

文章编号 1006-8147(2020)03-0256-05

论 著

原肌球蛋白的重组表达、鉴定及与免疫球蛋白 E 结合能力分析

刘甫¹, 李军普¹, 李绍深², 李智伟¹, 孔德玉³, 白虹⁴, 李会强¹(1.天津医科大学医学技术学院,天津 300203;2.天津市中医药研究院附属长征医院检验科,天津 300120;
3.天津市港口医院检验科,天津 300456;4.天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070)

摘要 目的:在大肠杆菌中重组表达贝类主要过敏原—原肌球蛋白(Pen a 1),并且评估其 IgE 结合活性。方法:首先基于 Pen a 1 的已知序列人工合成 Pen a 1 基因,其次将其与质粒 pET-28a 连接以构建重组表达质粒 pET-28a(+)-Pen a 1,经测序、酶切鉴定后导入表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)细胞中。通过 IPTG 诱导,重组表达 Pen a 1 蛋白,镍柱纯化表达产物,并采用 SDS-PAGE 电泳及质谱技术鉴定所得重组蛋白。最后应用贝类过敏患者采用 LICA 技术检测该重组蛋白的 IgE 结合活性。结果:PCR 结果表明,目的基因全长为 930 bp,与理论预测值一致。SDS-PAGE 电泳结果显示,目的蛋白在宿主菌内以可溶性蛋白的形式高效表达,分子量约为 36 kD,大小与理论值相符。质谱鉴定结果进一步说明所得的重组蛋白为原肌球蛋白 Pen a 1。免疫分析结果表明该蛋白具有较高的 IgE 结合能力。结论:成功表达、纯化出有良好免疫学活性的重组原肌球蛋白 Pen a 1,为进一步研究 Pen a 1 在贝类动物如虾类过敏的诊断和治疗中作用奠定基础。

关键词 贝类过敏;重组过敏原;原肌球蛋白(Pen a 1);免疫球蛋白 E

中图分类号 R446.61

文献标志码 A

Recombinant expression, identification and immunoglobulin E binding analysis of tropomyosin Pen a 1

LIU Fu¹, LI Jun-pu¹, LI Shao-shen², LI Zhi-wei¹, KONG De-yu³, BAI Hong⁴, LI Hui-qiang¹

(1. Medical Technology College, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Port Hospital, Tianjin 300456, China; 4. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To clone and express Pen a 1 as a major allergen from *Penaeus aztecus* in *E. coli*, and to analyze its immunoglobulin E (IgE) binding ability. **Methods:** The gene coding Pen a 1 protein sequences were synthesized and cloned into the *Bam* HI and *Hind* III sites of pET28a (+) expression vector. After sequencing and identified by restriction endonuclease digestion, the verified pET-28a(+)-Pen a 1 was transformed into *E. coli* BL21 cells. The recombinant expression of Pen a 1 was induced by IPTG. The recombinant protein was purified using Ni²⁺-NTA affinity column chromatography, characterized by sodium dodecyl sulphate SDS-PAGE and MS, and tested by LICA for IgE reactivity with sera from individuals with shellfish allergy. **Results:** PCR analysis showed that the size of the target gene fragment was about 930 bp, which was consistent with the theoretical predictions. SDS-PAGE showed that the recombinant protein was highly expressed in the form of soluble protein in *E. coli*, and its molecular weight was about 36 kD, which was in accordance with the theoretical value. The results of mass spectrometry further revealed that the expression product was tropomyosin Pen a 1. Immunological analysis indicated the protein had high IgE binding ability. **Conclusion:** Recombinant tropomyosin Pen a 1 with good immunogenicity was successfully produced, which laid the foundation for further study on the role of Pen a 1 in the diagnosis and treatment of allergies including shrimp allergy.

Key words shellfish allergy; recombinant allergen; tropomyosin (Pen a 1); IgE

贝类是导致食物过敏的主要原因之一,在食物过敏患者中的流行率为 2.8%~8.0%^[1]。随着近年来贝类消费量的不断增加,免疫球蛋白 E(IgE)介导的贝类过敏对儿童和成人造成的健康威胁日益严重。基金项目 国家自然科学基金资助项目(81772259);天津医科大学校内科研基金资助项目(2110/2JY018)

作者简介 刘甫(1985-),男,助理实验师,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:白虹, E-mail: Hongbai25@163.com;李会强, E-mail: lihuiqiang1965@163.com。

益严重。

目前关于贝类过敏的实验室血清学诊断包括基于食物粗提物(包括过敏原组分与非过敏原组分)作为抗原的检测和基于纯化或者重组过敏原作为已知抗原的分子诊断^[2]。分子诊断可以明确致敏蛋白,提高诊断特异性,并且某些过敏原与临床症状的严重性相关,因此,这种诊断方法具有显著优势^[3]。目前已明确的贝类过敏原有 15 种^[4]。由于部

分过敏原组分在其来源中含量降低,并且纯化过程易受其他组分的干扰,通过提取纯化的方式获得单个过敏原蛋白往往难以实现。而过敏原重组表达技术可以高效的获取足量的单一目的蛋白,已被广泛应用^[5-6]。

此外,一些贝类过敏人群仅对单一过敏原组分敏感,而另一些患者则对多种组分同时敏感^[7]。这些不同的过敏原识别模式对贝类提取物在过敏原特异性免疫治疗(allergen-specific immunotherapy, AIT)中的安全性和有效性产生了一些限制。重组过敏原与其天然组分类似,但具有稳定的质量和无限量的产量等优点,便于选择符合条件的患者和适合的过敏原进行AIT脱敏治疗,从而使这一领域朝着更有效的治疗效果、更少的不良反应的方向发展^[9]。

原肌球蛋白(Pen a 1)是贝类动物中的主要过敏原组分。本研究中笔者成功表达、纯化出有良好免疫学活性的重组Pen a 1,为进一步研究Pen a 1在贝类动物过敏的诊断和治疗中作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III (美国NEB公司),DNA连接酶(美国NEB公司),质粒提取试剂盒、PCR凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)LB培养基(上海生工生物工程有限公司),Ni-NTA纯化系统、长臂生物素(美国ThermoFisher Scientific公司),抗人IgE抗体(美国Sigma-Aldrich公司),链霉素标记的感光球、裸的发光球(北京科美生物公司)。

1.2 血清样本 收集天津市中医药研究院附属长征医院和天津市港口医院2018年1月-9月共63例临床血清样本,分别来自35例贝类过敏患者和28名健康志愿者。IgE介导的贝类过敏的诊断按照欧洲变态反应与临床免疫学学会(European Academy of Allergy and Clinical Immunology, EAACI)指南推荐的以下诊断标准做出,即基于与贝类摄入相关的严重和/或急性过敏反应等明确的临床病史,以及血清贝类特异性IgE>0.35 kU_A/L(ImmunoCAP系统,Phadia)。如果无临床贝类过敏病史且血清贝类特异性IgE<0.35 kU_A/L,则为阴性血清样本,作为对照。患者入组前均获得书面知情同意。本研究经天津医科大学伦理委员(TMUHMEC2017008)批准,按照《赫尔辛基宣言》的原则进行。

1.3 Pen a 1基因的合成 由于Pen a 1序列(GenBank No. DQ 151457)已知,委托通用生物系统(安徽)有限公司人工合成目的基因。目的基因合成后,通过PCR扩增初步验证其片段大小。根据Pen a 1

序列设计合成特异性引物,上游引物为5'-ACTG-GTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCATGG CCATCAAGAAGAAGAT-3',下游引物为5'-CTCAGTG-GTGGTGCTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGTAGCCAGACAGTTTCGCTG-3'。将合成的引物和目的基因配制成混合液作为反应模板,加入DNA聚合酶、dNTP配制成PCR反应体系,进行PCR扩增并鉴定PCR扩增结果。

1.4 重组表达质粒pET-28a(+)-Pen a 1的构建 首先目的基因Pen a 1与载体pET-28a(+)分别用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切;然后进行核酸电泳,凝胶回收;最后在DNA连接酶的作用下,目的基因Pen a 1与载体pET-28a(+)进行连接,从而构建重组表达质粒pET-28a(+)-Pen a 1。将构建好的重组质粒转化至感受态Top10中,涂布相应抗性琼脂平板。培养过夜后,平板挑菌,37℃ 250 r/min 摇菌16 h,用菌液进行PCR鉴定,并将阳性克隆菌液送测序。测序比对正确的质粒,进一步进行 *Bam* H I -*Hind* III 双酶切验证。

1.5 重组过敏原蛋白Pen a 1的表达、纯化 通过热休克转化法,将获得含Pen a 1编码区和组氨酸亲和纯化标签(6His)的重组质粒转化到大肠杆菌BL 21(DE3)中,并涂布含卡那霉素琼脂平板。培养过夜后,平板挑菌至LB菌液培养基。当培养基在600 nm处的光密度值(OD)达到0.4~0.6时,添加终浓度为1 mmol/L的IPTG,在37℃,220 r/min的条件下诱导表达3 h。4℃环境中4 000×g离心5 min,收集菌液沉淀,PBS(pH 7.4,0.01 mol/L)重悬,超声裂解菌体,离心取上清进行蛋白电泳。根据Ni²⁺-NTA亲和层析说明书,对裂解液上清进行纯化,获得单一的重组蛋白。为进一步验证该蛋白,蛋白电泳、切胶回收后,送至上海生工生物工程有限公司进行质谱鉴定。

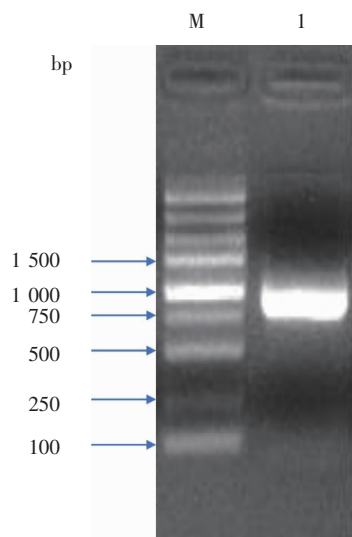
1.6 重组过敏原蛋白Pen a 1的免疫学活性评估 血清过敏原特异性IgE(sIgE)检测采用光激化学发光均相法(light-initiated chemiluminescent assay, LICA)。LICA基于纳米粒子对的形成和发光氧通道免疫分析技术。研究表明,该方法具有灵敏度高、分析范围广、周期快、无需洗涤等优点,适用于血清过敏原sIgE的检测^[8]。首先参照生物素试剂说明书中的标准程序,将重组过敏原Pen a 1标记生物素。同时依据已有文献中的标记流程^[8],将抗人IgE与发光球表面带有的化学基团共价连接,制备抗人IgE标记的发光球。

然后在96孔板中依次加入25 μL用含有1%

人血清白蛋白(HSA)的PBS(pH 7.4, 0.01 mol/L)稀释(1:20)的血清样品, 50 μ L(1:1 000, 稀释液: PBS/HSA)抗人 IgE 抗体标记的发光球和 1 μ g/L 的生物素化 Pen a 1 溶液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 30 min。随后, 加入 150 μ L 链霉亲和素标记的感光球, 反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 避光条件下震荡孵育 10 min。最后, 在 LICA 仪器上检测化学发光信号(chemiluminescence, CL), 信号值单位用相对光单位(relative light units, RLU)表示。同时将健康人血清平行处理作为阴性对照。每份血清样本复孔检测。

2 结果

2.1 Pen a 1 基因的 PCR 扩增鉴定 根据 Pen a 1 已知序列, 设计上下游引物, 将合成的目的基因经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后, 如图 1 所示, 所得目的片段的大小约为 930 bp(加上保护碱基及酶切位点), 与理论预测值相符。

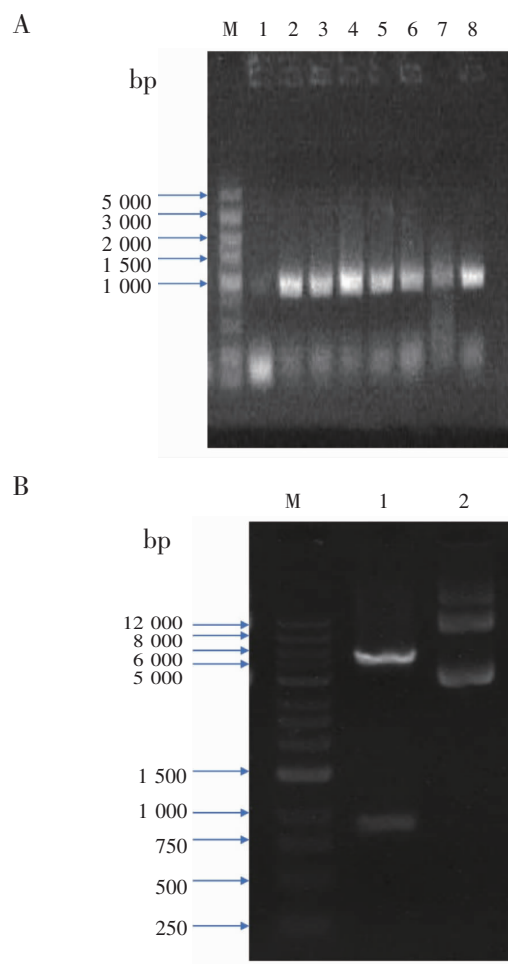


注: M: DNA marker; 1: 原肌球蛋白(Pen a 1)基因扩增产物

图1 原肌球蛋白(Pen a 1)PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of the tropomyosin Pen a 1

2.2 重组表达质粒 pET-28a (+)-Pen a 1 的验证 将目的基因与质粒载体酶切连接后, 构建重组表达质粒 pET-28a (+)-Pen a 1。部分样品的菌落 PCR 结果如图 2A 所示, PCR 扩增出的目的基因大小约为 930 bp, 与预测的片段大小 930 bp 相符, 说明目的基因成功连接到质粒载体上。同时阳性克隆菌的正向与反向测序结果显示所得序列与 NCBI 上所公布的 Pen a 1 序列一致。此外将测序正确的菌落摇菌培养, 提取质粒并进行双酶切, 获得的条带约 867 bp、5 400 bp 与预期 867 bp、5 400 bp 的大小一致, 见图 2B。酶切结果表明获得了含 Pen a 1 基因的重组质粒。



注: A. M: DNA Marker; 1~8: 菌落样本编号; B. M: DNA Marker;

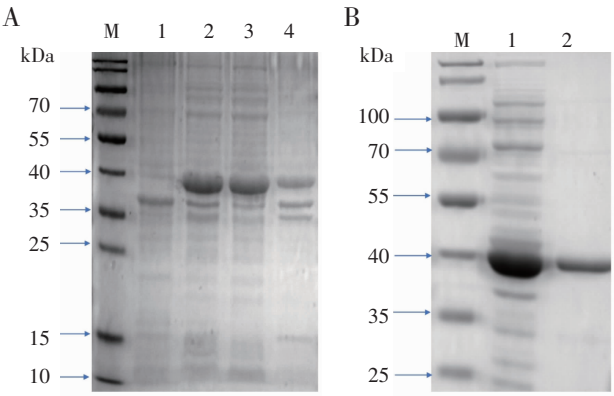
1: 重组质粒 pET-28a(+)-Pen a 1; 2: 重组质粒 pET-28a(+)-Pen a 1 经 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切

图2 重组表达质粒 pET-28a(+)-Pen a 1 的验证

Fig 2 Verification of recombinant expression plasmid pET-28a(+)-Pen a 1

2.3 目的蛋白的表达、纯化及鉴定 用 1 mmol/L IPTG 诱导培养, 在 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 条件下表达 3 h, SDS-PAGE 电泳结果显示(图 3A)在 36 kD 处出现一条明显增多的蛋白条带, 分子量与预测值相符, 且未诱导的菌体中未明显出现该条带。该目的蛋白主要出现在超声波处理后的上清液中产生, 所以为可溶性表达。镍柱纯化后, SDS-PAGE 电泳结果显示(图 3B)获得了单一纯化的目的蛋白。此外经进一步质谱鉴定(表 1), 该目的蛋白为原肌球蛋白。

2.4 血清 IgE 抗体与原核表达产物 Pen a 1 的结合能力 采用 LICA 技术检测重组 Pen a 1 过敏原结合贝类过敏患者血清 IgE 抗体的结合能力。如图 4 所示, 71.4%(25/35) 的患者血清 sIgE 抗体对重组 Pen a 1 过敏原敏感, 与已有的文献报道类似, 说明该重组过敏原具有来良好的过敏原性。



注:A.M: 蛋白 Marker;1:IPTG 未诱导的菌体表达蛋白;2:IPTG 诱导的菌体表达蛋白;3:诱导的菌体上清蛋白;4:诱导的菌体沉淀蛋白;B.M:蛋白 Marker;1:IPTG 诱导的菌体表达蛋白;2:纯化后的目的蛋白

图 3 目的蛋白的表达、纯化

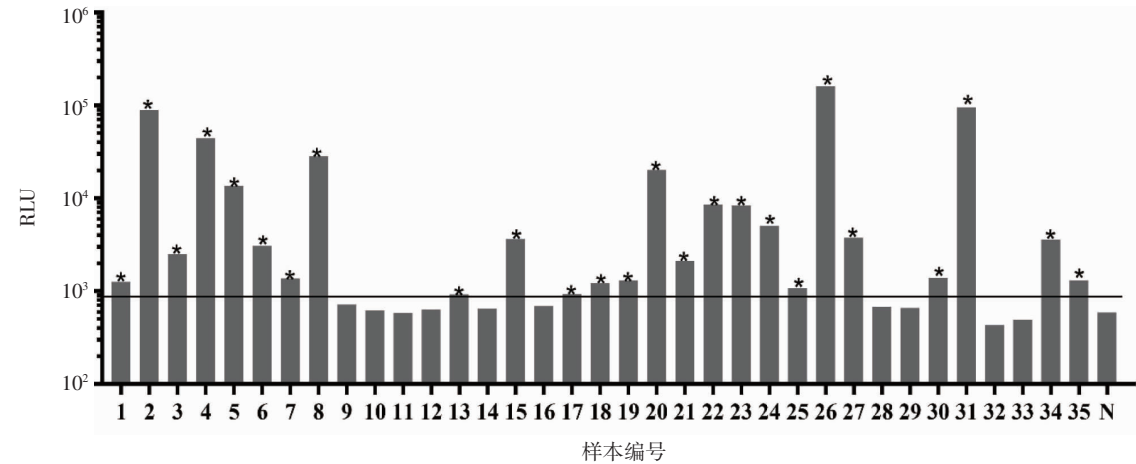
Fig 3 Expression and purification of the Pen a 1 allergen

表 1 重组过敏原 Pen a 1 质谱鉴定

Tab 1 Identification of recombinant tropomyosin Pen a 1 by MS/MS and Mascot database searches

GenBank 蛋白编号	蛋白名称	理论分子量/D	得分	匹配的肽段数
AAZ76743	Penaeus monodon, tropomyosin	32 830	292	4
CDW59661	Trichuris trichiura, Elongation factortu	24 465	171	2
KZC10872	Dufourea novaengliae, tropomyosin-1	35 055	108	2

用 LICA 检测贝类过敏血清抗体与 Pen a 1 结合反应性($n=35$)。作为阴性对照,健康人血清同时也被检测($n=28$)。如果过敏血清的 CL 值高于以水平线表示的通过将两个标准偏差(SD)与阴性对照的平均 CL 值相加而确定的截断值 (Cutoff Value = Mean+2SD),则被认为反应阳性。



注:每一列表示单个血清;Pen a 1 阳性患者用星号标记

图 4 重组过敏原 Pen a 1 与血清 sIgE 结合能力

Fig 4 The ability of recombinant tropomyosin Pen a 1 binding to serum sIgE

3 讨论

由于重组过敏原有可能克服天然过敏原提取物在诊断与脱敏免疫治疗中的缺点,目前许多过敏原已蛋白已被克隆、测序和表达^[9-12]。本研究中,根据 Pen a 1 已知序列,笔者人工合成了其目的基因,然后与载体 pET-28a(+)酶切连接,构建重组表达质粒 pET-28a(+)-Pen a 1。用 IPTG 处理诱导转化的大肠杆菌 BL21 表达该重组蛋白。通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白质表达,得到与预计的分子量匹配的单一特异性条带。进一步的质谱分析鉴定结果证实了重组融合蛋白与 Pen a 1 过敏原一致。因此,笔者成功构建了 pET-28a(+)-Pen a 1 融合表达载体,并在大肠杆菌中成功表达。

Pen a 1 是贝类动物中被发现的第一个主要的

过敏原,并且在 13 个不同物种中被 WHO/IUIS 确定和登记为过敏原^[2]。同时 Pen a 1 也被认为是主要的泛过敏原,介导甲壳类与其他节肢动物如尘螨或者蟑螂之间的交叉反应性^[13-14]。研究表明,在虾摄入后的相关过敏反应诊断中,虾原肌球蛋白 sIgE 的检测优于基于商业粗提物的皮肤点刺试验和虾 sIgE 的测定^[15]。目前过敏原单组分 Pen a 1-sIgE 的测定以重组过敏原 Pen a 1 作为已知抗原,采用荧光免疫分析(ImmunoCAP system; Phadia, Uppsala, Sweden)^[16],但相关试剂及设备尚未被国内引进。因此本次研究所得的目的蛋白可以作为检测原料,依托国产检测平台(LICA 技术)将有助于本地区过敏人群的精准诊断。

目前对海鲜过敏的治疗策略在本质上大多是

姑息性的,即避免摄入致敏食物,强调了对食物进行标签和检测海鲜过敏原的必要性^[2]。研究认为 AIT 是唯一能改变过敏性疾病(如过敏性鼻炎和哮喘)自然病程的病因治疗^[17]。但是天然的过敏原提取物在过敏原含量上往往表现出很大的差异,可能缺乏重要的过敏原,并且可能被其他来源的过敏原污染。相反,重组技术可以生产生物活性充分表征的、纯度高、未污染的疫苗组分。此外,基因工程技术可以对野生型过敏原进行修饰,以产生具有低 IgE 反应性的过敏原衍生物(“低过敏原”),降低在 AIT 过程中引发不良过敏反应的风险,并保留免疫原活性^[18]。同时在研究贝类过敏的免疫学机制以及加热对过敏原蛋白的影响中,也常常利用重组过敏原^[19-20]。原肌球蛋白作为贝类过敏人群的主要致敏原,其重组表达形式优于有天然提取物,有助于贝类过敏人群的 AIT 治疗及其他机制研究。

综上,本次研究为进一步研究重组 Pen a 1 在变态反应诊断和治疗中的应用提供了基础。

参考文献:

- [1] El-Qutob D. Shrimp allergy: beyond avoidance diet[J]. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2017, 49(6): 252
- [2] Ruethers T, Taki A C, Johnston E B, et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens[J]. *Mol Immunol*, 2018, 100: 28
- [3] Borres M P, Maruyama N, Sato S, et al. Recent advances in component resolved diagnosis in food allergy[J]. *Allergol Int*, 2016, 65(4): 378
- [4] Faber M A, Pascal M, El Kharbouchi O, et al. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond[J]. *Allergy*, 2017, 72(6): 842
- [5] Tscheppe A, Breiteneder H. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017, 172(4): 187
- [6] Mas S, Boissy P, Monsalve R I, et al. A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from salsola Kali pollen for allergy diagnosis[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, 167(2): 83
- [7] Pascal M, Grishina G, Yang A C, et al. Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2015, 3(4): 521
- [8] Bian Y, Liu C, She T, et al. Development of a light-initiated chemiluminescent assay for the quantitation of sIgE against egg white allergens based on component-resolved diagnosis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(5): 1501
- [9] Myrset H R, Barletta B, Di Felice G A, et al. Structural and immunological characterization of recombinant Pan b 1, a major allergen of northern shrimp, *pandalus borealis*[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013, 160(3): 221
- [10] Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo L P, et al. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*[J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(15/16): 1983
- [11] Rohrback S E, Wheatly M G, Gillen C M. Calcium binding to *Procambarus clarkii* sarcoplasmic calcium binding protein splice variants[J]. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*, 2015, 179: 57
- [12] Zhang Y, Zhu L, Li S, et al. Identification of the major allergenic epitopes of *Eriocheir sinensis* roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses[J]. *Mol Immunol*, 2016, 74: 125
- [13] Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, et al. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129(1): 38
- [14] DeWitt AM, Mattsson L, Lauer I, et al. Recombinant tropomyosin from *Penaeus aztecus* (rPen a 1) for measurement of specific immunoglobulin E antibodies relevant in food allergy to crustaceans and other invertebrates[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48: 370
- [15] Gamez C, Sanchez-Garcia S, Ibanez M D, et al. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy[J]. *Allergy*, 2011, 66(10): 1375
- [16] Van Hage M, Hamsten C, Valenta R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(4): 974
- [17] Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International consensus on allergy immunotherapy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(3): 556
- [18] Valenta R, Campana R, Focke-Tejkl M. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(2): 351
- [19] Kamath S D, Thomassen M R, Saptarshi S R, et al. Molecular and immunological approaches in quantifying the air-borne food allergen tropomyosin in crab processing facilities[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2014, 217(7): 740
- [20] Mahajan A, Youssef L A, Cleyrat C, et al. Allergen valency, dose, and FcεRI occupancy set thresholds for secretory responses to pen a 1 and motivate design of hypoallergens[J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1034

(2019-09-05 收稿)