

大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 基因的克隆及其原核表达载体的构建

邬玉兰, 刘志刚

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060)

摘要:利用 RT-PCR 克隆大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 的全长基因, 根据序列设计带有酶切位点的特异性引物, 扩大大豆 Gly m Bd 30K 的完整开放阅读框, 与 pET-28a 载体连接, 构建原核表达载体。结果表明: 克隆了大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 基因, 且构建了其原核表达载体。该基因含有长度为 1 140 bp 的开放阅读框, 编码 379 个氨基酸。该蛋白质的相对分子质量为 42 758, 等电点为 5.08。序列同源性分析发现其与数据库中已知的 Gly m Bd 30K 基因同源性很高, 因此认为其是大豆的过敏原基因, 在 GenBank 数据库中的登录号为 EU883600。克隆的大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 基因及构建的原核表达载体, 为大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 的重组表达和免疫活性鉴定等奠定基础。

关键词:大豆; 过敏原; Gly m Bd 30K; 克隆; 原核表达载体

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)01-0011-05

Cloning and Prokaryotic Expression Vector Construction of Gly m Bd 30K Gene from Soybean(*Glycine max*)

WU Yu-lan, LIU Zhi-gang

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

Abstract: The RT-PCR was applied to clone the full-length allergen genes from soybean and the sequences were analyzed. The specific primers were designed. The ORF of Gly m Bd 30K of soybean was subcloned into the expression vector pET 28a. Results showed that the open reading frame(ORF) of cloned cDNA contained 1 140 bp and encoded 379 amino acids, and the estimated molecular mass of the encoded protein was 42 758 with pI 5.08. Sequence analysis showed that this clone shared high identities with Gly m Bd 30K from soybean. The deduced protein was therefore regarded as the major allergen of Gly m Bd 30K of soybean(GenBank database entry No. EU883600). Cloning and prokaryotic Expression Vector Construction of Gly m Bd 30K gene from soybean, which will be used as base for the expression and identification of allergen protein.

Key words: Soybean(*Glycine max*); Allergen; Gly m Bd 30K; Cloning; Prokaryotic Expression Vector

世界粮农组织(FAO)1995年报告, 90%以上的食物过敏是由牛奶、鸡蛋、鱼、贝壳海产品、花生、大豆、坚果类和小麦引起^[1]。大豆蛋白属于8类主要致过敏食物之一, 大豆是人类主要的蛋白来源之一^[2]。大豆蛋白在食品加工业的广泛应用, 给大豆敏感人群带来了一定的食物安全问题^[3-4]。

Gly mBd 30K 也称为 P34, 是半胱氨酸蛋白酶木瓜蛋白酶超家族的一个边缘成员。Ogawa 等的与 IgE 结合试验中表明, 超过 65% 以上对大豆敏感的病人仅对 Gly mBd 30K 蛋白过敏, 即使是种子的一

小部分(小于总种子蛋白的1%), 因此 Gly mBd 30K 蛋白被视为大豆蛋白中一个重要的免疫显性过敏原^[5-7]。早在 1998 年 Takano T 就在 NCBI 数据库中提交了大豆 Gly mBd 30K 的 DNA 序列(AB013289), 而 2006 年 Schmidt M A 在 NCBI 的核酸数据库中提交了大豆 Gly mBd 30K 的 mRNA 序列(DQ324851)。目前国内关于大豆过敏原的研究报道很少。

研究成功克隆了大豆的主要过敏原基因 Gly mBd 30K, 并构建了其原核表达载体。

收稿日期: 2008-07-28

基金项目: 广东省科技重点专项资助项目(2003A3080502), 深圳市科技计划资助项目(200326)。

作者简介: 邬玉兰(1988-), 女, 实验员, 主要从事过敏原的分子生物学研究。E-mail: xinyi880826@163.com。

通讯作者: 刘志刚, 教授, 博士生导师。E-mail: lzg@szu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆购自超市。RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司;AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 BBI 公司;pMD18-T 载体、Ex- Taq 酶、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶均购于 Takara 公司;质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶纯化试剂盒购于 OMEGA 公司。原核表达载体 pET-28a 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 简并引物的设计 从 SWISS- PROT、TrEM- BL 以及 NCBI 的数据库下载大豆 Gly m Bd 30K 的核酸序列。利用 CLUSTAL W 程序对这些序列进行同源性比对,确定其保守区域。根据保守区域序列,设计并合成简并引物(由上海生工合成):

dadou5a 5'atgggttccttctgttgctt 3'

dadou3a 5'tcaaagaggagatgatcaactc 3'

1.2.2 Gly m Bd 30K 基因的 RT-PCR 扩增 取大豆 3 粒于液氮中充分研磨,称取大约 100 mg,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。以合成的 cDNA 第一链产物为模板进行 PCR 反应。电泳检测 PCR 产物,并切胶回收。

1.2.3 RT-PCR 产物克隆和测序 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)的 LB 平板进行抗氨苄筛选,挑取阳性菌落(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 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/>)将所得克隆与已知大豆基因进行多序列比对,分析其序列同源性。

1.2.5 原核表达载体的构建 在大豆 Gly m Bd 30K cDNA 的 5'和 3'末端通过 PCR 反应分别引入 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点,PCR 引物序列如下:

dadou5t 5'gaacatatgatgggttccttctgttgctt 3'(*Nde*I)

dadou3t 5'gaactcgagtcaaagaggagatgatcaactc 3'(*Xho*I)

回收 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上经测序无误后,提取阳性菌落质粒,所得质粒与原核表达载体 pET28a 分别进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,并将获得的基因片段与 pET28a 的酶切产物相互连接,构建重组表达质粒。以重组质粒转化大肠杆菌 Top10,菌落 PCR 鉴定,提取阳性质粒,进行双酶切鉴定,阳性克隆进行测序鉴定。

2 结果与分析

2.1 大豆 Gly m Bd 30K 基因的克隆

提取的大豆总 RNA 经反转录合成 cDNA 第一链,然后以此为模板,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),在 1 150 bp 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。

M.
DNA
Stand-
ard
Markers
(DL2000
ladder
);
1-
2.
RT-
PCR
amplification
with
dadou5t
and
dadou3t
as
prim-
ers
RT-PCR 扩增结果
RT-PCR amplification

阳性克隆的菌落 PCR 鉴定
Identification of the positive
cloned soybean cDNA

2.2 序列分析与同源性分析

克隆得到的大豆 Gly m Bd 30K 基因(图 3)由

1 140个碱基组成,其中开放阅读框为 1 140 个碱基(含终止密码子)。推导核酸序列编码 379 个氨基酸。经计算分析,推测该蛋白质的相对分子质量为

42 758,等电点为 5.08。在 GenBank 数据库中的登录号为 EU883600。

测序所得序列通过 NCBI 中的 BLAST 进行序列比对,同时推导其相应的氨基酸序列,将所得克隆推导出的氨基酸序列与数据库中已知的大豆 Gly mBd 30K 基因的氨基酸序列进行对比,分析其序列同源性。结果显示:克隆的大豆 Gly mBd 30K 基因与数据库中已知的大豆 Gly mBd 30K 基因同源性为 100% (DQ324851、AB013289),与 P34 中空泡硫基蛋白酶同源性为 99% (J05560、AY348863),与豆薯的木瓜蛋白酶蛋白同源性为 87% (DQ152924) (图 4)。

说明此次所得克隆是大豆的 Gly mBd 30K 基因。

2.3 载体的构建及鉴定

提取经菌落 PCR 鉴定为阳性的重组表达质粒,进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析(图 5)。载体片段约为 5 000 bp,插入的大豆 Gly 高度重视。大豆是 8 类主要致敏食物之一。人类所得到的蛋白质 80% 来源于植物蛋白,其中 16% 来源于大豆^[10]。我国有一病例报道“1983 年至 1986 年 11 月期间,由于食物过敏而引起的变态反应性疾病 184 例。其中以大豆过敏者居首,占 25.5%”^[11]。1934 年 Duke 报道了婴儿对大豆蛋白的过敏反应^[12];1969 年 Castimpoalas 等从大豆蛋白中分离出 4 种球蛋白,即:大豆球蛋白(Glycinin)、 α -伴球蛋白(α -conglycinin)、 β -伴球蛋白(β -conglycinin)和 γ -伴球蛋白(γ -conglycinin),并证明它们是大豆蛋白中主要的抗原成分^[13]。Ogawa T 等用免疫印迹技术,识别了大约 15 种大豆过敏原,其中 3 种是主要的过敏原,被分别命名为 Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 60K,都存在于 7S 球蛋白组分中^[14];Bando N 研究发现大豆 Gly m Bd 30K 蛋白是一种糖蛋白,并提示多糖能够引起过敏反应^[15]。可见,国外对于大豆过敏原的研究很多,而国内却很少。

研究利用生物信息学方法,首先根据数据库已知序列设计并合成简并引物,从大豆中克隆出 Gly m Bd 30K 基因,由 1 140 个碱基组成,其中开放阅读

3 K 核酸序列及推导的氨基酸序列

of soybean and the deduced amino acid sequence

mBd 30K 的基因片段 1 140 bp,同预期的大小一致。阳性克隆的 DNA 序列测定结果显示,插入的片段准确无误。说明该表达载体构建成功。所构建的重组表达质粒包括大豆 Gly mBd 30K 的完整编码序列(包括起始密码子和终止密码子)。

3 讨论

过敏反应(变态反应)是人类常见自身免疫性疾病,它是一种复发率很高的疾病。世界各国的变态反应疾病的总发病率约为 10% ~ 30%^[8],其中食物过敏在相当大的程度上危害着过敏人群的健康,据 2005 年吕相征报道约有 1% ~ 3% 的成年人以及高达 5% ~ 8% 的儿童及婴幼儿对一种或多种食物过敏^[9],食品安全中的过敏问题也逐渐引起人们的

框为 1 140 个碱基(包括终止密码子),编码 379 个氨基酸。该序列编码的蛋白相对分子质量约为 42 758,等电点为 5.08。在 GenBank 数据库中的登录号为 EU883600。通过对其编码氨基酸序列的同源性分析发现其与数据库中已知的大豆 Gly mBd 30k 基因同源性为 100% (DQ324851、AB013289),与 P34 中空泡硫基蛋白酶同源性为 99% (J05560、AY348863),与豆薯的木瓜蛋白酶蛋白同源性为 87% (DQ152924)。研究证实:如蛋白间有 30% 的序列相同性,就可以根据已知蛋白推测其同源蛋白的空间结构和相似的功能^[16]。因此认为研究所得克隆是大豆的 Gly m Bd 30K 基因。对于大豆 Gly m Bd 30K 基因的基础研究国内少有报道。本实验室克隆了大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 基因,对其序列进行分析,并成功构建其原核表达载体,为大豆 Gly m Bd 30K 的进一步重组表达、免疫活性鉴定及变应原标准化奠定了实验基础。此外,这一方法与常规的通过 cDNA 的构建以及筛选来得到新的过敏原基因的方法相比,耗时短、操作简便而且花费低,具有相对的优势。

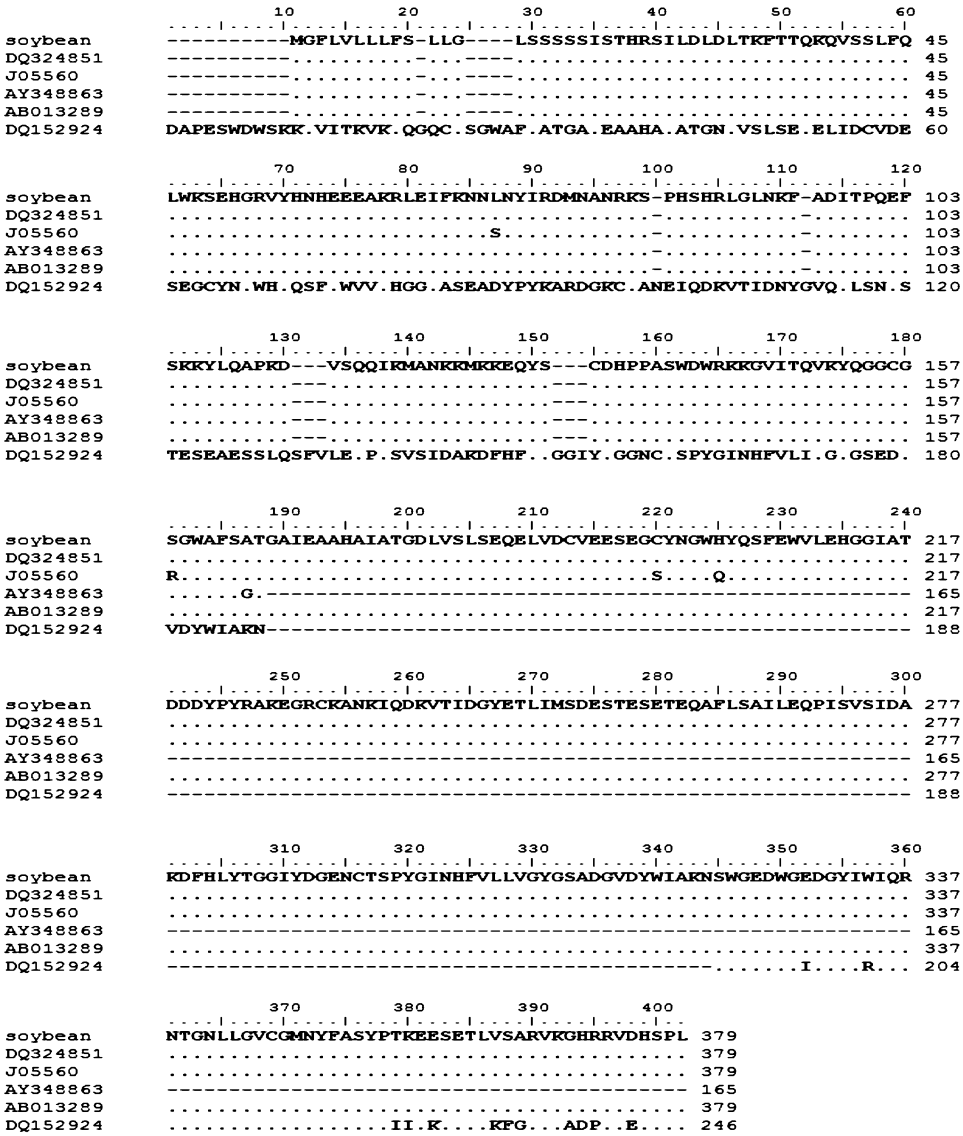


图4 大豆 Gly mBd 30k (soybean) 推导的氨基酸序列和已知的大豆 Gly mBd 30k (DQ324851、AB013289)、P34 (J05560、AY348863)、豆薯 (DQ152924) 的氨基酸序列同源性比较

Fig.4 Alignment among allergen sequences of soybean (DQ324851、AB013289)、P34 (J05560、AY348863)、Pachyrhizus erosus papain-like (DQ152924)

参考文献

[1] WHO Workshop. Asthma management and prevention [R]. The global initiative for asthma ascertariate, 1996; 1-2.

[2] Metcalfe D. The nature and mechanisms of food allergies and related diseases [J]. Food Technology, 1992, 5(5): 136-140.

[3] Herian A M, Taylor S L, Bush R K. Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults [J]. International archives of allergy and applied immunology, 1990, 92 (2): 193-198.

[4] Vidal C, Perez-Carral C, Chomon B. Unsuspected sources of soybean exposure [J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 1997, 79(4): 350-352.

[5] Kalinski A J, Melroy D L, Dwivedi R S, et al. A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases which is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 15; 267 (17): 12068-12076.

[6] Kalinski A J, Weisemann J, Matthews B F, et al. Molecular cloning

M.
DNA
Stand-
ard
Markers

;
1
—

4.
pET28a/
Gly
mBd
30k
digested
with
*Nde*I
and
*Xho*I

■ pET28a/Gly mBd

■ 双酶切鉴定

■ Enes digestion analysis of

■ pET28a/Gly mBd 30k

of a protein associated with soybean oil bodies which is homologous to thiol proteases of the papain family [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265 (23) : 13843-13848.

- [7] Ogawa T, Tsuji H, Kitamura K, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1993, 57 (6) : 1030-1033.
- [8] Vrtala S, Focke-Tejkl M, Swoboda I, et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates [J]. Methods, 2004, 32 (3) : 313-20.
- [9] 吕相征, 刘秀梅. 健康人群食物过敏状况的初步调查 [J]. 中国食品卫生杂志. 2005, 17 (2) : 119-120. (Lu X Z, Liu X M. Health status of food allergy crowd preliminary investigation [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2005, 17 (2) : 119-120.)
- [10] 郑云兰, 李霞辉. 大豆营养分析技术 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1991: 190. (Zheng Y L, Li X H. Soybean nutritional analysis [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1991: 190.)
- [11] 李钢, 丁淑霞, 左容, 等. 食物过敏引起变态反应疾病 184 例临床分析 [J]. 佳木斯医学院学报, 1989, 12 (3) : 269. (Li G, Ding S X, Zuo R, et al. Food allergies cause allergic disease clinical analysis of 184 cases [J]. Jiamusi Medical College, 1989, 12 (3) : 269.)
- [12] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy [J]. Allergy, 1934 (5) : 300-304.
- [13] Castimpoalas N. Isolation of α -, β -, and γ -conglycinins [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969, 129: 409-497.

- [14] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigation of the IgE binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean sensitive patients with atopic dermatitis [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 37 (6) : 555-565.
- [15] Bando N, Tsuji H, Yamanishi R, et al. Identification of the glycosylation site of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 1996, 60 (2) : 347-348.
- [16] Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments [J]. Protein Engineering, 1999, 12: 85-94.