

# 粉尘螨变应原第1组分原核表达质粒 pCold-TF-Der f 1 构建及鉴定

杨李, 周鹰, 王运刚, 马桂芳, 孙金霞, 崔玉宝

盐城卫生职业技术学院医学检验技术教研室, 江苏 盐城 224006

**摘要:** **目的** 建立粉尘螨变应原第1组分全长基因原核表达质粒pCold-TF-Der f 1。**方法** 以质粒pET-28a(+)-Der f 1为模板扩增目的基因Der f 1, 克隆至pCold-TF DNA载体, 转化大肠埃希菌BL21, IPTG诱导表达并用SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)和蛋白印迹法(Western blotting, WB)验证产物。**结果** PCR扩增获得Der f 1编码全长基因, 成功构建表达质粒pCold-TF-Der f 1, SDS-PAGE和WB验证表明该质粒在大肠埃希菌中正常表达, 且基本为可溶性表达。**结论** 成功建立尘螨变应原原核表达质粒pCold-TF-Der f 1, 并成功实现其原核表达, 为进一步生产基因工程变应原提供基础依据。

**关键词:** 尘螨变应原; 基因重组; 原核表达

**中图分类号:** R384.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2012)04-0289-03

## Construction and identification of prokaryotic expression plasmid pCold-TF-Der f 1 for the dust mite allergen Der f 1

YANG Li, ZHOU Ying, WANG Yun-gang, MA Gui-fang, SUN Jin-xia, CUI Yu-bao

Department of Clinical Laboratory, Yancheng Health Vocational & Technical College, Yancheng 224006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: CUI Yu-bao, Email: ybcui1975@hotmail.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30660166, NSFC81001330), Scientific Development Plan of Yancheng City (No. YK2008079), Jiangsu Provincial Health Department (No. Z200914), Jiangsu Provincial Health Department (No. J200907), and "Six Adults Just" High Peak, Personal Department of Jiangsu Province

**Abstract: Objective** To construct prokaryotic expression plasmid pCold-TF-Der f 1 for the dust mite allergen Der f 1. **Methods** The Der f 1 gene in full length was amplified from pET-28a(+)-Der f 1 plasmid and cloned to the vector pCold-TF-DNA, with the recombinants then transferred into *Escherichia coli* BL21. The genetically engineered bacteria with pCold-TF-Der f 1 plasmids were induced by IPTG and the expressed products were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The Der f 1 gene was acquired by PCR, with pCold-TF-Der f 1 successfully constructed, and expressed in *E. coli*, which was indicated SDS-PAGE and western blotting. **Conclusion** The prokaryotic expression plasmid pCold-TF-Der f 1, which contain Der f 1 gene fragment of *Dermatophagoides farinae*, can be successfully constructed with its expression in *E. coli* BL21 accomplished.

**Key words:** Dust mite allergen; Gene recombination; Prokaryotic expression

尘螨是一种强烈的变应原,与过敏性哮喘、过敏性鼻炎及过敏性湿疹等关系密切<sup>[1]</sup>。国际免疫联合会已公布的尘螨变应原有23种之多<sup>[2]</sup>,因此临床采用粗提浸液诊治螨类过敏性疾病安全性较低,难以标准化<sup>[3]</sup>,而采用生物化学方法提纯尘螨变应原耗时长,过程繁琐,成本较高,且不能从根本上提高变应原的纯度问题<sup>[4]</sup>。其中第1组分Der f 1被认为是引起变态反应性

疾病最重要的变应原<sup>[5]</sup>,因而制备基因工程变应原对螨类过敏疾病的临床诊治有重要意义<sup>[4,6]</sup>。我们以往采用pET28a为载体构建了粉尘螨第1组分原核表达体系,但表达获得的蛋白质为包涵体<sup>[7]</sup>。此次研究采用高效表达体系pCold建立尘螨变应原原核表达质粒,并在大肠埃希菌中表达获得可溶性产物,为进一步生产基因工程变应原用于尘螨变应原性疾病的临床诊治提供了基础依据,结果报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 笔者已构建的质粒pET-28a(+)-Der f 1。BamH I/Xho I、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A)、PrimeSTAR® HS DNA

**基金项目:** 国家自然科学基金(30660166, NSFC81001330); 盐城市科技发展计划项目(YK2008079); 江苏省卫生厅招标课题(Z200914); 江苏省卫生职业技术教育研究立项课题(J200907); 江苏省“六大人才高峰”第六批项目

**作者简介:** 杨李(1986-),女,助教,主要从事病原生物学研究。

Email: wendyangli@qq.com

**通讯作者:** 崔玉宝, Email: ybcui1975@hotmail.com

Polymerase (Code No. DR010S)、pCold-TF DNA 载体 (TaKaRa Code No. D3365)、In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Code No. 639619)、*Escherichia coli* Competent Cell JM109 (Code No. D9052)、DNA Ligation Kit (Mighty Mix) (Code No. D6023)、protein Marker, 均购自宝生物工程(大连)有限公司; *E. coli* BL21(DE3) Stratagene 公司生产; Perfect Protein Marker 由 Novagen 公司生产; Precision Plus Protein Standards 购自 BIO-RAD 公司; True blue PEROXIDASE Substrate 由 Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL, Gaithersburg, MD) 提供; Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Code No. D9030A)、PVDF 膜、Western blotting (WB) 膜封闭液、CBB-R250 染色液, 购自天根生化科技(北京)有限公司, Penta-His Antibody 为 Qiagen 公司生产, 辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG (HRP-Rabbit Anti-mouse IgG) 为 Zymed Laboratories 生产, 其他化学试剂均为国产分析纯售品。

1.2 尘螨变应原第 1 组分 Der f 1 编码基因扩增 参考 GenBank AB034946 公布的 Der f 1 核酸序列设计引物, 加入 BamH I / Xho I 酶切位点, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。上游引物: 5'-GTA CCC TCG AGG GAT CCA TGA AAT TCG TTT TGG CCA T-3', 下游引物: 5'-AAT TCG GAT CCC TCG AGT CAC ATG ATT ACA ACA TAT G-3'。以笔者保存的质粒 pET-28a(+)-Der f 1 为模板扩增 Der f 1 全长基因, PCR 反应总体积为 50 μl, 包括质粒 pET-28a(+)-Der f 1 (100 倍稀释液) 1 μl、5 × PrimeSTAR buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 10 μl、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μl、上下游引物各 0.5 μl、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl、dH<sub>2</sub>O 33.5 μl, 置 PCR 仪上, 98 °C 10 s、55 °C 5 s、72 °C 1 min 条件下运行 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A) 切胶回收获得目的基因。

1.3 克隆质粒 pCold-TF-Der f 1 构建与测序验证 用 BamH I / Xho I 酶切 pCold-TF DNA 载体 (TaKaRa Code No. D3365), 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A) 切胶回收即得目的载体片段, 50 μl 的酶切反应体系包括 pCold-TF DNA 2 μl、10 × K buffer 5 μl、BamH I (10 U/μl) 1.5 μl、Xho I (10 U/μl) 1.5 μl、dH<sub>2</sub>O 40 μl, 37 °C 反应 4 h。使用 In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Code No. 639619) 将目的基因与载体片段连接, 反应体系为 1 μl 目的基因 (约 80 ng/μl)、1 μl 目的载体片段 (约 50 ng/μl)、2 μl 5 × In-Fusion Reaction buffer、1 μl In-Fusion Enzyme、5 μl dH<sub>2</sub>O, 反应条件 37 °C 水浴

15 min、50 °C 水浴 15 min, 取连接产物 1 μl 热转化至 *E. coli* Competent Cell JM109 (Code No. D9052) 中, 涂布平板, 37 °C 过夜培养。挑取阳性克隆, 提取质粒, 委托宝生物工程(大连)有限公司测序。测序用上游引物: 5'-GCG GGT CTG GAA GTT CTG TT-3', 下游引物: 5'-CCA AAT GGC AGG GAT CTT AG-3'。

1.4 质粒 pCold-TF-Der f 1 诱导表达及 SDS-PAGE (十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 验证 取 0.5 μl 质粒 pCold-TF-Der f 1 转化到 BL21 中, 使用 LB/抗生素 Amp (100 μg/ml) 平板, 10 μl 转化液涂布, 37 °C 过夜培养后, 挑取单菌落至 2 ml LB/Amp (100 μg/ml) 培养基中, 37 °C 过夜进行种培养。在 Glass tube 中添加 6 ml LB/Amp (100 μg/ml) 培养基, 添加种培养菌液 120 μl, 37 °C 主培养至 A600 nm 值约为 0.55~0.65 后 15 °C 放置 15 min。再添加 100 mmol/L IPTG 60 μl (final 1 mmol/L IPTG) 进行诱导, 15 °C 培养 24 h。集菌后 1.0 A 相当的菌体加入 160 μl PBS 悬浊后进行超声波破碎, 将菌体破碎液置 13 600 × g 离心 5 min, 取全蛋白、上清, 沉淀各 8 μl, 加入 2 μl 5 × SDS Loading buffer, 95 °C 加热 10 min, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE, 结束后用 CBB-R250 染色。pCold-TF 空白载体同步操作, 为对照。

1.5 WB 验证蛋白表达 按上述方法进行 SDS-PAGE。将 PVDF 膜、滤纸分别剪切成与凝胶相同大小, 使用转膜缓冲液处理后, 按滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸的顺序依次放在转膜仪电极板之间, 将蛋白转至 PVDF 膜, 转膜仪参数设置为电流 51 mA, 转印时间 90 min。将 PVDF 膜置于含 1.5% BSA 的 10 ml Blocking buffer 中, 4 °C 平放过夜封闭。使用稀释后 Penta-His Antibody 溶液 5 ml 进行一次抗体反应 1 h。TBST 缓冲液 20 ml 洗涤 2 次、TBS 缓冲液洗涤 3 次, 使用稀释后 HRP-Rabbit Anti-mouse IgG 抗体溶液 5 ml 进行二次抗体反应 1 h, TBST 缓冲液 20 ml 洗涤 2 次、TBS 缓冲液冲洗 3 次后, 1 ml 底物显色 1 min。

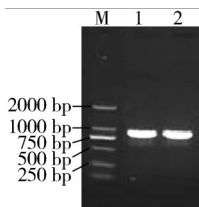
## 2 结果

2.1 表达质粒 pCold-TF-Der f 1 的构建 以 pET-28a (+)-Der f 1 为模板, PCR 扩增 Der f 1 编码基因, 取 5 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1), 切胶回收得 Der f 1 基因片段。用 BamH I / Xho I 酶切 pCold-TF DNA, 切胶回收即得目的载体片段 (图 2)。将 Der f 1 与载体片段连接, 构建得质粒 pCold-TF-Der f 1, 委托宝生物工程(大连)有限公司测序, 结果与预期一致。

2.2 质粒 pCold-TF-Der f 1 原核表达及产物验证 取 0.5 μl 质粒 pCold-TF-Der f 1 转入 BL21 中, 取 10 μl 转化液涂布 LB/抗生素 (含 100 μg/ml 氨苄青霉素) 平板,

挑取单菌落进行种培养至 A600 nm 为 0.61 时添加 IPTG 进行诱导,培养至 A600 nm 为 1.35 时进行集菌,超声波破碎、离心提取蛋白质,SDS-PAGE 有目的蛋白

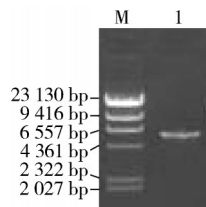
表达,且基本为可溶性表达(图 3A)。pCold-TF DNA 表达的蛋白分子质量为  $55 \times 10^3$ ,插入基因分子质量约为  $34 \times 10^3$ ,与预期结果一致(图 3B)。



注: M. DL 2000 DNA Marker; 1、2. PCR 产物。

图 1 目的基因 Der f 1 扩增电泳图

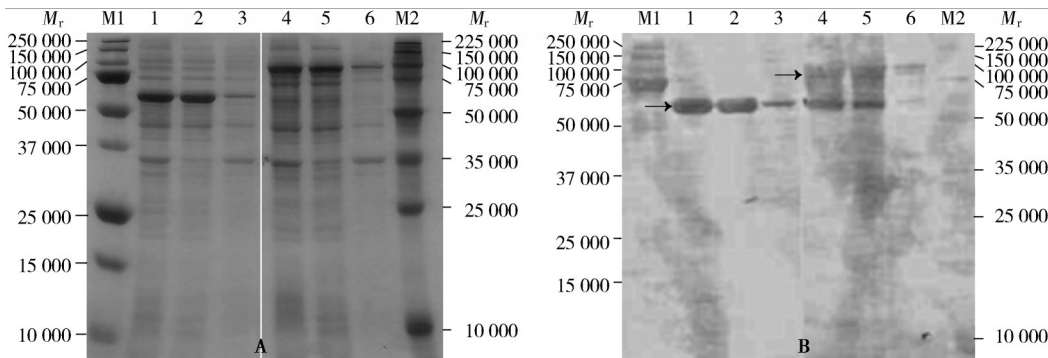
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of the group 1 allergen of *Dermatophagoides farinae*



注: M.  $\lambda$ -Hind III DNA Marker; 1. BamHI/Xho I 酶切 pCold-TF-Der f 1 结果。

图 2 pCold-TF 酶切电泳图

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of the recombinant plasmids pCold-TF-Der f 1



注: A. SDS-PAGE; B. WB; M1. precision plus protein standards; 1. 含 pCold-TF 的 BL21 全细胞; 2. 含 pCold-TF 的 BL21 上清; 3. 含 pCold-TF 的 BL21 沉淀; 4. 含 pCold-TF-Der f 1 的 BL21 全细胞; 5. 含 pCold-TF-Der f 1 的 BL21 上清; 6. 含 pCold-TF-Der f 1 的 BL21 沉淀; M2. perfect protein Marker。

图 3 质粒 pCold-TF-Der f 1 在 BL21 中的表达及验证

Fig. 3 Expression and verification of pCold-TF-Der f 1 in BL21 cells

### 3 讨论

大肠埃希菌表达系统是一种最简单的外源表达系统,其优点是遗传背景比较清楚,表达水平较稳定、易操作<sup>[8]</sup>。在以往的研究中成功构建了 pET-28a(+)-Der f 1 表达质粒,转化 *E. coli* BL21 表达,SDS-PAGE 电泳显示 pET-28a(+)-Der f 1 基因正常表达,但表达为包涵体<sup>[7]</sup>。本研究从原核表达质粒 pET-28a(+)-Der f 1 扩增获得 Der f 1 基因,将其克隆至 pCold-TF DNA 载体中,并导入大肠埃希菌内表达,SDS-PAGE 电泳及 WB 验证其成功表达,插入基因分子质量约为  $34 \times 10^3$ ,与以往报道一致<sup>[7]</sup>。含 pCold-TF 的 BL21 细菌上清及 pCold-TF-Der f 1 的 BL21 细菌上清均出现一条清晰的蛋白带,提示二者均为可溶性表达。

本研究采用的 pCold-TF DNA 为重组质粒载体,由于 pCold-TF DNA 带有可溶性标签 Trigger Factor(TF),能促使融合蛋白最大限度地以可溶形式存在<sup>[9]</sup>,提高目的蛋白质的可溶性。

综上所述,本研究成功获取了质粒 pCold-TF-Der f 1,并实现其原核表达。为进一步生产基因工程变应原提供了基础依据,对深入开展螨类变态反应性疾病的预

防诊断均具有重要的指导意义。

### 参考文献

- [1] 甘明,何嵩,李卓雅,等. 粉尘螨主要变应原 Der f 1 基因的改造与可溶性表达[J]. 热带医学杂志,2008,8(6):521-524.
- [2] Cui YB, Zhou Y, Shi W, et al. Molecular cloning, expression, sequence analyses of dust mite allergen Der f 6 and its ige-binding reactivity with mite allergic asthma patients in southeast China [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2):961-968.
- [3] 崔玉宝,周鹏,彭明,等. 尘螨变应原 Der f 1 全序列的原核表达及生物信息学分析[J]. 四川动物,2008,27(1):37-43.
- [4] Thomas WR, Smith WA, Hales BJ. The allergenic specificities of the house dust mite[J]. Chang Gung Med J, 2004, 27(8):563-569.
- [5] 彭江龙,崔玉宝,王华民,等. 尘螨变应原 Der f 1 植物表达载体的构建及表达[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(3):250-253.
- [6] Chua KY, Cheong N, Kuo IC, et al. The *Blomia tropicalis* allergens [J]. Protein Peptide Letters, 2007, 14(4):325-333.
- [7] Cui YB, Zhou P, Peng JL, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen, Der f 1, in *Escherichia coli* [J]. Braz J Med Biol Res, 2008, 41(5):380-388.
- [8] 胡友莹,周鹰,杨李,等. 粉尘螨变应原第 2 组分基因的原核表达及生物信息学分析[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(6):533-539.
- [9] Yin X, Liu LL, Jia Y, et al. Expression and biological function analysis of chicken aminopeptidase N [J]. Chin J Biotech, 2010, 26(4):470-475.

收稿日期:2012-02-20