

利用套式PCR 技术鉴别屋尘螨和 粉尘螨主要变应原基因及其 在尘螨疫苗研制中的应用*

白羽 吉坤美 刘志刚** 包莹 李盟

(深圳大学生命科学学院, 深圳 518060)

摘要 通过提取屋尘螨和粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子基因组DNA作模板, 分别设计Der p 1和Der f 1各2套内外扩增引物并进行一步法套式PCR, 根据扩增出目的片段来检测尘螨变应原Der p 1和Der f 1基因片段, 并以培养基提取物为阴性对照和已通过形态学鉴别为纯屋尘螨、纯粉尘螨的基因组DNA为阳性对照。PCR产物经电泳后切胶回收并克隆到T载体上, 进行DNA序列分析并在GenBank中进行同源性比较。结果显示, 从屋尘螨和粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子分别扩增出含有屋尘螨和粉尘螨主要变应原Der p 1和Der f 1基因片段, 扩增部分的序列与GenBank数据库里相应序列同源性为100%。从阴性对照提取物中未扩增得到目的基因片段, 从阳性对照DNA提取物中能扩增得到目的变应原Der p 1和Der f 1基因片段。本研究首次应用套式PCR技术鉴别了屋尘螨和粉尘螨原始种子和生产种子, 为尘螨疫苗研制以及工业化生产提供了一种有效的质量控制手段。

关键词 尘螨; Der p 1; Der f 1; 套式PCR; 疫苗

尘螨是一种分布极为广泛而又十分强烈的过敏原, 它引发的变态反应疾病如过敏性哮喘、过敏性鼻炎等是临床上的常见病、多发病 (Hatts-Mills *et al.*, 1992)。引起变态反应疾病的尘螨主要包括粉尘螨 (*Der matophagoides farinae*) 和屋尘螨 (*Der matophagoides pteronyssinus*) (Hatts-Mills *et al.*, 1992)。目前认为过敏原疫苗脱敏治疗是过敏性疾病惟一的对症治疗方法 (Bousquet *et al.*, 1998)。国内外一般单独采用纯粉尘螨或者单独采用纯屋尘螨或者各50%作为尘螨变应原疫苗研制的生物原材料。我国早在上个世纪70年代, 国内众多的医院变态反应科(室)就相继开展了粉尘螨变应原粗浸液院内制剂的研制以及临床应用, 但迄今为止尚没有经过国家食品药品监督管理局批准上市的国产标准化尘螨疫苗注射液。德国默克公司和丹麦爱尔开-阿贝优公司研制的标准化尘螨脱敏疫苗先后于1998年和2004年进入中国市场。

尘螨变应原疫苗研制的生物原材料的质量控制是疫苗研制的关键之一。我们在研制国产化、标准化的尘螨变应原疫苗的过程中, 根据生物制药的普遍要求, 建立了尘螨变应原疫苗研制用的原始种子和生产种子。由于屋尘螨和粉尘螨两者形态结构比较相似 (Krantz, 1978), 而且在生长发育过程中形态结构有一定的变化, 因此在疫苗研制过程中通过尘螨的形态结构特征区分屋尘螨和粉尘螨的方法有一定的局限性。考虑到尘螨主要变应原Der p 1和Der f 1是尘螨疫苗中最主要的有效成份, 我们在前期研究工作 (刘志刚等, 2005; 朱健琦等, 2006) 基础上采用了一步法套式PCR技术来区分这2个基因, 这不仅可以达到辅助鉴别疫苗研制过程中采用的屋尘螨和粉尘螨生物原材料, 而且通过扩增后测序能够对尘螨疫苗生物原材料中最主要的有效成份的基因进行监控 (如是否变异等), 从而为尘螨疫苗的研制以及工业化生产提供了一种有效的原材料质量控

收稿日期: 2006-07-20

* 基金项目: 国家863计划 (2002AA214011); 国家自然科学基金 (30271226; 30471505); 广东省科技重大专项 (2003A3080502); 粤港关键领域重点突破项目 (20054982207); 深圳市科技计划资助项目

**通讯作者: E-mail: LZG@szu.edu.cn

制手段。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

屋尘螨 (*D. pteronyssinus*) 和粉尘螨 (*D. farinae*) 取自深圳大学生命科学学院刘志刚教授课题组进行尘螨疫苗研制时建立的原始种子库和生产种子库。该原始种子最初来源于刘志刚教授研制尘螨疫苗院内制剂使用的种子。动物基因组DNA试剂盒和切胶回收DNA试剂盒购自Qiagen公司, LA Taq酶、T4DNA连接酶等购自TaKaRa公司, DNA序列分析由上海英骏公司进行。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌Top 10 F'由本室保存。pMD18T载体为TaKaRa公司产品。

1.3 尘螨形态学鉴定

用解剖针将螨挑出放在滤纸上, 再用玻璃棒蘸取一滴树脂氯醛封固液固定后, 在显微镜下40×10观察, 根据屋尘螨和粉尘螨的形态特征加以鉴定。

1.4 PCR引物设计

根据GenBank序列号X65197所发表的Der p1基因组序列和序列号X65196所发表的Der f1基因组序列, 设计8条引物, 并由上海生工合成。其序列分别如下:

(1) 扩增Der p1 DNA片段的正向外引物序列为5'-CTGAAACTAACGCCTGCAGTATCAATGGA-AAT-3';

(2) 扩增Der p1 DNA片段的反向外引物序列为5'-TGTGCATTTGGTCGTCGGCATGATTGTC-CTA-3';

(3) 扩增Der p1 DNA片段的正向内引物为5'-GAAATGCTCCAGCTGAAATC-3';

(4) 扩增Der p1 DNA片段的反向内引物为5'-TCGATAGTAGCTTTCTTGG-3';

(5) 扩增Der f1 DNA片段正向外引物序列为5'-CAAGCGCTTGCCGTATCAATTCGGTTAACGTT-3';

(6) 扩增Der f1 DNA片段的反向外引物序列为5'-ATGTTGCCAATTTGGTCGTCGGCATTGTTG-3';

(7) 扩增Der f1 DNA片段的正向内引物序列为5'-GGAATTGGATTACGATCAC-3';

(8) 扩增Der f1 DNA片段的反向内引物序列为5'-GTATGGATAGCTTCTTTCTTC-3'。

1.5 尘螨基因组DNA的提取

分别从屋尘螨和粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子中挑取300只雌雄各半的尘螨作为样品, 按试剂盒说明书分别提取其基因组DNA作为PCR模板, 同时提取50 mg培养前尚无尘螨的培养基(主要以面粉为主要成份)所含生物的总基因组DNA作为PCR模板做阴性对照, 此外, 分别提取300只雌雄各半纯屋尘螨和纯粉尘螨的基因组DNA作为PCR模板做阳性对照。

1.6 Der p1和Der f1 DNA片段的PCR扩增

由以上提取的基因组DNA分别做模板, 将Der p1和Der f1内外2对引物分别加入PCR管中进行第1阶段循环, PCR反应条件为95℃变性5 min; 94℃变性50 s, 68℃退火50 s, 72℃延伸50 s, 进行18个循环; 再进行第2阶段循环, 按94℃变性50 s, 55℃退火50 s, 72℃延伸50 s, 进行12个循环, 最后72℃反应10 min后冷却至4℃结束反应。分别取阳性对照、阴性对照和样品PCR产物5 μL作1.5%琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增结果。如有目的基因片段, 则用切胶回收DNA试剂盒回收扩增产物, 并采用分子克隆常用方法将上述回收的PCR扩增产物克隆至pMD18T载体上, 进行DNA序列测定(由上海英骏公司完成)。

1.7 同源性比较

应用BLAST方法将DNA序列测定结果与GenBank数据库进行同源性比较。

2 结果

2.1 尘螨形态学鉴定

屋尘螨和粉尘螨共同归属于蜱螨亚纲(Acari)、无气门目(Astigmata)、麦食螨科(Pyroglyphid)、尘螨亚科(Dermatophagoidinae)。两者形态结构较为相似, 在显微镜下辨认, 可发现粉尘螨第1对足较屋尘螨的大, 粉尘螨的体形稍圆滑(图1, 2)。

2.2 套式PCR

用Der p1的两对引物对屋尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子基因组DNA作为模板和纯屋尘螨基因组DNA作为阳性对照均能扩增出260 bp的DNA片段, 而用Der f1的两对引物对上

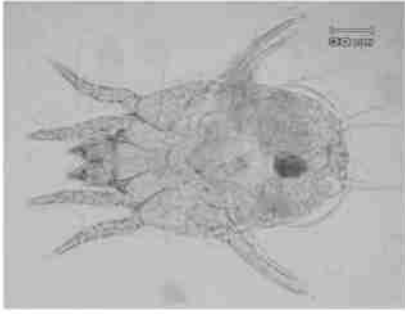


图 1 封片后的屋尘螨

Fig. 1 *Der matophagoides pteronyssinus*

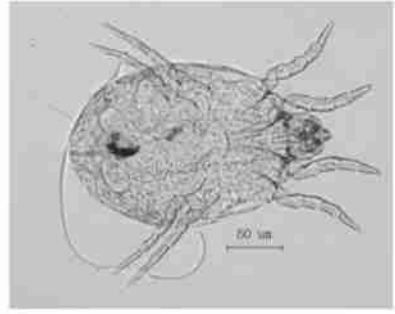


图 2 封片后的粉尘螨

Fig. 2 *Der matophagoides farinae*

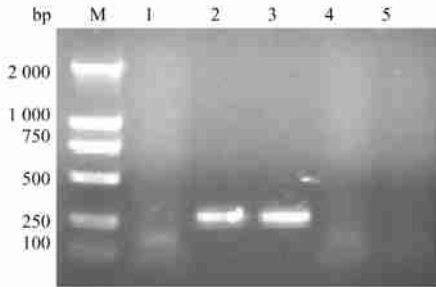


图 3 *Der p 1* DNA 片段的 PCR 扩增结果

Fig. 3 Electrophoresis of *Der p 1* gene fragment PCR product

M: DNA 分子量标准; 1: *Der p 1* 引物扩增新配制的尘螨培养基所含生物基因组 DNA (阴性对照); 2: *Der p 1* 引物扩增纯屋尘螨基因组 DNA (阳性对照); 3: *Der p 1* 引物扩增屋尘螨原始和生产种子库基因组 DNA; 4: 用 *Der f 1* 引物扩增屋尘螨原始和生产种子库基因组 DNA; 5: *Der f 1* 引物扩增纯屋尘螨基因组 DNA

M: DNA Marker; 1: Negative amplified control with *Der p 1* primers; 2: Positive amplified control with *Der p 1* primers; 3: Amplified 260 kb *Der p 1* fragment from species banks for *Der matophagoides pteronyssinus*; 4: Negative amplified control with *Der f 1* primer to banks for *Der matophagoides pteronyssinus*; 5: Negative amplified control with *Der f 1* primer to *Der matophagoides pteronyssinus*.

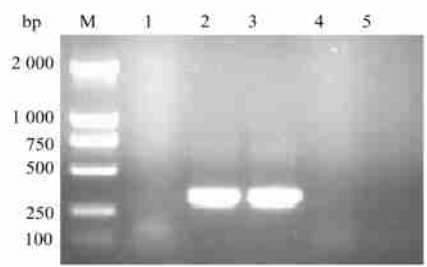


图 4 *Der f 1* DNA 片段的 PCR 扩增结果

Fig. 4 Electrophoresis of *Der f 1* gene fragment PCR product

M: DNA 分子量标准; 1: *Der f 1* 引物扩增新配制的尘螨培养基所含生物基因组 DNA (阴性对照); 2: *Der f 1* 引物扩增纯粉尘螨基因组 DNA (阳性对照); 3: *Der f 1* 引物扩增粉尘螨原始和生产种子库基因组 DNA; 4: 用 *Der p 1* 引物扩增粉尘螨原始和生产种子库基因组 DNA; 5: *Der p 1* 引物扩增纯粉尘螨基因组 DNA

M: DNA Marker; 1: Negative amplified control with *Der f 1* primers; 2: Positive amplified control with *Der f 1* primers; 3: Amplified 310 kb *Der f 1* fragment from species banks for *Der matophagoides farinae*; 4: Negative amplified control with *Der p 1* primer to banks for *Der matophagoides farinae*; 5: Negative amplified control with *Der p 1* primer to *Der matophagoides farinae*.

述样品均不能扩增出 DNA 片段。用 *Der f 1* 的两对引物对以粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子基因组 DNA 作为样品和纯粉尘螨基因组 DNA 作为阳性对照均能扩增出 310bp 的 DNA 片段, 而用 *Der p 1* 的两对引物对上述样品均不能扩增出 DNA 片段。阴性对照均未扩增出相应的 DNA 片段 (图 3, 4)。说明 PCR 结果可以用来鉴别尘螨疫苗研制用的屋尘螨和粉尘螨种子。我们根据这种方法又连续对 3 批尘螨疫苗中试用的原

始种子和生产种子进行了检测, 结果显示这种方法可以很好地鉴别出屋尘螨和粉尘螨变应原基因。

2.3 *Der p 1* DNA 片段序列分析和同源性比较

从屋尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子中 PCR 扩增产物, 经切胶回收、克隆至 pMD-18 T 载体上, 分别从原始种子和生产种子扩增的 DNA 克隆中各挑选 3 个阳性克隆并进行 DNA 序列分析, 6 个序列分析结果完全一致。结果见

图 5。

应用BLAST方法与GenBank数据库进行同源性比较发现,从屋尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子中扩增出大小为260 bp的Der p 1 DNA片段,其序列与GenBank发表的Der p 1基因组DNA 5'端的序列(编号为X65197)同源性为100%。

```

1  GAAATGCTCC AGCTGAAATC GATTGCGAC AAATGCGAAC TGCTACTCCC ATTCGTATGC
61  AAGGAGGCTG TGGTTCATGT TGGGCTTCTC CTGGTGTGTC CGCAACCGAA TCAGCTTATT
121 TGGCTTACCG TAATCAATCA TTGGATCTTG CTGAACAAGA ATTAGTCGAT TGTGCTTCCC
181 AACACGGTTG TCATGGTGAT ACCATTCCAC GTGGTATTGA ATACATCCAA CATAATGGTG
241 TCGTCCAAGA AAGCTACTAT CGA

```

图 5 从屋尘螨疫苗研制用的种子中扩增出的Der p 1基因片段DNA测序结果
Fig. 5 DNA sequence of Der p 1 gene fragment from house dust mite for vaccine manufacture

```

1  GGAATTGGAT TTACGATCAC TGCGAACTGT CACTCCAATC CGTATGCAAG GAGGCTGTGG
61  TTCATGTTGG GCTTCTCTG GTGTGCGC AACTGAATCA GCTTATTTGG CCTACCGTAA
121 CACTTCATTG GATCTTCTG AACAGGAACT CGTCGATTGC GCATCTCAAC ACGGATGTCA
181 CGGCGATACA ATACCAAGGT TAGGTCCCTC TCCAATTAAT ATTACAATAT TAATTAACAA
241 TAACAATAAT AATCAGAGGC ATCGAATACA TCCAACAAAA TGGTGTGCGT GAAGAAAGAA
301 GCTATCCATA C

```

图 6 从粉尘螨疫苗研制用的种子中扩增出的Der f 1基因片段DNA测序结果
Fig. 6 DNA sequence of Der f 1 gene fragment from powder dust mite for vaccine manufacture

应用BLAST方法与GenBank数据库进行同源性比较,发现从粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子中扩增出大小为310 bp的Der f 1 DNA片段,其序列与GenBank发表的Der f 1基因组DNA 5'端的序列(编号为X65196)同源性为100%。

3 讨论

近几十年来,全球变态反应疾病(过敏性疾病)的发病率逐年升高,成为危害人类健康的主要问题之一。全球过敏性疾病发病率约15%~30%,主要有过敏性鼻炎、过敏性哮喘和过敏性胃肠炎等。我国过敏性鼻炎患者达1500多万,过敏性鼻炎患者超过5000万。其中,小儿过敏性鼻炎患者就达600多万。全球的过敏性疾病的发病率和死亡率仍呈上升趋势(Gruchalla *et al.*, 2005)。严重的过敏性鼻炎等变态反应疾病成为

2.4 Der f 1 DNA 片段序列分析和同源性比较

从粉尘螨疫苗研制用的原始种子和生产种子中PCR扩增产物,经切胶回收、克隆至pMD-18T载体上,分别从原始种子和生产种子扩增的DNA克隆中各挑选3个阳性克隆并进行DNA序列分析,6个序列分析结果完全一致,结果见图6。

潜在的致死性疾病,严重影响了人们的生活和生存质量。如何防治过敏性鼻炎等变态反应疾病是需要迫切解决的任务之一。

变态反应疾病是由于人体吸入、食用或接触过敏原引起的。其中,尘螨是最常见的吸入性变应原之一。美国纽约的一项调查显示,多达83.7%以上哮喘病人对尘螨过敏(Gruchalla *et al.*, 2005)。我国临床上,对尘螨过敏占有过敏性疾病患者皮试阳性率的首位,约占70%~80%。在哮喘死亡率高的地区,哮喘常和对尘螨过敏以及与尘螨接触等有关,两者之间存在一定的因果关系。研究表明,鼻炎、哮喘的发生与对尘螨过敏有密切的临床相关性(陈育智等, 2003)。

世界卫生组织(WHO)于1997年1月27~29日在日内瓦发布了过敏性疾病进行脱敏治疗的技术指南,并认为过敏原脱敏疫苗治疗是目前过敏性疾病惟一的对症治疗方法(Bousquet *et*

al., 1998)。尘螨脱敏疫苗通过使用逐渐增加以尘螨变应原为有效成份的提取物进行皮下注射等方式对过敏患者进行脱敏治疗 (Bousquet *et al.*, 1998)。引起变态反应疾病的尘螨主要包括粉尘螨 (*D. farinae*) 和屋尘螨 (*D. pteronyssinus*)。国内外一般单独采用纯粉尘螨或者单独采用纯屋尘螨或者各 50% 作为尘螨变应原疫苗研制的生物原材料。

尘螨变应原疫苗研制的生物原材料的质量控制是疫苗研制的关键之一。我们在研制国产化、标准化的尘螨变应原疫苗的过程中, 根据生物制药的普遍要求, 建立了尘螨变应原疫苗原始生产种子和生产种子。常规检测该尘螨种子纯度的做法是通过在显微镜下观察培养箱中尘螨的形态和结构特征来区分屋尘螨和粉尘螨, 如粉尘螨前面一对足较屋尘螨的大、粉尘螨的体形稍圆滑等特征, 但这种通过形态学方面的鉴定要掌握丰富的形态学分类知识, 否则, 从形态上较难区别两者。而且, 屋尘螨和粉尘螨形态结构较为相似 (Krantz, 1978), 在生长发育过程中形态结构有一定的变化, 因此在疫苗研制过程中通过尘螨的形态结构特征区分屋尘螨和粉尘螨的方法有一定的局限性。为此, 我们在实际研制尘螨疫苗的过程中, 采用了以形态学鉴别粉尘螨和屋尘螨为主要手段, 同时采用了套式 PCR 技术扩增尘螨主要变应原基因 (Der f 1 和 Der p 1) 以及应用 Der f 1/Der p 1 单抗进行免疫印迹作为二种辅助鉴别实验手段, 以确保尘螨疫苗研制的生物原材料的质量。

尘螨 I 类变应原 Der p 1 和 Der f 1 是尘螨疫苗中最主要的有效成份。它是一种半胱氨酸蛋白酶, 其前体由 321 个氨基酸组成, 经过去除信号肽等加工处理后为 223 个氨基酸, 分子量为 25 kDa 左右, 有 1 个糖基化位点; Der p 1 和 Der f 1 两者氨基酸序列的同源性在 80% 以上, 两者基因的同源性也比较高, 因此, 设计的引物应尽量选择两者序列差异性大的部分, 为此我们选的这一部分序列位于 5' 端的前 460 bp 的保守区域 (Yasuhara *et al.*, 2001)。本研究分别设计了两套内外引物, 选择两者序列差异较大的部分做为引物, 这样做基因检测时能很好地区分出 Der p 1 和 Der f 1。6 个 Der p 1 DNA 片段测序结果里没有 Der f 1 序列, 6 个 Der f 1 DNA 片段测序结果里也没有 Der p 1 序列。这一方面说明了本研究设计

的两套内外引物特异性很高, 能很好的区别 Der p 1 和 Der f 1 基因片段, 达到辅助鉴别屋尘螨和粉尘螨两个物种的作用。另一方面, 在一定程度上反映我们建立的尘螨疫苗种子所选择的物种有很好的纯度。通过基因来鉴别物种一般选择该物种比较保守的序列如 rDNA 序列, 但本文考虑到 Der p 1 和 Der f 1 是尘螨疫苗中最主要的有效成份, 采用套式 PCR 区分这 2 个基因, 不仅可以达到辅助鉴别屋尘螨和粉尘螨两个物种的作用, 而且通过扩增后测序能对疫苗原材料中最主要的有效成份的基因进行监控 (如是否变异等)。

一步法套式 PCR 采用两套引物, 外引物退火温度高, 我们选用了 68°C 作为第 1 阶段循环的退火温度, 在此温度下内引物不与模板退火, 然后降低退火温度 (至 55°C) 再扩增内引物片段, 这样, 在操作过程中, 仅打开 PCR 反应管 1 次, 减少了污染的可能性, 同时更加简便和快速。本研究选择从基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增来检测尘螨变应原 Der p 1 和 Der f 1 的基因片段, 比用反转录 RT-PCR 方法更简单、更方便 (刘志刚等, 2005)。本研究首次采用一步法套式 PCR 技术用于尘螨疫苗研制以及工业化生产过程中鉴别屋尘螨和粉尘螨种子的主要变应原基因, 提供了一种简便快速的质量控制手段。

参考文献

- 刘志刚, 邢苗, 吉坤美, 等. 2005. 一种检测空调过滤网灰尘中尘螨变应原基因的方法. 中国发明专利, 公开号 CN1597985A.
- 朱健琦, 刘志刚, 高波, 等. 2006. 粉尘螨 I 类变应原的克隆表达、纯化及免疫学特性. 昆虫学报, 49 (2): 213~218.
- 陈育智, 马煜, 王红玉, 等. 2003. 中国三城市儿童个人过敏原与喘息及气道高反应性的相关性研究. 中华儿科杂志, 41 (7): 538~541.
- Bousquet J., R. Lockey, H. J. Malling. 1998. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102: 558~562.
- Gruchalla, R. S., J. Pongratic, M. Haut *et al.* 2005. Inner city asthma study: relationships among sensitivity, allergen exposure, and asthma morbidity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115 (3): 478~485.
- Krantz, G. W. 1978. A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc.; Corvallis. Press, 509.
- Hatts-Mills, T. A., W. R. Thomas, R. C. Aalberse *et al.* 1992. Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 89: 1046~1060.
- Yasuhara, T., T. Takai, T. Yuuki *et al.* 2001. Cloning and expression

of cDNA encoding the complete prepro form of an isoform of Der f 1, the major group 1 allergen from house dust mite *Dermatophagoides*

farinae. *Bosci · Biotechnol · Biochem.*, 65 (3) : 563~569.

TO DISTINGUISH ALLERGEN GENES OF *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* FROM *DERMATOPHAGOIDES FARINAE* BY NESTED PCR AND ITS APPLICATION FOR THE VACCINE MANUFACTURE

BAI Yu JI Kun-Mei LIU Zhi-Gang* BAO Ying LI Meng

(College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060)

Abstract In order to distinguish allergen genes of *Dermatophagoides pteronyssinus* from *Dermatophagoides farinae*, genomic DNA was separated from main species banks and working species banks for mite allergen vaccine manufacture and was used as templates for PCR amplification. The genomic DNA from culture materials without mite was also used as negative control and at the same time genomic DNA from *D. pteronyssinus* and *D. farinae* as positive controls, respectively. The Der p 1 and Der f 1 DNA fragments were amplified by one step nested PCR. PCR products were cloned into pMD18T vector and were sequenced. Sequences obtained were compared with GenBank data by BLAST. From main species banks and working species banks for mite allergen vaccine manufacture, 0.26 kb Der p 1 and 0.3 kb Der f 1 DNA fragments were amplified by one step PCR, which were consistent with the results from positive controls. No DNA fragment was amplified from negative control. Their DNA sequences were 100% identical with *D. pteronyssinus* and *D. farinae* from GenBank data respectively. The present method can distinguish *D. pteronyssinus* from *D. farinae* in the manufacture of mite allergen vaccine.

Key words Mite; Der p 1; Der f 1; Nested PCR; Vaccine

*Author for correspondence