2.2 BAA蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化结果 重组质粒pET-44a-BAA转化入大肠杆菌RosettaBlue™后, 蛋白质诱导表达结果显示, 在相对分子质量45 000处出现了一条新的蛋白条带, 与目的蛋白BAA分子质量相符, 见图2a。经Quantity One软件分析, 目的蛋白约占总蛋白的40%, 说明目的基因BAA在大肠杆菌中得到了高效表达。大肠杆菌中的融合蛋白BAA用2种方法经Ni柱亲和和层析纯化后发现, 在非变性条件下, 未能得到理想的纯化效果, 而在变性条件下, 缓冲液中加入6 mol/L的尿素后, 却得到了较理想的纯化效果, 经SDS-PAGE分析, 在相对分子质量45 000处可见到清晰目的条带, 经Quantity One软件分析蛋白纯度约90%, 见图2b。



2.3 BAA融合蛋白的Western Blot鉴定结果 融合蛋白BAA经Western Blot分析, 在相对分子质量45 000位置可见一明显的条带, 这与SDS-PAGE中BAA融合蛋白的位置完全相符, 说明融合基因BAA在大肠杆菌中成功表达, 并具有反应原性。见图3。



2.4 BAA融合蛋白的氨基酸序列测定结果 经蛋白质氨基酸测序后发现, 其N端15个氨基酸序列为T-M-E-H-Y-L-K-T-Y-L-S-W-L-T-E, 图4列出了N端1-6个氨基酸的测序图。将上述氨基酸序列与融合蛋白BAA序列比对发现, 该序列与目的序列完全相同, 这说明表达的蛋白为融合蛋白BAA。

3 讨论

抗原特异性脱敏治疗被认为是可以从病因方面治疗过敏性疾病的有效方法^[13], 但其中的特异性脱敏制剂

需要有完整的抗原表位和非常高的纯度。A、B 两类蛋白的氨基酸相似率约为 50%。国外的许多研究只侧重于 ABA-1 蛋白中的 ABA-1A1, 而忽视了 ABA-1 中其他蛋白的作用, 而国内则主要是利用蛔虫的粗提液进行脱敏治疗, 存在较高的危险性。本次实验, 为了得到更多的抗原表位, 选择了 ABA-1 中氨基酸序列差异较大的 ABA-1A1, ABA-1A2 及 ABA-1B1 基因片段进行融合, 并根据大肠杆菌的密码子偏爱性和 RNA 结构对基因进行优化设计, 得到新的目的基因, 并成功表达融合蛋白 BAA。同时, 利用全基因合成的方法可以不受原材料的限制。

实验所表达的目的蛋白 BAA 主要以可溶解的形式存在, 这与以往研究对于 ABA-1A1 基因的研究相同^[14-15]。但采用非变性条件纯化时未得到理想结果, 与以往研究在表达纯化 ABA-1A1 蛋白时的研究不同^[14-15]。实验在采用含有 6 mol/L 尿素的变性溶液的条件下进行纯化时, 得到了较理想的纯化结果, 这可能与融合蛋白的组氨酸标签发生折叠有关, 但具体原因还需要进一步的探讨研究。

实验纯化后的融合蛋白 BAA 经 Western blot 检测和蛋白质氨基酸测序鉴定, 结果均显示所得蛋白为目的蛋白, 这就为 BAA 融合蛋白的临床用特异性蛔虫脱敏疫苗的研制和蛔虫过敏原在变应性疾病中的作用机制研究提供了重要物质基础, 但融合蛋白 BAA 与天然 ABA-1 蛋白结构与功能是否一致, 尚有待于进一步的研究。

4 参考文献

[1] Kennedy MW, Qureshi F. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode *Ascaris*. *Immunology*. 1986;58(3):515-522.

[2] Christie JF, Dunbar B, Kennedy MW. The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with its homologue in *Toxocara canis*. *Clin Exp Immunol*. 1993;92(1):125-132.

[3] Christie JF, Dunbar B, Davidson I, et al. N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*, and MHC-restricted IgE responses to it. *Immunology*. 1990;69(4):596-602.

[4] Yu HM, Wen SL. *Shanghai Shiyandongwu Kexue*. 2000;20(4):217-219.
余洪猛, 文三立. 蛔虫变应原致过敏性鼻炎豚鼠模型建立[J]. *上海实验动物科学*, 2000, 20(4):217-219.

[5] Abraham, WM. Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21(5):743-754.

[6] Matera G, Giancotti A, Scalise S, et al. *Ascaris lumbricoides*-induced suppression of total and specific IgE responses in atopic subjects is interleukin 10-independent and associated with an increase of CD25(+) cells. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):280-286.

[7] Dowling DJ, Noone CM, Adams PN, et al. *Ascaris lumbricoides* pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability in vivo. *Int J Parasitol*. 2010;41(2):255-261.

[8] Kennedy MW. The nematode polyprotein allergens/antigens. *Parasitol Today*. 2000;16(9):373-380.

[9] Bulmer M. The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics*. 1991;129(3):897-907.

[10] Sambrook J. Beijing: Science Press. 2003.
萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2003.

[11] Cao CX. Beijing: Chemical Industry Press. 2008.
曹成喜. 分析生物化学技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[12] Simpson RJ. Beijing: Chemical Industry Press. 2009.
辛普森. 蛋白质组学中的蛋白质纯化手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.

[13] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8-160.

[14] McSharry C, Xia Y, Holland CV, et al. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infect Immun*. 1999;67(2):484-489.

[15] Moore J, McDermott L, Price NC, et al. Sequence-divergent units of the ABA-1 polyprotein array of the nematode *Ascaris suum* have similar fatty-acid- and retinol-binding properties but different binding-site environments. *Biochem J*. 1999;48(Pt 1):337-343.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 课题受国家科技重大专项重大课题(2008ZX08011-005)及重点课题(2009ZX08011-004B)、国家自然科学基金项目(30771240)和广州市教育系统科研创新学术团队(B94118)资助。

作者贡献: 陶爱林、文忠和于超生对该实验进行了设计, 于超生、邹泽红和陈蕙芳为实验实施者。实验评估为陶爱林、文忠和于超生。于超生、邹泽红和陈蕙芳负责资料收集, 于超生成文。陶爱林和文忠审校, 陶爱林对文章负责。于超生文忠对文章的贡献相同, 故并列列为第一作者。

致谢: 感谢翁志强教授、傅意玲检验师、李胜涛、李辉严及迟琼在实验技术方面给予的帮助, 感谢何颖助教、阮林讲师在文章修改方面的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 实验利用融合基因技术, 将蛔虫过敏原 ABA-1 中的主要基因进行融合, 得到新的目的基因 BAA, 新的基因能更好的代表蛔虫过敏原 ABA-1 的特点, 研究可能会更准确。该实验为过敏原谱表达的一部分, 过敏原谱的建立可以为过敏原的改造、脱敏疫苗的生产提供更详实的数据。