

尘螨变应原 Der f1 真核表达载体的构建及转染 CHO 细胞 *

彭江龙¹ 崔玉宝² 钱士匀¹ 裴 华¹ 陈年根¹ 黄幼生¹

(1 海南医学院 海南 海口 571101 2 盐城卫生职业技术学院 江苏 盐城 224006)

摘要 目的 构建尘螨变应原 Der f1 真核表达载体 转染真核细胞并进行蛋白表达。方法 根据 Genebank 中 Der f1 基因的核酸序列 (AB034946), 设计引物, 采用 PCR 法, 从保存的 JM109 工程菌中扩增 Der f1 编码基因, 克隆到真核表达质粒 pcDNA3.1/myc-his A 上, 以脂质体法转染 CHO 细胞 经 G418 筛选 进行稳定表达细胞株的筛选和鉴定。结果 将目的基因 Der f1 成功连接到 pcDNA3.1/myc-hisA-Derf1 并转染 CHO 细胞 获得稳定表达的 CHO 细胞株。结论 成功构建了尘螨变应原 Der f1 真核表达载体,并转染 CHO 细胞表达蛋白质。

关键词 尘螨 ;Der f1 基因 ;真核转染 ;CHO 细胞

中图分类号 :R384.4 ,R392.8 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)14-2612-03

Construction of Eukaryotic Vector of Derf1 Gene of Dermatophagoides Farinae and Transfection of CHO Cells*

PENG Jiang-long¹, CUI Yu-bao², QIAN Shi-yun¹, PEI Hua¹, CHEN Nian-gen¹, HUANG You-sheng¹, HUANG Mian-qing¹

(1 Hainan Medical College, Haikou 571101, China; 2 Yancheng Health Vocational & Technical College, Yancheng 224006, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expressing vector of derf1 gene of dermatophagoides farinae, and transfect CHO cells for protein expression. **Methods:** According to the Genebank nucleic acid sequences of Derf1 (No.AB034946), designed primers, amplified the Der f1 gene from the preservative engineering bacteria JM109 by PCR, then cloned it into plasmid pcDNA3.1/myc-his A; and then transfected the plasmid into CHO cells by liposomes and screening the positive cell clone use G418 to express the protein of Derf1 gene. **Results:** The Derf1 gene was connected to plasmid pcDNA3.1/myc-hisA and screening into CHO eukaryotic expression cells successfully. **Conclusions:** The eukaryotic expression vector of Derf1 was constructed well and got its protein.

Key words: Dermatophagoides Farinae; Der f1 gene; Eukaryotic transfection; CHO cell

Chinese Library Classification: R384.4, R392.8 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)14-2612-03

前言

尘螨体积微小 ,广泛存在于人类生活和工作环境中 ,其排泄物、螨体及螨的代谢物均含变应原,过敏体质者吸入后,可诱发 型变态反应,从而引起哮喘、过敏性鼻炎、异位性皮炎和荨麻疹等多种变态反应性疾病^[1]。

目前 临床主要采用粉尘螨变应原粗提浸液免疫治疗哮喘患者 ,由于变应原浸液包含成分较复杂如存在变应原、非过敏性或毒性蛋白及其它成分 ,所以很难进行变应原标准化 ,且在治疗中长期使用易导致红晕、肿胀、硬结、坏死等局部反应和休克、喉头水肿、支气管痉挛、荨麻疹等全身反应^[2,3]。因此 ,提高变应原纯度是减少免疫治疗副反应发生的有效途径。随着分子生物学技术的发展和成熟 ,研制基因工程变应原成为变态反应学研究的主流。本研究拟构建尘螨变应原 Der f1 真核表达载体 ,并转染 CHO 细胞进行真核表达。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

尘螨变应原 Derf1 基因来自课题组保存的 JM109 工程菌

(含质粒 pMD19-T 载体 ,连接有 Derf1 基因)。PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase , 内切酶 Bam H 、Xho ,DNA Ligation Kit Ver.2.0 ,凝胶回收试剂盒 ,均购自日本宝生物公司(Takara) ;质粒 PcDNA3.1/myc-hisA 购自 invitrogen 公司 ;DH5α 感受态细胞购自 TIANGEN 公司。1640 培养基、小牛血清为 GIBCO 公司 ,Lipofectamine 转染试剂购自上海生工 ,G418 为 SIGMA 公司。

1.2 方法

1.2.1 Derf1 克隆与连接 从 pMD19-T 克隆 Derf1 至 pcDNA3.1/myc-hisA ,连接成 pcDNA3.1/myc-hisA-Derf1 。

①设计引物。上游引物 5' 端加上 BamH (GGATCC)酶切位点、保护碱基 CGC、kozak 序列 GGCCACC ,序列如下 :5'-CGCGGATCCAGGCCACCATGAAATTCGTTTGGCCAT-TGTCT-3' ;下游引物 5' 端加上 Xho (CTCGAG)酶切位点、保护碱基 GCGCCG ,序列如下 :5'-GCGCCGCTCGAGTCACAT-GATTACAACATATGGATATTGT-3'。②JM109 工程菌复苏、增菌培养 ,提取质粒 pMD19-T。以 pMD19-T 为模板 ,扩增 Derf1 目的基因。PCR 的反应体系 :总体积为 50μl :5× Buffer 10 μl、dNTP MIX4 μl、上游引物 1 μl、下游引物 1 μl、模板(50

* 基金项目 国家自然科学基金(30860261)

作者简介 彭江龙(1972-) 男 ,硕士 ,讲师 ,主要从事病原生物学与变态反应性疾病的研究 ,E-mail:37584476@163.com

(收稿日期 2011-03-21 接受日期 2011-04-17)

倍稀释)2 μ l、酶 0.5 μ l、灭菌水 31.5 μ l ;反应条件 94 $^{\circ}$ C 5 min、在 98 $^{\circ}$ C 10s、58 $^{\circ}$ C 15s、72 $^{\circ}$ C 1min 的条件下 30 循环、72 $^{\circ}$ C 10 min。③PCR 产物全量进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,切出 Derf 1 的目的基因条带回收纯化目的基因。④pcDNA3.1/myc-hisA 转化 DH5 α 涂板,氨苄青霉素(Amp)抗性,培养过夜,挑菌,摇菌过夜,提取质粒。⑤目的基因回收产物 Bamh /Xho 双酶切,电泳,切胶回收 pcDNA3.1/myc-his 以 Bamh /Xho 双酶切,电泳切胶回收。将上述回收产物以 DNA Ligation 连接酶连接 Derf1 和 pcDNA3.1/myc-hisA。

1.2.2 转化与验证 pcDNA3.1/myc-his -Derf1 热转化至 DH5 α , 氨苄青霉素筛选,阳性克隆摇菌,提取质粒 pcDNA3.1/myc-his -Derf1 Bamh /Xho 双酶切,电泳验证。质粒 pcDNA3.1/myc-his -Derf1 送测序。

1.2.3 表达质粒 pcDNA3.1/myc-hisA-Derf1 转染 CHO 细胞 复苏细胞,待长至 85%以上时,转至 24 孔培养板,继续培养 24h 至细胞生长达 90%左右密度,将转染试剂和质粒混和作用 15min,加入无血清培养细胞,进行细胞转染,培养 8h 后,改为有血清培养基,再培养 48h,弃去上清,加入含 400 μ g/ml G418 的培养基进行筛选,两周后换以 200 μ g/ml G418 的培养基进行维持培养。待形成阳性克隆后转移至 24 孔板传代培养。

1.2.4 Derf1 转染 CHO 真核表达产物的检测 将转染后的阳性

细胞克隆用无血清培养基培养 1 周,吸取上清离心,以 SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维薄膜,以 His 鼠单克隆抗体(1:5000,上样 20 μ g)进行 Western-blotting 检测表达产物。

2 结果

2.1 Derf 1 目的基因的扩增

以质粒 pMD19-T 为模板,PCR 扩增 Derf 1 目的基因,取 5 μ l 电泳,如图 1 所示。

2.2 双酶切验证

用 BamH I 和 Xho I 双酶切质粒 pcDNA3.1/myc-his -Derf1,琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2 所示,获得与预期相符的结果。

2.3 目的基因测序

将构建好的质粒 pcDNA3.1/myc-hisA-Derf1 送测序,目的基因碱基序列与参考序列(Genebank AB034946)完全一致,见图 3。

2.4 Western-blotting 法检测目的基因表达产物

以 Western-blotting 检测 Derf1 转染 CHO 真核表达产物,约 36KD 处可见明显的免疫杂交条带,提示转染基因有稳定表达,见图 4。

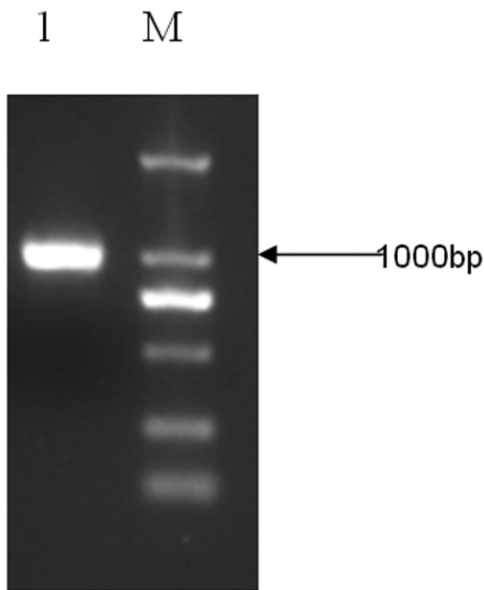


图 1:尘螨变应原 Derf1 经 PCR 扩增后回收纯化后的基因产物电泳图
(M :DL2000 DNA Marker ;1 :Derf1 基因)

Figure 1. The electropherogram after amplified by PCR and purified of Derf1 gene (M: DL2000 DNA Marker; 1: Derf1 gene)

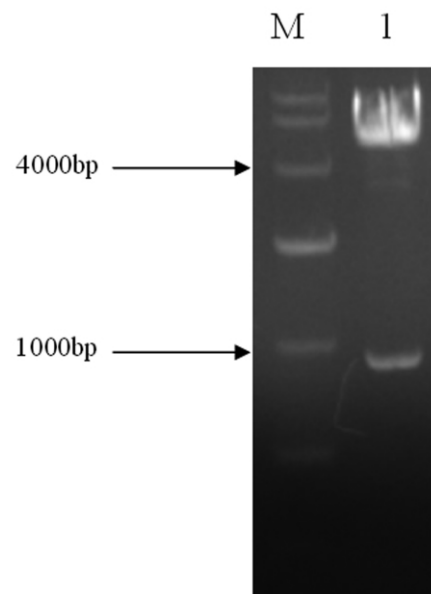


图 2 质粒 pcDNA3.1/myc-hisA -Derf1 的 Bamh /Xho 双酶切电泳
(M :DL10000 DNA Marker ;1 :双酶切产物)

Figure 2 The electropherogram of plasmid pcDNA3.1/myc-hisA-Derf1 after digested by restriction enzyme Bamh and Xho
(M: DL10000 DNA Marker; 1: product)

3 讨论

尘螨隶属于节肢动物门(Arthropoda)、蛛形纲(Arachnida)、蜱螨亚纲(Acarina),广泛存在于人类生活和工作环境中,其分泌物、排泄物、代谢物及螨体均有较强的变应原性。尘螨变应原成份十分复杂,约含 30 种以上,其中第一组分和第二组分被认为是最主要的变应原,是结合 IgE 的主要成分,具有半胱氨酸

蛋白酶和溶菌酶活性,是目前研究最多的主要变应原^[4,5]。尘螨变应原进入人体后,可引起过敏性哮喘、过敏性鼻炎、特异性皮炎及过敏性荨麻疹等多种变态反应性疾病。《哮喘全球防治策略》指出,哮喘每年造成的直接或间接损失超过 100 亿美元^[6]。而近年来随着环境污染的加重,由于尘螨变应原导致的过敏性变态反应疾病发病率越加严重,据报道可知,目前全国过敏性鼻炎跟十五年前相比增加了四成^[7]。

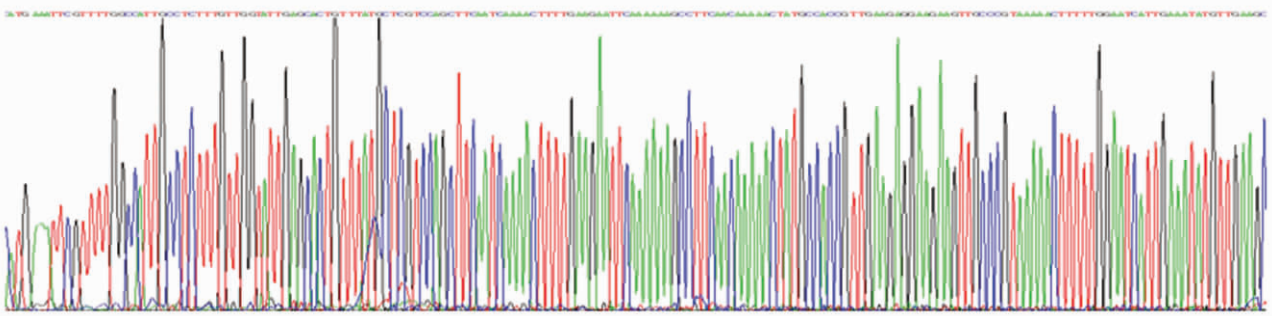


图3 目的基因 Derf1 的测序图(部分)
Figure 3 The sequencing map of Derf1 gene (part)

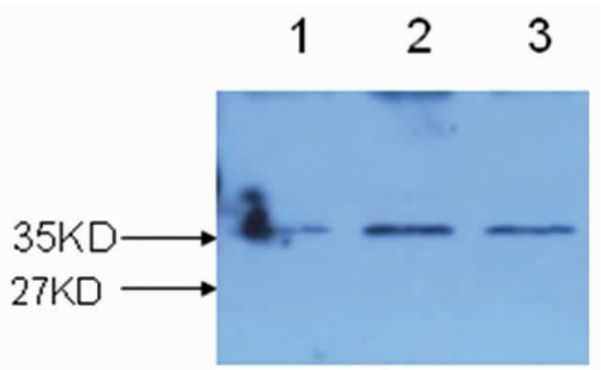


图4 Derf1 的 Western-blotting 蛋白分析结果(1、2、3 为 Derf1 的 CHO 细胞株)
Figure 4 Western-blotting of Derf1 (1,2,3 was CHO cell line of Derf1)

目前,临床对于尘螨变应原性疾病多采用变应原特异性免疫治疗,也是迄今唯一的病因治疗方法,即采用尘螨变应原粗提浸液进行脱敏治疗,以提高患者对尘螨性变应原的免疫耐受,从而减轻过敏反应的严重程度^[8]。1997年WHO建议将变应原浸液改称为变应原疫苗(allergen vaccine),并在《WHO有关免疫治疗的指导文件》(1998)指出,鼓励应用和发展标准化的变应原疫苗,成功的免疫治疗取决于高质量的变应原疫苗^[9]。尘螨粗提浸液成份复杂,不但难以标准化,而且易产生严重的过敏反应,免疫治疗中容易出现副反应,因此,加强尘螨变应原性疾病相关的重组变应原的研究,对于研究其发病机制、治疗和防治等是十分必要的^[10]。研究表明,通过基因工程技术获得纯化的重组变应原在可替代传统的天然变应原浸液,基因工程技术通过减少重组变应原 IgE 结合的抗原表位,能有效地降低 IgE 介导的过敏反应,同时通过保留变应原 T 细胞识别所必须的结构域,因而具有较好的免疫原性,减少免疫治疗的危险性,提高脱敏治疗的效果^[11,12]。

尘螨主要变应原的原核表达已有报道,但是其表达产物的免疫效果并不理想,抗原性远远低于天然变应原,如屋尘螨变应原第1组分原核表达产物与哮喘患者血清 IgE 的结合力仅为天然变应原的 50%^[13,14]。推测可能是此重组变应原为原核表达产物,而尘螨是真核生物,原核表达不具有表达后的蛋白质修饰等功能,也可能是原核表达产物成分单一,缺少调节性佐剂成分,因而免疫效果并不理想^[15,16]。因此,我们采用基因克隆方法,将尘螨主要变应原 Derf1 连接至真核表达载体 pcDNA3.1/myc-hisA 质粒,成功构建了真核表达载体,并转染

CHO 真核细胞进行蛋白表达。我们在引物设计中,引入 kozak 序列 GGCCACC 以利于蛋白表达,并借助于真核表达质粒 pcDNA3.1/myc-hisA 上的 His 标签,用于蛋白检测和之后的蛋白纯化。从 western-blotting 检测图可见,所检测的三株转染后的 CHO 细胞株均有蛋白表达,其分子量大约为 36KD 左右,与理论推测的目的基因表达产物分子量相吻合。

参考文献(Reference)

[1] 许金鹏,李朝品.屋尘螨和粉尘螨 类变应原研究进展[J].中国媒介生物学及控制杂志,2009,20(5):494-496

[2] Dinakar C, Portnoy JM. Allergen Immunotherapy in the prevention asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004, 4(2):131-136

[3] Jody R. Tversky, Anja P. Bieneman, Kristin L. Chichester, et al. Subcutaneous Allergen Immunotherapy Restores Human Dendritic Cell Innate Immune Function[J]. Clin Exp Allergy,2010, 40(1): 94-102

[4] 胡传翠,李朝品.尘螨与变应性疾病的研究进展[J].医学综述,2009; 15(7):1054-1056

[5] Janneane F. Gent, Kathleen Belanger, Elizabeth W. Triche, et al. Association of pediatric asthma severity with exposure to common household dust allergens. Environmental Research, 2009;109(6):768-774

[6] NHLBI workshop report. Global strategy for asthma management and prevention[M]. New York: NIH Publication, 2006; 36-59

[7] Paivi M. Salo, Jiang Xia, C. Anderson Johnson, et al. Indoor allergens, asthma, and asthma-related symptoms among adolescents in Wuhan, China[J]. Ann Epidemiol, 2004, 14(8): 543-550

[8] Marjolein P de Vries, Lisette van den Bemt, Karen Aretz, et al. House dust mite allergen avoidance and self-management in allergic patients with asthma: randomised controlled trial[J]. Br J Gen Pract, 2007; 57 (536): 184-190

[9] Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases[J]. Allergy, 1998;53(suppl):1-42

[10] Kawamoto S, Suzuki T, Aki T, et al. Der f 16: a novel gel-solin2related molecule identified as an allergen from the house dust mite, Dermatophagoides farinae [J]. FEBS Letters, 2002, 516: 234-238

[11] 李国平,刘志刚,钟南山.支气管哮喘特异性免疫治疗与变应原疫苗的研究进展[J].国外医学呼吸系统分册,2004;24(1):34-37

[12] Maksymilian Chruszcz, Martin D. Chapman, Lisa D. Vailes, et al. Crystal structures of mite allergens Der f 1 and Der p 1 reveal differences in surface exposed residues that may influence antibody binding [J]. J Mol Biol,2009; 386(2): 520-530

(下转第 2649 页)

- mice[J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(6): 2041-2044
- [3] Wang S, Chen J, Au KT, Ross MG. Expression of aquaporin 8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188(4): 997-1001
- [4] Anderson J, Brown N, Mahendroo MS, Reese J. Utilization of different aquaporin water channels in the mouse cervix during pregnancy and parturition and in models of preterm and delayed cervical ripening[J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 130-140
- [5] Yeung CH, Callies C, Rojek A, Nielsen S, Cooper TG. Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2009, 80(2): 350-357
- [6] Yeung CH, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S, Cooper TG. Aquaporins in the human testis and spermatozoa--identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance [J]. Int J Androl, 2010, 33(4): 629-641
- [7] McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG, Hughes FM Jr. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins [J]. Endocrinology, 2002, 143(8): 2905-2912
- [8] Brañes MC, Morales B, Ríos M, Villalón MJ. Regulation of the immunexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(5): C1048-1057
- [9] Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr, Huet-Hudson YM. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement[J]. Biol Reprod, 2003, 69(5): 1481-1487
- [10] Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA, Ross MG. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(5): 1226-1231
- [11] Liu H, Koukoulas I, Ross MC, Wang S, Wintour EM. Quantitative comparison of placental expression of three aquaporin genes [J]. Placenta, 2004, 25(6): 475-478
- [12] Liu H, Wintour EM. Aquaporins in development - a review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3:18
- [13] Mann SE, Ricke EA, Yang BA, et al. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187:902-907
- [14] Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, et al. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194:884-887
- [15] Liu HS, Song XF, Hao RZ. Expression of aquaporin-1 in human placenta and fetal membranes [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 28(3): 333-336
- [16] X.Q. Zhu, S.S. Jiang, X.J. Zhu, et al. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in Fetal Membranes and Placenta in Human Term Pregnancies with oligohydramnios[J]. Placenta, 2009, 30:670-676
- [17] Hao RZ, Liu HS, Xiong ZF. Expression of aquaporin-1 in human oligohydramnios placenta and fetal membranes [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2009, 29(6): 1130-1132

(上接第 2614 页)

- [13] 朱健琦, 刘志刚. 粉尘螨 类变应原(Der f)的克隆表达、纯化及免疫学特性[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(6):472-474
- [14] Hamida Hammad, Marcello Chieppa, Frederic Perros, et al. House dust mite allergen induces asthma via TLR4 triggering of airway structural cells[J]. Nat Med, 2009, 15(4): 410-416
- [15] Karin Yeatts, Peter Sly, Stephanie Shore, et al. A Brief Targeted Review of Susceptibility Factors, Environmental Exposures, Asthma Incidence, and Recommendations for Future Asthma Incidence Research[J]. Environ Health Perspect, 2006; 114(4): 634-640
- [16] Shin-ichiro Narita, Randall M. Goldblum, Cheryl S. Watson, et al. Environmental Estrogens Induce Mast Cell Degranulation and Enhance IgE-Mediated Release of Allergic Mediators[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(1): 48-52