

论著

腰果主要过敏原 Ana o 3 的重组表达与鉴定

闫娟娟¹, 余钿田¹, 张嘉懿², 边颖¹, 李会强¹

(1. 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2. 天津市儿童医院检验科, 天津 300074)

摘要:目的 克隆获得腰果主要过敏原 Ana o 3 基因, 并利用 pCold-SUMO 原核表达载体重组表达 Ana o 3 并鉴定免疫活性。方法 提取腰果总 RNA, 逆转录至 cDNA, 设计特异性引物, 通过巢式 PCR 技术克隆腰果 Ana o 3 基因, 将其插入 pCold-SUMO vector, 鉴定并测序; 将测序正确的阳性质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3), 低温 15 °C 诱导表达。摸索诱导表达条件, 经镍柱纯化, 并通过 Western blot 鉴定免疫活性。结果 测序结果表明, 克隆腰果 Ana o 3 基因片段全长为 417 bp, 与 GenBank 上 Ana o 3 基因 CDS 序列基本一致; 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 目的蛋白分子量为 27 kD 左右, 大小与理论值相符; Western blot 结果表明, 与腰果过敏阳性血清具有良好的反应性。结论 从腰果中成功克隆了 Ana o 3 基因, 并于原核系统表达了 Ana o 3 蛋白, 证实了此蛋白与腰果过敏血清具有良好的反应性。

关键词:腰果; Ana o 3; 基因克隆; 重组; 表达; 过敏原; 免疫印迹; 食品安全

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2017)01-0037-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.01.008

Prokaryotic expression and identification of recombinant cashew nut allergen Ana o 3YAN Juan-juan¹, SHE Tian-tian¹, ZHANG Jia-yi², BIAN Ying¹, LI Hui-qiang¹

(1. College of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China;

2. Department of Medical Laboratory, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China)

Abstract: Objective To clone and express an important cashew nut allergen Ana o 3 in *Escherichia coli* (*E. coli*) using pCold-SUMO expression vector and identify its immunocompetence. **Methods** Total RNA was extracted from the cashew nut and reverse transcribed into cDNA. Then, the full-length cDNA sequence of Ana o 3 was amplified by nested polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, and subsequently inserted into the pCold-SUMO expression vector between *Stu* I and *Bam* H I restriction sites. The correct construct was identified by both colony PCR and gene sequencing. The inducible expression of Ana o 3 was performed at 15 °C by an addition of L-(+)-arabinose and isopropyl b-d-thiogalactoside (IPTG), and the purification of the recombinant His-tagged protein was accomplished by the Ni-NTA purification system. The immunocompetence of the recombinant Ana o 3 was evaluated by Western blot. **Results** DNA sequencing analysis showed that the full length of Ana o 3 was 417 bp, encoding a polypeptide of 138 amino acids which was in accordance with that in GenBank. Also, the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis result indicated the molecular weight of the recombinant Ana o 3 was 27 kD, which was in agreement with the theoretical value. Additionally, Western blot results showed that the recombinant Ana o 3 had good reactivity with 13 cases of cashew-allergic serum samples. **Conclusion** A recombinant expression vector of Ana o 3 had been successfully constructed, and the purified recombinant protein exhibited good reactivity with cashew-allergic sera.

Key words: Cashew nut; Ana o 3; gene clone; recombination; expression; allergen; Western blot; food safety

腰果过敏是一种常见的坚果类过敏,甚至成为影响人类健康的危险因素之一^[1]。流行病学研究发现,欧美等发达国家坚果类过敏的患病率高达

1.4%^[2],坚果类食物中腰果过敏的发病率为15%~30%^[3];而在我国无锡地区,陈国千等^[4]用德国 Mediwiss 过敏原检测系统检出儿童腰果过敏阳性率为19%。腰果过敏是由 IgE 介导的变态反应,可引起皮肤、呼吸道和胃肠道症状,严重时可导致过敏性休克,且危及生命^[5]。

食物过敏原特异性 IgE (sIgE) 检测是诊断食物过敏的重要方法之一,分子诊断是 sIgE 检测的重要趋势。分子诊断强调以单一组分为已知抗原,替代食物

收稿日期:2016-11-06

基金项目:天津医科大学校基金面上项目(2014KYM08)

作者简介:闫娟娟 女 硕士 研究方向为食物过敏实验诊断

E-mail:13502190375@163.com

通信作者:李会强 男 教授 研究方向为食物过敏实验诊断及相

关技术 E-mail:lihuiqiang1965@163.com

蛋白提取液(混合蛋白),分别检测待检血清中 sIgE,减少彼此干扰,有效提高 sIgE 检测的准确性^[6]。目前,已明确的腰果过敏组分有3种,即 Ana o 1、Ana o 2、Ana o 3。Ana o 1 为 50 kD,7S 的豌豆球蛋白;Ana o 2 为 33 kD,11S 的球蛋白;Ana o 3 为 12.6 kD,2S 的白蛋白^[7]。研究报道,3种重组过敏原与腰果过敏阳性血清特异性 IgE 结合频率依次为 50%、62% 和 93%^[8-10]。天然过敏原提取困难,且蛋白容易降解,难于标准化^[11]。因此,本研究通过构建 Ana o 3 重组质粒并以大肠埃希菌(*Escherichia coli*)作为表达宿主,进而获得可溶性好、表达量高、免疫活性强的重组 Ana o 3,为实现腰果 sIgE 分子诊断提供优质抗原。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及血清来源

新鲜腰果购自天津世纪联华超市,腰果过敏阳性血清、阴性血清由天津市儿童医院提供。

腰果过敏阳性病例共 13 例(见表 1),临床诊断依据包括:典型的临床过敏史,血清总 IgE > 100 kU/L,腰果 sIgE > 0.35 kU_A/L 等。阴性对照血清 1 例,来自无任何过敏史的健康体检人群。

表 1 腰果过敏阳性病人临床资料

Table 1 Clinical characteristics of cashew-allergic patients

编号	性别	年龄	临床 sIgE 水平	
			浓度/(kU _A /L)	分级
1	男	5 月	0.71	2.0
2	男	12 岁	0.51	1.4
3	男	1 岁	0.39	1.1
4	男	14 月	2.90	2.8
5	男	3 岁	2.30	2.5
6	女	14 岁	28.80	4.3
7	男	1 岁	10.60	3.5
8	男	2 月	0.71	2.0
9	男	1 岁	0.45	1.3
10	女	1 岁	0.41	1.1
11	男	11 岁	0.41	1.1
12	女	5 岁	0.45	1.3
13	男	3 岁	1.40	2.2

1.1.2 主要仪器与试剂

水平摇床,PCR 仪、Mini-PROTEAN 3 垂直板型电泳仪、Mini Trans-Blot 电转印槽、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad,Nano Drop 2000c 分光光度计(美国 Thermo scientific)。

Escherichia coli Top 10 感受态细胞、*Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞、原核表达载体 pCold-SUMO vector、Trizol、总 RNA 提取试剂盒、逆转录第一链合成试剂盒、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、快速 DNA 产物纯化回收试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒、Trans2K plusII DNA Marker、Q5 Hot start

DNA pol、Pfu DNA 聚合酶、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Stu* I、*Bam*H I 均购自大连宝生物公司,镍柱(德国 Invitrogen),辣根过氧化物酶(HRP)底物(美国 Millipore),鼠抗人 IgE-HRP(美国 Sigma),氨苄青霉素、*L*-阿拉伯糖、丙基-β-*D*-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、细菌裂解液(1% Triton-X100,1 mmol/L 溶菌酶,0.1 mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液)等试剂均购自上海生工生物工程股份有限公司,特异性引物也由其合成。

1.2 方法

1.2.1 Ana o 3 基因的克隆

取腰果植物组织样品,按照 Trizol 说明进行总 RNA 提取,利用 Nano Drop 2000c 分光光度计进行纯度分析。然后逆转录 PCR(RT-PCR)获得腰果 cDNA。根据 GenBank 中 Ana o 3 的核酸序列(AY081853.1),设计巢式引物(见表 2),通过巢式 PCR(Nested PCR)技术获得 Ana o 3 目的基因。

表 2 巢式 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for nested PCR

引物	序列(5'-3')	酶切位点
F1	TGGCAAAGTCTTACTCTCCT	无
R1	AAACGCCAGAGTTGTGAAGC	无
F2	AAAAGGCCTTATGGCAAAGTCTTACTCC	<i>Stu</i> I
R2	CGCGGATCCCTAATAAGATGACTGAAA	<i>Bam</i> H I

注:下划线为酶切位点

1.2.2 表达载体 pCold-SUMO-Ana o 3 的构建

将获得的 Ana o 3 基因与 pCold-SUMO 质粒进行 *Stu*I 和 *Bam*H I 双酶切,T4 DNA 连接酶将回收产物相互连接,即得重组质粒。将重组质粒转入 *Escherichia coli* Top10,涂布含有氨苄青霉素的 LB 培养基(100 μg/ml)进行抗氨苄青霉素筛选,挑取单个菌落进行菌落 PCR,设置空载对照,鉴定片段大小并测序。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的菌株进行质粒提取,转化至表达菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)。将含有重组质粒的表达菌株,接入 LB 培养基(*L*-阿拉伯糖 0.5 mg/ml、氨苄青霉素 100 μg/ml),扩大培养至 600 nm 吸光度(OD₆₀₀)为 0.4~0.6 时,15℃静置 30 min。留取一部分菌液为未诱导,剩余进行 15℃分管诱导,9 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,加入裂解液,冰上超声破碎。4℃、12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,检测 IPTG 终浓度(0.5、1 mmol/L)、诱导时间(3、24 h)对 Ana o 3 可溶性表达量的影响。设置 pCold-SUMO 空载质粒及 *Escherichia coli* BL21(DE3)空菌为蛋白表达阴性对照。最后用 12% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

1.2.4 重组蛋白的纯化

按照最优表达条件扩大蛋白表达量,获取细菌裂解上清。因重组蛋白带有 His 标签,采用 Ni-NTA 进行目的蛋白提纯。首先,在柱子中加入 Ni-NTA 和不含咪唑的 Binding Buffer (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, pH = 8.0) 进行镍柱平衡;然后加入细菌裂解上清 4 °C 慢摇 1 h,使目的蛋白与镍柱进行充分结合;为了去除未结合蛋白,加入含低浓度咪唑的 Wash Buffer (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 咪唑 20 mmol/L);最后加入含高浓度咪唑的 Elution Buffer (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 咪唑 250 mmol/L) 洗脱亲和柱,收集洗脱液,SDS-PAGE 检测纯化结果。最终,用 Nano Drop 2000c 分光光度计检测蛋白浓度。

1.2.5 重组蛋白的免疫活性鉴定

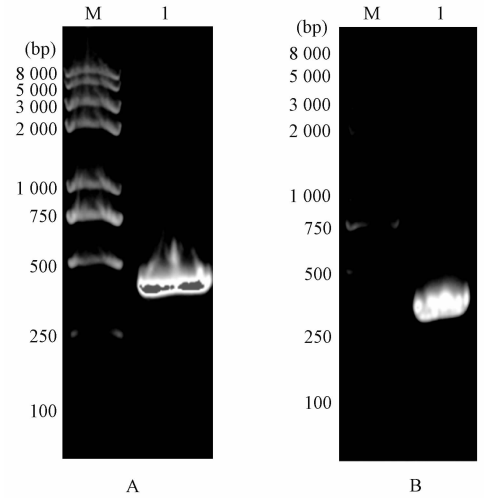
采用 Western blot 将重组 Ana o 3 抗原转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上,条件为:70 V 恒压 1.5 h;加入 5% 脱脂牛奶封闭,室温慢摇 2 h;TBST 洗 3 次,10 min/次,将 13 例腰果过敏性血清及阴性对照血清分别 1:10 稀释至 1 ml,4 °C 慢摇过夜;洗涤,加入 1:7 500 稀释的鼠抗人 IgE-HRP,室温孵育 1 h;洗涤,最后加入 HRP 化学发光底物,反应 3 min,曝光。

2 结果

2.1 Ana o 3 基因克隆结果

巢氏 PCR 第一轮扩增出目的片段,经琼脂糖凝胶电泳后,在约 480 bp 处有一条亮带,与理论预测

大小 487 bp 相符,见图 1A;以第一轮 PCR 产物为模板,在第二对引物的作用下扩增出目的片段,与理论预测大小一致(436 bp),见图 1B。



注:A 图中 M 为 Marker, I 为 Ana o 3 第一轮 PCR 产物;

B 图中 M 为 Marker, I 为 Ana o 3 第二轮 PCR 产物

图 1 腰果过敏原 Ana o 3 基因克隆

Figure 1 Gene cloning results of cashew nut allergen Ana o 3

2.2 重组质粒 pCold-SUMO-Ana o 3 的构建及鉴定

Ana o 3 基因产物及 pCold-SUMO 载体经酶切、连接后,构建重组表达载体 pCold-SUMO-Ana o 3,构建简图见图 2。空载 pCold-SUMO 及重组表达载体 pCold-SUMO-Ana o 3 分别进行菌落 PCR,琼脂糖凝胶电泳见图 3,可以看出泳道 2 重组质粒与泳道 1 空载相差约 400 bp 左右,表明大小与预测的理论值

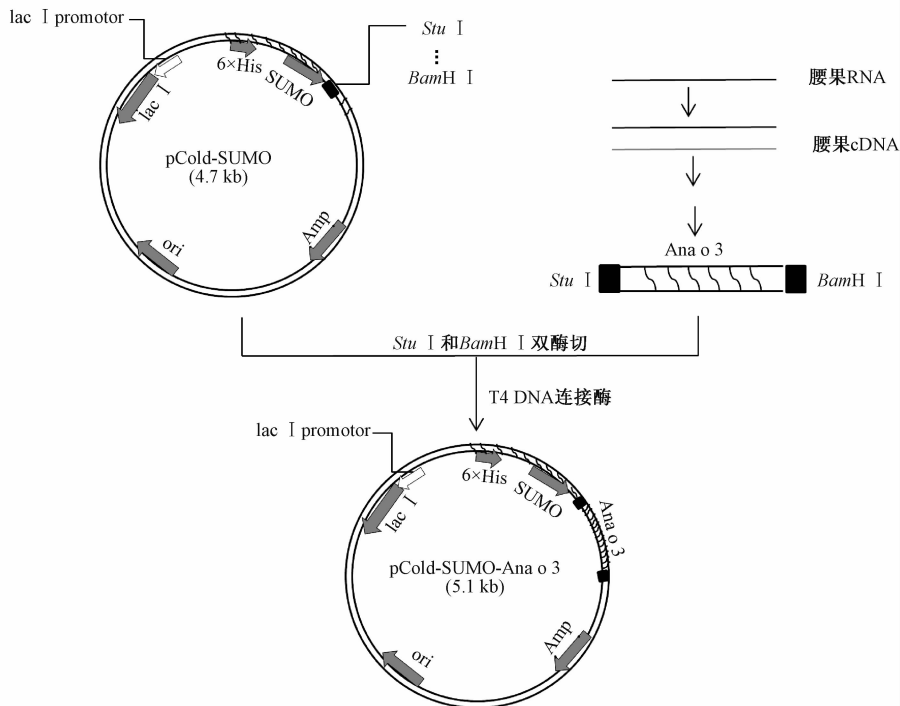
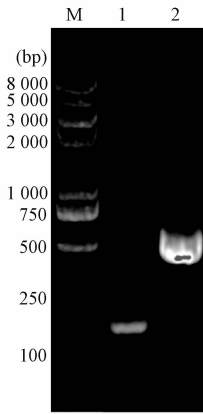


图 2 Ana o 3 基因表达质粒的构建

Figure 2 Construction of recombinant plasmid pCold-SUMO-Ana o 3



注: M 为 Marker; 1 为 pCold-SUMO 空载;
2 为 pCold-SUMO-Ana o 3 重组质粒

图 3 重组质粒 pCold-SUMO-Ana o 3 菌落 PCR 鉴定
Figure 3 Identification of recombinant plasmid pCold-SUMO-Ana o 3 by Colony PCR

417 bp 相符。将该阳性菌株进行测序(见图 4), 结果表明与 GenBank 上 Ana o 3 基因编码序列基本一致(99.5%, 415/417), 最终编码出的氨基酸序列完全相同。

2.3 重组 Ana o 3 的诱导表达

图 5A 中 SDS-PAGE 结果表明, 与空菌(1)、空

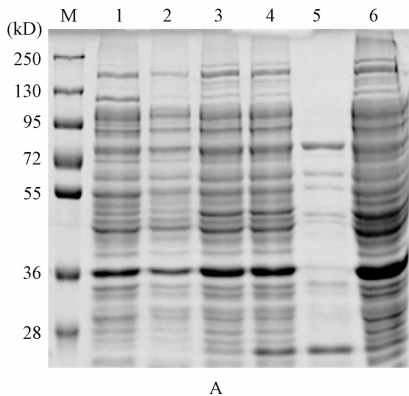
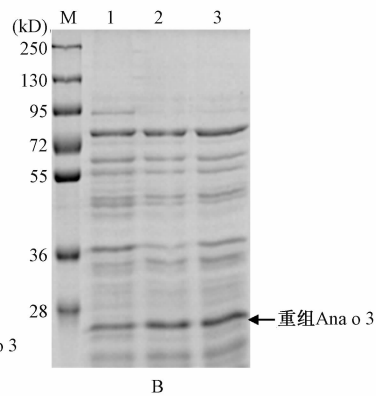


图 4 阳性菌株测序结果与 Ana o 3 的编码序列比对分析
Figure 4 Sequence analysis of positive strains and Ana o 3 in GenBank

载(2)、未诱导(3)阳性菌相比, 阳性菌(4)经 IPTG 诱导后, 明显多出一条带, 约 27 kD。由于 SUMO 标签约 15 kD, 编码的 Ana o 3 蛋白约 12.6 kD, 所以融合蛋白理论值为 27.6 kD, 与电泳显示条带大小一致; Ana o 3 蛋白于上清(5)和沉淀(6)中均存在, 且上清中目的蛋白含量明显多于沉淀。初步摸索上清中可溶性蛋白的诱导表达条件, 图 5B 可见诱导表达浓度 0.5、1 mmol/L 差别不明显, 0.5 mmol/L 效果稍好; 诱导时间 3 h 与 24 h 相比, 无明显差别, 因此, 选择 3 h 进行大量表达。



注: A 图为重组 Ana o 3 的表达及分布情况; M 为 Marker; 1 为空菌株(BL21); 2 为空载体(pCold-SUMO); 3 为未诱导菌体蛋白; 4 为诱导后菌体蛋白; 5 为诱导后菌体裂解上清; 6 为诱导后菌体裂解沉淀(3~6 为阳性菌株); B 图为重组 Ana o 3 的诱导表达条件优化; M 为 Marker; 1 为 IPTG 终浓度 1 mmol/L 诱导 24 h; 2 为 IPTG 终浓度 0.5 mmol/L 诱导 24 h; 3 为 IPTG 终浓度 0.5 mmol/L 诱导 3 h

图 5 Ana o 3 重组蛋白诱导表达情况

Figure 5 Inducible expression of recombinant protein Ana o 3

2.4 重组 Ana o 3 的纯化结果

由于 pCold-SUMO 冷休克表达载体含有 6 个 His 标签, 采用镍柱纯化, 图 6 为纯化后的结果, 箭头所指为目的条带, 电泳扫描显示目的条带比例约占 70% 左右, 经紫外吸收测定, 蛋白浓度为 0.7 mg/ml。

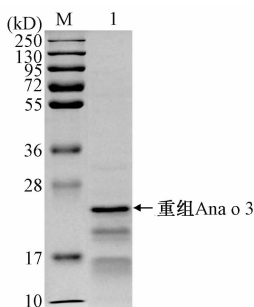
2.5 重组 Ana o 3 免疫活性鉴定

纯化蛋白免疫印迹结果如图 7 所示, 显示腰果过敏阳性血清中除 10 号阳性血清外, 其他均与重组

蛋白显示不同强度的结合, 阴性血清未显示特异性结合。此结果说明重组蛋白与腰果过敏性 sIgE 具有良好的反应性。

3 讨论

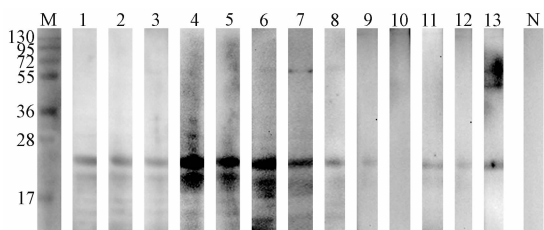
腰果过敏作为一种较常见的食物过敏, 其发病率高, 引起的后果严重, 过敏伴随持久^[12]。腰果过敏原 Ana o 3 分子量小, 相对含量少, 提取天然 Ana o 3 纯品较为复杂, 且批间差异较大。然而, Ana o 3 作为



注:M为Marker;1为Ana o 3重组蛋白镍柱纯化产物

图6 镍柱纯化 Ana o 3 重组蛋白的电泳结果

Figure 6 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein Ana o 3 by Ni-NTA



注:M为Marker;1~13为腰果过敏阳性血清;N为阴性血清

图7 重组 Ana o 3 的 Western blot 结果

Figure 7 Western blot analysis of recombinant Ana o 3

2S 白蛋白,可抵抗胃肠道的消化作用^[13],进而引起过敏的发病率高,因此过敏原 Ana o 3 特异性 IgE 检测具有重要意义。

pCold-SUMO 是一种新型的冷休克原核表达载体^[14],其 SUMO 标签具有抗蛋白酶水解、增加小分子量蛋白表达量等功能,而表达所用的 15 °C 低温又可使蛋白合成速度减慢,从而促进靶蛋白正确折叠、提高蛋白可溶性表达等^[15]。然而,表达过程中仍不可避免的会有包涵体的形成,本研究上清与沉淀比例约为 3:2,这与陈春丽等^[16]表达的 SUMO-dCap 分布比例相一致。镍柱纯化后,除目的条带外,其余两条含量较少的小片段可能为纯化时洗涤不彻底所致。

本研究选用 13 例腰果过敏阳性病例血清作为识别抗体,检测纯化的重组蛋白与其特异性结合能力,结果发现重组 Ana o 3 与 10 例腰果过敏阳性血清反应较强,说明重组 Ana o 3 具有较好的免疫活性。但重组 Ana o 3 与其他 3 例腰果过敏血清反应较弱或者无反应,说明少部分腰果过敏阳性血清中不含针对 Ana o 3 过敏组分的抗体。对比临床资料,发现蛋白免疫印迹结果与腰果 sIgE 浓度并未成良好的线性关系,可能因为临床检测腰果 sIgE 所用的抗原为腰果混合组分 (Ana o 1、Ana o 2、Ana o 3),而本研究的检测抗原为腰果 Ana o 3。本次重组 Ana o 3 对于腰果单组分研究具有重要意

义,不仅可为腰果 sIgE 检测提供优质原料,同时为腰果过敏原 sIgE 的分子诊断创造条件。

参考文献

- [1] Vetander M, Helander D, Flodström C, et al. Anaphylaxis and reactions to foods in children—a population-based case study of emergency department visits[J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(4): 568-577.
- [2] Willison L N, Sathe S K, Roux K H. Production and analysis of recombinant tree nut allergens [J]. *Methods*, 2014, 66(1): 34-43.
- [3] McWilliam V, Koplin J, Lodge C, et al. The prevalence of tree nut allergy: a systematic review[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(9): 54.
- [4] 陈国千, 彭光泉, 唐建英, 等. 无锡地区儿童过敏原分析[J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(9): 844-845.
- [5] Clark A T, Anagnostou K, Ewan P W. Cashew nut causes more severe reactions than peanut: case matched comparison in 141 children[J]. *Allergy*, 2007, 62(8): 913-916.
- [6] Tuano K S, Davis C M. Utility of component-resolved diagnostics in food allergy[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(6): 32.
- [7] Reitsma M, Bastiaan-Net S, Sforza S, et al. Purification and characterization of *anacardium occidentale* (cashew) allergens Ana o 1, Ana o 2, and Ana o 3[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(5): 1191-1201.
- [8] WANG F, Robotham J M, Teuber S S, et al. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(1): 160-166.
- [9] Robotham J M, Xia L X, Willison L N, et al. Characterization of a cashew allergen, 11S globulin (Ana o 2), conformational epitope [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(9): 1830-1838.
- [10] Savvatiyanos S, Konstantinopoulos A P, Borgå Å, et al. Sensitization to cashew nut 2S albumin, Ana o 3, is highly predictive of cashew and pistachio allergy in Greek children [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(1): 192-194.
- [11] Asero R, Ballmer-Weber B K, Beyer K, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: current status and new perspectives [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(1): 135-147.
- [12] Sicherer S H, Munoz-Furlong A, Godbold J H, et al. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(6): 1322-1326.
- [13] Mattison C P, Grimm C C, Wasserman R L. In vitro digestion of soluble cashew proteins and characterization of surviving IgE-reactive peptides [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(4): 884-893.
- [14] 钟晓武, 付强, 邹颀, 等. 烟草糖基转移酶基因 NtGT5a 的克隆及原核表达 [J]. *烟草科技*, 2014(7): 393-397.
- [15] ZHANG L, LI X, WEI D, et al. Expression of plectasin in *Bacillus subtilis* using SUMO technology by a maltose-inducible vector [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(10): 1369-1376.
- [16] 陈春丽, 郭宇飞, 陈筱薇, 等. 利用 SUMO 系统高效表达可溶性猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白 [J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(3): 393-397.