

霜天蛾主要变应原的克隆、筛选及序列分析

刘 昀¹, 孙秀珍¹, 张王刚², 李 唯¹, 冯向莉¹, 徐 晶¹ (西安交通大学医学院第二附属医院¹呼吸内科,²血液内科, 陕西 西安 710004)

摘要:目的 对霜天蛾 cDNA 表达文库进行免疫学筛选, 分离和鉴定霜天蛾主要变应原阳性克隆, 并测定和分析阳性克隆变应原 cDNA 序列, 为制备重组霜天蛾昆虫变应原疫苗和疫苗的标准化奠定基础。方法 构建 λ ZAP II 噬菌体霜天蛾表达文库, 应用霜天蛾免疫多克隆免疫血清和霜天蛾特异性过敏患者血清反复筛选霜天蛾 cDNA 表达文库, 所得的阳性克隆经转化克隆至 pBluescript 质粒, PCR 扩增 cDNA 片段, 并对片段进行序列测定、分析。结果 对 5×10^4 的噬菌体斑进行免疫学筛选, 成功获得 5 个阳性克隆。经 PCR 扩增并测序分析表明, 5 个阳性克隆基因与 GenBank 中已知基因无明显同源性。结论 筛选出 5 个霜天蛾主要变应原的新基因, 为霜天蛾过敏患者的特异性免疫治疗及进一步的实验研究奠定基础。

关键词: 霜天蛾; 变应原; 基因克隆; 免疫学筛选; 序列分析

中图分类号: R394.2; R593.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2007)08-1145-04

Cloning, screening and sequence analysis of the major allergens of *Psilogramma menephoron*

LIU Yun¹, SUN Xiu-zhen¹, ZHANG Wang-gang², LI Wei¹, FENG Xiang-li¹, XU Jing¹

Departments of Respiratory¹ and Hematology², Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: **Objective** To identify and isolate the genes encoding the allergens of *Psilogramma menephoron* by screening the cDNA expression library. **Methods** The cDNA expression library of *Psilogramma menephoron* was constructed in λ ZAP II phage, and the library was screened using the sera from the patients allergic to *Psilogramma menephoron* and those from the rabbits immunized with *Psilogramma menephoron* extracts. The positive clones were subcloned into pBluescript plas, and the cDNA in the positive clones were amplified with PCR and sequenced. **Results and Conclusion** Five positive clones were obtained by immunological screening of 5×10^4 recombinants. Sequence analysis showed that the positive clones contained the new genes of *Psilogramma menephoron* allergens. This success in isolating these genes may facilitate the development of specific immunotherapy against *Psilogramma menephoron* allergy and further research of allergic diseases.

Key words: *Psilogramma menephoron*; allergen; gene clone; immune screen; sequence analysis

变态反应性疾病是一类严重影响人类生活质量的常见病, 被世界卫生组织(WHO)列为 21 世纪重点防治的三大疾病之一。世界各国的变态反应疾病的总发病率约为 10%~30%^[1,2]。近年来国内外的研究表明, 气传昆虫致敏原在变态反应性疾病的发生、发展中与花粉、真菌等起同等重要的作用^[3-5]。多个地区的研究显示蛾是重要的吸入性致敏原^[6-8]。我们既往的调查研究也显示, 霜天蛾是西安地区主要的气传优势致敏昆虫^[9]。研究表明, 应用基因工程技术制备重组变应原不仅可以明确主要变应原的组分及结构, 并且可以保持变应原的抗原性用于变态反应疾病的诊断和治疗^[10]。本研究在成功构建霜天蛾 cDNA 表达文

库的基础上, 应用兔抗霜天蛾多克隆免疫血清及对霜天蛾特异性过敏的患者血清筛选霜天蛾 cDNA 表达文库, 并对筛出的阳性克隆进行序列测定和分析, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 霜天蛾昆虫的收集

5~10 月, 在西安市郊区植被密集地(南为长安区, 东为霸桥区)及杨陵县郊区 3 点分设光源诱捕器, 每晚 8 时至次日凌晨 7 时为捕虫时间, 次日晨收集所捕捉的昆虫, 经鉴定为霜天蛾后活体投入液氮罐内, -180°C 冷冻保存。

1.2 血清的收集及制备

1.2.1 兔抗霜天蛾多克隆免疫血清的制备 霜天蛾粗提液(1 mg/ml)1 ml 加等体积福氏完全佐剂混匀, 多点皮下注射免疫家兔。4 周后霜天蛾粗提液(1 mg/ml)1 ml 加等体积福氏不完全佐剂混匀强化免疫, 后每间隔 1 周强化免疫 1 次, 共强化 3 次, 最后 1

收稿日期: 2007-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(30271160)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30271160)

作者简介: 刘 昀(1972-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 变态反应性疾病的防治, 电话: 029-13572887605, E-mail: yangkun113@sohu.com

通讯作者: 孙秀珍

次强化免疫后第 4 天, 兔耳缘静脉取血, ELISA 试验检测抗体效价 $>1:10000$ 时颈动脉放血, 分装后 -80°C 冷冻保存。

1.2.2 霜天蛾特异性过敏患者阳性血清的收集 临床上选择有夏秋季昆虫过敏史的患者, 霜天蛾变应原皮肤点刺试验阳性且对花粉等变应原无过敏的患者 25 例, 男 10 例、女 15 例, 平均年龄 (35.4 ± 19.5) 岁, 静脉采血 5 ml, 分离血清, -80°C 冷冻保存。

1.2.3 血清的预处理 参照文献[11]的方法制备大肠杆菌裂解液, 超声裂解后取上清, 无菌滤过, 分装后 -80°C 冷冻保存。使用前, 每毫升抗血清中加入 0.5 ml 大肠杆菌裂解液, 置室温缓慢摇动 4 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 保存于 4°C 以备免疫筛选时使用。

1.3 蛋白电泳及免疫印迹分析

1.3.1 霜天蛾变应原蛋白电泳 制备霜天蛾变应原浸液^[12], 浓缩后采用 Bradford 法测定蛋白浓度。取标准蛋白及霜天蛾粗制提取液各 20 μl 按 1:1 比例加入 20 μl 1 $\times$ 上样缓冲液, 沸水浴中加热 10 min, 冷却后 10 000 r/min 离心 10 min。采用不连续变性凝胶电泳(SDS-PAGE): 浓缩胶(5%) 电压为 30 V/cm, 分离胶(12%) 为 20 V/cm, 待溴酚蓝线到达分离胶底部后停止电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色直到背景清晰。在全自动凝胶成像分析系统上测定各组分的分子质量。

1.3.2 免疫印迹分析 霜天蛾变应原浸液蛋白电泳后, 直接转印至 PVDF 膜, 2% 牛血清白蛋白的 TBS 封闭, 然后分别与兔血清(1:100)、人血清(1:10)反应, 4°C 摇动过夜, 清洗后分别与 TBS 稀释的抗人 IgG-HRP(1:200)、抗兔 IgG-HRP(1:2000)反应, 清洗后 DAB 显色液显色。

1.4 cDNA 表达文库的构建与免疫学筛选

本室已成功构建 cDNA 表达文库, 并予以鉴定^[13], 按文献[11]的方法对文库进行免疫学筛选。取 10 μl 噬菌体与过夜培养的 XL1-Blue MRF 大肠杆菌菌液 100 μl 混匀, 37°C 孵育 20 min, 铺平板, 按文库滴度计算平板数, 使每个 90 mm 平皿生长 200~400 个噬菌斑。 37°C 培养过夜, 以高压过的 10 mmol/L IPTG 浸泡过的硝酸纤维素膜铺于平板上, 37°C 继续培养 8 h, 非对称标记后, 剥离硝酸纤维素膜, 依次与封闭液、抗血清、生物素化的抗兔或抗人 IgG(1:500 倍稀释)、亲和素标记碱性磷酸酶(1:400 倍稀释)反应, 最终在 BCIP/NBT 显影液中显色。将滤膜与平板对照, 确定阳性斑区, 用接种环挑取阳性噬菌斑, 放入加有 2 滴氯仿的 1 ml SM 中, 4°C 过夜, 使噬菌体从琼脂块中洗脱出来。按上述方法, 先用兔血清进行初筛, 保证筛选克隆数在 5×10^4 以上。在初筛的基础上, 再用混合人血清进行复筛, 筛选出的阳性克隆更换人血清后再

次复筛 3 遍, 直至筛选出单克隆。

1.5 阳性克隆的分析

1.5.1 噬菌体的体外切割转化为 pBluescript 质粒 混合新鲜过夜培养 XL1-Blue MRF 大肠杆菌菌液 200 μl 、噬菌体 250 μl 、辅助噬菌体 1 μl , 37°C 孵育 20 min, 加入 3 ml LB 培养液, 37°C 振荡培养 3 h, $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min, 后 1000 g 离心 15 min, 保留上清。取 10 μl 上清, 与 200 μl SOLR 大肠杆菌混合, 37°C 孵育 20 min, 铺 LB 平板(氨苄抗性), 37°C 培养过夜, 挑取单克隆, LB 培养基中过夜培养, 保存质粒菌株。

1.5.2 阳性片段的 PCR 扩增 挑取含 pBluescript 质粒的单克隆菌, 接种 LB 培养液中过夜培养, 碱裂解法提取质粒, 以 T3 和 T7 为上下游引物, 以 pBluescript 质粒为模板, PCR 扩增目的片段, PCR 反应条件: 94°C 变性 1 min, 57°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 35 个循环后, 72°C 继续延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 全自动凝胶成像分析系统测定产物片段大小。

1.5.3 阳性克隆的序列测定 提取质粒, 以 T3 和 T7 为测序引物, 采用 Sangei 双脱氧末端终止法, 自动测序仪测序。测序结果与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性比对。

2 结果

2.1 霜天蛾昆虫变应原蛋白电泳结果

霜天蛾粗浸液经 SDS-PAGE 电泳, 染色后显示出了 20 余种蛋白质成分(图 1), 其相对分子质量在 12 000~128 000 之间。

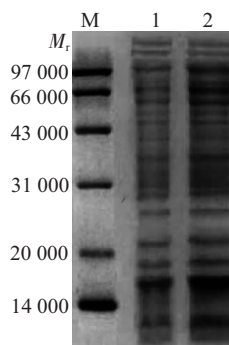


图 1 霜天蛾昆虫粗制液 12%SDS-PAGE 分析

Fig.1 12%SDS-PAGE analysis of *Psilogram mamenephron* protein extracted by Coca's solution

M: Molecular weight marker; Lanes 1, 2: Coca's crude extract of *Psilogram mamenephron*, loaded with 20 μl and 30 μl , respectively

2.2 免疫印迹分析

霜天蛾粗浸液经电泳后转印至 PVDF 膜上, 再与 9 例霜天蛾过敏患者血清中特异性 IgG 结合, 免疫印迹分析结果(图 2)显示有 6 条蛋白反应条带, 相对分

子质量及结合率分别为:79 000 (33.3%),74 000 (66.7%),66 000 (22.2%),49 000 (22.2%),36 000 (44.4%)和 25 000(55.6%)。阴性对照健康人血清及空白对照 TBS 均无条带。

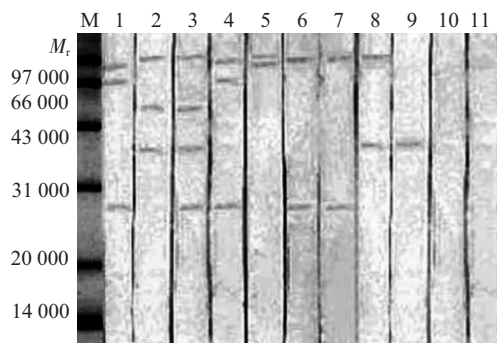


图 2 霜天蛾主要变应原与特异性过敏患者血清免疫印迹结果

Fig.2 Western blotting of the major allergens of *Psilogramma menephron* with the sera of the allergic patients

M: Molecular weight marker; Lanes 1-9: No.1-9 patients allergic to *Psilogramma menephron*; Lane 10: Negative control; Lane 11: Blank control

霜天蛾粗浸液经电泳后转印至 PVDF 膜上,与兔免疫血清中特异性 IgG 结合,免疫印迹分析结果(图 3)显示有 10 条蛋白反应条带,相对分子质量分别为 100 000、92 000、79 000、74 000、66 000、49 000、43 000、36 000、25 000 和 16 000。与人血清的免疫印迹结果比较,二者所识别的蛋白条带相似,兔血清较人血清识别更多的条带。

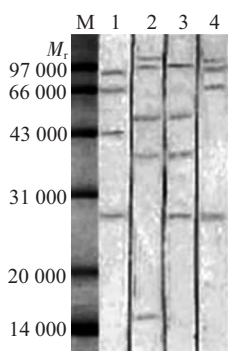


图 3 霜天蛾主要变应原与免疫兔血清免疫印迹结果

Fig.3 Western blotting of the major allergen of *Psilogramma menephron* with immunized rabbit sera

M: Molecular weight marker; Lanes 1-4: No. 1-4 immunized rabbit sera

2.3 阳性克隆的筛选

应用免疫兔血清在对 5×10^4 个噬菌体克隆进行初筛后,得到 24 个阳性克隆,对初筛阳性克隆用过敏患者血清反复复筛,直至单克隆,最后确定 5 个阳性

克隆。

2.4 阳性克隆的 PCR 鉴定

5 个阳性克隆均扩增出单一片段(图 4),全自动凝胶成像分析各片段大小分别为 910、2600、1280、1062 和 1280 bp,表明经过复筛确定的阳性克隆均含有外源性 cDNA 片段,3 号克隆和 5 号克隆可能是相同片段。

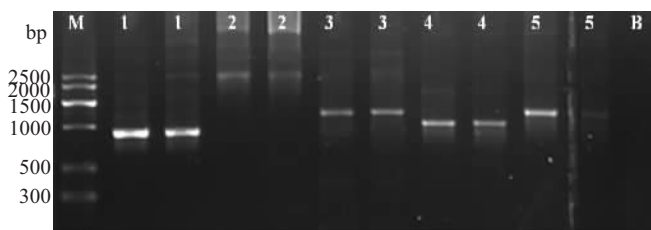


图 4 阳性克隆 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig.4 Gel electrophoresis of the PCR product of the positive clones

M: Molecular weight marker; Lanes 1-5: Clones 1-5; Lane B: Blank control

2.5 阳性克隆的序列分析

对 1、2、4、5 号克隆进行序列测定,并在 GenBank 中进行基因同源性分析,结果表明这 4 个片段均为新发现的基因片段,与已知基因无同源性片段。

3 讨论

近年来随着工业化的迅速发展,变态反应疾病的发病率逐年上升。目前只有特异性免疫治疗是唯一可以影响变态反应疾病的自然病程并有可能阻止疾病进展的有效治疗方法。变应原提取液的质量控制及标准化是影响变态反应病特异性诊断的准确度(灵敏度及特异度)及免疫治疗疗效的关键因素。但天然变应原提取液的成分非常复杂,包括主要、次要致敏蛋白组分、非致敏蛋白组分及其他物质,其效价及组分难以标准化,降低了诊断的特异性及治疗的安全性,使其应用受到限制^[14]。1998 年 WHO 指出:鼓励应用和发展标准化的变应原疫苗,用于变态反应病的诊断和特异性免疫治疗^[15]。越来越多的研究表明,通过基因工程技术获得的标准化重组变应原具有与天然变应原提取液几乎完全相同的变应原性和免疫原性,能取代传统的天然变应原浸液用于变态反应病的诊断和特异性免疫治疗。在近十年来,重组变应原的研究取得了很大的进展,多种变应原如尘螨、花粉、动物毛发、蟑螂及食物等的主要致敏组分已被克隆、重组、分析^[16,17],并用于变态反应病的特异性诊断中,部分重组变应原免疫治疗的应用已进入临床试验阶段^[18]。

变应原的种类具有显著的地区性特点,我们调查

研究了西安地区气传昆虫种类,发现气传优势昆虫主要是蝶和蛾,应用优势昆虫的提取液给哮喘患者行皮肤点刺试验及特异性 IgE 测定,发现霜天蛾的阳性率最高,分别为 52%及 42%^[9],进一步应用霜天蛾提取液对 64 例过敏性哮喘患者进行特异性免疫治疗,总有效率达 76.5%^[19],提示霜天蛾是西安地区主要气传昆虫致敏原。在临床变态反应疾病诊断和脱敏治疗中应尽可能使用具有区域特色的变应原以提高诊断的特异性和治疗的疗效,因此对本地区霜天蛾主要变应原组分分析鉴定具有重要的临床意义,为进一步建立变应原的标准化及质量监控体系提供了先决条件。

对变应原表达文库的筛选,抗体的选择是保证准确筛出变应原致敏组分的先决条件,理想的抗体是多克隆、高滴度、IgG 类且能与天然和变性蛋白不依赖于构象的表位均能特异性结合的抗体。近年来国内外研究者对变应原主要致敏组分的筛选有采用过敏患者血清或家兔、大鼠免疫血清。患者血清筛选变应原致敏组分,虽然更结合临床,但由于患者血清成分复杂,可能会对一些非特异性变应原蛋白组分反应,而产生假阳性结果,纯化后的血清又有可能降低抗体效价,而影响筛选结果;免疫动物血清较患者血清成分单一,而且可以获得高效价抗体,但动物血清抗体与人抗体识别的变应原组分是否一致,尚有待研究。究竟何种抗体更适合于变应原表达文库的筛选,目前尚无相关研究。本研究分别应用霜天蛾特异性过敏患者血清和家兔免疫血清对霜天蛾提取液进行免疫印迹试验,结果表明二者共同识别 6 条蛋白条带,兔血清较患者血清能多识别 4 条蛋白条带。这可能:家兔免疫血清是应用霜天蛾变应原的整体作为抗原免疫家兔而制备的,它包含了所有可能的致敏成分,且经过正规免疫周期和强化免疫,所获得的抗体效价较高;而患者血清只是根据患者特异性过敏成分产生的抗体,血清中抗体效价较低,且具有个体差异性,不同个体所致敏的蛋白成分存在差异。本研究应用霜天蛾变应原提取液免疫兔血清作为探针用于表达文库的初筛,筛选出的阳性克隆进一步再用霜天蛾过敏患者血清反复筛选,既保证能筛选出所有的致敏组分,也保证了所筛选出阳性克隆的特异性。

本研究同时结合免疫动物血清和霜天蛾过敏患者血清筛选霜天蛾表达文库,获得 5 个阳性克隆,进一步测序后,经过对 GenBank 的检索发现,与已知基因无同源性片段,为新发现的霜天蛾致敏蛋白组分,为进一步表达霜天蛾重组变应原,制备标准化变应原疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] WHO Workshop. Asthma management and prevention: the global initiative for asthma ascretariate[C]. 1996: 1-2.
- [2] Vrtala S, Focke-Tejkl M, Swoboda I, et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates[J]. Methods, 2004, 32(3): 313-20.
- [3] Singh AB, Kumar P. Common environmental allergens causing respiratory allergy in India[J]. India J Pediatr, 2002, 69(3): 245-50.
- [4] 陈欢, 刘光辉, 祝戎飞. 武汉地区支气管哮喘患者常见吸入变应原调查[J]. 临床内科杂志, 2004, 21(11): 785-6.
- [5] 程曲径. 哮喘儿童变应原皮试临床分析[J]. 实用临床医学, 2001, 1(4): 39-40.
- [6] Okuda M, Usami A, Itoh H, et al. Nationwide investigation of insect allergy in patients with allergic rhinitis [J]. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 2002, 105(12): 1181-8.
- [7] Wynn SR, Swanson MC, Reed CE, et al. Immunochemical quantitation, size distribution, and cross-reactivity of Lepidoptera (moth) aeroallergens in southeastern Minnesota[J]. J Allergy Clin Immunol, 1988, 82(1): 47-54.
- [8] Gupta S, Jain S, Chaudhry S, et al. Role of insects as inhalant allergens in bronchial asthma with special reference to the clinical characteristics of patients [J]. Clin Exp Allergy, 1990, 20 (5): 519-24.
- [9] 孙秀珍, 刘 昀, 李雅莉, 等. 哮喘患者气传昆虫变应原疫苗的实验[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(19): 1813-5.
- [10] Scheiner O, Malling, Villalba M, et al. Basic and practical aspects of recombinant allergens[J]. Allergens, 1995, 50(5): 384-92.
- [11] 萨姆·布鲁克, 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1192-4, 1175-83.
- [12] 乔秉善. 变态反应学实验技术[M]. 2 版. 北京: 协和医科大学出版社, 2002: 46-55.
- [13] 孙秀珍, 刘 昀. 霜天蛾 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定[J]. 西安交通大学学报, 2005, 26(3): 314-6.
- [14] Bonifazi F, Bilo MB. Efficacy of specific immunotherapy in allergic asthma: myth or reality[J]? Allergy, 1997, 52(7): 698-710.
- [15] Bousquet J, Lockey R, Malling H. WHO position paper. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases [J]. Allergy, 1998, 47(7): 698-704.
- [16] 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[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34 (1): 115-22.
- [17] 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[J]. Clin Exp Allergy, 2006, 36 (1): 77-86.
- [18] Tulic MK, Fiset PO, Christodoulouopoulos P, et al. Amb a 1-immuno-stimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113(2): 235-41.
- [19] 李雅莉, 孙秀珍, 张 洁, 等. 霜天蛾过敏性哮喘患者特异性免疫治疗的效果评价[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2003, 24(3): 237-8.