文章编号:1000-5404(2008)12-1107-04

论著

幽门螺杆菌 UreB414-OMP18-LTB 融合蛋白的构建及免疫原性初步研究

葛 迪,郭 刚,毛旭虎,张卫军,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 构建幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)尿素酶B亚单位活性片段(UreB414)、外膜蛋白(OMP18)及大肠埃希菌LTB融合疫苗并研究其抗原性。**方法** PCR扩增ureb414、omp18、ltb基因,分别克隆入pMD18-T载体,测序并鉴定方向后依次连接,构建融合基因UOL,然后将其亚克隆入原核表达载体pET-28a,转化入大肠埃希菌BL21,SDS-PAGE电泳进行表达,Western印迹检测表达蛋白的抗原性。**结果** PCR扩增分别获得约414、537 bp和320 bp产物,与GenBank中相关序列具有高度同源性,三者融合后获得一约1 200 bp目的基因。重组融合蛋白表达量可达细菌总蛋白的15%,免疫印迹检测结果显示该重组蛋白可为UreB、OMP18、LTB兔抗血清特异识别,具有良好的抗原性。**结论** 成功构建了具有良好免疫原性的UreB-OMP18-LTB融合蛋白。

关键词: 幽门螺杆菌;尿素酶;外膜蛋白;大肠埃希菌不耐热毒素B亚单位;疫苗

中图法分类号: R378.99;R392.1;R394-33 **文献标识码:** A

Construction and immunogenicity of a fusion vaccine candidate of UreB-OMP18-LTB from *H. pylori*

GE Di, GUO Gang, MAO Xu-hu, ZHANG Wei-jun, ZOU Quan-ming (Laboratory of Clinic Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a fusion vaccine of *Helicobacter pylori* (Hp) urease subunit B (UreB), outer membrane protein18 (OMP18) and *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit, summarized as UOL and study its antigenicity so as to lay a foundation to produce an *H. pylori* vaccine. Methods The UreB414, OMP18 and LTB genes were amplified by PCR, and cloned into pMD 18-T vector, and the products were identified and fused to abtain UOL. UOL was then subcloned into a procaryon expression vector pET-28a and transformed into *E. coli* cells BL21. Immunogenicity of the recombinant fusion protein was analyzed by Western blotting. Results The PCR fragments of ureb414, omp18 and ltb genes were about 414, 537 and 320 bp, which had high homology with those related sequences in GenBank. Recombinant protein amounted to 15% of the total bacterial protein. Western blot showed that the protein had a specific reaction with UreB, OMP18 and LTB antiserum. Conclusion Expression of the fusion protein of UOL in *E. coli* cells provides a basis to produce engineered vaccine against Hp.

Key words: *Helicobacter pylori*; urease; outer memberane protein18; *E. coli* heatlabile enterotoxin B subunit; vaccine

---

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2003AA215020)

Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA215020)

作者简介: 葛 迪,女,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,主要从事病原细菌诊防方面的研究。电话:(023)68753590,E-mail: gd1124@126.com

通信作者: 邹全明,电话:(023)68752316

收稿日期: 2007-07-26;**修回日期:** 2008-01-03

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)是一种全世界范围的人类感染致病菌,其感染率占世界人口的一半以上。Hp 感染是慢性胃炎、胃及十二指肠溃疡的主要病因,同时与胃腺癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生密切相关[1-4]。如何预防和根除 Hp 感染一直是广大科研工作者关注的焦点。单一 Hp 抗原的免疫保护率几乎均低于80%,2 种及以上抗原组合可获得理想的保护效果[5],多价疫苗将是今后 Hp 疫苗研究的主要方向。本研究采用 DNA 重组技术将幽门螺杆菌保护性抗原尿素酶 B 亚单位活性片段(UreB414)、外膜蛋白 18 和大肠埃希菌不耐热肠毒素 B 亚单位进行融合表达,并对融合蛋白 UreB414-OMP18-LTB 的抗原活性进行了研究,为进一步研制幽门螺杆菌疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

幽门螺杆菌临床分离株 9806、大肠埃希菌 DH5α 和 BL21(DE3)均由本实验室培养和保存;质粒 pET28a 为本室保存。

1.2 主要试剂

Ex-Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、pMD18-T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司;DNA marker、Protein marker、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_4DNA 连接酶购自 MBI 公司;QSepharose High Performance 阴离子交换柱购自 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 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 引物的设计 根据 GenBank 中 ureb414、omp18、ltb 的序列和重叠延伸的实验目的,分别设计引物,设计引物 P1、P2 用于扩增 ureb414 基因,在上游引物 P1 5′端引入 *Nco* Ⅰ酶切位点,在下游引物 5′端引入氨基酸 linker 的核苷酸序列并构成重叠延伸的尾部。设计引物 P3、P4 用于扩增 omp18 基因;在上游引物和下游引物分别引入氨基酸 linker 的互补序列。设计引物 P5、P6 用于扩增 ltb 基因;并在 P5 5′端引入氨基酸 linker 的互补序列,在下游引物 P6 5′端引入 *Xho* Ⅰ酶切位点。引物采用 Primer Premier 5.0 软件分析评价,送北京赛百盛生物工程公司合成。引物如下:

P1:5′-CCATGGACACTTTGAATGAAGCTGGTTGTG-3′(下划线部分为 *Nco* Ⅰ酶切位点)

P2:5′-CAT*CGGAGGATCCTGCGG*AAATTCTTTTTTGTT-3′(斜体为 linker)

P3:5′- TTT*CCGCAGGATCCTCCG*ATGAAGAGATCTTCTG-3′(斜体为 linker)

P4:5′-TGC*AGGCGGGTCCTGTGG*CTTCATTAATTTGAC-3′(斜体为 linker)

P5:5′-AAG*CCACAGGACCCGCC*TGCACCCCAGTCTATT-3′(斜体为 linker)

P6:5′-CCGCCTCGAGTTAGTTATCCATACTGATTGCCGC-3′(下划线部分为 *Xho* Ⅰ酶切位点)

1.3.2 初次 PCR 反应 抽提 Hp 基因组 DNA 为模板,以 P1、P2,P3、P4,P5、P6 为各自引物按常规 PCR 方法以 50 μl 反应体系进行扩增,分别获得了与 linker 相连的 ureb414、omp18、ltb 基因。反应条件为预变性 94 ℃ 10 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 56 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 60 s, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min。取 5 μl,PCR 反应产物,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳确认所扩增片段。

1.3.3 重叠 PCR 反应 初次 PCR 反应获得的 U-linker、O-linker、L-linker 用胶回收试剂盒回收,以回收后的 DNA 混合物 U-linker、O-linker 作为模板,P1、P4 为引物,50 μl 反应体系作重叠延伸反应,获得以 linker 相连接的 U 和 O-linker 的融合基因(U-O-linker)。反应条件为预变性 94 ℃10 min 之后,变性 94 ℃ 30 s,退火 55 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 60 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。再以纯化后的 DNA 混合物 U-O-linker 作为模板,P1、P6 为引物,50 μl 反应体系作重叠延伸反应,获得以 linker 相连接的 U-O-L 的融合基因。反应条件为预变性 94 ℃ 10 min 之后,变性 94 ℃ 30 s,退火 55 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃完全延伸 15 min。用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.3.4 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 的物质的量比为 1∶4 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-UOL 和表达载体 pET28a 用 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,以 1% 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,pET28a 片段与插入 DNA 的物质的量比为 1∶3连接后的重组表达载体 pET28a-UOL 再经 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.5 重组质粒转化 将重组载体 pET28a-UOL 转化感受态大肠埃希菌 BL21(DE3),构建的重组工程菌涂布含 K^+的 LB 琼脂培养基37℃培养 12 ~ 16 h,挑选单菌落接种于含 K^+的 LB 液体培养基中,置 37 ℃摇床振荡培养 12 h 抽提质粒,以 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.6 目的蛋白的诱导表达 挑取 pET28a-UOL/BL21 单个菌落,接种于含 K^+的 LB 培养基中振摇过夜。次日按 1∶100 比例将过夜培养物转种于新鲜培养基中, 37 ℃振摇培养至吸光度值 D(600)达 0.4 ~ 0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,诱导表达 6 h。离心收集菌体,以蛋白加样缓冲液处理 100 ℃ 5 min, 12 % 分离胶作聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),薄层凝胶扫描分析重组蛋白表达情况。以最适浓度 IPTG 分别诱导培养 0、2、4、6 h,以确定最适诱导时间。

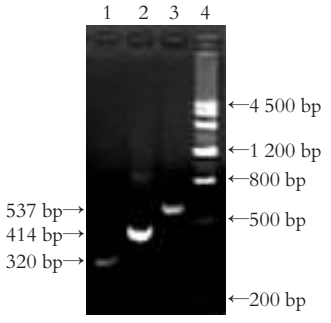
1.3.7 Western blot 诱导表达菌的全菌裂解产物 12% 分离

胶 SDS-PAGE ,将凝胶上的蛋白电转移至硝酸纤维素膜(NC)上;膜浸泡于含 100 g/L 脱脂奶粉的封闭液中, 4 ℃过夜封闭非特异性位点;用 PBS 洗膜后,分别加入 Hp 全菌血清、UreB414、LTB 兔抗血清作为一抗,室温作用 1 h ,再用 PBS 洗膜;然后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔血清作二抗,室温作用 1 h ,继续用 PBS 振摇洗膜,最后用 DAB 显色。

2　结果

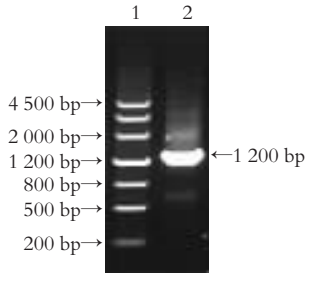
2.1　目的基因的扩增

PCR 从 Hp 基因组 DNA 分别扩增出一约 414、537 bp 和 320 bp 产物,与预计 ureb414、omp18、ltb 长度相符(图 1)。重叠 PCR 扩增获得 1 200 bp 的融合基因 UOL(图 2)。



1: ltb PCR 扩增产物; 2: ureb414 PCR 扩增产物; 3: omp18 PCR 扩增产物; 4: DNA 标准

图 1　PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

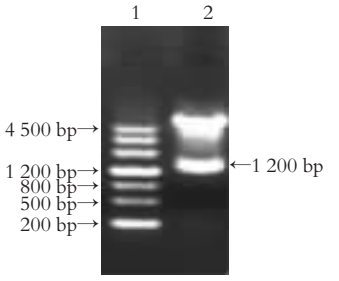


1: DNA 标准; 2: UOL PCR 扩增产物

图 2　融合基因 UOL PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

2.2　重组质粒 pET28a-UOL 的鉴定

重组表达质粒经 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切后,产生 1 300 bp 和 5 400 bp 左右的片段,小片段与重叠延伸 PCR 扩增产物片段的大小一致(图 3),证明重组成功。



1: DNA 标准; 2: pET28a-UOL/*Nco* Ⅰ + *Xho* Ⅰ

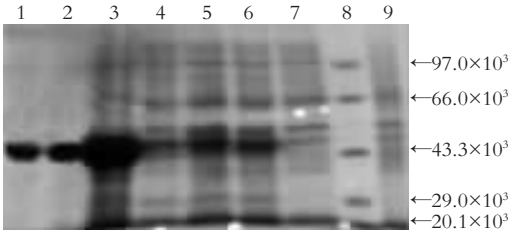
图 3　重组质粒 pET28a-UOL 酶切鉴定

2.3　目的片段同源性分析

对重组质粒进行基因的核苷酸测序,融合基因中的 ureb、omp18 和 ltb 序列均与基因库中公布的核苷酸序列的相似性分别为 99% 、99.5% 、100% 。

2.4　重组融合蛋白 UOL 的表达及纯化

将重组工程菌转化大肠埃希菌 BL21 并鉴定后,接种于 3 ml LB(K^+)培养液中,37 ℃摇床培养过夜。次日将过夜培养的重组工程菌按 1% 的比例转种于 20 ml LB (K^+)培养液中, 37 ℃摇床培养待 $D(600) \approx 0.8$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 开始诱导,SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达。超声破菌和包涵体洗涤证实融合蛋白 UOL 以包涵体形式表达, 表达量约占全菌的20%(图4),Western blot 显示融合蛋白具有与兔抗 Hp、UreB414、LTB 血清发生抗原抗体反应的能力。大量生产采用高密度发酵,目标蛋白表达率为 18% 。离心收集菌体,将其悬浮于 10 倍体积的 TE 缓冲液中,经高压均质破菌后,差速离心收集包涵体, 包涵体洗涤后溶解于包涵体溶解液中(1 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、10 mmol/L DTT、8 mol/L 尿素 pH 7.0 ~ 9.0) 。经过复性纯化,12% SDS-PAGE 显示目标蛋白呈现单一条带,相对分子质量约为 44.0×10^3,纯度为 89% (图 4)。



1、2: 纯化后目的蛋白;3: 超声沉淀;4: 超声上清;5: 发酵后目的蛋白; 6: 重组蛋白 5 h 取样;8: 蛋白标准; 7,9: pET28a-BL21 空载体对照

图 4　融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.5　重组融合蛋白 UOL 和 Western 印迹

Western 印迹反应显示,重组融合蛋白 UOL 与兔抗 Hp 全菌血清、兔抗 UreB414、兔抗 LTB 血清均能发生反应,表明该重组蛋白具有良好的免疫反应性。

3　讨论

联合化学药物治疗可获得较高的 Hp 根除率,但存在诸如抗生素耐药、药物不良反应及价格昂贵等问题,难以广泛推广。疫苗是预防和控制传染性疾病最有效的方法。随着 Hp 有效的保护性抗原的陆续发现,相应的基因克隆及动物模型的不断完善,Hp 疫苗研制的可行性大大提高,其中工程菌尿素酶亚单位疫苗已经进入Ⅲ期临床试验阶段。与此同时,多亚单位疫苗也越来越受到人们的关注。Ruggiero 等[6] 认为,在细菌感染过程中,由于宿主与致病菌之间的复杂作

用机制,单一的抗原组分的疫苗难以产生完全而有效的保护作用。因此,在 Hp 单一保护性抗原疫苗研究基础上,构建的多亚单位或包括多个抗原组分的疫苗,将能激发机体产生比单一亚单位成分更强的免疫反应,并可减少机体变态反应的发生几率。本室在前期大量的研究工作中,针对 UreB 和 HpaA 两个亚单位抗原的保护性均在动物实验中得到了验证。另外,黏膜佐剂对于诱发有效的免疫保护必不可少[7]。佐剂 LTB 不仅能明显提高抗原的免疫保护作用,其本身亦能刺激机体产生非特异的保护性应答。LTB 一方面通过与抗原结合,增加其相对分子质量而提高抗原性,另一方面通过与黏膜上皮表面抗原提呈细胞(主要为 M 细胞)上的 GM1 神经节苷脂结合,促进抗原与佐剂复合物被抗原提呈细胞所摄取,更好地刺激机体免疫系统,发挥免疫增强作用。

由于 Hp 保护性抗原的相对分子质量较大,如 UreB 相对分子质量为 66×10^3,以此构建基因工程重组融合蛋白存在蛋白表达率低和纯化难度大等困难[8]。选择大分子蛋白中具有免疫保护功能的蛋白片段来替代全长蛋白分子,仍可以发挥有效免疫应答作用,且为基因工程重组疫苗的构建带来便利。Kaoru 等在尿素酶 B 亚单位蛋白单克隆抗体的研究中发现:该单克隆抗体能够阻断尿素酶活性,从而确定了尿素酶中 321 ~339 位氨基酸序列与酶活性相关,被动口服单克隆抗体可以减少 Hp 的定植,尿素酶活性相关抗体在整个尿素酶抗原免疫保护中占据主要地位。通过单克隆抗体筛选出尿素酶活性相关的功能片段,以此替代完整的尿素酶蛋白可以在疫苗免疫应答中发挥作用,同时,不同保护性抗原的功能活性小片段可通过基因工程方法进行基因水平连接构建表达出重组融合蛋白。因此,选择了从 UreB 蛋白中 5′端 251 位氨基酸到 389 位氨基酸的 138 个氨基酸为目的片段 ureb414,该片段含有已确定的 CHHLDKSIKEDV12 肽的尿素酶活性相关位点,并由此功能性小片段 ureb414 替代全长的大分子蛋白构建重组多价疫苗。

我们将 Hp 疫苗主要候选抗原 UreB414、OMP18、ILT 基因克隆并经重叠延伸 PCR 的方法用 linker 连接在一起。不同蛋白质模块通过寡肽 linker 连接时,正确的设计和应用 linker,对于融合蛋白后期的表达和期望的功能具有决定性作用。本研究选用的 linker 由 5 个氨基酸组成,自 N 端起分别为 PQDPP(脯氨酸-谷氨酰胺-天冬氨酸-脯氨酸-脯氨酸),含有 3 个脯氨酸残基。DNAstar 软件分析融合蛋白中 linker 的柔韧性显示,该 linker 具有良好的柔韧性。柔性区的存在使 linker 两侧的蛋白功能区正确折叠,从而推测能够产生正确的生物结构和空间构象,形成具有生物活性的空间结构。经序列分析显示融合基因拼接正确。BLAST 分析表明所克隆序列与 GenBank 中相应核苷酸和蛋白质序列均具有 99% 以上同源性。我们将融合基因亚克隆入原核表达载体 pET28a,转化入大肠埃希菌 BL21(DE3)后表达一相对分子质量约为 44 000 蛋白质,分别与 Hp、UreB414、LTB 抗血清特异反应,证实融合蛋白具有良好的免疫反应性。本研究成功地将 OMP18、UreB414、LTB 经重叠延伸 PCR 的方法用 linker 连接在一起,其方法简单易行不需要内切酶消化和连接酶处理。在构建表达载体的时候,利用 pET28a 末端 6 个组氨酸构成的纯化标签,由于该区域能与镍离子特异结合,因此在纯化中首选镍离子亲和层析的方法进行纯化。本研究为进一步研究其免疫保护作用及 Hp 疫苗的研制奠定了重要的实验基础。

参考文献:

[1] Mitchell H M. The epidemiology of Helicobacter pylori[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1999, 241: 11 -30.

[2] Kuipers E J, Thijs J C, Festen H P. The prevalence of Helicobacter pylori in peptic ulcer disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1995, 9 (Suppl 2): 59 -69.

[3] IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human[M]. Lyon: Word Health Organization, 1994: 177 -240.

[4] Ishii E, Yokota K, Sugiyama T, *et al*. Immunoglobulin G1 antibody response to Helicobacter pylori heat shock protein 60 is closely associated with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(6): 1056 -1059.

[5] Telford J L, Ghiara P. Prospects for the development of a vaccine against Helicobacter pylori[J]. Drugs, 1996, 52(6): 799 -804.

[6] Gieseler S, Konig B, Konig W, *et al*. Strain-specific expression profiles of virulence genes in Helicobacter pylori during infection of gastric epithelial cells and granulocytes[J]. Microbes Infect, 2005, 7(3): 437 -447.

[7] Montecucco C, Papini E, de-Bernard M, *et al*. Molecular and cellular activities of Helicobacter pylori pathogenic factors[J]. FEBS Lett, 1999, 452(1 -2): 16 -21.

[8] 赵玉霞, 章 涵, 段广才, 等. 人幽门螺杆菌 UreB 与 Omp11 双价疫苗载体的构建与鉴定[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42 (1): 103 -106.

(编辑 吴培红)