四川大学学报(医学版)
J Sichuan Univ (Med Sci Edi) 2016; 47(1):14 - 18

葎草花粉主要变应原 Hum s1 的表达、纯化与结构预测*

刘 昀,孙秀珍,徐 晶,吴媛媛
西安交通大学第二附属医院 呼吸科(西安 710004)

【摘要】 **目的** 克隆、表达、纯化葎草花粉主要变应原 Hum s1,预测、分析其蛋白结构及功能,为评估该重组变应原的诊断及治疗效果奠定基础。**方法** 采用 PCR 扩增目的基因 *Hum s*1,并将 *Hum s*1 通过 *Kpn* Ⅰ/*Xho* Ⅰ 位点克隆到 pET32a 表达载体,转化到克隆菌株 *E. coli* DH5α,用 PCR 验证重组载体,并将表达载体转化至表达菌株 *E. coli* BL-21,IPTG 诱导表达目标基因,利用快速蛋白液相色谱技术纯化融合蛋白,并对表达蛋白的结构与功能进行预测分析。**结果** 成功构建原核表达质粒 pET32a-G2,并表达纯化葎草花粉主要变应原 Hum s1,纯度达 90%以上。分析其结构含有 3 个潜在的抗原表位,2 个 EF-手型结构域,成功构建其三维模型。ELESA 试验证明重组蛋白能与葎草花粉过敏患者血清结合,具有免疫学活性。**结论** 成功构建了葎草花粉变应原 *Hum s*1 的原核表达载体,表达并纯化了重组蛋白,并通过生物信息学方法获得了目的蛋白的抗原表位和三维结构模型,为进一步开展重组疫苗研究奠定了基础。

【关键词】 葎草花粉 重组变应原 基因克隆

Expression, Purification and Structure Prediction of Hum s1, a Major Allergen of *Humulus Scandens*

LIU Yun, SUN Xiu-zhen, XU Jing, WU Yuan-yuan. Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【**Abstract**】 **Objective** Hum s1, a major allergen of *Humulus Scandens*, was cloned, expressed and purified. Its protein structure and function was predicted and analyzed, which provided a foundation for further studies into the diagnostic and therapeutic efficacy of the recombinant allergen. **Methods** The target gene was amplified by PCR and sub-cloned into the expression vector pET32a through *Kpn* Ⅰ/*Xho* Ⅰ site. The recombinant plasmid was transformed into clone strain *E. coli* DH5α. The positive recombinant plasmid identified by PCR was transformed into the expression strain *E. coli* BL-21. The expressed fusion protein was induced by IPTG, and purified using fast protein liquid chromatography. The structure and function of the protein was predicted and analyzed. **Results** Prokaryotic expression plasmid pET32a-G2 was constructed successfully. Hum s1 was expressed and purified. The purity of expressed fusion protein exceeded 90%. It has three potential antigen epitopes and two EF-hand structural domains. A three-dimensional model was successfully constructed. The recombinant protein was proved to have immunological activity, with ELESA showing good attachment to sera samples of patients who were allergic to *Humulus Scandens*. **Conclusion** Prokaryotic expression vector of *Hum s*1 was successfully constructed. The recombinant protein was expressed and purified, with its epitope and three-dimensional model being predicted by bioinformatics. The study provided a basis for further development of recombinant vaccines.

【**Key words**】 *Humulus Scandens* Recombinant allergen Gene clone

支气管哮喘是呼吸系统常见病,近年来在我国的发病率有随着环境污染的加重而逐年增高的趋势。而目前哮喘的治疗主要依赖于激素,特异性免疫治疗(脱敏治疗)是唯一针对哮喘病因的治疗方法,也是患者可以脱离激素的希望,其疗效已得到肯定[1]。现临床上用于脱敏治疗的变应原疫苗多为粗制或纯化的变应原浸液,因其成分复杂,有引起严重过敏反应的风险。重组变应原疫苗因其成分明确,而且其组成成分可以精确定量并标准化,减少了不良反应的发生,应用其替代纯化变应原疫苗用于哮喘患者的脱敏治疗成为目前研究的热点。国内有人应用重组尘螨变应原疫苗用于哮喘动物模型的脱敏治疗,取得较好疗效[2];国外有研究者在 2012 年首次将重组变应原疫苗用于临床试验[3]。葎草花粉是中国大多数地区哮喘患者的主要花粉致敏原,本课题组近 30 年的吸入变应原调查结果也显示葎草花粉是西安地区的夏秋季的主要花粉致敏原[4-7]。本课题组在既往调查研究的基础上已构建了葎草花粉 cDNA 表达文库[8],筛选并获得了多个葎草花粉主要变应原 cDNA 克隆[9],本研究主要目的是对筛选

* 国家自然科学基金(No. 81102252)资助

出的葎草花粉主要变应原 Hum s1 进行表达、纯化及结构预测，为评估该重组变应原的诊断及治疗效果奠定基础。

1　材料及方法

1.1　材料

1.1.1　*菌株和质粒*　菌株 *E. coli* BL-21 及 *E. coli* DH5α 为本实验室保存，表达质粒 pET32a 购自 Phamacia 公司，pTripIE×2 阳性噬菌粒为本实验室筛选出的阳性克隆剪切而成的噬菌粒。

1.1.2　*主要试剂*　*Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ购自 Phamacia 公司，*T*4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品，His-tag 亲和层析柱及 Q 柱为 GE 公司预装柱，PCR 引物由上海生工合成。

1.1.3　*患者血清*　8 例葎草花粉特异性过敏患者血清来源于西安交通大学第二附属医院变态反应室 2010～2014 年收集的葎草花粉过敏患者血清库。葎草花粉过敏的诊断标准：①葎草花粉变应原皮内试验风团直径≥组胺对照的风团直径；②CAP 变应原体外检测系统检测血清葎草花粉特异性 IgE（sIgE）为 2 级及以上。

1.2　方法

1.2.1　*含 Hum s1 基因表达质粒的构建*　合成表达载体亚克隆所需的引物（G2），引物序列（5′-3′）G2-F：ggGGTACCGACGACGACGACAAGATGGCTGAAGTTAAAGAAG，G2-R：ccgCTCGAGTTATTTTGAGAGTTTATTG，上下游引物分别引入 *Kpn* Ⅰ/*Xho* Ⅰ酶切位点；①以阳性噬粒 pTripIE×2 为模板，PCR 法扩增目的基因 *Hum s*1，PCR 产物引用 *Kpn*Ⅰ/*Xho*Ⅰ双酶切后与同样经 *Kpn*Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切的 pET32a 表达载体，在 *T*4 DNA 连接酶的作用下连接。将目的基因通过 *Kpn*Ⅰ/*Xho*Ⅰ位点克隆到 pET32a 表达载体，并且在基因的 N 端加入肠激酶酶切位点；②将构建好的 pET32a-G2 质粒转化到感受态克隆菌株 *E. coli* DH5α，并培养扩增，随机挑取克隆作为模板，以 s1-F/T7 ter 为引物，用 PCR 验证重组载体；③选择 PCR 阳性克隆送测序检测，并培养抽提质粒。

1.2.2　*融合蛋白的表达*　①将 5 ng pET32a-G2 质粒转化到表达菌株 *E. coli* BL-21，并蓝白斑筛选阳性克隆；②分别挑选 3 个白色克隆，用 LB 培养基扩增这些克隆，每小时取少量菌液，应用分光光度计测定细菌生长浓度（以空白 LB 为对照调零，波长为 600 nm），并在光密度值（OD_{600}）达到 0.8 左右时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，诱导表达 3 h 或 16 h，并通过 SDS-PAGE 检测表达情况，结果显示在3 h和 16 h 均有蛋白表达，且 16 h 表达量较 3 h 大，故选择 16 h 诱导表达；③选择有明显目标蛋白表达的菌株，使用 LB 培养基，摇瓶培养 1 L 培养液。37 ℃培养约 6 h，当细菌 OD_{600} 达到 0.8 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续诱导表达 16 h（过夜）；④用高速冷冻离心机离心收集培养好的菌体。

1.2.3　*目标蛋白的纯化*　①将 1.2.2 中表达后的菌体重新悬浮于 Tris-HCl（pH8.0）缓冲液中，应用超声破菌。离心，15 000 r/min，20 min，电泳检测。目标融合蛋白在破菌上清中。将上清转入干净的试剂瓶，弃去沉淀。②利用快速蛋白液相色谱（AKTA Explorer 100，GE）纯化融合蛋白。先利用 His-tag 亲和层析柱初步纯化融合蛋白，上样及平衡缓冲液为缓冲液 A：50 mmol/LTris-HCl，0.5 mol/L NaCl，pH8.0；洗脱缓冲液为缓冲液 B：50 mmol/L Tris-HCl，0.5 mol/L NaCl，0.5 mol/L 咪唑，pH8.0，用 50 mL 缓冲液 A 平衡柱子，然后上样，再用0～100％缓冲液 B 梯度洗脱，收集目标组分；③利用重组肠激酶对融合蛋白进行酶切，37 ℃水浴过夜；④利用 His-tag 柱和 Q 柱对酶切后目标蛋白进行纯化，His-tag 柱上样及洗脱同上，收集穿透液，再经 Q 柱纯化，Q 柱上样及平衡缓冲液为缓冲液 A：50 mmol/L Tris-HCl，pH8.0；洗脱缓冲液为缓冲液 B：50 mmol/L Tris-HCl，1 mol/L NaCl，pH8.0，用 50 mL 缓冲液 A 平衡柱子，然后上样，再用0～100％缓冲液 B 梯度洗脱，收集目标组分。

1.2.4　*目的基因编码蛋白结构的生物信息学分析*　应用 Antheprot软件预测 *Hum s*1 基因编码蛋白的亲、疏水性，二维结构及抗原性；InterProScan 分析蛋白结构域，应用 SWISS-MODEL 同源建模软件，构建目标蛋白三维模型，并用 SWISS-PdbViewer 软件观察三维模型。

1.2.5　*ELISA 试验鉴定表达蛋白的免疫学特性*　将表达并纯化的融合蛋白分别经 1∶10、1∶100，1∶1 000稀释后，包被 ELISA 板，并应用正常人血清 1∶100 作为阴性对照，葎草花粉过敏患者血清1∶100 稀释后加入 ELISA 板孵育 1 h，洗板后，加羊抗人 sIgE 反应后显色，酶标仪上 450 nm 测定 OD 值。

2　结果

2.1　融合蛋白的表达

选择有明显目标蛋白表达的菌株,并选择 16 h 作为诱导时间,IPTG 诱导融合蛋白的表达,电泳检测表达情况,结果显示在 26×10^3 处有融合蛋白的表达,蛋白相对分子质量与预计值(26.3×10^3)相符,且存在于裂解液上清中,见图 1。应用凝胶电泳图像分析系统计算出目的蛋白约占总蛋白的 35% 以上,说明 *Hum s*1 基因在 pET32a-G2 表达载体系统中得到高效表达。

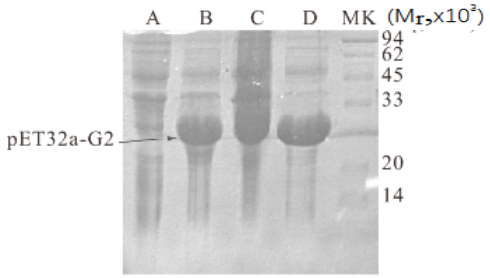


图 1 目标蛋白表达结果

Fig 1 The expression of target protein

A: The lysate of whole bacteria without induction; B: The lysate of whole bacteria after induction; C: The sediment of whole bacteria lysate after induction; D: The supernatant of whole bacteria lysate after induction; MK: Protein marker

2.2 目标蛋白的纯化

融合蛋白经酶切并 His-tag 柱纯化后的结果见图 2,电泳结果表明融合蛋白被酶切后呈现出 2 条相对分子质量分别为 16×10^3 及 10×10^3 的蛋白条带,目标蛋白存在于 His 柱穿透液。图 3 显示了经 Q 柱纯化后的目标蛋白,经 Pixel Intensity 软件计算目标蛋白纯度达 90%以上。

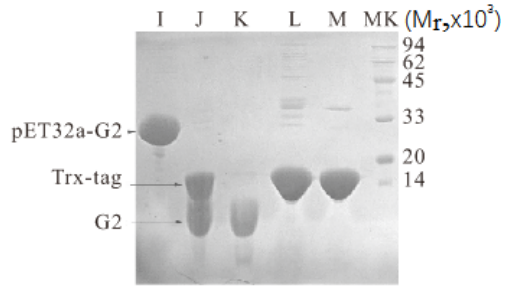


图 2 融合蛋白酶切及 His 柱纯化酶切后目标蛋白结果

Fig 2 The results of digestion of fusion protein and purification of digested protein with His column

I: The fusion protein before digestion; J: The fusion protein after digestion; K: The penetration solution of His column; L: The eluantion of His column 1; M: The eluantion of His column 2; MK: Protein marker

2.3 目的基因编码蛋白结构的生物信息学分析

用 Antheprot 软件对 *Hum s*1 基因编码蛋白进行分析,结果见图 4,显示其有 3 个潜在的抗原表位,分别为 1～9 位、17～24 位及 36～56 位氨基酸(黄色突出部分),肽链的二级结构(图 5)以 α-螺旋为主(76%),片层与转角结构非常少。亲、疏水性分布较均匀,为膜表面蛋白,无跨膜结构。InterProScan 分析出 *Hum s*1 基因编码蛋白含有 2 个钙结合蛋白的 EF-手型结构域。SWISS-MODEL

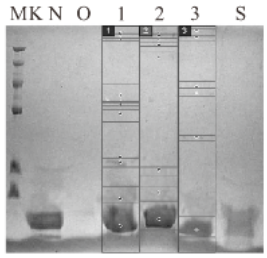


图 3 目标蛋白经 Q 柱纯化后电泳图及纯度分析

Fig 3 Purification of target protein with Q column and purity analysis

N: The fusion protein after digestion; O: The penetration solution of Q column; 1: The eluantion of Q column 1; 2: The eluantion of Q column 2; 3: Eluant of Q column 1; MK: Protein marker; S: Eluant of Qcolumn 2

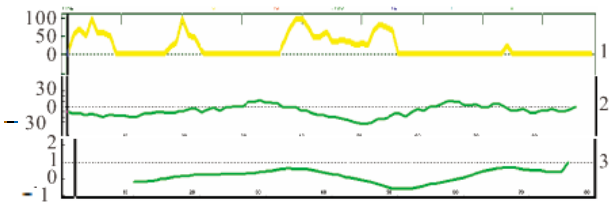


图 4 *Hum s*1 基因编码蛋白抗原性、疏水性、跨膜结构预测

Fig 4 Prediction of antigenicity, hydrophobicity and transmembrane structure of the protein encoded by *Hum s*1 gene

1: The curve of antigenicity; 2: The curve of hydrophobicity; 3: The curve of transmembrane structure

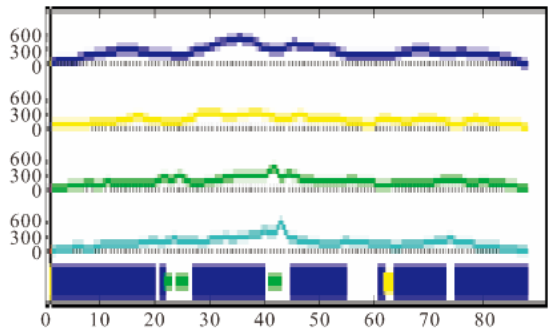


图 5 *Hum s*1 基因编码蛋白二级结构预测及比例

Fig 5 Prediction and proportion of secondary structure of the protein encoded by *Hum s*1 gene

Blue: Helix; Yellow: Sheet; Green: Turn; Light blue: Coil

同源构建出三维目标蛋白模型(图 6)，以 2opoB 为模板，序列同源性 58%，E-value：1.82e-15，分辨率 1.75A，说明构建的三维模型稳定，可靠。

2.4　ELISA 试验鉴定表达蛋白的免疫学特性

ELISA 试验显示表达的目的蛋白与 8 例葎草花粉过敏患者血清 sIgE 均能特异性结合，具有良好的免疫学活性(图 7)。

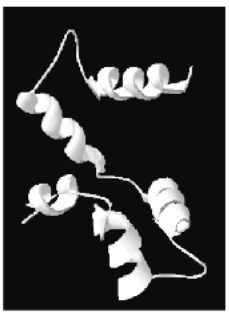


图 6　*Hum s*1 基因编码蛋白二级结构预测

Fig 6　Prediciton of secondary structure of the protein encoded by *Hum s*1 gene

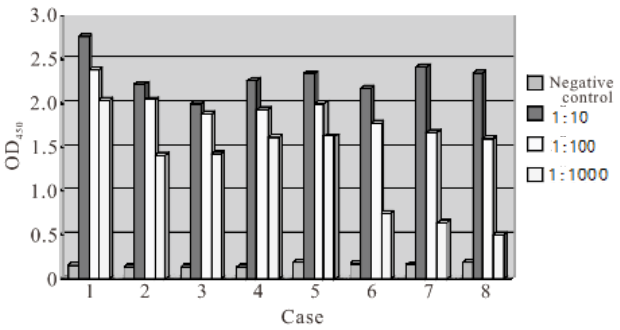


图 7　表达的目的蛋白与 8 例葎草花粉过敏患者血清特异性 IgE 结合 ELISA 实验

Fig 7　The specific IgE ELISA binding experiment of target protein using serum sample of eight patients who were allergic to Humulus Scandens

1-8：The serum of eight patients

3　讨论

本课题组的既往研究发现葎草花粉是西安地区主要的气传花粉致敏原[10]，我们将葎草花粉变应原提取液用于过敏性哮喘患者过敏原的诊断及特异性免疫治疗，曾取得较好疗效。但因为粗制变应原提取液成分复杂，有引起严重过敏反应的风险，国家已严格限制粗制变应原在过敏性疾病的诊断及治疗中的应用。因此，寻找新的、安全性更高的变应原产物用于过敏性疾病的诊断及治疗，成为目前变态反应研究的热点。

变应原提取液的的纯度及质量决定了过敏原诊断的准确性及特异性免疫治疗的疗效及副作用，天然变应原提取液成分非常复杂，除包含有主要致敏蛋白、多种次要致敏蛋白，还包含有多种杂质，其组分难以精确标准化及定量，其应用于过敏性疾病的特异性免疫治疗，不仅有诱发严重过敏反应的危险，也有诱导新的过敏产生的风险，使患者对原来不过敏的成分反而产生过敏，从而加重过敏性哮喘的症状，因此粗制变应原提取液的应用受到限制[11]。而详细了解变应原的成分及组分，解读变应原致敏组分的基因及分子结构，制备重组变应原疫苗用于过敏性疾病的诊断及特异性免疫治疗，为变态反应性疾病的特异性免疫治疗提供了新的思路[12,13]。在近十年来，国内外有关重组变应原的研究取得了很大的进展，杨属、梯牧草、悬铃木属、车前属、松属、橄榄属等多种花粉变应原的致敏蛋白成分已被确定[14]，多种变应原的主要致敏蛋白(如 Bet v1，Blag 2 及 Ara h1 等)的三维结构已被成功构建，桦树花粉的 IgE 结合位点、T 细胞活化位点已被明确定位，从而重组合成低致敏性花粉变应原疫苗用于脱敏治疗[15,16]。

本研究在既往研究的基础上，对从葎草花粉 cDNA 表达文库中筛选到的一个新发现的葎草花粉 cDNA 序列(将此基因命名为 *Hum s*1)进行了表达、纯化及结构预测分析。为获得大量高纯度的变应原，我们采用了 pET 表达系统，结果获得占总蛋白量 35%的目的蛋白，蛋白相对分子质量与预计值相符，表明目标蛋白在此表达系统内高效表达，经 His 柱和 Q 柱纯化后，蛋白纯度达到 90%以上。ELISA 试验显示表达的目的蛋白与 8 例葎草花粉过敏患者血清 sIgE 均能特异性结合，具有良好的免疫学活性。

蛋白质的氨基酸序列及其三级结构决定了蛋白的生物学特性，近年来，随着计算机技术的发展，近期研制的很多软件都可预测蛋白结构，而且，研究证明预测得到的蛋白结构与试验测定的结构相符。本研究对 *Hum s*1 基因编码的蛋白结构及功能进行预测，Antheprot 软件预测其有 3 个潜在的抗原表位，分别为 1～9 位、17～24 位及 36～56 位氨基酸，肽链的二级结构以 α-螺旋为主，片层与转角结构非常少。亲、疏水性分布较均匀，为膜表面蛋白，无跨膜结构。InterProScan 分析 *Hum s*1 基因编码蛋白含有 2 个钙结合蛋白的 EF-手型结构域，提示 *Hum s*1 基因属于花粉钙结合蛋白家族(polcalcins)。而对钙结合蛋白家族的研究发现，EF-手型结构域广泛

存在于多种花粉变应原的基因结构中，如具有 2 个手型结构域的 *Bet v*4、*Aln g*4、*Cyn d*7、*Phl p*7、*Ole e*3 和 *Bra r*1，3 个手型结构域的 *Bet v*3，4 个手型结构域的 *Jun o*4、*Ole e*8 等花粉变应原，钙离子在这些花粉变应原与 IgE 抗体的结合中发挥重要作用[17,18]。本研究同时应用 SWISS-MODEL 软件同源建模的方式构建目标蛋白三维模型，以预测出该蛋白的三维结构，从图中也可以看出 *Hum s*1 基因编码蛋白含有 5 个 α-螺旋结构。而既往研究发现，变应原蛋白表面的 α-螺旋可能是潜在的 IgE 结合位点[19]。根据上述潜在的抗原表位及 IgE 结合位点，我们可以改造上述 EF 结构域或 α-螺旋结构，从而获得低致敏性变应原，降低重组变应原的致敏性，减弱脱敏治疗过程中可能诱发的过敏反应，为葎草花粉过敏性疾病的特异性免疫治疗提供新的研究方向。

本研究通过重组、表达葎草花粉主要变应原 *Hum s*1 基因并对其编码蛋白的结构及功能进行预测，为制备低致敏性的标准化重组变应原奠定了基础。

参 考 文 献

1 Wallner M1, Pichler U, Ferreira F, *et al*. Recombinant allergens for pollen immunotherapy. Immunotherapy, 2013; 5(12): 1323-1338.

2 李 娜，姜玉新，刁吉东等. 粉尘螨Ⅲ类重组变应原对哮喘小鼠免疫治疗的效果. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2014; 32(4): 280-284.

3 Klimek L, Schendzielorz P, Pinol R, *et al*. Specific subcutaneous immunotherapy with recombinant grass pollen allergens: first randomized dose-ranging safety study. Clin Exp Allergy, 2012; 42(6): 936-945.

4 Yin J, Ye ST, Gu RJ, *et al*. An important allergenic pollen in china-humulus. J Allergy Clin Immunol, 1995; 95(1): 164-166.

5 卢家美，孙秀珍，李满祥等. 西安市气传花粉变应原 20 年变化特点研究. 国际呼吸杂志，2012; 32(3): 340-343.

6 卢家美，孙秀珍，李满祥等. 西安市过敏性哮喘变应原谱的分析. 西安交通大学学报(医学版)，2012; 33(6): 728-731.

7 王 班，高 萍，刘 洁等. 上海市西南部空气中气传花粉调查. 中华临床免疫和变态反应杂志，2010; 4(3): 168-175.

8 刘 昀，孙秀珍，张王刚等. 葎草花粉 cDNA 表达文库的构建及鉴定. 西安交通大学学报(医学版)，2006; 27(4): 327-329.

9 徐 晶，孙秀珍，刘 昀等. 从葎草花粉 cDNA 表达文库中筛选过敏性哮喘特异性变应原. 中华医学杂志，2009; 89(42): 3002-3006.

10 刘 昀，孙秀珍，李 维等. 变态反应性疾病变应原的体内外诊断及分析. 国际呼吸杂志，2009; 29(1): 20-23.

11 Akdis M. New treatments for allergen immunotherapy. World Allergy Organ J, 2014; 7(1): 23. doi: 10.1186/1939-4551-7-23.

12 Couderc R, Just J. Recombinant allergens for diagnosis and specific immunotherapy——value in pediatric patients. Bull Acad Natl Med, 2013; 197(3): 645-659.

13 Jutel M, Akdis CA. Novel immunotherapy vaccine development. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014; 14(6): 557-563.

14 Dewitt AM, Andersson K, Peltre G, *et al*. Cloning, expression and immunological characterization of full-length timothy grass pollen allergen Phl p 4, a berberine bridge enzyme-like protein with homology to celery allergen Api g 5. Clin Exp Allergy, 2006; 36(1): 77-86.

15 Mahler V, Vrtala S, Kuss O, *et al*. Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v1. Clin Exp Allergy, 2004; 34(1): 115-122.

16 Reuter A, Fortunato D, Perono Garoffo L, *et al*. Novel isoforms of Pru av 1 with diverging immunoglobulin E binding properties identified by a synergistic combination of molecular biology and proteomics. Proteomics, 2005; 5(1): 282-289.

17 Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, *et al*. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. Allergy, 2004; 59(3): 243-267.

18 Garmatiuk T, Swoboda I, Twardosz-Kropfmüller A, *et al*. Characterization of mutants of a highly cross-reactive calcium-binding protein from Brassica pollen for allergen-specific immunotherapy. Immunobiology, 2013; 218(9): 1155-1165.

19 García-Mayoral MF, Treviño MA, Pérez-Piñar T, *et al*. Relationships between IgE/IgG4 epitopes, structure and function in *Anisakis simplex* Ani s 5, a member of the SXP/RAL-2 protein family. PLoS Negl Trop Dis, 2014; 8(3): e2735. doi: 10.1371/journal-pntd.0002735.

(2015－03－18 收稿，2015－10－11 修回)

编辑 汤 洁