

德国小蠊主要变应原 Bla g 2 在毕赤酵母菌中的表达

刘志刚, 何毅华

【摘要】 目的 在毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)中表达德国小蠊主要变应原 Bla g 2, 以获得其可溶性蛋白。**方法** 根据已知的 Bla g 2 基因序列设计带有酶切位点的引物, PCR 扩增德国小蠊变应原Bla g 2基因, 经酶切后将该基因连接到毕赤酵母真核表达载体 pGAPZaA, 获重组质粒 pGAPZaA-Bla g 2, 该重组质粒线性化后, 经电转化法转化毕赤酵母 GS115, 用 PCR 筛选出重组子并在 YPD 培养基中表达。用 Ni²⁺亲和层析法纯化重组蛋白 Bla g 2, 用蛋白质印迹(Western blotting)分析其免疫学活性。**结果** 重组质粒 pGAPZaA-Bla g 2转化毕赤酵母 GS115 后进行表达, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析显示, 重组蛋白Bla g 2表达产物以可溶性分子形式存在, 相对分子质量(*Mr*)为 45 000。培养 3 d 的表达量占上清总蛋白的 50 %。表达产物重组蛋白Bla g 2经 Ni²⁺亲和层析纯化后, Western blotting 分析, 在约 *Mr* 45 000 处有 1 条明显的特异性条带, 该蛋白具有免疫学活性。**结论** 获得了真核表达的德国小蠊主要变应原重组蛋白Bla g 2, 该蛋白以可溶性蛋白的形式分泌到培养液中, 避免了原核表达的变复性过程。

【关键词】 德国小蠊; Bla g 2; 变应原; 毕赤酵母; 表达; 免疫学鉴定

中图分类号: R384.9

文献标识码: A

Expression of Allergen Bla g 2 from *Blattella germanica* in *Pichia pastoris*

LIU Zhi-gang, HE Yi-hua

(Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

【Abstract】 Objective To express the major allergen of *Blattella germanica* (Bla g 2) in *Pichia pastoris* and obtain the soluble protein. **Methods** The known Bla g 2 gene was used to design the primers which had the restriction enzyme sites. PCR method was applied to obtain the Bla g 2 gene. The gene fragment was then cut and ligated with the *Pichia* expression vector pGAPZaA, resulting in a recombinant plasmid pGAPZaA-Bla g 2. The linearized pGAPZaA-Bla g 2 was transformed into *Pichia pastoris* GS115 through electroporation, then screened to positive transformants, and the protein was expressed in YPD medium. Purification of the recombinant protein was achieved by metal (Ni²⁺) chelating affinity chromatography and Western-blotting assay indicated its IgE binding capacity. **Results** With the expressed recombinant protein, SDS-PAGE showed the presence of the product in the supernatant of the culture with *Mr* 45 000. After 3 days culture, the recombinant protein occupied 50% of the total proteins in the supernatant. The recombinant protein was purified and Western-blot demonstrated an adequate IgE binding capacity of the product. **Conclusion** A recombinant protein of Bla g 2 has been obtained, which is soluble in the supernatant and therefore can avoid a process of denaturalization and renaturation of the recombinant.

【Key words】 *Blattella germanica*; Bla g 2; Allergen; *Pichia pastoris*; Expression; Immunoblotting

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39860071,30571625), Guangdong Provincial Key Project of Science and Technology (No.2003A3080502)

国内外学者对蟑螂与变态反应性疾病(如外源性哮喘等)的关系作了深入的研究, 已证实蟑螂是外源性哮喘的主要诱因之一。在我国蟑螂主要以美洲大蠊和德国小蠊两个物种为主。德国小蠊含有 Bla g 1、Bla g 2、Bla g 4 和 Bla g 5 等重要变应原。以往的研究表明,

Bla g 2 是一种主要变应原, 能够引起 60%~80%的蟑螂过敏性患者的 IgE 反应, 而且只需 10⁻⁵~10⁻⁶ μg/ml 的低浓度就能引起皮试阳性反应^[1,2]。近来的流行病学研究显示, 与其他常见的室内变应原(如屋尘螨和猫皮屑)相比较, 蟑螂变应原只需 1%的水平就足以引起 IgE 反应^[3]。这说明 Bla g 2 是特别重要的变应原。

目前, 国外对重组变应原进行了深入的研究, Karla等^[4]纯化了天然的 Bla g 2 蛋白, 对其免疫学特性

基金项目: 国家自然科学基金(No.39860071, 30571625)、广东省科技计划重点项目(No.2003A3080502)
作者单位: 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060

进行了鉴定,并得到了其 cDNA 序列;Anna Pomes 等^[5]通过同源比较,基于凝乳酶和胃蛋白酶的三维晶体结构,用软件推导出了 Bla g 2 的三维构象。但国内对德国小蠊重组变应原的研究尚未见报道。因此,无论是从改进国内现有的免疫诊断用粗抗原,提高检测的敏感性与特异性,还是从研制用于变态反应疾病分子疫苗的目标考虑,构建德国小蠊主要变应原 Bla g 2 的高效表达质粒,制备高纯度变应原均显必要性。本研究用德国小蠊变应原 Bla g 2 基因在毕赤酵母中表达,纯化后用蛋白质印迹(Western blotting)分析其免疫学活性。

材料与方 法

1 血清

对蟑螂皮试阳性(Ⅱ级或Ⅱ级以上)的 30 例患者血清由深圳市第一人民医院和深圳市南山区人民医院过敏反应科提供,分装后-20℃保存。

2 主要材料和试剂

穿梭质粒 pGAPZaA 和毕赤酵母菌 GS115 购自美国 Invitrogen 公司。pUCm-T-Bla g 2 质粒由本实验室构建,大肠埃希菌 (*E.coli*)Top10 由本实验室保存。pMD18-T 载体、限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I、T₄DNA 连接酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶和 DNA 片段纯化试剂盒均为日本 Takara 公司产品,限制性内切酶 *Bsp*HI 购于美国 BioLab 公司。硝酸纤维素膜为英国 Amersham 公司产品。生物素标记的抗人 IgE 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素购自美国 KPL 公司,其他试剂为国产分析纯。

3 目的基因的扩增

根据已知 Bla g 2 基因序列设计引物,上游引物为 5'-gactcgagaaaagagaggtgttcattgtacaattggtgcac-3', 下游引物为 5'-agtgcggccgcgacgctttctactgaacggcc-3', 为便于 PCR 产物的克隆和表达,分别在两引物的 5' 端引入 *Xho* I 和 *Not* I 的酶切位点(上海生工生物工程技术服务公司合成)。以含有 Bla g 2 基因的 pUCm-T-Bla g 2 质粒为模板进行 PCR,反应条件为:94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环,最后 72℃ 7 min。

4 pGAPZaA-Bla g 2 穿梭质粒的构建

将上述 PCR 扩增产物回收纯化,插入到 pMD18-T 载体,提取阳性克隆质粒,用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切后,回收目的片段,与经同样酶切的 pGAPZaA 片段

进行连接,再把连接产物转化 *E.coli* Top10,酶切鉴定后,送上海生工生物工程技术服务公司进行序列测定。

5 穿梭质粒转化酵母宿主菌

按 Invitrogen 试验手册所提供的方法,制备成感受态毕赤酵母菌 GS115,取出 80 μl 与 10 μg *Bsp* HI 酶切线性化的重组质粒 pGAPZaA-Bla g 2 混匀,以 Eppendorf 电转仪(Multiporator 4308,德国)于 2500 V 5 ms 条件下电转化,将菌液涂布于含 100 μg/ml 糖蛋白(Zeocin) 抗生素的胰蛋白胨酵母 (YPDS) 选择平板上,置 30℃ 培养 2~3 d,观察转化子的生长情况。

6 Bla g 2 重组子的 PCR 检测

将上述培养的单菌落接种于 10 ml YPD 培养液中,30℃ 培养过夜。用 3S spin DNA 提取试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司)提取毕赤酵母 DNA,以其为模板,用 5'-a-Factor 和 3'-AOX 1 引物进行 PCR 扩增,条件为:95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s, 共 30 个循环,最后 72℃ 10 min。

7 Bla g 2 重组蛋白的表达

接种单菌落于 10 ml YPD 培养基中,250 rpm/min 30℃ 培养过夜。次日取 50 μl 培养液加到 20 ml YPD 培养基中,250 rpm/min 30℃ 培养。分别培养 0、24、48、72 和 96 h,各取 1 ml 离心,取上清进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

8 Bla g 2 重组蛋白的纯化

取培养 3 d 的上清,加入 1/9 体积 100% 的三氯乙酸(TCA),冰上放置 1 h 后,4℃ 8000×g 离心 10 min,弃上清,用无水乙醇洗涤沉淀 2 次后,溶于 500 μl PBS,在快速蛋白液相色谱仪(FPLC,瑞典 Amersham 公司)上装好的琼脂糖凝胶(Hi-Trap)柱上,按常规上 Ni²⁺,用平衡缓冲液(PBS,10 mmol/L 咪唑,pH 8.0)平衡层析柱(3 个柱床体积),上样品,平衡至基线后,用洗脱液(PBS,200 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗脱,收集洗脱峰,对含目的蛋白的洗脱组分进行透析并分析其纯度。

9 表达产物的免疫活性测定

取 10 μl 纯化的重组蛋白 Bla g 2 进行 SDS-PAGE 电泳,同时用 20 μl 空载体转化菌诱导上清作对照,然后转移到硝酸纤维素膜上,转移条件为 0.25 A 1 h,以蟑螂过敏患者的阳性混合血清为一抗,生物素标记的鼠抗人 IgE 为二抗,进行蛋白质印迹(Western-

blotting)分析。

结 果

1 pGAPZaA-Bla g 2 穿梭质粒的构建与鉴定

PCR 扩增的 Bla g 2 基因片段的长度约为 1 000 bp, 与预计的大小(984 bp)相符。穿梭重组质粒 pGAPZaA-Bla g 2 经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切, 得到相应的片段, 表明目的基因已插入表达载体 pGAPZaA。经进一步测序表明序列及读码框均正确。

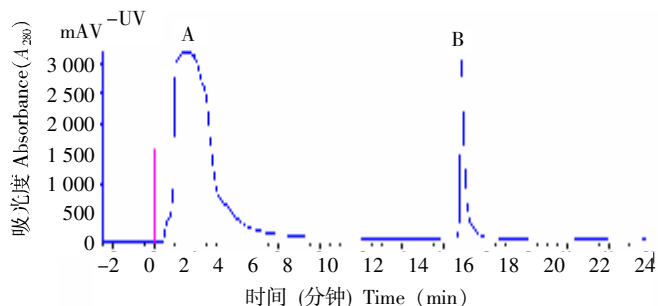
2 重组酵母的获得与鉴定

通过 Zeocin 压力筛选出来的重组子, 提取总 DNA, 经 PCR 进一步分析染色体整合情况。结果扩增得到约 1.4 kb 的条带 (图 1), 说明穿梭重组质粒 pGAPZaA-Bla g 2 已整合入 GS115 的基因组 DNA 中。

3 Bla g 2 重组蛋白的表达

用 SDS-PAGE 电泳对重组毕赤酵母的上清液进行分析, 结果显示在相对分子质量(*Mr*)45 000 处出现 1 条表达条带, 而用 pGAPZaA 空质粒转化毕赤酵母 (GS115) 的培养液上清则无此条带。同时对不同培养时间表达量的分析结果表明, 培养第 1 天即有表达产物出现, 但表达量较低, 随着表达时间的延长, 表达量也逐步增高, 到第 3 天达到高峰, 目的蛋白约占总蛋白的 50%。

4 Bla g 2 重组蛋白的纯化



左图: FPLC 纯化, A: 穿透峰, B: 200 mmol/L 咪唑洗脱峰;

右图: SDS-PAGE 分析纯化产物, M: 蛋白质标志物, 1: 纯化产物。

Left Fig: Elution profile, fraction, A: Breakthrough peak; fraction, B: 200 mmol/L imidazol elution peak;

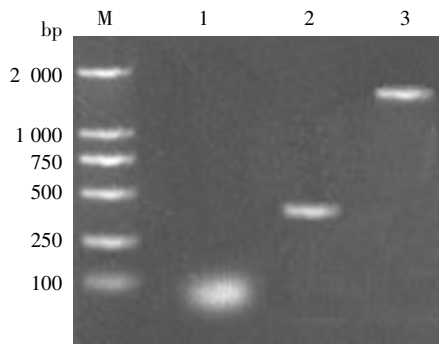
Right Fig: Coomassie-stained SDS gel, M: Protein marker, 1: Fraction B.

图 2 Bla g 2 重组蛋白的表达与纯化

Fig.2 FPLC purification of recombinant Bla g 2

讨 论

变态反应性疾病(如哮喘、过敏性鼻炎等)是临床



M: DNA 标志物 (DL 2000), 1: GS115, 2: 不含目的基因的空载体, 3: 重组 pGAPZaA-Bla g 2 穿梭质粒。

M: DNA marker (DL 2000), 1: GS115, 2: GS115 transformed with pGAPZaA, 3: GS115 transformed with pGAPZaA-Bla g 2.

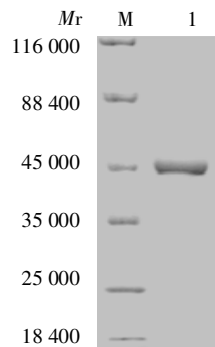
图 1 PCR 鉴定重组子

Fig.1 PCR detection of transformants

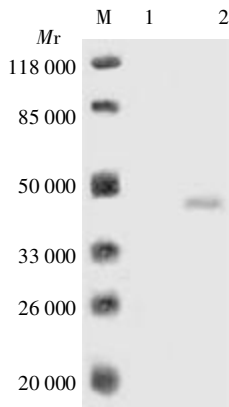
利用 Bla g 2 重组蛋白的 C 端 6 组氨酸标签, 采用 Ni²⁺亲和层析的方法纯化重组蛋白, 当用 200 mmol/L 的咪唑进行洗脱时, 可观察到一尖锐的峰型出现, 经 SDS-PAGE 分析, 目的蛋白主要集中在 B 峰 (图 2), 且纯度达到了 95%。

5 重组蛋白的免疫原性鉴定

用蟑螂过敏患者的混合血清作为一抗进行的 Western blotting 分析, 结果在约 *Mr* 45 000 处有一明显的识别条带, 而空载体转化菌诱导上清对照未见特异性条带(图 3), 说明 Bla g 2 重组蛋白具有良好的 IgE 结合活性。



常见病、多发病, 各国变态反应性疾病的总发病率已高达 10%~30%, 并有逐年增多的趋势^[6]。在引起过敏性疾病众多的变应原当中, 蟑螂是主要的吸入性变



M: 蛋白质标志物, 1: GS115/ pGAPZaA 上清, 2: GS115/ pGAPZaA-Bla g 2 上清。

M: Protein marker, 1: Supernatant of GS115/pGAPZaA, 2: Supernatant of GS115/pGAPZaA-Bla g 2.

图 3 pGAPZaA-Bla g 2 重组变应原的 Western blotting 分析
Fig.3 Western blotting analysis of pGAPZaA-Bla g 2 expressed product

应原之一。目前,临床上对蟑螂过敏患者进行体内外诊断和特异性免疫治疗时,仍广泛使用蟑螂粗浸液,但粗浸液中含有大量非致敏组分,稳定性差,难以标准化。近 20 年随着分子生物学技术的飞速发展,基因工程技术已广泛地应用于多种变应原的研究,并取得了一系列进展。有研究证实,有三级结构的重组变应原的疗效和安全性与天然变应原类似^[7,8]。

成熟 Bla g 2 蛋白为 Mr 36 000, 包含 328 个氨基酸残基,序列分析揭示与天冬氨酸蛋白酶同源。但它引发 IgE 合成的能力与其酶活性无关。作者等曾在大肠埃希菌中进行了 Bla g 2 原核表达,尽管产物具有良好的过敏性,但 Bla g 2 存在 11 个半胱氨酸和 3 个糖基化位点,原核表达产物复性较为困难,并且大肠埃希菌细胞壁的脂多糖为内毒素原,不利于大规模的开发利用。真核表达系统能对蛋白进行加工修饰,维持其三级构象。因此,过敏原基因克隆过程中,全长编码序列的获得并采用真核表达系统是获取重组过敏原较好途径的趋势^[9]。毕赤酵母作为新近发展起来的表达宿主,具有发酵后分泌的上清液中杂蛋白少、可以高密度发酵、不存在内毒素和遗传学稳定等优点,其分泌表达的特点又有利于表达那些含二硫键多、翻译后需要正确折叠成有生物活性形式的蛋白质。针对 Bla g 2 的特点,本研究首次在毕氏酵母中分泌表达了 Bla g 2 变应原。

pGAP 是组成型表达系统,整个生产过程中只需

用到 YPD 培养液,无需甲醇进行诱导,极为便利。本研究在设计时,使重组蛋白的 N 端融合有 a-Factor 信号肽,导致该蛋白被分泌到培养液中,信号肽随后被切除,形成了天然的氨基端。同时为了方便蛋白的纯化,把该蛋白的 C 端与 pGAPZaA 载体的 myc 肽段及 6HIS 融合(增加了约 4 000 个碱基)。重组蛋白 Bla g 2 的氨基酸序列存在 3 个 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr),毕赤酵母对它们糖基化后会使得蛋白相对分子质量有所增加,约比实际值大 9 000。利用 6 组氨酸标签,采用 Ni²⁺亲和层析柱对表达产物进行初步纯化,纯化后的目的蛋白的纯度达到 90%,可基本满足过激性疾病诊断的要求。

I 型变态反应是 IgE 介导的过敏反应,结合在肥大细胞或嗜碱粒细胞表面的 IgE 经变应原交联后将导致致敏靶细胞脱颗粒,释放出诸如组胺、白三烯等生物活性介质,引起相应的临床症状(如过敏性休克、过敏性鼻炎和哮喘等)^[10],因此与 IgE 抗体的结合能力是变应原的重要特征之一。本研究 Western blotting 结果显示重组 Bla g 2 变应原能较好地与蟑螂过敏患者特异性 IgE 结合。因此,该重组变应原可用于蟑螂变态反应性疾病的特异性诊断及免疫治疗。

参 考 文 献

- [1] Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106: 409-418.
- [2] Arruda LK, Vailes LD, Ferriani PL, et al. Cockroach allergens and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107: 419-428.
- [3] Patterson ML, Slater JE. Characterization and comparison of commercially available German and American cockroach allergen extracts [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 721-727.
- [4] Arruda K, Vailes LD, Mann BJ, et al. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2[J]. Biol Chem, 1995, 270:19563-19568.
- [5] Pomes A, Chapman MD, Vailes LD, et al. Cockroach allergen Bla g 2 structure, function, and implications for allergic sensitization [J]. Am J Respirat Critical Care Med, 2002, 165: 391-395.
- [6] Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma[J]. Nature, 1999, 402: B2-B4.
- [7] Platts-Mills TA, Chapman MD. Allergen standardization[J]. J Allergy Clin Immunol, 1991, 87: 621-625.
- [8] Rolland JM, O'Hehir RE. Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies[J]. Allergo Int, 2002, 51: 221-231.
- [9] Stewart GA, Robinson C. The immunobiology of allergenic peptidases[J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33: 326.
- [10] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis[J]. Science, 1994, 265: 1237-1240.

(收稿日期: 2006-08-07 编辑:盛慧锋)