基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0037-04

幽门螺杆菌 vacA-ctxB 融合基因原核表达载体的构建

张任飞[1],杨致邦[1],周 侠[1],夏丽君[2],李昌庆[3],陈 瀑[4]

(1. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室,重庆 400016;2. 成都市核工业四一六医院检验科,成都 610051;3. 成都市第六人民医院检验科,成都 610051;4. 重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400022)

【摘 要】目的:构建幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, H.pylori)致细胞空泡毒素抗原(Vacuolating cytotoxin antigen A,vacA)毒性片段与霍乱毒素(Cholerae toxin,Ctx)B 亚单位(ctxB)基因的原核表达载体,为进一步表达 VCTB 重组蛋白,制备防治 H.pylori 感染的口服疫苗奠定基础。方法:通过比较国内 H.pylori 代表株的 vacA 基因毒性亚单位,找出高度同源性片段,按基因文库中提供的 vacA 基因和 ctxB 基因序列设计引物。以 H.pylori 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 vacA 毒性片段基因,克隆至质粒 pQE30 中,获得重组质粒 pQE30-vacA。以 pET32(α)+-ctxB 质粒为模板 PCR 扩增 ctxB 目的基因。再将纯化的 ctxB 基因片段插入 pQE30-vacA 中,构建含双基因的表达质粒 pQE-vctB,构建的表达质粒 pQE-vctB 转化大肠杆菌 Top10,培养后,提取纯化重组质粒 pQE-vctB,内切酶双酶切鉴定。结果:扩增的 vacA DNA 片段约为 723 bp,ctxB 基因的 DNA 片段约为 372 bp,与预计长度相符合。构建的表达质粒 pQE-vctB 酶切鉴定,与插入 pQE30 的目的基因片段相符。测序结果 vctB 融合基因由 1 092 bp 组成,编码 364 个氨基酸残基的多肽,与基因文库相符。结论:含 vacA 和 ctxB 融合基因的原核表达载体构建成功,为进一步表达 VCTB 重组蛋白奠定了基础。

【关键词】幽门螺杆菌;细胞空泡毒素;霍乱毒素 B 亚单位;载体

【中国图书分类法分类号】R378.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Construction of vacA-ctxB prokaryotic expression vectors to Helicobacter pylori

ZHANG Ren-fei, et al

(*Department of Pathobiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To lay a foundation of expressing VCTB fusion protein and preparation the oral vaccine for prophylaxis and therapy of H.pylori infection, the prokaryotic expression vectors contained the fusion gene vacA toxic subunit of H.pylori and cholera toxin subunit B(ctxB) was constructed. *Methods*: The high homogeneity gene fragment was found in comparing VacA toxic subunit gene of domestic typical H.pylori strains. The primers were designed according to vacA and ctxB sequences in the gene bank. VacA toxic subunit gene was amplified by PCR as the template of DNA genome of H.pylori and cloned into plasmid pQE30, which was plasmid pQE30-vacA. The ctxB gene was amplified by PCR as the template of pET32(α)+-ctxB plasmid. The purified ctxB gene was inserted into pQE30-vacA to construct expressing plasmid pQE-vctB of containing vacA and ctxB genes. pQE-vctB was transformed into prokaryotic *E.coli* Top10. The recombinant plasmid of bacteria cultivated was extracted and purified, and cutted with the incision enzyme to evaluated. ***Results***: The sequence of vacA gene amplified was about 723 bp and the sequence of ctxB gene was about 372 bp. They were consistented with the anticipated length of the DNA. The expressing plasmid pQE-vctB was conformitied with objective gene inserted into pQE30. vctB fusion gene sequenced as 1 092 bp by the sequencing was conformitied with the genebank, and encodes polypeptides of 364 amino acid residues. *Conclusion*: The prokaryotic expression vectors contained vacA and ctxB fusion gene was constructed successfully and lay a foundation of expression VCTB fusion protein.

【Key words】 H.pylori; Vacuolating cytotoxin antigen A; Cholera toxin subunit B; Vector

自 1983 年澳大利亚学者 Marshall 和 Warren 首次分离出 H.pylori 以来,大量资料表明 H.pylori 是引起胃炎、胃溃疡等胃疾病的主要生物因素,与胃腺癌和胃淋巴瘤的发生密切相关[1,2],并被定为人类"Ⅰ"类致癌原[3]。近期的研究还发现 H.pylori 与心脑血管疾病(如冠心病),自身免疫性疾病,皮肤病及缺铁性贫血、肝性脑病等也有高度的相关性[4-7]。H.pylori

作者介绍:张任飞(1978-),女,硕士,
研究方向:幽门螺杆菌口服疫苗。

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

感染呈世界性流行,人群对 H.pylori 具有普遍易感性[8]。预防和治疗 H.pylori 感染一直是医学微生物学和消化疾病领域的研究热点之一。依据 H.pylori 致病机制研发有效的抗 H.pylori 感染口服疫苗具有应用前景。在 H.pylori 的多种致病因素中,VacA 是引起胃疾病及胃外损伤的主要毒力因子[9-11],与胃癌的发生有密切关系[12],针对 VacA 的防治措施具有重要价值。

目前国外多采用 H.pylori 的全菌抗原或有效抗原成分与免疫佐剂 Ctx 混合后口服免疫,取得了较好的防治效果。霍乱毒素 B 亚单位(CtxB)为非毒性的膜受体结合亚单位,可以和细胞膜上的神经节苷脂受体结合,介导霍乱毒素 A 亚单位(CtxA)进入细胞发挥其毒性作用。单独的 CtxB 具有较强的免疫活性,当其经化学方法或基因融合技术与不相关抗原形成偶联蛋白或融合蛋白时,CtxB 的佐剂活性大大高于单独 CtxB 的佐剂活性。本研究旨在构建 H.pylori 细胞空泡毒素(VacA)毒性亚单位与霍乱毒素 B 亚单位 (CtxB) 融合基因 vacA-ctxB 的原核表达载体,为进一步表达 VCTB 重组蛋白质,制备防治 H.pylori 感染的口服疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

H.pylori 菌株为本室从临床病人胃黏膜标本分离,经标准方法鉴定后保存。pET32(α)⁺-ctxB 质粒为本室构建保存。pQE30 质粒源于重庆医科大学病毒性肝炎研究所,本室保存。

1.2 工具酶与试剂

Kpn Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*BamH* Ⅰ限制性内切酶,Taq 酶、T4 DNA 连接酶、dNTP、DNA Marker 购自 Takara 公司。异丙基硫代 P-D- 半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 产品;蛋白质 marker 为 MBI 公司售品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒为北京百泰克生物公司产品;质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品;胰蛋白胨、酵母抽提物均为 OXOID 公司产品。7%绵羊血平板为本室制备。

1.3 重组质粒 pQE30-vacA-ctxB 构建的技术路线见图 1。

1.4 重组质粒 pQE30-vacA 的构建

将 H.pylori 菌株接种于 7%绵羊血平板上,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,洗下菌液,按细菌基因组 DNA 小量制备法提取 DNA。通过 BLAST 比较国内 H.pylori 代表株的 vacA 基因毒性亚单位,找出高度同源性片段,以基因文库中提供的 vacA 基因序列为依据,用引物设计软件 primer5.0 设计引物。在 vacA 基因上游引物引入 *Kpn* Ⅰ酶切位点,即 P1:5'-GCCGGTACCCATTATTGGGTCAAAGGC-3';下游引物引入 *Sal* Ⅰ酶切位点与终止子,P2:5'-GCCGTCGACCTAGTTACTATCTTGTTTGTCGT-3'。引物由 invitrogen 公司合成。

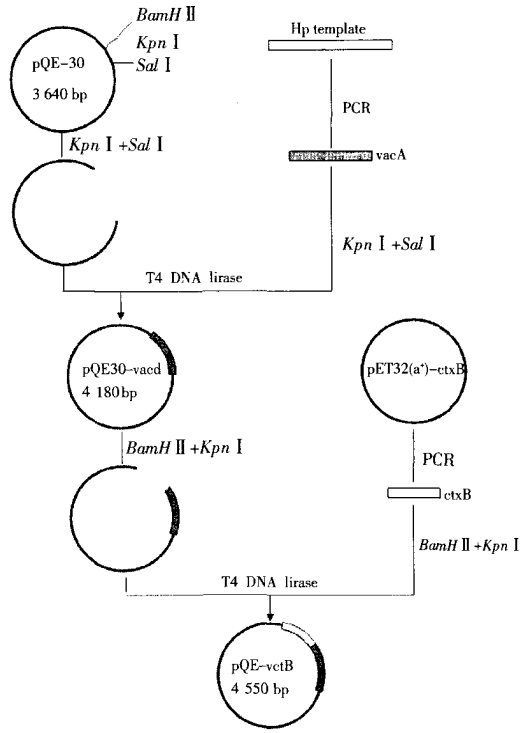


图 1 重组质粒 pQE30-vacA-ctxB 构建的技术路线

以提取的 H.pylori DNA 为模板,PCR 扩增 vacA 毒性片段基因,条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,57℃退火 50 s,72℃延伸 90 s,共 35 个循环,最后 1 个循环结束后 72℃延伸 10 min。反应结束后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收 PCR 产物纯化,将纯化的 PCR 产物和质粒 pQE30 用 *Kpn* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ内切酶分别进行单酶切,所得产物琼脂糖凝胶电泳并回收纯化。纯化后的 vacA 片段用 T4 DNA 连接酶定向插入同样双酶切的质粒 pQE30,获得重组质粒,命名为 pQE30-vacA。转化 E.coli Top10,抽提质粒,分别用 *Kpn* Ⅰ单酶切和 *Kpn* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ双酶切重组质粒 pQE30-vacA,同时用质粒 pQE-30 做对照,琼脂糖凝胶电泳鉴定。将酶切鉴定后的重组质粒送重庆医科大学病毒性肝炎研究所进行 DNA 双测序。以 pQE30-vacA 质粒、pQE30 质粒为模板,扩增 vacA 基因,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 目的基因 ctxB 片段的 PCR 扩增

以基因文库中提供的 ctxB 基因序列为依据,用引物设计软件 primer 5.0 设计引物。在 ctxB 基因上游引物引入 *BamH* Ⅰ酶切位点,即 P3:5'-CCC GGATCCATGATTAAATTAAAA-TTT GGT-3';下游引物引入 *Kpn* Ⅰ的酶切位点,并去掉终止密码,即 P4:5'-CCCGGTACCATTTGCCATACTAATTGCG-3'。引物由上海生物工程公司合成。以 pET32(α)⁺-ctxB 质粒为模板 PCR 扩增 ctxB 目的基因,以 pET32(α)⁺ 质粒为模板作对照。条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 1 个循环结束后 72℃延

伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确定扩增片段的位置正确与否，并回收目的片段，*BamH* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ酶双酶切后纯化，获得 ctxB 基因片段。

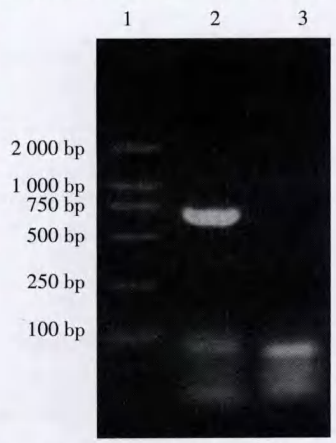
1.6 重组质粒 pQE30-vacA-ctxB 构建

用 *Kpn* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ内切酶双酶切构建的重组质粒 pQE30-vacA，再将纯化后的 ctxB 片段以上述方法插入 pQE30-vacA 获得含融合基因的重组质粒 pQE30-vacA-ctxB，命名为 pQE-vctB。将此质粒以氯化钙法转化至大肠杆菌 Top10，经扩增培养，小剂量抽提纯化重组质粒 pQE-vctB，用 *BamH* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ3 种内切酶分别两两组合做双酶切，琼脂糖凝胶电泳鉴定，测序。

2 结 果

2.1 目的基因 vacA 片段 PCR 扩增结果

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见在 720 bp 左右有 1 条带，大小与预想一致，结果见图 2。



1. DNA marker; 2. PCR 产物; 3. 对照

图 2 V 基因的 PCR 扩增

2.2 重组质粒 pQE30-vacA 鉴定结果

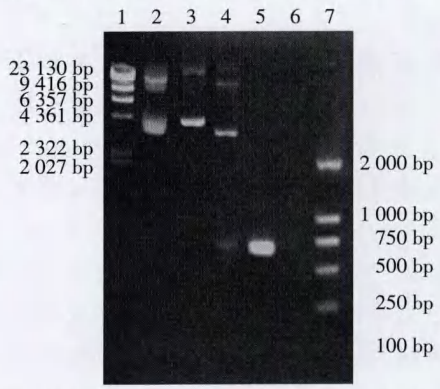
pQE30-vacA 质粒经 *Kpn* Ⅰ单酶切后可见 4 180 bp 条带，经 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后可见 720 bp 和 3 460 kb 两条带，扩增 vacA 基因片段，可得到 720 bp 条带。酶切与 PCR 结果均与预期一致，见图 3。序列分析表明，所得序列完整，与文献中国菌株相比有高度的同源性，而与标准株 AF361700 比较有 1.5% bp 发生变异，以及一个氨基酸发生变异。

2.3 目的基因 ctxB 片段 PCR 扩增结果

PCR 产物经 1%琼脂糖电泳分析可见在 372bp 左右有 1 条带，大小与预想一致，结果见图 4。

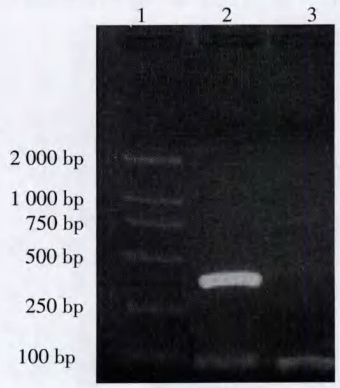
2.4 重组质粒 pQE-vctB 双酶切、PCR 鉴定结果

pQE-vctB 质粒经 *Kpn* Ⅰ单酶切后，琼脂糖电泳可见 4 550 bp 条带，经 *BamH* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后可见 1 090 bp 和 3 460 bp 两条带，经 *BamH* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切后可见 4 180 bp 和 372 bp 两条带。经 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后可见 3 832 bp 和 720 bp 两条带。分别以 pQE-vctB 质粒、pQE30 质粒为模板进行 PCR 扩增后，经琼脂糖电泳可见以 pQE30-vacA 质粒为模板可以扩增出 372 bp 条带，而以 pQE30 质粒为模板却无此条带。结果见图 5。



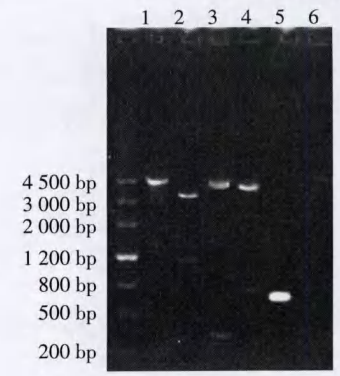
1、7. DNA marker; 2. pQE30-vacA; 3. pQE30-vacA/*Kpn* Ⅰ; 4. pQE30-vacA/*Kpn* Ⅰ+*Sal* Ⅰ; 5. pQE30-vacA 的 PCR 产物; 6. 对照

图 3 重组质粒 pQE30-vacA 双酶切、PCR 鉴定



1. DNA marker; 2. PCR 产物; 3. 对照

图 4 ctxB 的 PCR 扩增



1. pQE-vctB/*Kpn* Ⅰ; 2. pQE-vctB/*Sal* Ⅰ+*BamH* Ⅰ; 3. pQE-vctB/*BamH* Ⅰ+*Kpn* Ⅰ 4. pQE-vctB/*Sal* Ⅰ+*Kpn* Ⅰ; 5. pQE-vctB 的 PCR 产物; 6. 对照

图 5 重组质粒 PQE-vctB 双酶切鉴定

2.5 重组质粒 pQE-vctB 的序列分析结果

测序结果 vctB 融合基因由 1 092 bp 组成,编码 364 个氨基酸残基的多肽,与基因文库相符。

3 讨 论

H. pylori 在胃内集中定植于胃窦部, 生长于胃粘膜上皮表面与粘液层之间,是组织细胞外的寄生菌。机体对 H.pylori 的免疫保护作用主要依靠粘膜免疫系统产生的 SIgA,口服接种对感染具有较好的保护作用[13]。粘膜免疫系统的激活需要佐剂的参与,在免疫佐剂的选择上, 国内外多采用 Ctx 和大肠杆菌耐热肠毒素(Heat-labile enterotoxin of Escherichia coli, LT)混合,口服后均取得了较好的免疫防治效果。但由于 Ctx 和 LT 本身具有的毒副作用限制了作为免疫佐剂的应用。而霍乱毒素 B 亚单位(CtxB)为非毒性的膜受体结合亚单位,能与胃肠粘膜的膜受体结合。许多研究发现,单独的 CtxB 就具有较强的免疫活性,可以强化多糖、小分子肽等半抗原,也可作为可溶性抗原或弱抗原的佐剂,增强其免疫原性[14-15]。但 CtxB 简单地与抗原混合进行免疫时,产生的抗体效价远不如与抗原交联后进行免疫所产生的抗体效价高[16]。当其经化学方法或基因融合技术与不相关抗原形成偶联蛋白或融合蛋白时,CtxB 的佐剂活性大大高于单独 CtxB 的佐剂活性。

本研究将 H. pylori 细胞空泡毒素的保守基因片段[17]与 ctxB 基因片段相融合,根据基因文库中提供的 ctxB 基因和 vacA 基因序列设计引物, 构建 pQE-vctB 融合基因的重组质粒。经转化大肠杆菌 Top10,内切酶双酶切鉴定,可得到 720 bp vacA 基因片段和 372 bp ctxB 基因片段, 与插入 pQE30 的目的基因片段相符。此结果表明本试验已成功构建了 pQE-vctB 原核表达载体,为进一步表达 VCTB 重组蛋白,研制防治 H.pylori 感染的口服疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 胡伏莲,周殿元. 幽门螺杆菌的基础与临床[M].中国科学技术出版社.2002.443-446.

[2] Yang Y,Deng CS,Yao XJ,et al. Effect of Helicobacter pylor Ⅰ on morphology and growth of gastric epithelial cells[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi,2000,8(5):500-504.

[3] International agency for reseach on cancer. Schistosomes,liver flukes and Helicobacter pylori. iARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [R]. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum,1994.

[4] Montenero AS,Mollichelli N,Zumbo F,et al. Helicobacter pylori and atrial fibrillation:a possible pathogenic link[J]. Heart,2005,91(7):960-961.

[5] Ito S,Miyaji H,Azuma T,et al. Hyperammonaemia and helicobacter pylori[J]. Lancet,1995,346(8967): 124-125.

[6] 焦建中,赵春林,陈官培. 慢性肝病中幽门螺杆菌感染的临床研究[J]. 中国综合临床,2003,19(1):47-48.

[7] Yamanishi S,Iizumi T,Watanad E,et al. Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 ceNs by helicobacterpylofi urease[J]. Infect Immun,2006,74(1): 248-256.

[8] Guisset M,Coton T,Rey P,et al. Helicobacter pylori infection in developing countries[J]. Med Trop(Mars),1997,57(1): 77-82.

[9] Molinari M,Galli C,Norais N,et al. Vacuoles induced by Helicobacter pylori toxin contain both late endosomal and lysosomal markers[J]. J Biol Chem,1997,272(40): 25339-25344.

[10] Tombola F,Carlesso C,Szabo I,et al. Helicobacter pylori vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipidbilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation[J]. Biophys J,1999,76(3): 1401-1409.

[11] Pai R,Sasaki E,Tarnawski AS. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers[J]. Cell Biol Int,2000,24(5): 291-301.

[12] Joannel Rhead,Darrenp Letley,Marjan Mohammadi,et al. A New Helicobacter pylori Vacuolating Cytotoxin Determinant,the Intermediate Region,Is Associated With Gastric Cancer[J]. Gastroenterology,2007,133(3): 926-936.

[13] Lee C K,Weltzin R,Thomas W D,et al.Oral urease induces decretory IgA antibody and protects mice from challenge with Helicobacter felis [J]. J Infectious Diseases,1995,172(1): 161-172.

[14] Czerkinsky C,Russekk MW,Lycke,et al. Oral adminostration of a streptococal antigen coupled to cholera toxin B subunit evikes strong antibody in salivary glands and extramucosal tisses[J]. Infect Immun,1989,57(4): 1072-1077.

[15] Tamura S,Samegai Y,Kurata H,et al. Protection against Influenza virus infection by vaccine inocu lated intranasally with cholera toxin B subunit[J]. Vaccine,1988,6(5): 409-413.

[16] Mckenzie SJ,Halsey JF. Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response[J]. J Immun,1984,133(4): 1818-1824.

[17] 刘 淼,杨致邦,林珊珊,等.幽门螺杆菌空泡毒素基因毒性片段的克隆与表达[J]. 重庆医科大学学报,2003,28(6):720-723.

(责任编辑:关蕴良)