文章编号:1000-5404(2008)17-1587-04

论著

幽门螺杆菌双价亚单位分子内佐剂疫苗的构建表达与纯化

张卫军,郭 刚,刘开云,解庆华,邹全明 (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)

摘 要:**目的** 克隆表达幽门螺杆菌外膜蛋白烷基过氧化氢还原酶 ahpC、ureB414 功能片段基因,与大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位构建融合基因 ahpC-ureB414-ltB(aul)。**方法** 采用重叠延伸 PCR 的方法,以 AhpC 做为融合蛋白前端,与 UreB414 功能片段及黏膜佐剂 ltB 依次串联,在片段间引入 5 个氨基酸的柔性 Linker GGGGS 进行连接,将融合基因构建在原核表达载体 pET-22b(+)中,经酶切及测序鉴定后转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),IPTG 诱导表达融合蛋白 ahpC-UreB414-ltB (AUL)。融合蛋白经 AKTA-explore 纯化仪纯化融合蛋白。**结果** PCR 扩增出 1 350 bp 的目的基因片段 aul,工程菌 pET22b-aul/BL21 经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 显示有新生的蛋白表达条带,相对分子质量约为 50×10^3,与预期值一致,目的蛋白约占菌体总蛋白的 28.7%,重组蛋白用 Ni^{2+}-NTA 树脂提纯。纯化后的蛋白质经 SDS-PAGE 分析可见单一条带,图像软件分析表明纯度可达 85% 以上。Western blot 显示重组蛋白质具有良好的免疫反应性。**结论** 成功构建、表达融合蛋白 rAUL,纯化后的融合蛋白保持各亚单位组分及佐剂的独立免疫反应性。

关键词:幽门螺杆菌;不耐热肠毒素 B 亚单位;融合蛋白
中图法分类号:R378;R392-33;R392.7 **文献标识码**:A

Expression and purification of fusion protein of *Helicobacter pylori* ahpC-ureB414 and *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit

ZHANG Wei-jun, GUO Gang, LIU Kai-yun, XIE Qing-hua, ZOU Quan-ming (Laboratory of Clinic Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the fusion gene of *H. pylori* outer membrane protein AhpC, UreB414 and *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. Methods We constructed the fusion gene aul including ahpC, ureB414 and ltB gene by SOE PCR (splicing by overlap extension), setting AhpC gene before UreB414-ltB fusion gene and introducing a fixible linker GGGGS between them. Then the aul gene was constructed into the expression plasmid pET-22b(+). The fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 induced by IPTG, confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. The inclusion body was purified with AKTA-explore 100 system after washing. Results The fusion gene was successfully cloned into pET-22b(+). The gene segment inserted into the recombinant vector was identified by restriction enzyme digestion and sequencing, and proven to be consistent with that in GenBank. The relative molecular weight of the expressed product was 50×10^3. The purity of rAUL was up to 85% after Chelating Sepharose affinity chromatography. Conclusion The fusion proteins rAUL and rLUL were constructed and expressed successfully. The fusion proteins retain the immunoreactivity of each of their components as well as the binding activity with GM1 ganglioside.

Key words: *Helicobacter pylori*; heat-labile enteretoxin B subunit; fusion protein

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*,Hp)在全球范围内流行,是引起人类慢性活动性胃炎、消化性溃疡的重要致病因子,并与胃腺癌和胃淋巴瘤的发生密切相关[1]。现行推荐的根除 Hp 感染的治疗方案存在耐药菌株增加和药费昂贵等不可避免的问题。因此,疫苗的研制已成为全球 Hp 研究的热点。

外膜蛋白具有良好的免疫原性,不仅可以刺激体液免疫,而且对细胞免疫亦有刺激作用,并且还可以通过遗传工程技术大量表达,因此,外膜蛋白具有良好的免疫保护作用和应用前景。AhpC 是一种重要的抗氧化酶,预防 Hp 在氧冲击下带来的损伤[2]。在炎性作用因子中,氧化应激是造成胃部炎症的重要致病因子。尿素酶对 Hp 在胃内的寄生和致病都起重要作用,是定植因子又是毒力因子,是 Hp 疫苗研究中一种重要

基金项目:国家"十五"重大科技专项课题(2003AA2Z3C64)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (2003AA2Z3C64)
作者简介:张卫军,男,江苏省泰县人,硕士,高级实验师,主要从事生物制药方面的研究。电话:(023)68753591;E-mail:wjzhang@mail.tmmu.com.cn
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316
收稿日期:2007-12-04;修回日期:2008-01-19

的蛋白质。但相对分子质量为 66×10^3 左右，不利于表达和纯化。我室在前期研究中，利用生物信息学方法确定了以尿素酶第 251 位氨基酸到 389 位氨基酸代替尿素酶全长片段，该片段包含已确定的尿素酶活性相关抗原位点，并命名这 138 个氨基酸的功能片段为 UreB414。该片段在大肠杆菌中表达纯化后，经动物实验证实：能够刺激机体产生中和尿素酶活性的抗体[3]。

本研究拟对 Hp 外膜蛋白 Ahpc 和 UreB414 功能片段基因进行克隆表达，在此基础上，将这两个外膜基因与黏膜佐剂-大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位（LtB）构建融合基因。通过不同表达系统得到多亚单位的融合蛋白，为筛选有效的抗 Hp 感染的疫苗抗原奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细菌和质粒

Hp 临床分离菌株 9806、*E. coli* DH5α 及 BL21（DE3）本室保存，质粒 pET22b（+）购自 Novagen 公司，pET11c（+）-ureB414-ltB 质粒由本室构建保存。

1.2 工具酶及主要试剂

Nde Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Ex Taq* DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司，T_4 DNA 连接酶购自上海生物工程技术服务有限公司，基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司，质粒抽提试剂盒、PCR 纯化试剂盒购自 OMEGA 公司，HRP 标记羊抗兔 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司，兔抗 AhpC 血清、兔抗 UreB414 血清、兔抗 ltB 血清为本室制备，其他试剂为国产分析纯。

1.3 重组工程菌的构建及核苷酸序列分析

1.3.1 引物及 PCR 按天根生物离心柱型细菌基因组 DNA 抽提试剂盒Ⅰ说明进行 Hp 临床分离株 9806 基因组抽提。根据 GenBank 公布的 Hp 基因序列，用软件 primier 5.0 设计引物。ahpC 上游引物 P1 的 5′端引入 *Nde* Ⅰ酶切位点，保留起始密码子 ATG，下游引物 P2 的 5′端为 5 个氨基酸连接肽的编码序列，去除了终止密码子（TAG）。引物序列如下：P1：5′-CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3′；P2：5′-GTGTCGCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT-3′；ureB414-ltB 上游引物 P3 的 5′端插入 5 个氨基酸连接肽的编码序列与 ahpC 下游引物 P2 的 5′端的前 20 个碱基反向互补的序列，为重叠引物互补序列；下游引物 P4 的 5′端引入 *Xho*Ⅰ酶切位点。引物序列如下：P3：5′-GGAGGCGGTGGTAGCGACACTTTGAATGAAGCCGGT-3′；P4：5′-CTCGAGGTTTTCCATACTGATTGCCGC-3′ 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以 Hp 临床分离株 9806 基因和重组质粒 pET11c（+）-ureB414-ltB 为模板，按照 94℃ 预变性 5 min，94 ℃变性 60 s，60 ℃退火 60 s，72℃ 延伸 60 s，30 个循环，72℃ 延伸 10 min 进行 PCR。分别扩增 ahpC 和 ureB414-ltB，反应产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳。

1.3.2 重叠延伸 PCR 扩增 ahpC-ureB414-ltB 融合基因 分别纯化含接头序列的 ahpC 和 ureB414-ltB 基因，以回收产物为模板，以 ahpC 的上游引物 P1 和 ureB414-ltB 的下游引物 P4 为一对引物，进行重叠延伸反应，获得含接头序列的 ahpC-ureB414-ltB（aul）融合基因片段。反应产物于 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.3.3 pET22b（+）-aul 表达质粒的构建及鉴定 融合基因片段 ahpC-ureB414-ltB 和 pET22b（+）分别用 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切，将 ahpC-ureB414-ltB 连接并插入原核表达载体 pET22b（+）中，转化大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3），获得重组工程菌。酶切鉴定正确的质粒并送上海英骏生物技术有限公司进行重组质粒的目的基因核苷酸序列测定。

1.4 融合表达产物的诱导表达及 Western blot 分析

挑取阳性重组菌接种于含终浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 液体培养基中，37℃ 摇床培养至 D（600）为 0.6，加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG，在诱导培养后 1～6 h 分别收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳，检测目的蛋白的表达情况。同时进行 Western blot 检测。

1.5 重组融合蛋白的纯化

将诱导表达的菌液以 12 000 × *g* 离心收集菌体，再以 1∶10 的比例混悬于裂解缓冲液中，超声破菌后，将 12 000 × *g* 离心沉淀重悬于含 1% TritonX-100 的 TE 缓冲液中（pH = 8.0），4 ℃搅拌 30 min。再分别用含 1 mol/L 尿素和 2 mol/L 尿素的 TE 缓冲液洗涤，洗涤后的产物用含 8 mol/L 尿素的 TE 缓冲液（pH = 8.0）于 4℃过夜搅拌溶解，用 Q Sepharose High Performance 阴离子交换柱进行纯化。去离子水冲洗层析柱后，以缓冲液 A（10 mol/L Tris-HCl pH = 8.0）平衡层析柱，上样，流速 1 ml/min，使样品与 Q Sepharose High Performance 阴离子交换柱充分结合，以缓冲液 B（10 mol/L Tris-HCl，1 mol/L NaCl pH = 8.0）洗脱不同结合力的蛋白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。

1.6 GM1-ELISA 检测 rAUL 与神经节苷脂的结合

按文献[4]进行。

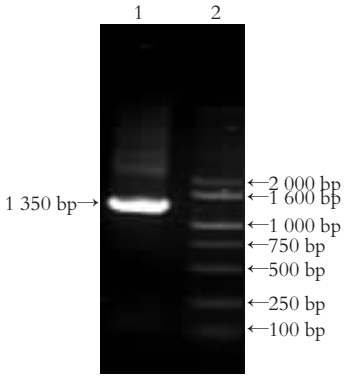
1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，SPSS 10.0 行多因素方差分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增

ahpC、ureB414-ltB PCR 扩增产物分别位于 600～700 bp 之间，与理论（分别为 594、723 bp）相符。ahpC-ureB414-ltB 融合基因的 PCR 扩增产物位于 1 300～1 400 bp 之间，其大小为 1 350 bp，该片段大小与理论值相符。见图 1。

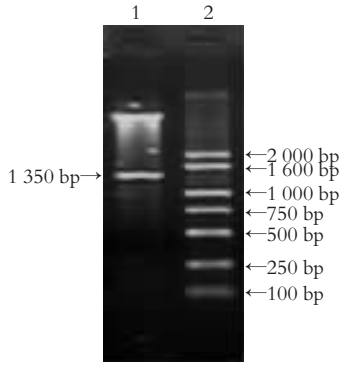


1：aul 融合基因 PCR 产物扩增结果；2：DNA 分子量标准

图 1 重叠延伸获得融合基因

2.2　重组表达质粒 pET22b(+)-ahpC-ureB-ltB 的鉴定及序列分析

构建的重组质粒表达质粒 pET22b(+)-ahpC-ureB-ltB，进行 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切鉴定，获得了 1 350 bp 片段大小的融合基因片段，见图 2。目的基因测序结果表明 插入的基因片段为 ahpC-ureB-ltB 融合基因片段，与 GenBank 报道的相比较，基因序列和氨基酸序列一致性为 99%，说明重组表达质粒 pET22b(+)-ahpC-ureB-ltB 构建成功。

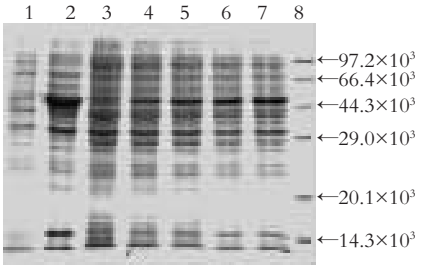


1：重组质粒 pET22b-AUL 经 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切结果；2：DNA 分子量标准

图 2　重组质粒 pET22b-AUL 酶切鉴定

2.3　融合蛋白 AhpC-UreB414-ltB 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的诱导表达结果

IPTG 诱导重组工程菌 pET22b(+)-AUL/BL21，从 SDS-PAGE 电泳图上可以看到，与空质粒菌相比，重组工程菌在 44.3 $\times 10^3$ 和 66.4 $\times 10^3$ 之间出现新的蛋白表达条带，且表达量随诱导时间的延长而增加，诱导表达的目的蛋白经 UVP 凝胶成像系统扫描分析，目的蛋白分别约占总蛋白的 28.7%。见图 3。



1：pET-22b(+)/BL21 空载体经 IPTG 诱导 6 h；2：pET22b-AUL/BL21 重组工程菌经 IPTG 诱导 6 h；3～7：pET22b-AUL /BL21 重组工程菌分别经 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h；8：蛋白分子量标准

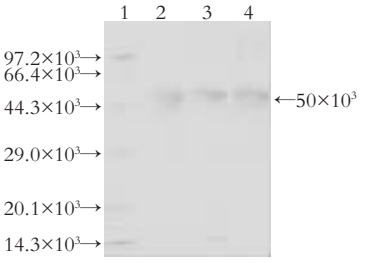
图 3　SDS-PAGE 检测 rAUL 蛋白表达

2.4　表达产物的 Western blot 分析

重组工程菌 pET22b(+)-AUL/BL21 表达产物分别与兔抗 AhpC 血清、兔抗 UreB414 血清、兔抗 ltB 血清进行 Western blot 分析，在 50 $\times 10^3$ 附近均出现一明显褐色沉淀，各抗血清组均能与融合蛋白反应，表明融合后的蛋白各组份保持其原有的免疫反应性。见图 4。

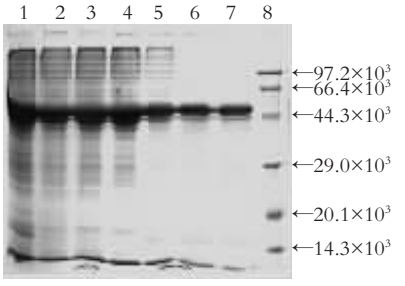
2.5　重组融合蛋白 AhpC-UreB414-ltB 纯化结果

利用超声波裂解诱导后工程菌 pET22b-AUL/BL21(DE3)，收集细菌的超声沉淀，经初步洗涤纯化获得重组融合蛋白 AhpC-UreB414-ltB 的包含体。以含 8 mol/L 尿素的缓冲液溶解包涵体蛋白，采用 Q Sepharose High Performance 层析柱进行纯化。经 SDS-PAGE 电泳分析(图 5)，纯化的目的蛋白经 UVP 凝胶成像系统分析，纯度达 85%。



1：蛋白分子量标准；2：兔抗 AhpC 血清；3：兔抗 UreB414 血清；4：兔抗 ltB 血清

图 4　rAUL 的 Western blot 分析



1：包含体；2～4：rAUL 融合蛋白阴离子层析流穿样品；5～7：rAUL 融合蛋白阴离子层析洗脱样品；8：蛋白分子量标准

图 5　阴离子交换柱层析纯化 rAUL 的 SDS-PAGE 结果

2.6　GM1-ELISA 结果分析

融合蛋白 rAUL 的 GM1-ELISA 测定结果如图 6 所示。rAUL 孔 D(600)值平均 > 0.8，判读为阳性；rAhpC 孔 D(600)值平均 < 0.2，判读为阴性。统计分析表明，rAUL、rltB 与 rAhpC 及空白对照相比，差异极显著($P < 0.01$)。结果证实重组融合蛋白 rAUL 中 ltB 组分具有与 GM1 神经节苷脂结合的能力。

3　讨论

目前在抗 Hp 疫苗的研制中，已选用了大量候选抗原进行了研究。但事实上只有细菌的表面抗原才能与机体的免疫系统接触并刺激保护反应，因此，抗原筛选的第一步工作应集中在细菌的外膜蛋白上[5]。细菌外膜蛋白不仅参与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，而且具有免疫原性，同时外膜蛋白也是重要的致病因子[6]。Hp 外膜蛋白质是激发免疫反应的主要成分，可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[7]。

一种抗原免疫很难在人体诱导出足够的保护性免疫，多种抗原组合似乎能引起更有效地保护性免疫。有文献报道，应用单个幽门螺杆菌抗原免疫，如尿素酶、热休克蛋白、细胞毒素和鞭毛蛋白等，保护率为 30%～90%。要获得更高的保护率或治愈率，疫苗应包含多种抗原。本实验采用重叠延伸 PCR 的方法将

Hp 两个外膜蛋白基因进行融合,并将两种蛋白间用富含疏水性氨基酸的接头连接,设计了编码 5 个疏水性和低电荷效应的氨基酸的序列 Gly Gly Gly Gly Ser(GGGGS)作为接头,尽可能保证蛋白质折叠成天然三维结构,使各个蛋白能够较大程度地保持其原有的生物活性,以适合与各自的受体结合点相互作用,经 Western blot 分析证实融合后的蛋白保持其原有的免疫反应性。重组融合蛋白采用 Q Sepharose High Performance 阴离子交换层析柱进行纯化,纯度可达 85% 以上,符合作为疫苗抗原的要求,同时融合蛋白的表达纯化方法简单,具有双功能的融合蛋白分子,可发挥多重免疫效应。

在实验中还引入分子内佐剂的设计,LtB 做为免疫佐剂用于免疫预防和治疗的研究已有不少报道,本实验将 Hp 的融合基因与大肠杆菌不耐热肠毒素 LtB 融合,通过 ELISA 分析证实重组抗原中的 LtB 组分保留了佐剂活性和反应原性,为下一步的重组蛋白的免疫保护性研究以及 Hp 基因工程疫苗的研制奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 吴亚男,邹全明,罗 萍,等. 幽门螺杆菌 ureB 单克隆抗体的制备及尿素酶活性抑制能力的研究[J]. 免疫学杂志,2005,21(5):393-396.
[2] Chuang M H, Wu M S, Lin J T, et al. Proteomic analysis of proteins expressed by Helicobacter pylori under oxidative stress[J]. Proteomics, 2005, 5(15):3895-3901.
[3] 袁小澎,邹全明,柏 杨,等. 幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位功能片段的纯化及活性研究[J]. 南方医科大学学报,2007,27(7):959-962.
[4] 高 原,邹全明,张卫军. 幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白分子内佐剂融合疫苗的构建、纯化及活性研究[J]. 中国药业,2006,15(18):11-13.
[5] 林焕建,王继德,白 杨,等. 幽门螺杆菌表面抗原免疫保护作用的体外与活体研究[J]. 中国微生态学杂志,2003,15(1):4-6.
[6] 赵香汝,杨汉春. 细菌外膜蛋白的研究现状[J]. 中国兽医杂志,1997,23(12):41-42.
[7] 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.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)17-1590-01

金属所致系统性接触性皮炎 81 例临床分析

杨卫兵,李 欣,张 栋,李丽君 (解放军第 181 医院皮肤科,广西 桂林 541002)

系统性接触性皮炎(systemic contact dermatitis, SCD)是指在个体已致敏状况下,通过口服、皮肤穿透或吸入抗原(半抗原)进入机体达到皮肤,从而引起皮肤所发生的炎症性疾病[1]。引起 SCD 的病因很多[1-3],包括药物、调味品、金属、染发剂等。本科收集了皮肤性病门诊 2005 年 6 月至 2006 年 6 月资料完整的 SCD 病例,现将结果报告如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准

临床表现应同时包括[1]:①3 个月以上的慢性复发病程;②金属直接接触部位有皮疹表现;③远隔部位(非金属直接接触部位)同时出现 2 处以上皮疹。变应原检查应满足以下要求:皮肤金属斑贴试验或生物共振仪(百康)变应原检测阳性。金属斑贴试验是诊断本病的金标准,但可供检测变应原种类少,因此,对部分临床表现典型,而金属斑贴试验结果阴性的患者,我们进行了生物共振仪(百康)变应原检测。生物共振仪应用生物物理学的原理检测变应原所产生的共振波,该方法检测范围广,但对其结果目前存在争议,因此为了保证诊断的准确性,对于生物共振仪检测的患者,如果检测结果与临床表现(金属接触部位有皮疹表现)不符合,或其结果与斑贴试验不符合,则予以剔除。

1.2 一般资料

收集了本院皮肤性病门诊 2005 年 6 月至 2006 年 6 月资料完整的病例。符合以上诊断标准者共 81 例,其中男性 32 例,女性 49 例。年龄 13~76 岁(平均 23.2 岁)。病程为 3 个月至 11 年(平均 2.8 年)。首诊者 18 例,其他 63 例均在我院或其他医院诊断为“湿疹”(33 例)、“泛发性神经性皮炎”(17 例)、“日光性皮炎”(7 例)、“过敏性皮炎”(6 例)等。

2 结果

2.1 主要临床表现

本组 81 例患者的临床表现分为两种类型:泛发性斑丘疹水疱型(65 例)、屈侧皮炎型(16 例),均伴有明显的瘙痒。73 例(90.12%)皮疹表现具有明显的季节性(炎热季节发生,寒冷季节好转或消退);另有 8 例(9.88%)表现为全年发病。此外 71 例(87.65%)患者具有脐周皮疹,另外 10 例(12.35%)患者在其他金属饰品接触部位(如手腕为手表接触部位、耳垂为金

(下转 1597 页)

作者简介:杨卫兵,男,湖南省冷水江市人,博士,副主任医师,主要从事皮肤变态反应和皮肤病理方面的研究。电话:(0773)2081678
收稿日期:2007-10-16;修回日期:2008-02-22