文章编号:1000-5404(2005)06-0547-03

论著

幽门螺杆菌 hpaA 真核表达质粒的构建及鉴定

曾韦锟[1],邹全明[2],井申荣[2] (第三军医大学:[1]新桥医院检验科,重庆 400037,[2]医学检验系临床生物医药中试研究基地,微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆幽门螺杆菌 hpaA 基因,并构建其真核表达质粒。**方法** 以 Hp NCTC11637 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 hpaA 基因,亚克隆至 pMD18-T 载体中,目的基因经酶切纯化后插入 pTCAE,转化 *E. coli* DH5α,酶切并测序鉴定正确的重组质粒命名为 pT-hpaA。电穿孔法将 pT-hpaA 转染 CHO 细胞,Western blot 检测 HpaA 蛋白的表达。**结果** 克隆重组得到 pT-hpaA,将 pT-hpaA 电穿孔法转染 CHO 后,培养上清经 Western blot 检测,在相对分子量为30 000条带处出现特异性抗原抗体反应。**结论** 成功构建了幽门螺杆菌 hpaA 真核表达质粒,体外 CHO 细胞转染和 Western blot 实验证实了 HpaA 蛋白的表达,为进一步的免疫实验奠定了基础。

关键词: *Helicobacter pylori*;hpaA;DNA 疫苗
中图法分类号: R377; R392.13; R394-33 **文献标识码**: A

Construction and identification of eukaryotic expression plasmid of hpaA of *H. pylori*

ZENG Wei-kun[1], ZOU Quan-ming[2], JING Shen-rong[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital 400037, [2]Pilot Scale Research Center for Biopharmaceutics and Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone hpaA gene of *H. pylori* and construct its eukaryotic expression plasmid. **Methods** Gene hpaA amplificated from genome of *H. pylori* 11637 strain by PCR was subcloned into pMD18-T vector. Then hpaA cut down from the vector with restriction enzyme was inserted to pTCAE, and the product confirmed by restriction enzyme digestion and sequence was transformed to *E. coli* DH5α. pT-hpaA was transfected into CHO cell by electroporation, and HpaA protein was detected by Western blot. **Results** hpaA gene was inserted into pTCAE and the immunological reaction band with anti-HpaA serum at MW 30 000 was detected by Western blot. **Conclusion** Eukaryotic expression plasmid of hpaA of *H. pylori* is successfully constructed. Western blot analysis demonstrates that the expression of HpaA protein can be detected in culture supernatants of transfeced CHO cells, which lays the foundation for the further study.

Key words: *Helicobacter pylori*; hpaA; DNA vaccine

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是定植于人胃粘膜的 G^- 螺杆菌,它与慢性胃炎、消化性溃疡(胃溃疡和十二指肠溃疡),以及胃癌的发生有密切的关系[1~5]。多年来人们就一直在尝试用疫苗预防和治疗 Hp 感染。到目前为止,对 Hp 疫苗的研究主要集中在全菌灭活疫苗和重组亚单位蛋白疫苗。核酸疫苗具有生产制备简单、存储方便等优点。此外,核酸疫苗能够全面激发机体细胞和体液免疫应答[6]。因此,研制 Hp 核酸疫苗具有重要意义。本研究拟以 Hp 鞭毛粘附素 A(hpaA)为抗原基因,构建 Hp hpaA 真核表达质粒,为进一步的疫苗研究奠定基础。

基金项目:国家"863"计划资助项目(2001AA215161)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2001AA215161)
作者简介:曾韦锟(1974-),男,贵州省贵阳市人,博士,医师,主要从事病原微生物的诊断和治疗方面的研究。电话:(023)68753590
通讯作者:邹全明,电话:(023)68752316,E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-01-08;**修回日期**:2005-03-04

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌种 Hp NCTC11637(中国预防医学科学院微生物与流行病学研究所)、*E. coli* DH5α(本室保种),质粒 pTCAE (IDEC Corp., M. Reff 惠赠)。

1.1.2 主要试剂 Ex-*Taq* 酶、T4 DNA Ligase、*Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、DNA marker、pMD18-T 载体(TaKaRa 公司);DNA 抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒(Omega 公司);CHO 细胞(本室保存)、DMEM 培养基及小牛血清(Hyclone 公司);兔抗 HpaA 抗体(本室制备),HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(武汉博士德公司),二氨基联苯胺(DAB)(上海生工)。

1.1.3 主要仪器 CO_2 培养箱(Harris,USA);电转仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 目的片段获取 用 1.0 ml ddH_2O 冲洗纯培养的 Hp NCTC11637,8 000×*g* 离心 1 min,弃上清,DNA 抽提试剂盒提取 Hp 基因组。根据 hpaA 基因设计引物,上游引物:P1:GTCGACATGAGAGCGAACAATCATTTTA (下划线部分为 *Sal*Ⅰ酶切位点);P2:

GGATCCTTATCGGTTTCTTTTGCCTT(下划线部分为 *Bam*H Ⅰ酶切位点)。PCR 反应:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 50 s,55 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 60 s,共 35 个循环,72 ℃完全延伸 10 min。

1.2.2 pT-hpaA 重组质粒的构建 hpaA PCR 产物经电泳、胶回收后与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5α。*Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切回收目的基因片段,并与同样经 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切回收的 pTCAE 载体连接,转化 *E. coli* DH5α。抽提待鉴定克隆的质粒,用 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定,将阳性重组质粒命名为 pT-hpaA。

1.2.3 hpaA 基因测序 上海申友生物技术有限公司完成。

1.2.4 疫苗的体外转染及 Western blot 鉴定 抽提 pT-hpaA 重组质粒行琼脂糖凝胶电泳,并用紫外分光光度计测定其在 260、280 nm 的吸光度值。电穿孔方法体外转染 CHO 细胞,方法简述如下:待 CHO 细胞生长至 75%满底,2.5 g/L 的胰酶消化细胞,用预冷的电穿孔缓冲液冲洗两次,并重新悬浮在该缓冲液中,使细胞的终浓度为(0.5 ~ 1.0) × 10^{10}/L。将 40 μg pT-hapA 与 0.8 ml 细胞悬液混合于 0.4 cm 的电转杯中,冰浴 10 min。电击 1 次(25 μF,电压为 160 V)后,将电转杯冰浴 10 min。用含有 100 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。Western blot 检测:转染后细胞培养 3 d 收集培养上清,行 SDS-PAGE 后转至 NC 膜上,用 Western blot 鉴定其免疫反应性,第一抗体为1∶1 000稀释的兔抗 HapA 血清,第二抗体为 1∶20 000稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,显色底物为 DAB。

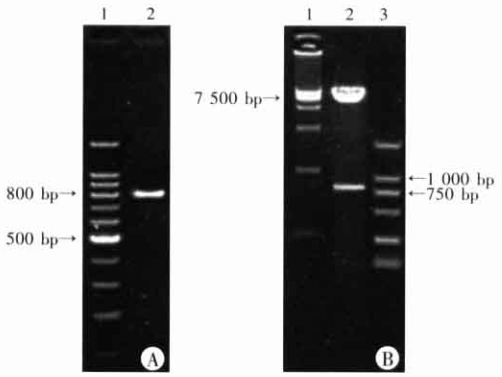
2 结果

2.1 PCR 扩增 hpaA 基因

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,出现 1 条清晰的带,大小为 700 ~ 800 bp,同预期的结果基本相符,见图 1A。

2.2 重组质粒 pT-hpaA 的酶切鉴定及测序结果

pT-hpaA 经 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切后,可见7 542 bp和 795 bp 大小两片段,大小同预计的结果相符,见图 1B。测序结果表明,重组质粒中的 hpaA 基因与 GenBank 公布的碱基序列一致。



A: Electrophoresis of PCR product of hpaA on agarose gel; 1: 100 bp ladder DNA marker; 2: PCR product of hpaA gene

B: Analysis of plasmid pT-hpaA by restriction enzyme cleavage; 1: DL15000 DNA marker; 2: pT-hpaA digested with *Sal* Ⅰ and *Bam*H Ⅰ; 3: DL2000 DNA marker

图 1 PCR 扩增 hpaA 基因和重组质粒 pT-hpaA 的酶切鉴定

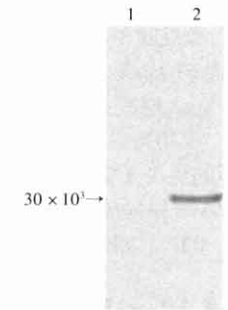
Fig 1 Electrophoresis of PCR product of hpaA gene and analysis of plasmid pT-hpaA by restriction enzyme cleavage

2.3 pT-hpaA 质粒的检测

大量抽提 pT-hpaA 质粒,琼脂糖电泳显示带型完整;紫外分光光度计检测,A_{260}/A_{280} = 1.865,质粒含量约为 1.3 mg/ml。

2.4 检测 HpaA 蛋白的表达

Western blot 检测转染后的 CHO 细胞培养上清,在分子量约为30 000位置呈现抗原抗体反应,提示转染后的细胞能够表达 HpaA 蛋白(图 2)。



1: Protein marker; 2: Culture supernatant of CHO transfected with pTCAE

图 2 Western blot 检测 HpaA 蛋白表达

Fig 2 Western blot analysis of culture supernatant of CHO cell transfected with pT-hpaA

3 讨论

Hp 在人群中的高感染率及其对人类健康的危害性引起广泛关注,如何预防和清除 Hp 感染是一个重要问题。抗生素的应用给抗 Hp 治疗带来了希望,运用联合药物治疗一般可以有效地清除 Hp,但是随着抗菌药物的使用,使耐药菌株的产生及药物的毒副作用等诸多问题暴露出来。同时药物根除 Hp 后,Hp 仍然能够反复感染人体[7]。因此,研究疫苗来预防和治疗 Hp 显得十分重要。

在对 Hp 疫苗的研究中,除了对全菌疫苗和蛋白疫苗的研究外,一些学者也对核酸疫苗做了一些尝试。Todoroki 等[8]构建了分别编码 HspA、B 的核酸疫苗,皮下免疫 C57BL 小鼠后,有效地降低了随后攻毒实验中细菌的定植量。Miyashita 等[9]构建了编码过氧化氢酶的核酸疫苗,通过滴鼻和皮下注射两种方式免疫 C57BL6,末次免疫后的 3 个月的攻毒保护性实验表明:与对照组相比,实验组小鼠获得了明显的保护,胃粘膜仅可见少数炎症细胞浸润,胃炎积分明显降低。这些研究表明,Hp 核酸疫苗能够诱导一定的保护性效果。

合理选择抗原是疫苗成败的关键。对 Hp 的研究表明,Hp 在胃粘膜的定植,靠的是 Hp 表面配体与胃粘膜上皮细胞受体的特异性结合。HpaA 是 Hp 重要的粘附素之一,具有表面暴露、抗原保守等特点[10]。另

外，HpaA 蛋白疫苗免疫动物能够诱导保护性免疫[11]。为此，我们选择 HpaA 作为 Hp 核酸疫苗的抗原。将克隆自 Hp11637 的 hpaA 基因插入 pTCAE 原核-真核穿梭质粒，并经酶切和测序证实插入目的片段的正确性。DNA 疫苗编码抗原的表达量是决定其效果的重要因素。本研究中的 pTCAE 质粒带有来源于巨细胞病毒的 CMV 启动子，它具有高效表达的特点。在实验中，当将 pT-hpaA 经电穿孔转染细胞后，Western blot 证实了具有免疫反应性的 HpaA 蛋白的高效表达，同时具有良好的免疫反应性。此外，载体中含有氨苄青霉素抗性基因(AMPR)。据报道，AMPR 中含有确定的两个拷贝的免疫刺激序列(immuno-stimulatory sequence, ISS)，又称为 CpG DNA。由于疫苗中 CpG DNA 被内吞入细胞后，可经一系列的过程释放 NF-kB 迁至核内启动相关基因的转录；并可激活不同的 MAPK 通路发挥佐剂的作用[12]。这些为增强疫苗诱导的免疫反应奠定了良好的基础。

综上所述，本研究构建了 Hp hpaA 真核表达质粒，并通过酶切、测序，以及体外转染实验证实其正确性，为进一步的免疫实验奠定了基础。

参考文献：

[1] Korn C, Meiss G, Gast F, *et al*. Genetic engineering of *Escherichia coli* to produce a 1: 1 complex of the anabaena sp. PCC 7120 nuclease NucA and its inhibitor NuiA[J]. Gene, 2000, 253(2): 221 - 229.

[2] Kiefer H, Vogel R, Maier Kee, *et al* . Bacterial expression of G-protein-coupled receptors: prediction of expression levels from sequence[J]. Receptors Channels, 2000, 7(2): 109 - 119.

[3] Amemiya K, Granger R P, Dalakas M C. DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 73(6): 484 - 492.

[4] Lee J H, Kim J H, Hwang S W, *et al*. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(3): 575 - 580.

[5] Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis[J]. Am J Surg Pathol, 1995, 19(Suppl 1): S37 - 43.

[6] Indresh K S, Margaret A L. Gene vaccine[J]. Ann Intern Med, 2003, 138: 550 - 559.

[7] Leal H Y, Torres J, Monath T P, *et al*. High rates of recurrence and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(11): 2395 - 2402.

[8] Todoroki I, Joh T, Watanabe K, *et al*. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice[J]. BBRC, 2000, 277(1): 159 - 163.

[9] Miyashita M, Joh T i, Watanabe K, *et al*. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori* catalase[J]. Vaccine, 2002, 20(17-18): 2336 - 2342.

[10] Evans D J, Evans D G. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives[J]. Helicobacter, 2000, 5(4): 183 - 195.

[11] Kim B O, Shin S S, Yoo Y H, *et al*. Peroral immunization with Helicobacter pylori adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits[J]. Clin Sci, 2001, 100(3): 291 - 298.

[12] Krieg A M, Wagner H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA[J]. Immunol Today, 2000, 21(10): 521 - 526.

(编辑 汪勤俭)

文章编号：1000-5404(2005)06-0549-01

个案与短篇

巨大房间隔缺损存活至高龄 1 例

A case report of an aged suffered from vast atrial septal defect

肖 航[1]，刘 玮[2]，司良毅[1] ([1]第三军医大学西南医院老年病科，重庆 400038；[2]第四军医大学西京医院眼科，西安 710032)

患者，女，74 岁，1964 年出现劳累后心悸、气促、乏力，当时于医院行心导管检查，发现房间隔缺损，未行手术治疗。此后多次于我院就诊，诊断为先天性心脏病、房间隔缺损、充血性心力衰竭、心房纤颤。半月前，患者受凉后轻度活动即引起心悸、气促、乏力，并咳嗽、咳痰。查体：血压 109/61 mmHg，颈静脉充盈，肝颈静脉回流征阳性，双下肺可闻及少量细湿啰音，心率 97 次/min，心律绝对不齐，心音强弱不等，脉搏短促，胸骨左缘第 2 肋间可闻及 3 级收缩期吹风样杂音，心尖部及三尖瓣听诊区均可闻及 3～4 级收缩期吹风样杂音。肝脏肋下 3 cm、剑突下 5 cm 可扪及，质中、轻压痛，双下肢轻度凹陷性水肿。超声心动图示：房间隔连续性中断，回声失落，间距 43 mm。房间隔中断处可探及舒张期左向右的分流束。左室收缩功能：EF，53%，FS，27%。右室 36 mm，右房 47 mm，左房 32 mm，左室 44 mm。结论：①房间隔缺损；②右房、右室明显增大，右心容量负荷增加；③三尖瓣关闭不全；④肺动脉瓣轻度关闭不全。胸片：双肺纹理增粗紊乱，呈肺淤血征，心影三尖瓣型增大，主要为右房及右室。肺动脉段异常突出，右下肺动脉瘤样增粗，呈残根样改

(下转 553 页)

作者简介：肖 航(1976－)，男，黑龙江省齐齐哈尔市人，硕士研究生，医师，主要从事老年医学方面的研究。电话：023-68765233

收稿日期：2004-10-20；修回日期：2005-01-16