

DOI:10.13350/j.cjpb.210811

· 论著 ·

粉尘螨聚泛素样蛋白基因克隆、表达与生物信息学分析*

李青青¹, 潘瑞琳¹, 周鹰², 袁存银¹, 崔玉宝^{1**}

(1. 南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 江苏无锡 214023; 2. 南京医科大学附属无锡儿童医院儿科实验室)

【摘要】 目的 克隆、表达粉尘螨聚泛素样蛋白(polyubiquitin, poly-u)的编码基因全长并制备表达质粒,对表达产物进行生物学预测和分析。方法 根据转录组测序及其功能注释结果,以粉尘螨 Total RNA 为模板,RT-PCR 和 RACE 技术获得全长基因后构建原核表达质粒,转化 E. coli BL21(DE3) T1R 感受态细胞中,利用异丙基-b-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,采用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物。采用生物信息学软件分析该基因及其编码蛋白的生物学特征。结果 获得了粉尘螨聚泛素样蛋白的编码基因,全长 1 644 bp,构建的原核表达质粒 pET28a(+)-poly-u 转化 BL21 后经 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定均可见目的蛋白条带。生物信息学分析该基因编码的蛋白质由 547 个氨基酸组成,相对分子质量为 61.3×10^3 。预测二级结构包括 α -螺旋(占 32.54%)、延伸主链(占 15.36%)和无规卷曲(占 52.10%),优势表位可能为 TGGQQMGR、LEDRRTL、IQDKEQIPPDQ。结论 成功获得粉尘螨聚泛素样蛋白的编码基因全长及其原核表达质粒,并对其生物学特征进行了分析,为进一步针对该基因开发尘螨防控措施奠定了基础。

【关键词】 粉尘螨;尘螨;生物信息学;基因克隆;泛素;多聚泛素

【中图分类号】 R384.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2021)08-0922-05

[Journal of Pathogen Biology. 2021 Aug; 16(8): 922-926.]

Cloning, expression, and bioinformatic analysis of the polyubiquitin-like protein gene of *Dermatophagoides farinae*

LI Qing-qing¹, PAN Rui-lin¹, ZHOU Ying², YUAN Cun-yin¹, CUI Yu-bao¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Wuxi Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University) **

【Abstract】 **Objective** To prepare expression plasmids to obtain the full-length gene coding for the polyubiquitin-like protein of *Dermatophagoides farinae* and to characterize that protein. **Methods** Primers were designed and synthesized in accordance with the results of previous transcriptome sequencing by the current authors. The cDNA fragment was verified with RT-PCR using the total RNA of *D. farinae* as a template, and the full-length sequence was obtained using the 5' RACE and 3' RACE techniques. Full-length cDNA was obtained with RT-PCR using total RNA as a template in order to construct a prokaryotic expression plasmid, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) T1R competent cells. Expression was induced with IPTG. The expression product was identified using SDS-PAGE and Western blotting. Bioinformatic software was used to analyze the full-length cDNA sequence and molecular characteristics of the encoded protein. **Results** The product of amplification with RT-PCR produced a clear band on agarose gel electrophoresis, and nucleotide sequencing of the pET28a(+)-poly-u plasmid yielded a coding gene 1 644 bp in length from the start codon ATG to the stop codon TAA. Once the plasmid was transformed into *E. coli* and its expression was induced with IPTG, a specific band was produced on SDS-PAGE and in Western blotting, indicating successful expression. Bioinformatic analysis revealed that the gene encodes a protein consisting of 547 amino acids. The protein had a molecular weight of about 61.3×10^3 . Its secondary structure included α -helices (32.54%), extended strands (15.36%), and random coils (52.10%). Its dominant epitopes may be TGGQQMGR, LEDRRTL, and IQDKEQIPPDQ. **Conclusion** The full-length cDNA of the polyubiquitin-like protein (polyubiquitin, poly-u) in *D. farinae* and its prokaryotic expression plasmid were obtained for the first time. Analysis of its molecular characteristics has laid the foundation for further research on strategies to control dust mites.

【Key words】 *Dermatophagoides farinae*; dust mites; bioinformatics; gene cloning; ubiquitin; polyubiquitin

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. NSFC81971511, NSFC81001330); 2020 太湖人才计划高端人才项目(No. 2020THRC-GD-7); 无锡市卫生计生科研重大项目(No. Z201701)。

** **【通讯作者】** 崔玉宝, E-mail: ybcui1975@hotmail.com

【作者简介】 李青青(1995-), 女, 安徽人, 在读硕士研究生。研究方向: 尘螨与过敏性疾病。E-mail: liqingqing1231@163.com

目前全世界有 30%~40% 人群受过敏性疾病困扰,已成为全球第六大疾病^[1]。20 世纪 60 年代, Voorhorst 报道尘螨是室内灰尘过敏原的主要来源,此后研究表明尘螨是过敏性疾病的重要诱因,如过敏性哮喘、过敏性鼻炎、特应性湿疹等,全球人口总数的 20% 和 50% 的过敏性疾病患者对尘螨过敏^[2-3]。粉尘螨和屋尘螨是我国人居环境中的优势螨种^[4]。为了解尘螨与过敏性疾病的关系,从 1980 年开始,多种过敏原编码基因被测序、克隆和表达,已经发现的粉尘螨和屋尘螨过敏原单组分有近 40 个^[5]。

Cui 等^[6-7]报道,为了解尘螨机体蛋白质的空间结构、优势抗原表位,及其与 T 和 B 细胞表位之间的相互作用,以便于进一步了解蛋白质的作用机制,有针对性地设计出螨类抑制剂和开发杀螨剂用于控制室内尘螨孳生,降低室内过敏原浓度,预防尘螨源性过敏性疾病的发生发展。本研究在进行粉尘螨转录组测序和功能注释时发现一段核酸序列与聚泛素样蛋白(polyubiquitin, poly-u)同源性较高。为进一步探讨其生理功能以及其作为靶点抑杀螨类的可能性,采用分子生物学方法获得了该编码基因全长并构建其原核表达质粒,通过生物信息学软件分析了其理化性质并预测表达蛋白的三维结构等特征,结果报告如下。

材料与方法

1 主要试剂与仪器

RNAiso Plus (Code No. 9108 & 9109), 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase (Code No. 6106), TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (Code No. RR02AG), MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (Code No. 9762), 5'-Full RACE Kit with TAP (Code No. 6107), Tks Gflex DNA Polymerase (Code No. R060A), pSIMPLE-19EcoRV/BAP Vector (Code No. 6012), *E. coli* Competent Cell JM109 (TaKaRa, Code No. 9052), BL21(DE3) T1R 感受态细胞均采购于大连宝生物公司; In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, Code No. 639633) 采购于 Clontech 公司; 电泳成像装置为英国 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; PCR 仪 (C1000) 和电泳仪均购于美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 粉尘螨总 RNA 提取 挑选 500 只粉尘螨,匀浆后使用 RNAiso Plus (Code No. 9108 & 9109) 试剂提取总 RNA,操作步骤按说明书进行。

2.2 目的基因获得 以粉尘螨总 RNA 为模板,使用 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase (Code No. 6106) 反转录合成 cDNA, 试验设立 M-

MLV(-) 对照组。使用 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (Code No. RR02AG) 进行 2 次 PCR 扩增,第 1 次 PCR 引物为 F1、R1,第 2 次 PCR 引物为 F1、R2。PCR 产物使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 (Code No. 9762) 切胶回收。

使用 TaKaRa 5'-Full RACE Kit with TAP (Code No. 6107) 对 5 μl 粉尘螨 Total RNA 进行 CIAP、TAP 处理,与 5'RACE Adaptor 连接后反转录合成 cDNA。5'RACE: 设计并合成引物 R3、R4,使用 TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase (Code No. R060A) 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收并纯化。3'RACE: 设计合成引物 F2、F3,使用 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (Code No. RR02AG) 进行 PCR 扩增,扩增产物电泳后切胶回收。引物序列见表 1,由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	长度 Length (bp)
F1	ATCAGCAACGTTTGATCTTTGC	22
F2	AACAGTTGGAAGATGGCCGAAC	22
F3	ACTTTGACTGGTAAACAAT	20
F4	AATGGTTCGCGATCCATGCAAAATCTTTGTGAAAAC	36
R1	TAGTTTCCACCACGAAGTCG	20
R2	AGATCAATCGTTGCTGGTCTGG	22
R3	ACCACGTAGACGCAATACCAAA	22
R4	CCTTTTGAATATTATAATCGGA	22
R5	GGTGGTGGTCTCGAGTTAGTTTCCACCACGAAGTC	36
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7t	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20

2.3 全长基因克隆及表达质粒构建 使用 TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase (Code No. R060A) PCR 扩增目的基因。反应体系 (50 μl): 反转录 cDNA 2 μl, 2×Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) 25 μl, Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/μl) 1 μl, F4 (20 pmol/μl) 1 μl, R5 (20 pmol/μl) 1 μl, 20 μl dH₂O₂。取 5 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段。使用 In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Code No. 639633) 将目的基因 PCR 产物和 pSIMPLE-19EcoRV/BAP Vector (Code No. 6012) 连接。连接体系: pSIMPLE-19EcoRV/BAP Vector (50 ng/μl) 1 μl, 目的基因扩增 PCR 产物 (50 ng/μl) 2 μl, 5×In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μl, 加 dH₂O₂ 至 10 μl。置 50 °C 中反应 15 min。取 1 μl 连接产物热转化至 *E. coli* Competent Cell JM109 (Code No. 9052) 中,涂布平板,37 °C 过夜培养。挑取阳性克隆,提取质粒,用引物 T7、T7t 进行测序,测序正确的质粒命名为

pET28a(+)-poly-u。

2.4 目的蛋白表达及鉴定 取 35 μl 转化液涂布 LB/抗生素 Amp(100 μg/ml) 平板, 37 °C 过夜培养。取 1.0 μl 质粒转化 Competent cell BL21(DE3)T1R。同样做 pET-28a(+) 空质粒对照。分别挑取单菌落至 2 ml LB/ Amp(100 μg/mL) 培养基中, 37 °C 过夜培养, 在玻璃管中添加 5 ml LB/ Amp(100 μg/ml) 培养基, 添加种培养菌液 100 μl。37 °C 培养至吸光度 A₆₀₀ = 0.6, 添加 100 mmol/L IPTG 50 μl (final 1 mmol/L IPTG) 于 37 °C 继续培养 4 h。然后用 SDS-PAGE 和 Western blot 验证表达产物^[8-10]。

2.5 生物信息学分析 利用 NCBI 网站的 ORF FINDER(www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 预测目的基因开放阅读框并翻译成氨基酸序列; 采用在线软件 ProtScale (https://web.expasy.org/protscale/) 进行理化性质预测。应用 SingaIP 5.0 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/) 进行信号肽序列分析。采用 TMpred 软件进行跨膜区分析, 采用 GOR4 软件预测氨基酸序列的二级结构。采用 SWISS-MODEL 进行三级结构预测, 并用 SAVES (https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/) 在线软件中的 PROCHECK 和 VERIFY-3D 方法进行模型质量评估。采用 Mega-X 软件建立分子进化树, 方法为 Neighbor-Joining (NJ), 类型为 Phylo-gram。使用 IEDB(http://tools.iedb.org/bcell/)、BepiPred 1.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/) 在线软件进行 B 细胞抗原预测。使用 VMD 软件在预测的三维结构上标注出优势抗原位置。

结 果

1 目的基因克隆

以粉尘螨总 RNA 为模板进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 扩增的目的基因条带清晰。通过 RACE 技术获得全长序列。使用 NCBI 的 ORF Finder 服务器对该系列进行开放读框架的分析, 显示含 1 个完整开放读码框, 从起止密码子 ATG 至终止密码子 TAA 全长 1 644 bp(图 1)。

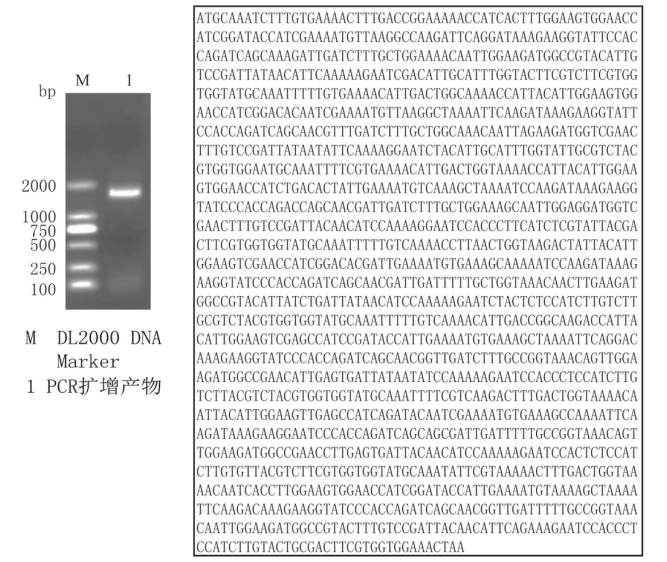
2 目的蛋白的表达与鉴定

将含有目的基因的质粒 pET28a(+)-poly-u 转入 BL21(DE3)T1R 感受态细胞中, 用 IPTG 对阳性克隆进行诱导表达, SDS-PAGE(图 2A) 和 Western blot (图 2B) 鉴定, 结果表明该质粒成功表达。

3 粉尘螨多聚泛素样蛋白的生物信息学分析

3.1 蛋白的分子特征 粉尘螨聚泛素样蛋白基因编码 547 个氨基酸, 相对分子质量约 61.3 × 10³, 理论 pI 7.74, 带负电荷的残基数为 (Asp + Glu) 77, 带正电荷

的残基数为 (Arg + Lys) 78。不稳定性指数为 35.74, 该蛋白质为稳定蛋白。脂肪指数 97.44, 亲水性的平均值 -0.497。跨膜结构域分析显示, 该编码蛋白具有螺旋区域, 无信号肽结构。蛋白的二级结构包括 α 螺旋 (占 32.54%)、延伸主链 (占 15.36%) 和无规卷曲 (占 52.10%) (图 3)。



M DL2000 DNA Marker 1 粉尘螨多泛素样蛋白基因 PCR 扩增产物

图 1 粉尘螨多泛素样蛋白基因 PCR 扩增产物电泳图 (左) 及其序列全长 (右)

M DL2 000 DNA marker; 1 RT-PCR amplification product of the *Dermatophagoides farinae* Polyubiquitin-like gene

Fig. 1 Agarose gel electrophores of RT-PCR amplification product of the *Dermatophagoides farinae* Polyubiquitin-like gene (Left) and Nucleotide sequencing of the *Dermatophagoides farinae* Polyubiquitin-like gene (Right)

3.2 抗原表位 使用在线软件 IEDB 和 BepiPred Server 预测 B 细胞优势抗原, 得到长度 > 6 个氨基酸的抗原 (表 2)。

3.3 空间结构 使用 SWISS-MODEL 软件以编号为 5b83.2.A 蛋白质分子为模板, 建立了粉尘螨多聚泛素样蛋白的三维空间结构 (图 4A), 模型质量 QMEAN 值为 0.76 (QMEAN 在 0~1 之间, 越趋近于 1, 模型质量越高), 模型质量评估较好。使用 SAVES 在线软件对该模型进行模型质量评估, 结果如表 3。在评估合格的三维结构模型上进行优势抗原注释, 结果见图 4B、4C、4D。

3.4 分子进化分析 使用 BLAST 软件对该序列进行同源性分析后, 选取同源性较高的屋尘螨、家蝇、蜜蜂、大黄蜂、拟南芥、长牡蛎、铜绿蝇、烟粉虱、米象、温带臭虫及夜蛾序列, 使用 MEGA-X 软件构建进化树, 结果见图 5。粉尘螨和屋尘螨进化关系较近, 独成一簇。

