

甜荞麦 16 kDa 过敏原基因的克隆及其原核表达载体的构建

刘晓宇, 王晓娟, 吴海强, 杨 波, 刘志刚*
(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060)

摘要: **目的** 对甜荞麦(common buckwheat)过敏原的分子生物学开展研究。**方法** 通过 RT-PCR 克隆甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的全长基因, 并根据序列设计带有酶切位点的特异性引物, 扩增甜荞麦 16 kDa 过敏原基因的完整开放阅读框, 与 pET-28a 载体连接, 构建原核表达载体。**结果** 本研究成功克隆了甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的基因, 且构建了其原核表达载体。该基因含有长度为 450 bp 的开放阅读框, 编码 149 个氨基酸, 在 GenBank 数据库中的登录号为 EU883600, 同源性分析发现其与数据库中已知的荞麦过敏原基因有高度的同源性。**结论** 本研究为甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的重组表达和临床过敏性疾病的诊断奠定了基础。**关键词:** 甜荞麦; 克隆; 16 kDa 过敏原; 原核表达载体

Cloning and prokaryotic expression vector construction of common buckwheat 16 kDa major allergen gene

LIU Xiao-Yu, WAN Xiao-Juan, WU Hai-Qiang, YANG Bo, LIU Zhi-Gang*
(Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

ABSTRACT: Objective To study the molecular biology of allergens from common buckwheat. **Methods** In this paper, the RT-PCR was applied to clone the full-length allergen genes from common buckwheat and the sequences were analyzed, and then the specific primers were designed. At last, the ORF of 16 kDa allergen gene of common buckwheat was subcloned into the prokaryotic expression vector pET 28a. **Results** The cDNA sequence coding for this allergenic protein contained 450 bp and encoded 149 aa. Sequence analysis showed that this clone shared high identities with 16 kDa allergen gene from common buckwheat. The deduced protein was therefore regarded as the major allergen of 16 kDa of common buckwheat (GenBank database entry No. EU883600). **Conclusion** This research lay a foundation for the recombinant expression of allergen protein and the diagnosis of allergic diseases.

KEY WORDS: common buckwheat; clone; 16 kDa allergen; prokaryotic expression vector

1 引言

过敏性疾病在过去几十年中发病率显著上升, 成为全球关注的公共卫生问题, 世界变态反应组织

公布的 30 个国家过敏性疾病流行病学调查结果显示: 世界各国变态反应性疾病的总发率为 10%~30%^[1,2]。世界卫生组织 (WHO) 已把过敏性疾病列为 21 世纪需重点研究和防治的四大疾病之一。已有数据显示,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101280、81271950)、深圳市重点实验室组建项目(SW201110010)、深圳市科技计划基础研究重点项目(JC201005250073A)、深圳大学基础科学研究项目(201101)

*通讯作者: 刘志刚, 博士, 教授, 从事过敏原基础研究及过敏性疾病机制研究。E-mail: lzg195910@126.com

约有 1%~3%的成年人以及高达 5%~8%的儿童及婴幼儿对一种或多种食物过敏^[3]。在众多的食物中小麦、荞麦是重要的过敏原之一,患者会出现瘙痒、荨麻疹、红斑、血管性水肿等症状,严重时可发生晕厥、休克等^[4]。目前国内对于小麦、荞麦过敏原的研究主要集中在临床流行病学调查上,对其中相关过敏原基因的分子生物学研究仅见少许报道^[5]。确定过敏原中的关键致敏蛋白并通过基因工程进行体外重组,表达高纯度的重组过敏原,以代替传统的过敏原天然提取物进行临床免疫诊断和免疫治疗,仍将是今后变态反应学研究的热点^[6]。

荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)属于蓼科植物,其栽培品种为甜荞麦(Common buckwheat)和苦荞麦(Tartary buckwheat)。前者在亚洲、欧洲和拉美等国家栽培广泛,尤其是在亚洲^[7]。甜荞麦种子中的蛋白质含量可达 15%,富含多种必需氨基酸,具有很高的营养价值和药用价值^[8,9]。甜荞麦种子中含有的类黄酮等生物活性物质能有效预防糖尿病、高血压和风湿性关节炎等疾病,受到医学界的普遍关注^[10-12]。

甜荞麦也含有许多过敏性成份,使接触或食用它的一些人产生过敏症状。自从 1909 年 Smith^[13]首次报道了甜荞麦的过敏性以来,甜荞麦已经被公认为是最重要的食物过敏原之一,引发由 IgE 介导的 I 型速发性过敏反应^[14,15]。甜荞麦的主要过敏原是储藏蛋白。国外研究人员通过 SDS-PAGE 和免疫印迹进行分析,结果显示甜荞麦的主要过敏原蛋白有 8、14、16、17、18、22、24、36、39、50、70 和 100 kDa^[16]。虽然国外对于甜荞麦的研究已取得一些进展,但是国内对甜荞麦的过敏性研究尚未见报道。

本实验成功克隆出了甜荞麦主要过敏原 16 kDa 过敏原的基因,对其序列进行分析,并构建了其原核表达载体,为甜荞麦 16 kDa 过敏原蛋白的重组表达、免疫活性鉴定及变应原标准化奠定了实验基础。

2 材料与方法

2.1 材料

甜荞麦品种为吉荞 10 号;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* I 和 *Xho* I、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 为 Invitrogen 公司产品。

2.2 方法

2.2.1 简并引物的设计

从 SWISS-PROT、TrEMBL 以及 NCBI 的数据库下载甜荞麦 16 kDa 过敏原的核酸序列。利用 CLUSTALW 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(由上海生物工程技术服务有限公司生物工程技术服务有限公司合成):

CW16KD5a 5'atgaagctcttcacatcctagcaac 3'

CW16KD3a 5'ttacacaaaataccgatttcctctcg 3'

2.2.2 16 kDa 过敏原基因的 RT-PCR 扩增

取 6~7 粒甜荞麦种子于液氮中充分研磨,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。以合成的 cDNA 第一链产物为模板进行 PCR 反应。电泳检测 PCR 产物,并切胶回收。

2.2.3 RT-PCR 产物克隆和测序

回收纯化的 RT-PCR 产物与 pMD18-T Vector 进行连接,用氯化钙法将连接产物转入 E.coli Top 10 克隆菌中。通过含氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板进行抗氨苄筛选,挑取阳性菌落(含重组质粒)进行菌落 PCR 验证。阳性菌落进行序列测定(上海生物工程技术服务有限公司完成)。

2.2.4 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,对该蛋白质的等电点和相对分子量利用在线程序 Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行评估。利用在线程序 CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)将所得克隆与已知甜荞麦基因进行多序列比对,分析其序列同源性。

2.2.5 原核表达载体的构建

在甜荞麦 16 kDa 过敏原基因 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:

CW16KD5t 5' gagcatatgaagctcttcacatcctag 3' (*Nde*I)

CW16KD3t 5' gagctcgagttacacaaaataccgatt 3' (*Xho*I)

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

进行 NdeI 和 XhoI 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析(图5)。插入的甜荞麦 16 kDa 过敏原的基因片段 450 bp, 同预期的大小一致。阳性克隆的 DNA 序列测定结果显示, 插入的片段准确无误。说明该表达载体构建成功。所构建的重组表达质粒包括甜荞麦 16 kDa 过敏原的完整编码序列(包括起始密码子和终止密码子)。

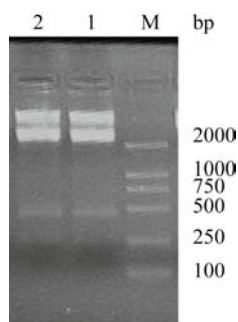


图5 重组表达质粒pET28a/16 kDa过敏原基因双酶切鉴定

Fig. 5 Double enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET28a/16 kDa allergen gene

M: DNA standard markers;

1, 2: pET28a/16 kDa allergen gene digested with NdeI and XhoI

4 讨论

本研究利用生物信息学方法, 首先根据数据库中已知序列设计并合成简并引物, 从甜荞麦中克隆出 16 kDa 过敏原基因, 由 450 个碱基组成, 其中开放阅读框为 450 个碱基(包括终止密码子), 编码 149 个氨基酸。该序列编码的蛋白相对分子质量约为 42758, pI 为 5.08。在 GenBank 数据库中的登录号为 EU883600。通过对其编码氨基酸序列的同源性分析发现其与数据库中已知的甜荞麦 10 kDa 过敏原基因同源性为 99%(ABO93594), 与甜荞麦 8 kDa 过敏原基因同源性为 87%(BAB79444)。研究提示如蛋白间有 30% 的序列相同性, 就可以根据已知蛋白推测其同源蛋白的空间结构和相似的功能^[16]。

本研究成功克隆出了甜荞麦 16 kDa 过敏原基因, 并构建了其原核表达载体。目前国内外尚无小麦、荞麦单克隆抗体, 对食品安全中小麦过敏原的检测带来一定的影响, 故本研究为小麦食物过敏原检测试剂盒的研制奠定了基础。同时, 尽管存在物种地域差异和人体体质差异, 但本研究显示我国甜荞麦 16 kDa 过敏原的基因序列与国外荞麦过敏原具有高度同源性, 为进一步开拓变态反应性疾病的标准化、过敏原制剂的研制及探讨变态过敏性疾病更安全、更有效地诊断和治疗方法提供理论基础。

参考文献

- [1] Ruffillia, Bonini S. Susceptibility genes for allergy and asthma [J]. Allergy, 1997, 52(3): 256-273.
- [2] WHO Workshop. Asthma management and prevention. The global initiative for asthma ascretariate, 1996: 1-2.
- [3] 吕相征, 刘秀梅. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 119-120.
- [4] 尹佳, 文利平. 小麦依赖-运动诱发的严重过敏反应: 15 例病例分析[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2010, 4(1): 26-32.
- [5] 郭亚范, 王葆琦, 张颖. 常见变态反应疾病过敏原检测分析(附 284 例报告) [J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 5: 556.
- [6] Ferreira F, Wallner M, Breiteneder H, et al. Genetic engineering of al2lergen: future therapeutic products [J]. J Int Arch Allergy Immunol, 2002, 128(3): 171-178.
- [7] 林汝法. 中国荞麦[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994, 226-243.
- [8] Hong JH, Ikeda K, Kreft I, et al. Near-infrared diffuse reflectance apectroscopic analysis of the amounts of moisture, protein, starch, anylose, and tannin in buckwheat flours [J]. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 1996, 42(4): 359-366.
- [9] Wieaiaander G. Review on buckwheat allergy [J]. Allergy, 1996, 51(10): 661-665.
- [10] Ren w, Qiao Z, wang H, et al. Tartary buckwheatflavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2001, 23(8): 427-432.
- [11] 张政, 王转花, 林汝法, 等. 苦养种子胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及部分性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(2): 247-251.
- [12] Ihme N, Kieaewetter H, Jung F, et al. Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-control clinical trial [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1996, 50(6): 443-447.
- [13] Smith HL. Buckwheat poisoning with report of a case in man [J]. Arch Intern Med, 1909, 3: 350-359.
- [14] Nakamura S, Yamaguchi M. Studies on buckwheat allergosis. Report 2: clinical investigation of 169 cases with the buckwheat allergosis gathered from the whole country of Japan [J]. Allergy Immunol, 1974/5, 20/21(4): 457-465.
- [15] Urisu A, Kondo Y, Morita E. Identification of a major allergen of buckwheat seeds by imunoblotting methods [J]. Allergy Clin Immunol News, 1994, 6: 151-155.
- [16] Yoshioka H, Ohmoto T, Urisu A, et al. Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e 1 from buckwheat [J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 761-767.

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



刘晓宇, 硕士, 从事食品过敏原分子生物学及致敏机制研究。



刘志刚, 博士, 教授, 从事过敏原基础研究及过敏性疾病机制研究。

E-mail: lzg195910@126.com