文章编号:1000-5404(2006)14-1499-03

论著

幽门螺杆菌疫苗候选抗原lpp20基因的克隆表达及其纯化研究

张卫军,邹全明,毛旭虎,罗 萍,解庆华,李玉红 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆市生物制药工程技术研究中心,重庆 400038)

提 要:目的 克隆表达幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)lpp20基因,为筛选预防或治疗幽门螺杆菌感染的疫苗保护性抗原奠定基础。**方法** 用PCR方法从临床分离株9806的染色体DNA中扩增出lpp20基因片段,将目的基因插入表达载体pET22b中,重组载体pET22b-Lpp20经DNA测序鉴定后,将重组质粒转化大肠杆菌*E. coli*. BL21(DE3),IPTG诱导表达。采用镍离子亲和层析纯化蛋白,并用SDS-PAGE和Western blot鉴定。**结果** PCR扩增的lpp20基因长度为528 bp,经酶切和测序分析,插入到载体的基因片段与GenBank公布的序列相似性达99%,SDS-PAGE显示,经IPTG诱导目的蛋白占总蛋白的19.7%,纯化后,蛋白纯度达80%以上。Western blot检测该蛋白与兔抗Hp的多克隆抗血清发生结合反应。**结论** 成功构建了lpp20表达载体pET22b-Lpp20,并在大肠杆菌中表达。

关键词: 幽门螺杆菌;lpp20基因;克隆
中图法分类号: R378.99;R392.13;R392.7 **文献标识码:** A

Cloning, expression and purification of lpp20 gene of *Helicobacter pylori*

ZHANG Wei-jun, ZOU Quan-ming, MAO Xu-hu, LUO Ping, XIE Qing-hua, LI Yu-hong (Laboratory of Clinic Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To perform cloning and expression of the lpp20 gene of *Helicobacter pylori* in order to construct a basis for vaccine to prevent and treat *H. pylori* infection. **Methods** The lpp20 gene of clinical isolates was amplified from *H. pylori* chromosomal DNA by PCR. The PCR product was inserted into the expression vector pET-22b. The recombinant vector pET22b-Lpp20 was identified by DNA sequencing and transformed to *E. coli*.. BL21(DE3) for expression under IPTG induction. The protein was purified by Chelating chromatography and identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The PCR product was about 528 bp. The gene segment inserted into the recombinant vector was proven 99% identical to the sequence in GenBank, and expressed the target protein up to 19.7% of total somatic protein by IPTG induction. The protein purity reached more than 80% after purification. The protein could be recognized by rabbit anti-Hp blood serum. **Conclusion** The expression vector pET22b-Lpp20 was successfully constructed and the protein can be expressed in *E. coli*..

Key words: Helicobacter pylori ; lpp20 gene; clone

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一植于人类胃黏膜的革兰染色阴性、螺旋状、微需氧菌;在全世界范围内广泛感染,是慢性胃病(慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌)的重要病因,对人类健康构成严重危害。目前对Hp的抗感染治疗存在较大问题,采用多种抗生素加质子泵抑制剂或铋盐的三联疗法、四联疗法,治疗费用昂贵,不良反应大,患者依从性差,耐药菌株产生常常使治疗失败。因此研制Hp疫苗可能是预防Hp感染最有前景的手段。

Hp的外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)是Hp的共有抗原成分,利用尿素酶、空泡毒素、热休克蛋白、黏附素、中性粒细胞激活蛋白等外膜蛋白作为Hp疫苗候选抗原的研究也有较多报道,除此之外,Hp还有30余种功能不明的外膜蛋白可能在机体免疫中起保护作用。Lpp20为幽门螺杆菌膜相关脂蛋白,在目前分离的Hp株均有表达,且与其他菌株间无交叉反应[1]。本实验利用基因克隆技术,将Hp Lpp20蛋白外膜编码的基因经PCR扩增后,构建重组载体,并在*E. coli*. BL21(DE3)中进行表达和纯化摸索,为筛选有效的Hp疫苗抗原奠定了基础。

作者简介: 张卫军(1972-),男,江苏省姜堰市人,硕士研究生,实验师,主要从事生物工程制药方面的研究。电话:(023)68753591,E-mail:wjzhang1972@yahoo.com.cn
通讯作者: 邹全明,电话:(023)68752316,E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2005-12-07;**修回日期:** 2006-01-06

1 材料与方法

1.1 材料

幽门螺杆菌临床分离株 9806、大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)均由本实验室培养和保存;质粒 pET22b 为本室保存;Ex-*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、pMD 18-T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司;DNA 标准、蛋白标准、细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自北京天为时代有限公司、DNA 电泳胶回收、质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;T_4 DNA 连接酶购自 MBI 公司;HiTrap Chelating 层析交换柱购自 Pharmacia 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司;引物合成由北京赛百盛生物工程公司完成;DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Hp 基因组 DNA 的提取 取 2 ml Hp 培养液,以 6 000 × *g* 离心 2 min,取沉淀按细菌基因组抽提试剂盒操作方法提取。

1.2.2 lpp20 编码基因的扩增 根据 GenBank 上公布的 Hp lpp20 基因序列,利用引物设计软件设计 lpp20 基因的引物 P1 和 P2,P1 的序列为:5′-CGCGCATATGAAAAATCAAGTT-3′带 *Nde* Ⅰ酶切位点,P2 的序列为:5′-CTCGAGCTTTTTAACCATGC CCAACT-3′带 *Xho* Ⅰ酶切位点。以 Hp 临床分离株 9806 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR。反应条件为:94 ℃预变性 5 min 后,然后 94 ℃变性 40 s,60 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,共循环 35 次,最后于 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,观察扩增结果并回收 PCR 产物。

1.2.3 重组载体的构建 回收的 PCR 产物与 pMD-18-T 按照载体与插入 DNA 的摩尔比为 1∶(2 ~ 10)的比例混合后,置 16 ℃连接过夜,体系为 pMD18-T 载体 1 μl,PCR 产物 2 μl,双蒸水 2 μl,连接液 5 μl。经蓝白斑筛选鉴定的 pMD18-T-Lpp20 和表达载体 pET22b 用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并进行胶回收后,用 T_4 DNA 连接酶于 22 ℃进行连接,pET22b 片段与插入 DNA 的摩尔比为 1∶(1 ~ 3)。连接后的重组表达载体 pET22b-Lpp20 再经 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 重组质粒转化 按《精编分子生物学实验指南》方法操作,DNA 碱基序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2.5 重组载体在 *E. coli.* 中的表达 取经酶切鉴定构建成功的重组工程菌接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃摇床培养光密度值 *D*(600)达到 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导,于诱导 0、2、4、6、8 h 取样,同时用空载体菌做对照,采用 SDS-PAGE 电泳分析重组 Lpp20 的表达。优化诱导表达条件,用 UVP 凝胶成像系统分析重组蛋白的相对含量。

1.2.6 表达产物的形式鉴定 将诱导表达的菌液以 12 000 × *g* 离心收集菌体,再以 1∶10 的比例混悬于 pH 11.0 裂解缓冲液中,超声破菌后,先以 800 × *g* 离心去除细胞碎片及未破碎的菌体,弃沉淀后上清再以 12 000 × *g* 离心,收集破碎上清及沉淀样品进行 SDS-PAGE 电泳,分析重组表达产物的表达形式。

1.2.7 表达产物的初纯化 用 HiTrap Chelating 亲和层析柱进行纯化。以缓冲液 A(10 mmol/L 碳酸盐缓冲液 0.5 mol/L NaCl,pH 11.0)平衡层析柱后,上样,流速 0.5 ml/min,使样品 HiTrap Chelating 亲和层析柱上的镍离子充分结合,以缓冲液 B(10 mmol/L 碳酸盐缓冲液,0.5 mol/L NaCl,0.5 mol/L 咪唑,pH 11.0)洗脱不同结合力的蛋白并收集到不同的收集管中,采用 SDS-PAGE 电泳分析不同收集管中洗脱的目的蛋白的量,用 UVP 凝胶成像系统分析蛋白的相对纯度。

1.2.8 Western blot 分析 取纯化后的蛋白 10 μl 上样进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 NC 膜上,0.2% 丽春红染色后,标记蛋白标准,漂洗干净后,用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 液 4 ℃封闭过夜。封闭后的 NC 膜置于 1∶1 000 稀释的兔抗 Hp 抗血清中,37 ℃摇床反应 1 h。TTBS 液洗膜后,用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗,37 ℃摇床反应 1 h,最后 DAB 显色至目的条带清晰时终止反应。

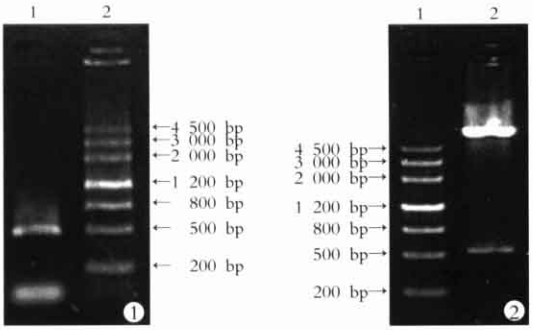
2 结果

2.1 Hp lpp20 编码基因的扩增

以 Hp 临床分离株 9806 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,所获 PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析(图 1)。结果显示,在 500 bp 附近有单一条带,片段的大小与预计相符。

2.2 重组载体酶切鉴定

回收 Hp lpp20 PCR 产物与 pMD18-T 连接后,转化感受态 DH5α 受体菌,经限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切切出 525 bp片段并回收,与限制性内切酶双酶切的表达载体 pET22b 在 T_4 连接酶作用下 22 ℃连接过夜,涂布含有氨苄抗性的 LB 平板培养,获得阳性重组质粒命名为 pET22b-Lpp20,重组质粒双酶切鉴定得到 1 条约 525 bp 的带,与实验设计相一致。见图 2。



1:lpp20 PCR 扩增产物;2:DNA 标准

图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

1:DNA 标准;2:pET22b-Lpp20 质粒经 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切

图 2 重组表达质粒 pET22b-Lpp20 酶切鉴定

2.3 lpp20 序列分析

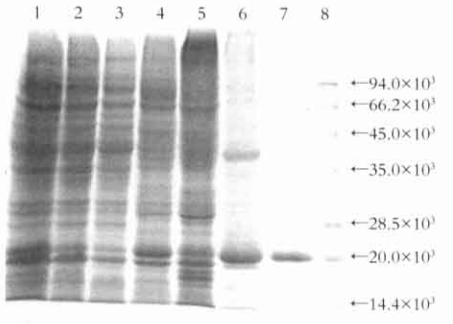
lpp20 的碱基测序与 GenBank 已公布的 Hp 菌株编码 lpp20 基因的序列进行同源性比对,其一致性达 99%(520/525),氨基酸序列同源性为 100%(175/175)。

2.4 重组载体在 *E. coli.* 中的表达及表达形式鉴定

重组质粒 pET22b-Lpp20 转化至 *E. coli.* BL21(DE3)中获得重组工程菌,接种 LB 液体培养基,于 37 ℃培养至 *D*(600)达到 0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h,收集菌体进行 SDS-PAGE 检测可见在 19×10^3 附近处出现 1 条新的蛋白带,与理论预测值相符。空载体转化菌 pET22b/BL21 诱导后在同一位置未出现相应的蛋白带。经 UVP 凝胶成像系统分析 Lpp20 的表达量约占总菌体蛋白的 19.7%。收集菌体经超声破菌后,取离心上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示重组载体在 *E. coli.* 中的表达形式主要以可溶形式存在。

2.5　重组表达蛋白 Lpp20 的纯化

利用蛋白分析软件预测 Lpp20 蛋白的等电点为 9.52，重组菌超声上清样品，利用 HiTrap Chelating 亲和层析柱纯化蛋白，收集流穿峰和洗脱峰，SDS-PAGE 电泳检测不同收集管中目的蛋白的量，经 UVP 凝胶成像系统分析纯化蛋白的相对纯度大于 80%（图 3）。

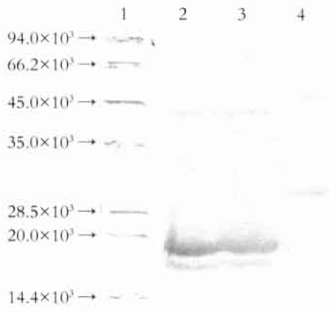


1：超声上清；2－7：亲和层析不同的收集管样品；8：蛋白标准

图 3　镍离子亲和层析纯化重组表达蛋白 Lpp20 SDS-PAGE 分析

2.6　重组表达蛋白 Lpp20 的免疫学活性分析

用兔抗 Hp 的多克隆抗血清 1∶1 000 稀释后作为一抗，Western blot 检测纯化后的蛋白 Lpp20，结果显示在 19×10^3 附近出现阳性反应，同时以空载体菌为对照，未发现阳性反应（图 4），说明该蛋白带为目的蛋白 Lpp20。



1：蛋白标准；2，3：pET22b-Lpp20；4：pET22b/BL21

图 4　免疫印迹鉴定目的蛋白

3　讨论

细菌外膜蛋白（OMP）不但在细菌代谢物质的运输、维持细菌的形态及调节细菌有关物质的合成方面起重要作用，也具有免疫原性，不仅可刺激体液免疫而且对细胞免疫亦有刺激作用，同时 OMP 也是重要的致病因子。Hp 外膜蛋白质是激发免疫反应的主要成分，外膜成分可作为细菌的表面抗原，与机体的免疫系统接触并刺激保护反应，从而诱导强大的菌株特异性免疫反应，作为潜在的靶标在保护性免疫中有着十分重要的意义[2]。

Hp OMP 由于大多存在于菌体表面，具有表面暴露，在不同 Hp 菌株中相对保守，可引起机体体液免疫等特点，一度受到研究人员关注，对幽门螺杆菌尿毒酶、黏附素和 cagA 等表面功能蛋白及多种功能不明的 OMP 的免疫原性做了大量研究，为 Hp 疫苗有效抗原筛选及产品研发提供帮助。国内外文献报道采用粗制的 OMP 抗原加黏膜佐剂免疫小鼠，发现免疫后的小鼠 Hp 的定植密度降低，但不能完全预防感染。与全菌抗原相比，0.5 mg 的 OMP 即达到 1 mg 全菌抗原的效果[3,4]，说明口服 OMP 对预防 Hp 感染具有一定保护作用，但需要筛选有效的免疫抗原与佐剂组合。

由于 Hp 低分子量 OMP 对胃癌及胃癌高发人群的筛选具有重要的价值[5]，用纯化的 OMP 免疫动物可获得清除体内 Hp 或预防感染的作用。有报道应用蛋白质组学技术和免疫印迹技术对感染患者 Hp 的 OMP 进行检测，并与公共数据库进行对比分析发现，具有免疫反应性的斑点聚集在低分子量区域（小于 31×10^3）[6]，但该结果的意义尚需进一步探讨。

本实验对编码 Hp 小分子 OMP lpp20 的基因进行克隆，序列与 GenBank 公布的序列一致性为 99%，成功构建重组载体 pET22b-Lpp20，经过双酶切鉴定及 DNA 测序，结果与理论一致。重组工程菌在 37℃进行诱导表达，可见分子量约为 19 000 的目的蛋白，表达量约占菌体总蛋白的 19.7%。经超声破菌和电泳分析，重组表达蛋白主要以可溶形式存在。有文献报道 Lpp20 定位于 Hp 表面，在 *E. coli.* 中重组表达时，也定位于 *E. coli.* 的表面，本实验结果与文献报道相同，同时经生物信息学软件预测显示，lpp20 基因第 1～21 位存在信号序列，这与重组蛋白的表达形式有一定关系。菌体破碎上清经镍离子亲和层析纯化，纯度大于 80%。对 Lpp20 的抗原性鉴定，以含 pET22b 的空质粒 BL21 转化菌超声破碎上清作为阴性对照，经 Western blot 证实，表达产物与抗 Hp 全菌的抗血清起反应，表明其具有良好的免疫学活性，为以后 Hp 疫苗有效抗原筛选及诊断试剂的开发奠定基础。

参考文献：

[1] 陈翠萍. 幽门螺杆菌疫苗[M]//张延龄，张　晖. 疫苗学. 北京：科学出版社，2004：722.

[2] 庞　智，朱红音，徐蔚文，等. 幽门螺杆菌 27 kDa 外膜蛋白的基因克隆和特性鉴定[J]. 胃肠病学，2002，7(5)：265－269.

[3] 陈　洁，陈曼瑚，朱森林，等. 外膜蛋白疫苗对幽门螺杆菌感染的免疫保护作用[J]. 胃肠病学，2001，6(2)：75－77.

[4] KEENAN J I，RIJPKEMA S G，DURRANI Z，*et al*. Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with Helicobacter pylori outer membrane antigens [J]. FEMS immunol Med Microbiol，2003，36(3)：199－205.

[5] SHIESH S C，SHEU B S，YANG H B，*et al*. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of *H. pylori* is related to clinical outcome of *H. pylori* infection in Taiwan[J]. Dig Dis Sci，2000，45(4)：781－788.

[6] 庞　智，萧树东. 幽门螺杆菌的免疫外膜蛋白质组学及其与胃部疾病的关系[J]. 临床肿瘤学杂志，2005，10(2)：172－177.

（编辑　汪勤俭）