基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0822-03

幽门螺杆菌 hp1188 基因的原核表达

韩 飞[1],杨致邦[2]

(1.重庆三峡中心医院微免科,重庆 404000;2.重庆医科大学基础医学院:病原生物学教研室;神经科学研究中心;基础医学实验教学中心病原生物学与免疫学实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:重组表达幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,*H. pylori*) hp1188 基因,为研究该基因所编码蛋白在 *H. pylori* 的黏附过程中的作用奠定基础。方法:以 *H. pylori* 标准株 NCTC 11637 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 hp1188 基因片段,克隆至质粒 pQE-30 中获得重组质粒 pQE30-hp1188,经 DNA 测序确认后将重组质粒转化大肠杆菌 DH5α,IPTG 诱导表达。Ni^{2+}-NTA 树脂亲和层析纯化表达蛋白,SDS-PAGE 检测表达,Western blot 鉴定相应抗原表位。结果:扩增的 hp1188 基因片段全长 810 bp,与基因文库中的 hp1188 基因同源性达 98%。SDS-PAGE 显示表达产物相对分子量约为 30 600 Dalton,与预期相符;大肠杆菌裂解液中表达产物接近可溶性蛋白总量的一半,但沉淀中仍能检测到表达蛋白。目标蛋白纯化后均一性接近 90%,Western blot 证实与多克隆抗体有良好结合能力。结论:成功克隆了 hp1188 基因,并在大肠杆菌 DH5α 中获得高效表达。

【关键词】幽门螺杆菌;hp1188 基因;表达

【中国图书分类法及分类号】Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-17

Prokaryotic expression of Helicobacter pylori gene hp1188

HAN Fei, et al

(*Department of Microbiology and Immunology, Chongqing Three-Gorges Central Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To express the recombinant protein of the hp1188 gene of Helicobacter pylori NCTC 11637 in order to lay a foundation for the study on adhesion. *Methods*: The hp1188 gene was amplified from NCTC 11637 chromosomal DNA by PCR. The PCR product was inserted into the expression vector pQE-30. The recombinant vector pQE30-hp1188 was identified by DNA sequencing and transformed to *E.coli* DH5α for expression under IPTG induction. The recombinant protein was purified by Ni^{2+}-NTA agarose and identified by SDS-PAGE and western blot. *Results*: The sequence of hp1188 gene amplified was about 810 bp with a 98% sequence homology with hp1188 genes in GenBank. SDS-PAGE determined that the molecular weight of its expression products was 30 600 Dalton. The expression products of *E.coli* DH5α lyzate was about 50% of total soluble proteins, and the pellet also had expressed. Its purity was over 90% after purified with Ni^{2+}-NTA agarose and Western blot showed that the recombinant protein possesses fine binding capacity with the rabbit anti-H.pylori. *Conclusion*: hp1188 gene was successfully cloned and highly expressed in *E.coli* DH5α.

【Key words】Helicobacter pylori; hp1188 gene; Expression

现已明确,幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,*H. pylori*)的感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌和黏膜相关性淋巴样组织(Mucosa-associated lymphoid tissue,MALT)淋巴瘤密切相关[1],已被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌[2]。*H. pylori* 致病机制尚不明了,但 *H. pylori* 必须首先定植于人胃黏膜才能进一步发挥其致病作用,而黏附是 *H. pylori* 定植在胃黏膜表面的前提。决定 *H. pylori* 黏附的因素包括胃动力、尿素酶和黏附素。黏附素是 *H. pylori* 定植于人胃黏的物质基础[3-6],已证实细菌的黏附素有 HpA、AlpA、AlpB、BabA 和 HopZ 等亚型。*H. pylori* 主要表达 HpA,但国内外报道的不同 *H. pylori* 菌株间 HpaA 表达量有较大差异;其它黏附素并不是存在于所有菌株中,如 BabA 仅存在于 CagA 致病岛阳性的菌株中[7]。2005 年 Sebastian[8]等人利用一种新方法即镍珠模型筛选出一种新的蛋白 1188,该蛋白存在于 *H. pylori* 表面,表达量很高,并与黏附有关。Sebastian 研究发现编码该蛋白的 hp1188 基因为 *H. pylori* 所特有,且相当保守,与已知的黏附素序列无同源性。本实验根据基因文库中提供的 hp1188 序列,以 *H. pylori* NCTC 11637 基因组 DNA 为模板,克隆和表达重组 Hp1188 蛋白,对鉴定其抗原活性,为进一步研究 Hp1188 蛋白在 *H. pylori* 感染中的作用和该菌的黏附机制,及防治 *H. pylori* 感染奠定基础。

作者介绍:韩 飞(1980-),女,硕士,检验师,研究方向:机会致病菌感染与免疫。

通讯作者:杨致邦,男,教授,E-mail:dryangfm365@sina.com。

基金项目:重庆市教委项目(渝教科 2003-7-3);重庆市科委攻关项目(CSTC,2005EA5020)。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

H. pylori 标准菌株 NCTC 11637 由重庆医科大学杨致邦教授惠赠，大肠杆菌 DH5α 和 pQE-30 质粒为本室保存。

1.2 工具酶与试剂

BamH Ⅰ、*Xhol* Ⅰ限制性内切酶，DL-2000 DNA Marker、T4 连接酶试剂盒购自 Takara 公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物公司；质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司；胶回收试剂盒为上海华舜公司产品；PCR 试剂盒、蛋白质 Marker 为 Fermentas 公司产品；Ni^{2+}-NTA 层析柱为 Invitrogen 产品；NC 膜与 DAB 显色试剂盒为武汉博士德公司产品；琼脂糖、IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N，N'-亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R250 均为 Sigma 公司产品；兔抗 *H. pylori* 全菌抗体由本室制备；辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 为北京鼎国产品。7%羊血平板为本室制备。

1.3 *H.pylori* 基因组 DNA 的提取

将 *H. pylori* 标准菌株 NCTC 11637 接种于 7%羊血平板上，置于厌氧培养罐中，微需氧环境下(5%O_2、10%CO_2、85%N_2)37℃培养 3～4 d，生长的菌落鉴定后，洗下菌落，按细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取 *H.pylori* 基因组 DNA。

1.4 引物的设计及合成

根据 GeneBank 公布的 hp1188 基因序列(GeneID: 899950)，利用 premier premier5.0 软件设计引物，引物序列为 P1:5'-CGC-CTCGAG-ATGAAGAGAGTTAGAGAA-3'(引入 *Xho* Ⅰ酶切位点)，P2:5'-CCC-GGATCCTCAGCAAATATTTTTT-3'(引入 *BamH* Ⅰ酶切位点)。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.5 hp1188 基因的 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增条件：95℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，47℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 58 s，共 35 个循环；最后 1 个循环结束后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳确定扩增片段的大小正确与否，并回收预期的目的片段。

1.6 重组质粒 pQE30-hp1188 的构建

参照文献[9]方法。将质粒 pQE-30 和纯化回收的 hp1188 基因片段分别用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切，回收酶切片段，用 T4 连接酶 16℃连接 6 h。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α，氨苄抗性筛选阳性重组子，抽提质粒，经 PCR 和双酶切鉴定，筛选出阳性克隆，并送上海英骏生物科技有限公司测序。

1.7 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒转化菌的单菌落接种于 LA(含氨苄青霉素 100 mg/L)液体培养基中，于 37℃ 培养过夜，以 1:20 的比例接种上述过夜菌于新鲜的 LA(含氨苄青霉素 100 mg/L)液体培养基中，37℃振荡培养至菌浓度为 A_{600}=0.4～0.6。加入 IPTG 至终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L，37℃ 诱导表达，分别收集诱导表达 1、3、4、5、24 h 菌体进行 SDS-PAGE 分析，确定最佳诱导表达条件。在最佳条件诱导下，收集菌液 1 ml 进行全菌蛋白的 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色，通过诱导前后全菌蛋白染色条带的对照，检测相应分子质量的外源性蛋白表达条带。将诱导表达的菌液在 4℃，5 000 g 离心 10 min 收集菌体，按每克湿菌 3 ml 比例加入超声破碎缓冲液(每 100 ml 含 2 mol/L Tris-HCl 1 ml，β-巯基乙醇 0.03 g)重悬菌体，冰浴下超声破碎细菌。条件为功率 280 W，破碎 3 s，间隔 3 s，总破碎时间为 40 min。然后 4℃，10 000 g 离心 20 min，分别收集裂解后所得到的沉淀与上清液，经 12%SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达形式。

1.8 重组蛋白的纯化

收集 2 L 诱导表达的菌液，在冰浴下超声裂解后的上清液中加 2 ml 50%的 Ni^{2+}-NTA 树脂溶液，0℃ 冰浴 1 h，其间不断振荡。将混合物转入下垫滤纸的注射器中，自然流干。用洗涤液(50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑)洗柱。分别收集洗涤液 W1～W4。用洗脱液 (50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，250 mmol/L 咪唑)洗柱，分别收集洗涤液 E1 至 E11。取适量样品进行 SDS-PAGE 分析，合并目的蛋白并用 PEG 8000 浓缩，最后将纯化样品分装，低温保存。采用 Bradford 法对纯化的重组蛋白进行定量。

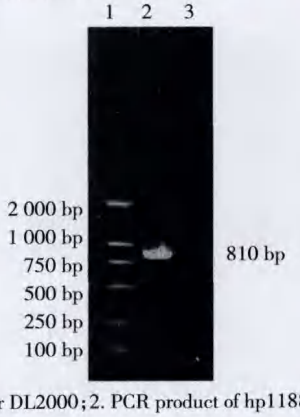
1.9 纯化蛋白的 Western blot 初步鉴定

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后半干法将凝胶上的蛋白电转移至 NC 膜上，以兔抗 *H. pylori* 的全菌血清为一抗，HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗，DAB 为显色底物检测其抗原特异性。

2 结 果

2.1 hp1188 基因 PCR 扩增结果

PCR 产物经琼脂糖电泳分析可见约 810 bp 的单一条带，片段大小符合预期(图 1)。



1. DNA marker DL2000；2. PCR product of hp1188 gene；3. Control (*E.coli* DH5α transformed with pQE30)

图 1 hp1188 基因的 PCR 扩增

2.2 重组质粒 pQE30-hp1188 鉴定结果

pQE30-hp1188 质粒，经 PCR 及双酶切鉴定，均可见约 810 bp 的目的蛋白带，见图 2。阳性克隆 DNA 测序结果表明插入的基因片段全长 810 bp，与 GeneBank 公布的 *H.pylori* 菌株 26695 相应序列进行核苷酸序列比对分析，基因序列的同源性为 98%。

2.3 重组蛋白的最佳表达条件

收集诱导前后的细菌全蛋白进行 SDS-PAGE 分析，诱导后的细菌较诱导前在相对分子质量 30 600 Dalton 处可见明

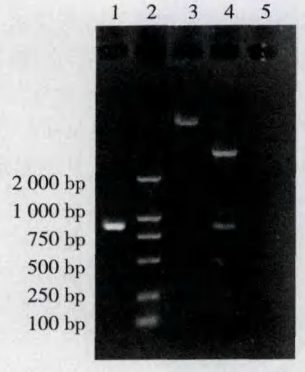
显增加的外源蛋白表达条带。最佳诱导表达条件为 37℃，IPTG 浓度 1.0 mmol/L，诱导时间 4 h，可得到最大的表达量，见图 3 和图 4。

2.4　重组蛋白表达形式分析

SDS-PAGE 分析表明，超声破碎菌的上清与沉淀均可见目的蛋白表达（图 5），图象软件分析表明可溶性表达蛋白接近全部可溶性蛋白的 50%。

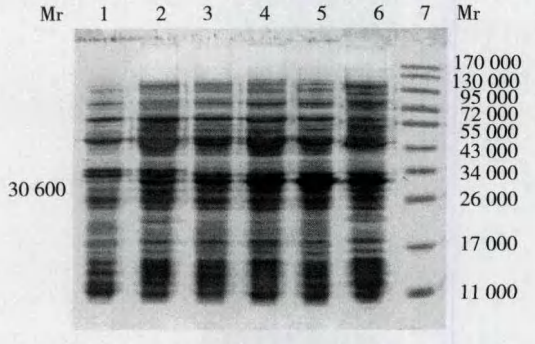
2.5　重组蛋白纯化产物的鉴定

经 SDS-PAGE 检测，图像分析表明，纯化产物主要存在于前第 2 管到～7 管洗脱液中，纯度可达 90%（图 6）。Bradford 法测定纯化重组蛋白的含量为 1.0 mg/ml。



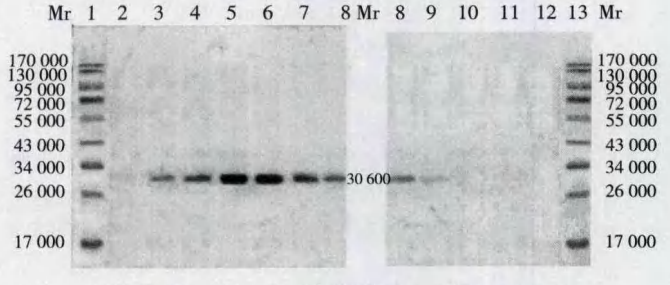
1. PCR product of pQE30-hp1188; 2. DNA marker DL2000; 3. pQE30-hp1188; 4. pQE30-hp1188/*BamH* Ⅰ + *Xho* Ⅰ; 5. PCR product of pQE30

图 2　重组质粒 pQE30-hp1188 的 PCR 及酶切鉴定



1. pQE30-hp1188 induced without IPTG; 2～6. pQE30-hp1188 induced with 1.0 mmol/L IPTG（1、3、4、5 和 24 h）; 7. Protein marker

图 4　重组蛋白最佳诱导时间的测定



1,13. Protein marker; 2～12. Purified recombinant protein (E1～E7; E7～E11)

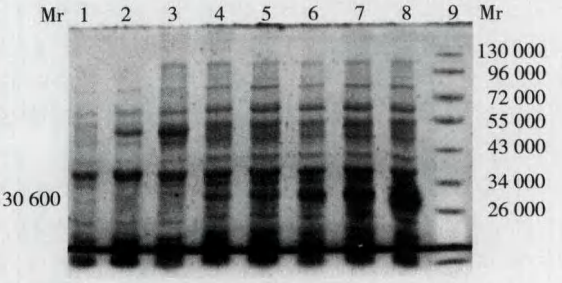
图 6　纯化的重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.6　纯化蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示，纯化蛋白与兔抗 *H. pylori* 血清在相对分子质量 30 600 Dalton 附近出现特异性反应条带，阴性对照未见反应条带（图 7）。表明纯化蛋白具有较好的反应原性。

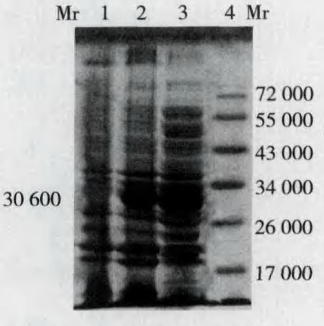
3　讨　论

H. pylori 感染呈世界性流行，人群对 *H. pylori* 具有普遍易感性，目前临床常用的治疗方案主要应用抗生素和质子泵抑制剂，但随之而出现的药物副作用大、治疗费用昂贵、患者顺应性差及耐药菌株的不断增加等问题使其难以达到理想的效果。因此，有必要研制 *H. pylori* 疫苗[10]，疫苗的成功研制及



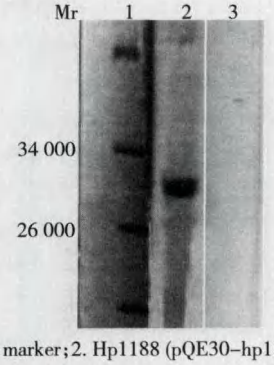
1. pQE30 induced with IPTG; 2. *E.coli* DH5α induced with IPTG; 3. pQE30-hp1188 induced without IPTG; 4～8. pQE30-hp1188 induced with different concentration of IPTG（0.1、0.3、0.5、0.8 及 1.0 mmol/L）; 9. Protein marker

图 3　重组蛋白最佳 IPTG 诱导浓度的测定



1. pQE30-hp1188 induced without IPTG; 2. supernatant of pQE30-hp1188 induced with IPTG; 3. pellet of pQE30-hp1188 induced with IPTG; 4. Protein marker

图 5　重组蛋白表达形式的鉴定



1. Protein marker; 2. Hp1188 (pQE30-hp1188 induced with 1.0 mmol IPTG); 3. Control (pQE30)

图 7　表达蛋白 Hp1188 的 Western blot 分析

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0825-04

纳米羟基磷灰石复合物修复骨缺损实验研究的影像学评价

肖智博[1],吕富荣[1],蒋电明[2],欧阳羽[1],吕发金[1],李 杰[2]
(重庆医科大学附属第一医院 1. 放射科;2. 骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过磁共振成像(Magnetic resonance imaging,MRI)与 X 线方法检测纳米羟基磷灰石/聚酰胺(n-HA/PA66)复合材料应用于修复骨缺损实验研究,综合评价其成骨能力,为骨缺损修复后全面、准确的影像学评价提供理论依据。方法:30 只新西兰大白兔行一侧胫骨髁钻孔,并植入 n-HA/PA66 复合材料。术后 2、4、6、8、12 周各时相点摄 DR 片、MRI 及动态增强 MRI 检查,并取材进行组织学观察。结果:(1)MRI 显示 n-HA/PA66 复合材料与骨组织易于区分,术后第 4 周开始从材料内部逐步强化,周围软组织水肿逐步吸收,术后 12 周修复区强化明显,周围水肿基本吸收。(2)X 线显示术后第 8 周开始,缺损填修复区内的骨质增生开始,术后 12 周缺损区呈高密度骨质修复表现。(3)组织学显示术后 4 ~ 12 周,n-HA/PA66 复合材料被界膜分隔成小岛,界膜内可见大量间充质细胞、成纤维细胞及小血管,后形成破骨及成骨细胞,修复区内骨小梁逐步形成。结论:MRI 联合 X 线能够清楚显示 n-HA/PA66 复合材料修复过程,对早期骨移植的成功有很好预测作用,并兼顾术区周围关节及软组织的恢复显示,具有临床可操作性。

【关键词】骨移植;MRI;骨缺损;纳米羟基磷灰石 - 聚酰胺 66 复合物
【中国图书分类法分类号】R816.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-29

作者介绍:肖智博(1979-),女,硕士,
研究方向:骨骼系统及头部影像诊断。
通讯作者:吕富荣,男,主任医师,副教授,E-mail:lfr918@sina.com。

基金项目:国家 863 计划子课题(编号:2002AA326020)。

应用在 *H. pylori* 感染的防治策略中意义重大。

对 *H. pylori* 感染的研究表明,*H. pylori* 在胃内定植的关键环节是黏附,随着人们对黏附素[11~13]本质的认识不断加深和黏附素在 *H. pylori* 定植过程中的决定性作用,从黏附素出发寻找保护性抗原,从而在感染的初期就能通过阻断黏附防止感染而最终将 *H. pylori* 清除。黏附素能够成为 *H. pylori* 疫苗候选抗原具备以下几个优点:位于细菌表面而免疫反应活性高;具有较高的保守性;蛋白质成分能够通过基因工程大规模生产和纯化。Sebastian[8]等人从 *H. pylori* 的全基因组中挑选出 5 个可能编码膜蛋白的 ORF,分别在 E.coli BL21 中表达出带组氨酸标签的这 5 种蛋白,并发现 hp1188 基因编码的蛋白 Hp1188 具有黏膜结合特性,其包被的镍珠能够与人胃腺癌黏膜上皮细胞结合,结合能力与血型抗原结合黏附素相当,且 Hp1188 蛋白在 *H. pylori* 菌外表面表达量很高。hp1188 基因全长 810 bp,其氨基酸序列高度保守,为 *H. pylori* 所特有,所编码蛋白分子量约 30 600 Dalton。因此,研究 Hp1188 的功能以及作为抗 *H. pylori* 感染的保护性抗原都具有重要意义。

本文选择 *H. pylori* 的 hp1188 基因,将全长 hp1188 基因克隆入原核表达质粒 pQE30,成功构建了 pQE30-hp1188 重组载体,表达的蛋白具有良好的免疫活性,为进一步分析表达产物的特性、*H. pylori* 黏附的分子机制和免疫保护作用、制备防治 *H. pylori* 定植的疫苗等奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Penta R, De Falco M, Iaquinto G, et al. Helicobacter pylori and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3): 337-345.

[2] Fireman Z, Trost L, Kopelman Y. Helicobacter pylori: seroprevalence and colorectal cancer [J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2(1): 6-9.

[3] 吴利先,杨致邦,林姗姗,等. 幽门螺杆菌临床株粘附素 HpaA 基因的克隆表达及在诊断中的价值[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(4):275-278.

[4] Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of helicobacter pylori to human gastric tissue[J]. Int J Med Microbiol, 2002, 292(3-4): 247-256.

[5] Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, et al. Infection by helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype[J]. J Pathol, 2008, 215(3): 308-316.

[6] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, et al. Helicobacter pylori infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation[J]. Gastroenterology, 2002, 123(6): 1992-2004.

[7] Hennig E E, Mernaugh R, Edl J, et al. Heterogeneity among helicobacter pylori strains in expression of the outer membrane protein BabA[J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3429-3435.

[8] Rubinsztein-Dunlop S, Guy B, Lissolo L, et al. Identification of two new helicobacter pylori surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 5): 427-434.

[9] 颜子颖,王海林,译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998:22-435.

[10] 李 晶,张建中. 幽门螺杆菌黏附素及受体研究与疫苗发展[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(6):580-582.

[11] Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, et al. Helicobacter pylori vaccine development: facing the challenge[J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295(5): 343-353.

[12] Odenbreit S. Adherence properties of Helicobacter pylori: impact on pathogenesis and adaptation to the host[J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295(5): 317-324.

[13] Sugiyama T, Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer [J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(3): 149-157.

(责任编辑:关蕴良)