

论著

牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的一基因片段的克隆、
表达、纯化及抗原性鉴定李建杰^{1,2}, 陈大玮², 闫浩², 杨成彬², 邓利³, 刘杰⁴, 刘志刚^{2,4}, 黄钟^{2,4}(1. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060; 2. 呼吸疾病国家重点实验室
深圳大学变态反应分室, 广东 深圳 518060; 3. 深圳大学生命科学院, 广东 深圳 518060;
4. 深圳大学医学院, 广东 深圳 518060)

摘要:目的 克隆并表达牛奶中主要过敏原 β -乳球蛋白(β -LG)的一基因片段,并检测其抗原性。方法 利用 RT-PCR 技术克隆 β -LG 蛋白基因片段,测序后将目的片段克隆入原核表达质粒 pET 载体,转化至大肠杆菌 origami,经 IPTG 诱导表达,获得重组 β -LG 片段蛋白。用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化,用 Western blot 和 ELISA 检测重组蛋白与牛奶过敏患者血清 IgE 的结合活性。结果 克隆获得 β -LG 片段蛋白,其开放阅读框基因为 264 bp(含终止密码子),编码 87 个氨基酸。获得的重组 β -LG 片段蛋白既以包涵体形式存在又以可溶性形式存在,用可溶性的蛋白进行纯化,经 Western blot 和 ELISA 检测具有较好的抗原性。结论 成功地克隆和表达了 β -LG 的一基因片段,为后续牛奶的免疫原性研究提供参考,也为研制牛奶主要过敏原的单克隆抗体和制备其主要过敏原的检测试剂奠定了基础。

关键词: 牛奶过敏原; β -乳球蛋白; 抗原性; 基因; 鉴定**中图分类号:** R72; S51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2011)02-0109-05**Cloning, expression and allergenicity-characterization of a fragment of the major
milk allergen β -lactoglobulin**Li Jianjie, Chen Dawei, Yan Hao, Yang Chengbin, Deng Li, Liu Jie, Liu Zhigang, Huang Zhong
(Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Objective To clone, express, purify a fragment of β -lactoglobulin, and to identify its allergenicity. **Methods** RT-PCR method was applied to clone the cDNA of a fragment of β -lactoglobulin, and then the fragment cDNA was sequenced and sub-cloned into pET expression vector. The cloned gene was expressed in *E. coli* origami induced by IPTG. The recombinant protein was purified by metal (Ni^{2+}) chelating affinity chromatography. The allergenicity was examined by both Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The recombinant fragment of β -lactoglobulin gene was cloned with a 264 bp open reading frame coding for 87 amino acids. The fragment of β -lactoglobulin was expressed both as inclusion bodies and soluble protein. The soluble protein was purified, and the immunogenicity of the protein identified by ELISA was good. **Conclusion** The clone and expression of the fragment of β -lactoglobulin was successful; which would provide references for the following studies on testing the immunogenicity of milk and lay great foundations for developing monoclonal antibodies and detection kits for the major allergens of milk.

Key words: Milk allergy; β -lactoglobulin; allergenicity; gene; identified

食物过敏是人体对摄入食物中的抗原物质产生的由免疫系统介导的一种不良反应。食品中的过敏原是食品安全的重要影响因素,对人的身体健康和生命安全造成了很大的影响。食品过敏原很

多,但 90% 以上的过敏是由牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果和小麦中的过敏原引起的。WHO 已将这 8 类食品定为常见的主要过敏食品^[1]。

牛奶含有人体必需氨基酸、丰富的钙磷,是人类的重要蛋白质源。尤其对于婴幼儿来说,牛奶是除了母乳之外的重要营养物质,但是牛奶又是较易引起过敏的食物之一^[2]。所以对牛奶中过敏原的检测就显得尤为重要,这就一定要研究其中主要过敏原蛋白的抗原性。

收稿日期:2010-07-09

基金项目:深港创新圈计划项目(200701);深圳大学团队基金(200904)

作者简介:李建杰 男 硕士生 研究方向为食物过敏原的分子生物学 E-mail:lijianjie1@126.com

通信作者:刘志刚 男 E-mail:lzg@szu.edu.cn

牛奶的乳蛋白主要由酪蛋白和乳清蛋白组成,分别约占牛奶总蛋白的 80% 和 20%,而 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)是乳清蛋白的主要成分,占乳清蛋白的 50%,占总蛋白的 12%,在牛奶中的平均浓度为 2 ~ 3 g/L,脱脂牛乳中 β -LG 的含量为 2 ~ 4 g/L,牛初乳中 β -LG 的浓度为 18.2 g/L^[3]。 β -LG 在牛奶中含量高,且其抗胃酸和抗蛋白酶水解,能直接通过胃肠道排出不被吸收而进入血液循环,因此 β -LG 被认为是牛奶中最主要的过敏原^[2]。引起婴儿过敏反应的主要蛋白质就是 β -LG^[4]。IgE 介导的牛奶过敏中 60% 是对 β -LG 过敏。约 82% 的牛奶过敏病人都对 β -LG 过敏^[5]。

与抗体结合者称为 B 细胞表位,包括 IgE 结合表位和 IgG 结合表位。引发食物过敏反应的免疫学物质基础就是过敏原表位,即过敏原中参与结合抗体的组成部分^[6]。Selo 等^[7]在研究 β -LG 时,确定了 β -LG 的主要 IgE 表位(人)为肽链 1 ~ 8 位,25 ~ 40 位,41 ~ 60 位,102 ~ 124 位,149 ~ 162 位;其中,氨基酸序列 41 ~ 60 位,102 ~ 124 位,149 ~ 162 位,这 3 个表位被 90% ~ 100% 过敏患者的血清识别,可认为是最主要的过敏表位。

反刍动物的奶中都含有 β -LG,且不同反刍动物奶中的 β -LG 存在相同或相似序列,故存在交叉反应^[8]。所以对牛奶中 β -LG 过敏的患者若用羊奶等代替牛奶,仍存在较大的过敏风险。故本文对常见反刍动物奶中的 β -LG 进行同源性分析,结合抗原表位的现有研究^[7],特定选取大多数反刍动物奶中含有的 β -LG 的一基因片段,构建该基因片段的表达载体,得到具有抗原活性的 β -LG 的一片段蛋白,为研制奶制品主要过敏原的特异性单克隆抗体和检测试剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司);RT-PCR 试剂盒 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit(BBI 公司);Ex-Taq 酶、限制性内切酶 *Bam*HI 与 *Xho* I 和 T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒(OMEGA 公司);Ni-NTA matrix 柱(Amersham Pharmacia 公司);HRP 标记的兔抗鼠 IgE 抗体、生物素标记的抗人 IgE 抗体、HRP 标记的链霉亲和素(KPL 公司)。

1.2 菌种和质粒

pMD18-T 载体(TaKaRa 公司);原核表达载体 pET-32a(Invitrogen 公司)。克隆菌种为大肠杆菌 Top10 菌株,表达菌种为大肠杆菌 origami 菌株,均

为本实验室保存。

1.3 血清

有牛奶过敏史的患者血清(20 例)由深圳市儿童医院提供,健康人血清为本实验室提供,均储存于 -80 °C 备用。

1.4 序列分析及引物设计

从美国国立生物信息中心(NCBI)的 GeneBank 数据库下载 27 个反刍动物的 β -LG 的核酸序列。利用 Bioedit 软件对这些序列进行同源性比对,确定其保守区域。再结合现有对其表位研究^[7],确定所研究片段。利用 Gene Tool 软件设计并合成引物,上游引物为 5'-CGGATCCACCAAGATCCCTGCGGTGTTC-3',下游引物为 5'-GCTCGAGCTAGATGTGGCACTGCTCCTCCA-3',再在引物上、下游分别添加 *Bam*HI 和 *Xho* I 酶切位点和保护碱基得到特异性引物,引物由上海生工合成。

1.5 牛乳腺总 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增

牛乳腺采购于深圳南山屠宰场。RNA 提取采用 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA,实验方法参照试剂盒说明书。以总 RNA 为模板进行逆转录合成第一链,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,并切胶回收。

1.6 RT-PCR 产物的克隆和测序

回收纯化的 RT-PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接。氯化钙法转化克隆菌大肠杆菌 Top 10。氨苄青霉素(Amp)LB 平板抗性筛选,一部分菌落 PCR 验证,一部分 LB/Amp 培养,菌落 PCR 验证后的阳性菌落培养后小量提取质粒,并用 *Bam*HI 和 *Xho* I 酶切鉴定,重组质粒测序(上海生工完成)。

1.7 重组表达质粒构建

PCR 产物连到 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 Top10,菌落 PCR 及 *Bam*HI 和 *Xho* I 双酶切鉴定。阳性菌落提取质粒,所得质粒与原核表达载体 pET-32a 分别进行双酶切,将获得的基因片段与 pET-32a 的酶切产物相连接,构建重组表达质粒。并转化大肠杆菌 origami,菌落 PCR 鉴定,提取阳性质粒,进行双酶切鉴定,阳性克隆经测序鉴定(北京合华大基因完成)后用于诱导表达。

1.8 β -LG 该片段蛋白的表达和纯化

挑取单菌落培养过夜,按 5% 比例接种于 1 000 ml LB 培养基(含氨苄),37 °C 培养至菌液的 A600 nm 到 0.6,加 IPTG (1 mmol/L),分别取诱导后 2、4、6、8 h 的菌体煮沸后聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)电泳验证诱导条件。确认表达量较高再大量表达。离心收集菌体,重悬于20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中超声破碎,取其上清和沉淀 SDS-PAGE 分析。如该蛋白以溶解形式存在,直接用亲和层析柱(Ni 柱)纯化,分别用40、100、300 mmol/L梯度咪唑洗脱,收集各个梯度洗脱液,取样进行 SDS-PAGE 分析。最后用 Broadford 法测定蛋白浓度。

1.9 West-blot 和 ELISA 检测目的蛋白的抗原性

West-blot:重组蛋白 SDS-PAGE 电泳,转硝酸纤维素膜(湿转法),2%牛血清白蛋白(BSA) 4℃封闭过夜;与 1:20 稀释的牛奶过敏患者特异性抗体 37℃孵育 2 h;加入经 TBST(TBSP/0.05% Tween-20)稀释(1:4000)HRP 标记的兔抗鼠 IgE 抗体,37℃孵育 2 h;以上每个步骤进行完后都用 TBST 洗 3 次(5 min/次)。将膜放入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)底物溶液中显色,双蒸水洗涤终止显色

反应,观察结果。ELISA:碳酸盐缓冲液(pH 9.0)按照 1:1、1:20、1:50 稀释纯化后的 β -LG 的片段蛋白,4℃包被过夜。37℃BSA 封闭 2 h。牛奶过敏患者血清为一抗(1:20 稀释),同时健康人血清为阴性对照,不加待测蛋白为空白对照,37℃孵育 1 h,加入生物素标记的抗人 IgE(1:2 000 稀释)100 μ l 作为二抗,37℃孵育 1 h,再与 HRP 标记的链霉亲和素标记进行反应,最后 TMB 显色,用自动酶标仪检测 A_{450} 值。检测 4 次,取平均值作图。

2 结果与分析

2.1 序列比较以及片段区的筛选

利用 NCBI 数据库中的 BLAST 将 β -LG 基因所编码的氨基酸序列与 GenBank 中的其它序列进行同源性分析,选取同源性高的 27 个反刍动物物种的 β -LG,用 Bioedit 软件,分析其保守序列(见图 1),保守序列为 103-180 氨基酸。

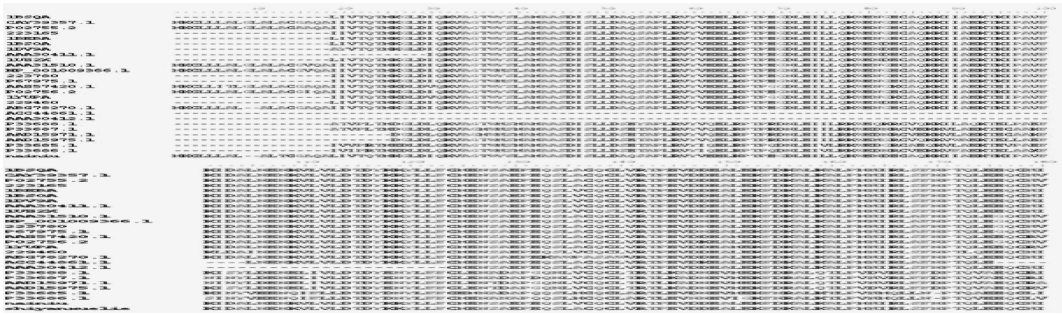


图 1 27 个物种的 β -LG 保守序列分析
Figure 1 Conservative sequence analysis of β -LG of 27 varieties

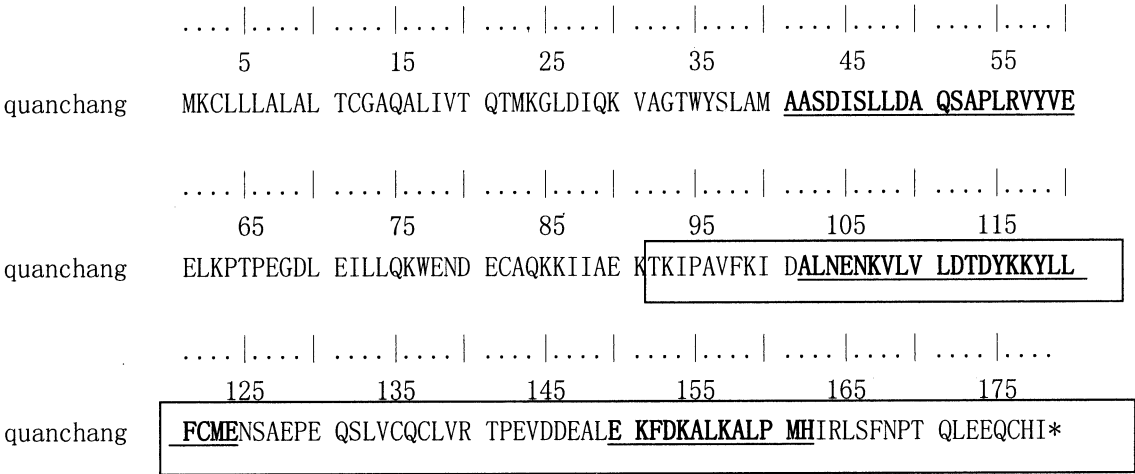


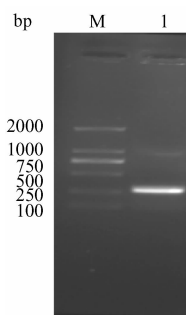
图 2 牛奶主要过敏原 β -LG 的 IgE 主要抗原表位、其在抗原中所处的位置(抗原表位的氨基酸残基用黑体字及下划线表示)及所克隆蛋白的氨基酸序列(图中方框)

Figure 2 Amino acid sequence of β -lactoglobulin. Amino acid residue sequence in bold and underlined corresponds to the sequence of the three IgE peptides identified and Amino acid sequence the study cloned. The numbers on the top of the figure indicate the position of the amino acid sequence in the native β -lactoglobulin. The cloning amino acid sequence in the experiment (middle box).

氨基酸序列 41 ~ 60 位、102 ~ 124 位、149 ~ 162 位为最主要过敏表位^[7],而对同源性较高的 27 个反刍动物物种的 β -LG 进行保守序列分析可知,103-180 位为保守序列,可正好含盖 102 ~ 124 位和 149 ~ 162 位,且对存在于反刍动物保守序列中的这两个主要表位串联一起的免疫原活性未见报道,故本文选择含有 102 ~ 124 位、149 ~ 162 位的保守片段进行免疫原性研究,以求减少不同过敏原蛋白之间的交叉反应和不同物种 β -LG 的检测次数。

2.2 牛 β -LG 该片段区基因的 PCR 扩增

提取的牛总 RNA 经反转录合成 cDNA 第一链,然后以此为模板,用引物进行 PCR 扩增。扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳(图 3),在 264bp 左右有一亮带,大小与理论预计值相符。



M: DNA 分子量标准;1:扩增的
 β -乳球蛋白一基因片段

图 3 牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白一个基因片段的 PCR 产物电泳图

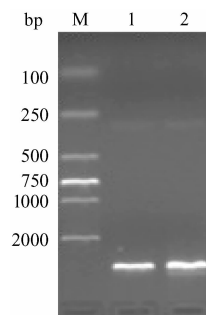
Figure 3 PCR results of a fragment of β -LG in milk

2.3 表达载体的构建和酶切鉴定

提取经菌落 PCR 鉴定为阳性的重组表达质粒,进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图 4,插入的 β -LG 的该基因片段大小约为 264 bp,结果与预期大小相符。阳性克隆的 DNA 序列测定结果显示, β -LG 的该基因片段是正确的,说明此表达载体构建成功。

2.4 β -LG 该片段蛋白的表达和纯化

28 °C 经 IPTG 诱导 4 h 获得重组蛋白,表达蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色显示在相对分子质量 27 kD 左右处有外源蛋白表达条带出现,蛋白相对分子质量与预期结果相符(见图 5-A)。破碎菌体后分别取上清和沉淀进行可溶性分析,结果见图 5-B,表达的重组蛋白在沉淀和上清中都有。利用 pET-32a 载体 5'端的 6 组组氨酸标签,采用 Ni^{2+} 柱亲和层析的方法纯化重组蛋白,进行 SDS-PAGE 分析,用 300 mmol/L 咪唑洗脱的峰中含有大量高纯度的目的蛋白(见图 6)。然后用 Bradford 法测定蛋白浓度,该片段蛋白的浓度为 0.35 mg/ml。



M: DNA 分子量标准;1-2: 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的该基因片段的重组表达质粒

图 4 原核表达载体的 *Bam*H I 和 *Xho* I 的双酶切鉴定

Figure 4 Identification of recombinant plasmid by Double Digests with *Bam*H I 和 *Xho* I

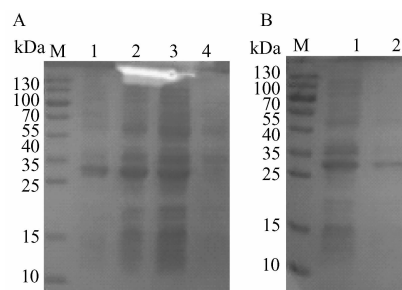


图 5-A M: 蛋白分子量标记;1:诱导 2 h 菌体煮沸上样;2:诱导 4 h;3:诱导 6 h;4:诱导前

图 5-B M: 蛋白分子量标记;1:诱导 6 h 后破碎菌体的沉淀;2:诱导 6 h 后破碎菌体的上清

图 5 牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的一个片段区蛋白诱导表达和纯化

Figure 5 Expression and Purification of recombinant a fragments of β -LG

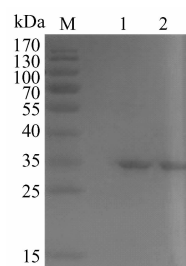


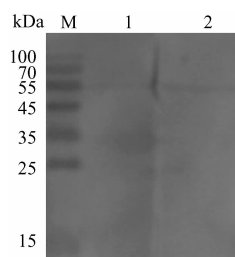
图 6 牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的一个片段区蛋白的纯化

Figure 6 Purification of recombinant a fragments of β -LG

2.5 β -LG 该片段蛋白的抗原性鉴定

见重组表达蛋白 Western-blot 印迹检测,结果在相对分子质量约为 27 kD 处有明显的识别条带(见图 7),说明牛奶重组抗原能与特异性 IgE 反应,具有抗原活性。ELISA 活性检测实验结果(见图 8)显示:该片段也有较好的抗原活性。该片段与健康人

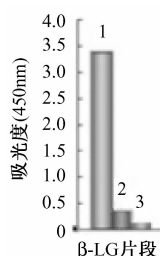
血清无明显反应。



M: 蛋白质分子量标记; 1: 重组 β -LG 一片段蛋白用牛奶过敏患者血清免疫的反应; 2: 阴性对照

图7 纯化后的该重组蛋白的 Western blot 分析

Figure 7 Immunogenic analysis of purified recombinant protein by Western blot analyse



1: 牛奶过敏血清反应; 2: 正常人血清反应; 3: 空白对照

图8 纯化后的重组 β -LG 一片段的 ELISA 活性检测分析

Figure 8 ELISA analysis of purified recombinant protein of the fragment of β -LG

3 讨论

目前检测牛奶过敏常用方法之一为牛奶-特异性 IgE 检测^[9], 而该检测方法的最大缺陷是与其他食物蛋白间存在交叉反应, 所以能够制备针对牛奶中某一过敏原蛋白或该过敏原蛋白特异序列建立高特异性的检测方法, 能很好地避免交叉反应, 从而能特异性地检测出牛奶过敏原。

牛乳 β -LG 属于强过敏原 lipocalin 家族, 也是母乳中不存在的一类蛋白质^[6], 其潜在的高致敏性能成为检测牛奶过敏原的有力指标。目前市场上奶源主要来自牛乳, 也有来自其他物种的乳汁, 故本文根据多个反刍动物物种的 β -LG 存在的保守序列和已有表位报道, 特异性选择 β -LG 中的一个片段进行了克隆表达和免疫原性鉴定, 以达到能特异性检测 β -LG 和减少不同蛋白间交叉反应的效果。

毛露甜等^[10]用饱和硫酸铵分段盐析和 DEAE 离子交换层析的方法对 β -LG 进行了分离纯化, 但该方法不能特异性地得到和研究该蛋白中的特定片段。本实验利用分子克隆的方法, 设计特异性引物, 表达出了 β -LG 特定片段蛋白, 且抗原性较好。说明本方法在研究过敏原蛋白特定片段方面较好。实验中对 β -乳球蛋白一个片段区基因进行 PCR 特

异扩增时, 出现了一条较弱的非特异性条带, 这可能与 PCR 时, Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低及 PCR 循环次数过多有关。可通过降低引物量、适当增加模板量、减少循环次数和适当提高退火温度加以改进。该研究得到的 β -LG 片段蛋白, 经 SDS-PAGE 检测可知, 6 h 时该蛋白量表达较 2 h 和 4 h 大, 且该片段蛋白既以包涵体的形式存在, 又以可溶性的形式存在, 且存在于包涵体中的量比可溶性中的多, 这可能与表达时的温度、蛋白性质等有关。本研究直接选取可溶性的该蛋白进行实验, 经 Western blot 和 ELISA 分析, 都呈阳性反应。同时与健康人血清没有明显反应性, 说明 PTE32a 载体的蛋白序列没有免疫原活性, 对重组的 β -LG 的该片段蛋白没有影响。说明该重组蛋白片段抗原性良好, 该片段蛋白含有确切的抗原表位, 说明以可溶性形式存在的该片段蛋白活性较好, 且保持了良好的折叠和构象。Western blot 实验结果背景较深, 可能是在封闭时 BSA 浓度较低封闭效果不好, 在后续研究中可增大封闭蛋白浓度。本文对不同物种中 β -乳球蛋白进行同源性分析, 选择一个同源序列, 同时尽可能包含较多表位, 这样既减少了交叉反应, 又有较强免疫性, 从而易为检出, 提高了准确率。

本研究证实了 β -LG 的一个片段蛋白的抗原性, 说明可以以该片段蛋白来制备其单克隆抗体, 为后续奶制品的免疫原性研究提供参考, 也为研制奶制品的主要过敏原检测试剂盒奠定了一定的技术基础。

参考文献

- [1] 何韶衡, 刘志刚. 基础过敏反应学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 710.
- [2] 布冠好, 郑枯, 郑海, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(6): 71-76.
- [3] 兰欣怡, 王加启, 卜登攀, 等. 牛奶 β -乳球蛋白研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(6): 109.
- [4] 李永涛, 张兰威, 孔保华. 消除乳清蛋白中 β -乳球蛋白致敏性的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 136-139.
- [5] FRISEH R, ADEL-PATIENT K, BERNARD H. IgE-mediated rat mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine β -lactoglobulin[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2005, 138(4): 291-292.
- [6] 李欣. 水牛乳中 β -乳球蛋白的 IgG 结合表位的定位研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [7] SELO I, CLEMENT G, BERNARD H, et al. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides[J]. Clin Exp Allergy, 1999, 29(8): 1055-1063.
- [8] JOHKE T, ELIZABETH C, HAGEMAN L. Some immunological relationships of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in milks of various species[J]. Biol Chem, 1962, 2(7): 28.
- [9] PATRIARCA G, SCHIAVINO D. Food allergy and food intolerance: diagnosis and treatment[J]. Intern Emerg Med, 2009(4): 11-24.
- [10] 毛露甜, 向军俭, 张在军. 牛乳中主要过敏原组分的分离纯化及鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 17-19.