大豆泛变应原 profilin 基因的克隆、序列分析和表位预测

吴凯威，余 晓，刘志刚，宋娟娟，张红云

（深圳大学生命科学学院，深圳 518060）

摘要 通过生物信息学方法对多种植物性食物和花粉泛变应原 proflin 基因进行比对，利用其中的高度保守区域设计并合成简并引物，通过 RT-PCR 克隆得到一个新的大豆 profilin 基因（396bp，pI 为 5.21，MW 为 14，1kD），序列同源性分析发现该基因和已知的多种植物性食物、花粉变应原 profilin有较高的同源性（>75%），因此认为其系大豆蛋白泛变应原 profilin，命名为 Gly m 3.02，EMBL/GeneBank 数据库登录号为 DQ784852，这为进一步重组表达和抗原表位分析等奠定了实验基础。

关键词 大豆；泛变应原；profilin；基因克隆

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000－9841(2007)01－0001－05

CLONING, SEQUENCE ANALYSIS AND ANTIGEN EPITOPE PREDICTION OF PANALLERGEN PROFILIN IN SOYBEAN

WU Kai-wei，YU Xiao，LIU Zhi-gang，SONG Juan-juan，ZHANG Hong-yun

（*College of Life Science*，*Shenzhen University*，*Shenzhen*，518060）

Abstract Bioinformatic method was used for the comparative analysis of numerous homologous plant food panallergen and pollen panallergen sequences. Conservative domains among the sequences were determined for degenerate primer designing. The defined RT-PCR conditions were adopted to clone the full-length gene of profilin from soybean and a novel full-length cDNA clone (396bp, pI 5.21, MW 14,1kD) was obtained. Sequence analysis showed that this gene shared high identities (>75%) with panallergen profilin from some plant food and pollen. The deduced protein was therefore regarded as panallergen and named as Gly m 3.02 (EMBL/GenBank database entry No. DQ784852). This novel panallergen profilin gene from soybean will be a base for the expression of allergen proteins and analysis of epitope applied in further studies and clinical treatment.

Key words *Glycine max*; Panallergen; Profilin; Gene cloning

Profilin 是一种广泛存在于真核细胞中的 12～15kD 的细胞溶质蛋白，它们在植物细胞中主要参与微丝的快速重组，例如胞质分裂、胞质流动、细胞延长、以及花粉管和根毛的生长等活动[1,2]。Profilin

收稿日期：2006－08－11
基金项目：广东省科技重点专项（No. 2003A3080502）、深圳市科技计划（No. 200326）资助
作者简介：吴凯威（1981－），男，硕士研究生，研究方向为过敏性疾病过敏原的分子生物学研究。
通讯作者：刘志刚，男，教授，博导，生命科学学院副院长。Tel：0755－26558940；E－mail：LZG@szu.edu.cn

首次作为变应原被鉴定出来是在桦树花粉中，名为Bet vⅡ。大多数植物中都存在 profilin，并且不同的物种间其同源性达 70％～85％。现在一般认为，profilin 是一种广泛存在于花粉和食物中的泛变应原，能够引起过敏病人发生变态反应[3,4]。

大豆蛋白是日常生活中一种重要的食物成分，但它可诱发易感人群产生超敏反应，特别是诱发儿童产生特异性皮炎[5]。目前通过免疫印迹方法，已鉴定出其变应原分子量范围在 8～90kD[6~8]。1999 年 Rihs[9] 等首次从大豆中克隆得到 profilin 基因，通过重组的方法初步鉴定其抗原表位，结果发现大豆 profilin 需要完整的构象才能被患者血清识别。由于植物的区域性和多样性，我国大豆泛变应原 profilin 基因与国外品种可能存在较大差异。目前国内关于大豆变应原基因的研究报道较少。

本文利用生物信息学方法对多种植物性食物和花粉的泛变应原 profilin 基因进行了同源性分析，利用其高度保守区域设计并合成简并引物，克隆得到一个新的大豆 profilin 基因，并对其进行了同源性分析和结构预测。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料大豆为我国北方品种白农六号。RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司；AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 BBI 公司；pMD18-T Vector、Ex-Taq、Agarose Gel DNA Purification Kit 均购于 Takara 公司。PCR 仪 PTC-200 为 MJ Research 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 简并引物的设计　从 SWISS-PROT 和 TrEMBL（www.expasy.org）以及 NCBI（www.ncbi.nlm.nih.gov）的 GeneBank 等数据库下载到 67 例植物性食物 profilin 的核酸序列。利用 Clustal W 程序对这些序列进行同源性比较，确定其保守区域。根据这些保守区域的序列，设计并合成简并引物（由上海生工合成）：

p83：5’-ATGTCGTGGCAGGCGTACGT-3’；

p85：5’-TTACAKGCCYTGTTCCAAKGAGGTA-3’。

1.2.2 总 RNA 的提取和 RT-PCR　取新鲜大豆（种子）于液氮中充分研磨，称取大约 100mg，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。

从合成的 cDNA 第一链产物中取 2ul 为模板进行 PCR 反应。反应体系为 50ul：10×buffer 5ul，10×dNTP 4ul，ddH$_2$O 35.75ul，引物 p83 为 1ul（50pm/ul），引物 p85 为 2ul（50pm/ul），0.25ul Ex-Tag 酶。PCR 反应程序为：95℃ 3 min 后用 Touchdown 方式进行扩增，第一个循环为 94℃ 45 s，65℃ 45 s，72℃ 2 min，此后每个循环的退火温度下降 1℃，当退火温度下降到 57℃时，则以 94℃ 45 s，57℃ 45 s，72℃ 2 min 运行 35 个循环，再于 72℃ 延伸 10 min 结束。电泳检测 PCR 产物，并切胶回收。

1.2.3 RT-PCR 产物的 T/A 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）、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板进行蓝白斑和抗氨苄筛选，挑取白色菌落（含重组质粒）进行菌落 PCR 验证。阳性菌落进行序列测定（上海生工完成）。

1.2.4 序列分析与同源性比对　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/）将所得克隆与来自不同材料的泛变应原 profilin 基因进行多序列比对，分析其序列同源性。

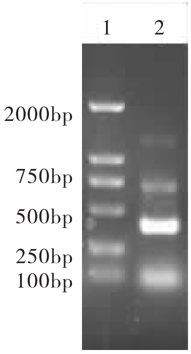
1.2.5 二级结构和抗原性预测　用 DNASTAR 5.0 软件对大豆 profilin 基因编码的蛋白质进行二维结构、亲水性及抗原性预测。其中二级结构、亲水性、抗原性、表面可能性预测分别采用 Chou-Fasman、Hopp-Woods、Jameson-Wolf、Emini 方法进行。

2 结果与分析

2.1 大豆 profilin 基因的克隆和全长 cDNA 的获得

提取的大豆总 RNA 经反转录合成 cDNA 第一链，然后以为此为模板，用简并引物进行 PCR 扩增。

扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳（图 1），可见在 400bp 左右有一亮带，大小与理论预计值相符。回收 RT-PCR 产物并与 pMD18-T Vector 连接后转化 *E. coli* Top 10。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定，阳性菌落（图 2）进行测序，测序结果用 NCBI 中的 BLAST 程序进行序列同源性比较，发现它们与 GenBank 中已知的花粉和一些水果的肌动蛋白抑制蛋白基因（profilin）序列同源性较高，得到一完整 cDNA 基因，与预期结果一致。



Lane 1　DNA Standard Markers(DL2000 ladder)
Lane 2　RT-PCR amplification with p83 and p85 as primers

图 1　RT-PCR 扩增结果

Fig. 1　RT-PCR amplification

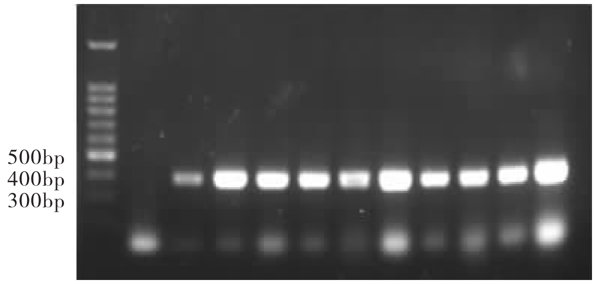


图 2　大豆 profilin cDNA 阳性克隆的菌落 PCR 鉴定

Fig. 2. Colony PCR identification of the positive clones contained soybean cDNA

2.2　序列分析与同源性比对

克隆得到的大豆 profilin 完整 cDNA 基因（图 3）由 396 个碱基组成，其中开放阅读框为 396 个碱基（含终止密码子）。推导该核酸序列编码 131 个氨基酸。经计算分析，推测该蛋白的等电点为 5.21，分子量为 14.1kD。

利用 EMBL-EBI 的 CLUSTAL W (1.82)程序进行氨基酸序列同源性比较，结果显示由大豆 profilin 基因推导的氨基酸序列与 Rihs 等[9]克隆得到大豆 profilin(Gly m 3.0101、Gly m 3.0102)的同源性较高，为 83%，而且与其它已知植物性食物及花粉泛变应原 profilin 的同源性也较高（图 4），如与花生和胡萝卜泛变应原 profilin 的同源性分别为 76%

```
ATGTCGTGGCAGGCGTACGTCGACGATCACCTCATGTGCGAGACTGACGG  50
 M  S  W  Q  A  Y  V  D  D  H  L  M  C  E  T  D  G
CCAGCACCTCACTGCCGCCGCCATCATCGGCCACGACGGCAGCGCCTGGG  100
  Q  H  L  T  A  A  A  I  I  G  H  D  G  S  A  W
CCCAGAGCGCCAACTTCCCTCAGTTCAAGCCCGTTGAGATTACAGCGATC  150
A  Q  S  A  N  F  P  Q  F  K  P  V  E  I  T  A  I
ATGAAAGACTTTGATGAACCTGGTTCCCTCGCCCCCACTGGGTTGACCT   200
 M  K  D  F  D  E  P  G  S  L  A  P  T  G  L  H  L
CGGTGGCACAAAGTACATGGTTATCCAGGGTGAGCCTGGAGTTGTCATCC  250
  G  G  T  K  Y  M  V  I  Q  G  E  P  G  V  V  I
GTGGAAAAAAGGGTCCTGGTGGCATCACCGTGAAGAAAACAACTCGGGCT  300
R  G  K  K  G  P  G  G  I  T  V  K  K  T  T  R  A
CTGATTATCGGAATATATGATGAACCAATGACCCCAGGACAGTGTAACAT  350
 L  I  I  G  I  Y  D  E  P  M  T  P  G  Q  C  N  M
GGTGTGGAGAGGTTGGGGGATTACCTCCTTGAACAAGGCCTGTAA       396
 V  V  E  R  L  G  D  Y  L  L  E  Q  G  L  *
```

图 3　大豆 profilin 核酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　cDNA sequence and deduced amino acid sequence of full length soybean profilin(Gly m 3.02)

和 79%；与桦树花粉 profilin（Betv Ⅱ）的同源性为 77%，这说明不同地区大豆品种中 profilin 基因存在一定的差异。而且，该基因与其它植物性食物和花粉泛变应原 profilin 也有很高的同源性，进一步可认定其为大豆 profilin 基因，根据变应原命名法则暂命名为 Gly m 3.02。

2.3　二级结构和抗原性预测

DNASTAR 软件可以根据电荷分布、分子运动、两亲性和抗原性等参数，对理论蛋白质的抗原表位进行综合判断，抗原指数在 1.3～1.7 之间的为潜在的主要抗原表位[10]。经该软件分析，预测大豆 profililn(Gly m 3.02)蛋白肽链的二级结构中亲、疏水区分布较为均匀，如图 5 所示，综合分析得到氨基酸序列 55～59、84～90、107～112 为潜在的 T 细胞抗原表位。

3　讨论

变态反应疾病（过敏性疾病）被世界卫生组织认为是当前世界性的重大卫生学问题，世界各国变态反应性疾病的总发病率高达 10%～30%，其临床症状一般有湿疹，麻疹，鼻炎，哮喘，关节炎等，有时可产生过敏性休克，甚至危及生命。大豆是引发变态反应疾病的八大类食物变应原之一。大豆蛋白中虽含有多种人体所需氨基酸，但也含有多种变应原成分，随着近年世界各国对大豆及其制品的生产量和消费量的增加，使得由大豆蛋白引发的变态反应的几率不断升高，尤其是在婴幼儿中。目前已有不少文献报道由于暴露在大豆蛋白中而产生的职业性哮

喘[11~13]。而近年发现引发口腔过敏症的食物变应原 profililn 和花粉变应原 profilin 之间存在一定的

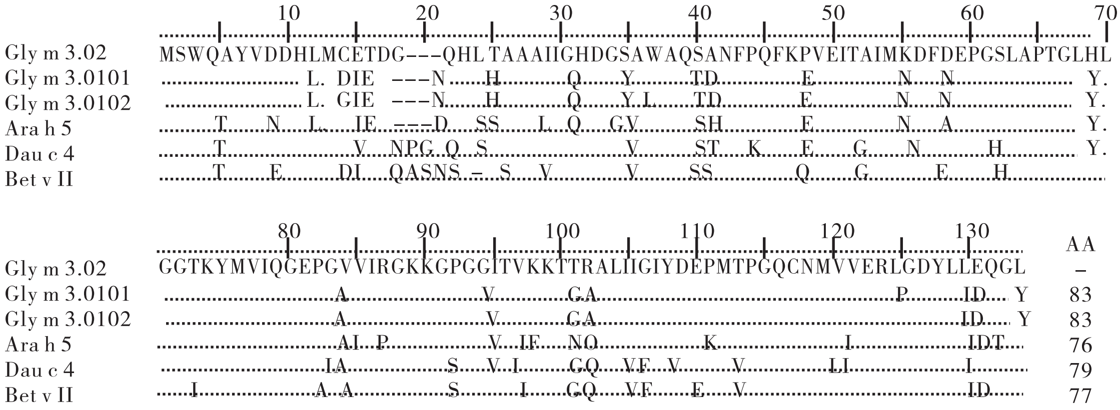


图 4 大豆 profilin(Gly m 3.02)推导的氨基酸序列和已知大豆(Gly m 3.0101、Gly m 3.0102)、花生(Ara h 5)、胡萝卜(Dau c 4)与桦树花粉(Bet v Ⅱ)profilin 同源性比较

Fig. 4 Sequence alignment of Gly m 3.02 with other profilin: Gly m 3.0101(*Glycine max*, AJ223982), Gly m 3.0102(*Glycine max*, AJ223981), Ara h 5(*Arachis hypogaea*, AF059616), Dau c 4(*Daucus carota*, AF456482), Bet v II(*Betula pendula*, M65179). The percentage of each sequence identity is given in the end

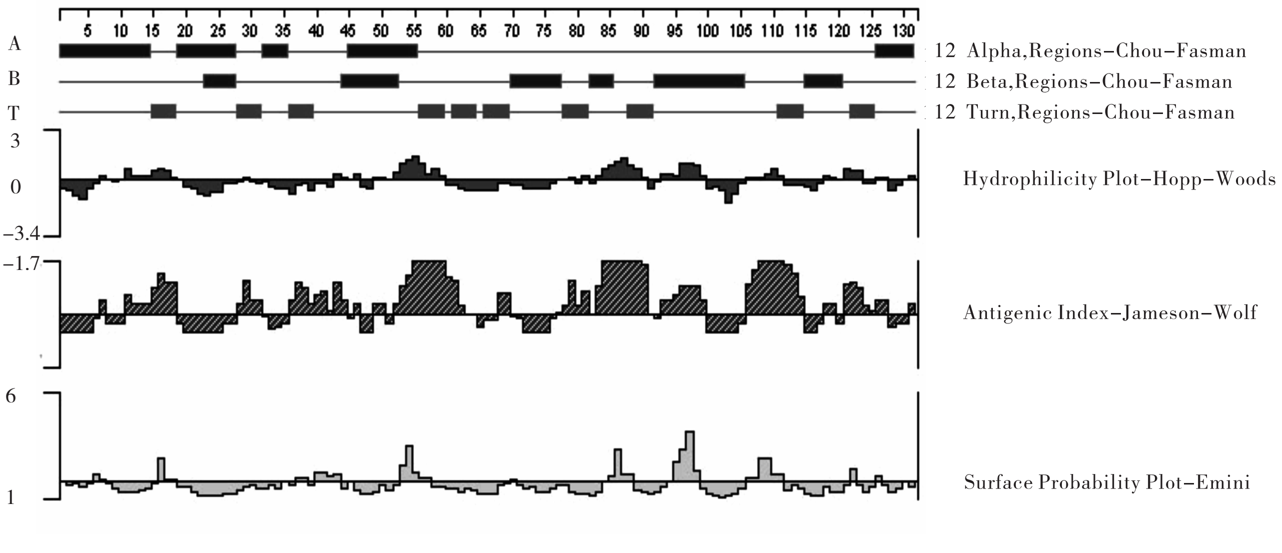


图 5 Gly m 3.02 的二级结构、亲水性和抗原性预测

Fig. 5 Secondary structure, hydrophilicity and antigenic prediction results of Gly m 3.02 product

联系——即存在交叉反应性。如对食物和树花粉过敏的病人 IgE 能识别苹果、梨、胡萝卜、芹菜和马铃薯中的 Bet vⅡ同源蛋白 profilin[14]。草花粉 profilin 过敏病人对芹菜和胡萝卜起反应[15]。一般认为造成这些交叉反应的原因是食物和花粉的 profilin 在序列上存在高度相似性。Rihs 等[9]的实验也证实了这一点,他们克隆了大豆 Gly m 3.01(profilin) cDNA 基因,通过比对发现该基因与其他物种(如花粉)的泛变应原 profilin 序列具有高度同源性,但是发现 IgE 交叉反应性主要是由于各 profilin 间存在高度保守的三维结构而不是它们氨基酸水平上的相似性造成的。另外,一些桦树花粉相关的水果和坚果中的 profilin 变应原相继被发现和克隆——如梨 Pyr c 4、樱桃 Pru av 4[16]、桃 Pru p 4[17]、榛子 Cora 2[18]等。

本研究利用生物信息学方法对多种植物性食物和花粉泛变应原 profilin 基因进行同源性分析,利用其高度保守区域设计并合成简并引物,从中国北方常见大豆中成功克隆出一个新的大豆 profilin 基因,该基因由 396 个碱基组成(含终止子),编码 131

个氨基酸，经计算推测等电点约为 5.21，分子量约为 14.1kD，按照变应原命名法则将其暂命名为 Gly m3.02，EMBL/GeneBank 数据库登录号为 DQ784852。通过对其编码氨基酸序列的同源性分析发现和已知大豆 profilin（Gly m 3.0101/Gly m 3.0102）以及其他已知的蔬果、花粉 profilin 具有较高的同源性（>75%），其中 Gly m 3.02 与 Gly m 3.01 的氨基酸序列同源性为 83%，提示不同地区的同一种变应原具有一定的区域特色，基因差异导致其编码的蛋白质的抗原性（免疫原性和反应原性）可能存在一定的差异。这可能是由于地域因素造成的，也可能是由于该品种在区域驯化或人为改良等选择进化过程中形成的。故在临床上应尽可能使用具有我国区域特色（即本地化）的变应原进行临床免疫诊断和治疗。本研究还运用生物信息学技术，对 Gly m 3.02 进行了二级结构预测，发现其可能含有三个潜在的抗原表位（氨基酸序列 55～59、84～90、107～112）。这些为进一步进行重组表达、抗原表位鉴定分析、研究植物性食物和花粉间交叉反应性以及变应原标准化奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Valster AH, Pierson ES, Valenta R, et al. Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection[J]. Plant Cell, 1997, 9: 1815－1824.

[2] Ramachandran S, Christensen HE, Ishimaru Y, et al. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2000, 124: 1637－1647.

[3] Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2001, 125: 57－65.

[4] Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, et al. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2002, 127: 259－268.

[5] Cantani A, Lucenti P. Natural history of soy allergy and/or intolerance in children, and clinical use of soy protein formulas[J]. Pediatr Allergy Immunology 1997, 8: 59－74.

[6] Burks AW, Brooks JR, Sampson H. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1988, 81: 1135－1142.

[7] Baur X, Pau M, Czuppon A, et al. Characterization of soybean allergens causing sensitization of occupationally exposed bakers[J]. Allergy, 1996, 51: 326－330.

[8] Helm RM, Cockrell G, Burks AW et al. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1998, 117: 29－37.

[9] Hans Peter Rihs, Zhiping Chen, Franziska Ruëff. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999, 104: 1293－1301.

[10] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel alogorithm for predicting antigenic determinants[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1988, 4: 181－186.

[11] Antó JM, Sunyer J, Rodriguez Roisin R et al. Community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. Toxicoepidemical Committee[J]. New England Journal of Medicine, 1989, 320: 1097－1102.

[12] Antó JM, Sunyer J, Reed CE et al. Preventing asthma epidemics due to soybeans by dust-control measures[J]. New England Journal of Medicine, 1993, 329: 1760－1763.

[13] Sunyer J, Antó JM, Rodrigo MJ et al. Case-control study of serum immunoglobulin-E antibodies reactive with soybean in epidemic asthma[J]. Lancet, 1989, 1: 179－182.

[14] Van Ree R, Voitenko V, Van Leeuwen WA et al. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1992, 98: 97－104.

[15] Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE crossreactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin) [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1995, 95: 962－969.

[16] Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J et al. Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2[J]. Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756: 315－325.

[17] Rodriguez Perez R, Fernandez Rivas M, Gonzalez Mancebo E et al. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2[J]. Allergy, 2003, 58: 635－640.

[18] Hansen KS, Ballmer Weber BK, Luttkopf D et al. Roasted hazelnuts-allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge[J]. Allergy, 2003, 58: 132－138.