维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0692－05

人幽门螺杆菌 VacA 与 HspA 双价疫苗载体的构建

汪志群[1], 黄爱龙[2], 蒲　丹[3], 陶小红[3], 王丕龙[3]

(1. 重庆医科大学应用技术学院,重庆　400050;2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆　400010;
3. 重庆医科大学临床学院消化科,重庆　400016)

【摘　要】目的:构建含人幽门螺杆菌(Hp)热休克蛋白 A(HsPA)和空泡毒素(VacA)编码基因的重组载体,进行核甘酸序列分析,为在 E. coliBL21 中表达,及其抗原性的研究奠定基础。方法:利用分子克隆技术,扩增 HpHspA、VacA 编码基因,分别将其与载体 pET32a(＋)进行酶切、连接,同时将筛选的 pET32a(＋)/HspA 和 pET32a(＋)/VacA 重组载体分别经 XhoⅠ、*BamH*Ⅰ双酶切,通过凝胶电泳回收 pET32a(＋)/HspA 和 VacA 片段,经 T4 连接酶将 pET32a(＋)/HspA 和 VacA 编码基因连接,而后转化并筛选含有两种目的基因的重组载体。结果:经酶切、测序分析表明,插入的基因片段为 HpHspA 和 VacA 编码基因,由 1080bp 组成,与 GenBank 报道的相比较,有 3.4%的碱基发生变异,1.10%的氨基酸残基改变;但编码的蛋白质特性无本质性改变。结论:成功地克隆了 HpHspA 和 VacA 编码基因,并构建了能够同时表达 HapA 和 VacA 蛋白的双价疫苗重组载体,为 Hp 蛋白质疫苗和核酸疫苗的研制奠定了良好的基础。

【关键词】幽门螺杆菌;热休克蛋白 A;VacA;原核表达载体

【中国图书分类法分类号】R378.2⁺;R392.11　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－11－18

Cloning and onstruction of recombinant vector of bivalent vaccine candidate of human Helicobacter pylori

JIANG Zheng, et al

(*Department of Physiology, College of Applied Technology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct a recombinant vector containing gene encoding heat shock protein A (HspA) and VacA with Mr 13 000 and 26 000 simultaneously from human Helicobacter pylori(Hp)for study on expression in E. coli BL21, and analysis of their antigenicity. *Methods*: The target genes encoding HspA and VacaA were amplified from Hp chromosome by PCR, digested by restricted endonuclease enzyme respectively, and inserted into the corresponding enzyme digested prokaryotic expression vector pET32a(＋). The recombinant vectors pET32a(＋)/HspA and pET32a(＋)/VacA were used to select and transform for sequence analysis. After recombinant vectors digested by restricted enzyme of Xhol, BamH Ⅰ simultaneously, the pET32a(＋)/HspA and VacA were taken out of agarose electrophoresis, and connected by T4 ligase again. The recombinant vector pET32a(＋)/HspA－VacA was used to select and identified by PCR and restricted endonuclease enzyme. *Results*: Enzyme digestion analysis and sequencing showed that the target genes were found in 1080 base pairs, and had been inserted into recombinant vector, but as compared with gene reported by GenBank, 3.40% of the gene mutation and 1.11% of amino acid residues change in Hp happened respectively. *Conclusion*: The genes coding HspA and VacA with Mr 13 000 and 26 000 respectively are cloned successfully. The results obtained lay the foundation for research on development of Hp protein and DNA vaccine applying to prevention of Hp infection.

【Key words】 Helicobacter pylori; Heat shock protein A; VacA; Prokaryotic expression vector

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori; Hp)是人类最常见的致病菌,我国普通人群的感染率为 50%～80%,并仍以每年 1%～2%的速度增加[1],Hp 感染不但与 B 型胃炎和消化性溃疡的发生有密切关系[2～7],而且与非溃疡性消化不良,MALT 淋巴瘤和胃癌的发生也有重要关系[8～15],故已被世界卫生组织国际癌症研究机构列入第一类致癌原[16]。近年来,由于广泛、大剂量抗生素应用,导致了耐药菌株的产生;同时出现了一些药物副作用;患者耐受性、依从性以及承受力都受到了挑战。鉴于此,不少研究工作者

作者介绍:汪志群(1965－　),女,讲教,
主要研究方向:胃肠激素。

维普资讯 http://www.cqvip.com

正致力于开发研究 Hp 治疗以及预防方案：Hp 疫苗的开发。而 HspA 和 VacA 为所有的 Hp 共同的抗原成分，为了克服单种抗原免疫原性弱的缺点以获得较好的免疫效果，有学者建议多种抗原成分联合起来制作疫苗抗原。因此，本实验利用基因克隆技术，将 HSpA 和 VacA 编码基因，进行 PCR 扩增，构建双价抗原的重组载体，在为 E. coli 中进行表达以及 Hp 疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

Hp 由本校微生物学教研室提供；Top10、BL21(DE3)菌株、pET32a(+)载体，为本校病毒性肝炎研究所构建、制备并保存；T_4DNA 连接酶和限制性内切酶(kpn Ⅰ，*BamH* Ⅰ，Sal Ⅰ和 Xhol)购自 Promega 公司；TaqDNA 聚合酶为 Takara 产品；d NTP 为上海生工生物工程公司产品；PE－2400 型 PCR 为美国 PE 公司产品。

1.2 HspA、VacA 编码基因的扩增

参照文献[17]，提取 Hp 基因组 DNA；根据 GenBank 的报道，经微机分析分别设计 HspA、VacA 编码基因的引物 P1、P2 和 P3、P4。P1 的序列为 5′－CCGGTACC－ATGAAGTTTCAACCATTAGG－3′，P2 为 5′－CCGGATCC－GTGTTTTTTGTGATCATGAC－3′；P3 为 5′－CCGGATCCATG－CATTATTGGGTCAAAGG－3′，P4 为 5′－GGGTCGACCTA－GTTACTATCTTGTTTGTCG－3′；P1 引物中引入 kpnI 酶切位 am，P2 引物中引入 *BamH* Ⅰ酶切位点，取缔了 HspA 5′的终止密码子(TAA)，P3 引物中引入 *BamH* Ⅰ酶切位点，P4 引物中引入 Sal Ⅰ酶切位点。在 HspA 扩增的 50μl 反应体系中，分别加入 1μl dNTP，2μl DNA(作为模板)及浓度各为 18μ mol/L 的 P1 和 P2 引物各 1μl，以及 1μl Taq DNA 聚合酶，按照以下条件即 94℃ 变性 5min，然后 94℃ 变性 1min，52℃ 退火 50s，72℃ 延伸 50s，共 35 个循环，最后 1 个循环结束后再 72℃ 延伸 7min 进行 PCR 扩增；而 VacA 扩增条件为 94℃ 变性 5min，然后 94℃ 变性 1min，54℃ 退火 50s，72℃ 延伸 55s，共 35 个循环，最后 1 个循环结束后再 72℃ 延伸 7min，所获 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，同时进行凝胶回收。

1.3 重组载体的构建

①pET32a(+)/HspA、pET32a(+)/VacA 载体的构建 将纯化的 HspA PCR 产物和 pET32a(+)，分别以 kpn Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切，而 VacA PCR 产物和 pET32a(+)，分别以 Sal Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切，并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化；分别将酶切纯化的目的基因与各自相应酶切的 pET32a(+)按 4:1(摩尔数)比例，在 4℃ 条件下连接过夜；同时根据文献[17]，制备 Top10 感受态细菌，将上述连接产物 10μL 转化感受态细菌，通过氨苄青霉素筛选重组载体，进行酶切鉴定和基因测序分析。②pET32a(+)/HspA－VacA 载体的构建 中量提取重组质粒 pET32a(+)/HspA 和 pET32a(+)/VacA，同时将两者进行 Xhol，*BamH* Ⅰ酶切，通过凝胶电泳分别回收 pET32a(+)/Hspa，VacA DNA 片段，将纯化的 pET32a(+)/HspA 和 VacA DNA 片段，按照上述方法进行连接、转化、筛选 pET32a(+)/HspA－VacA 重组载体，同时进行酶切鉴定，其构建示意图如下(图 1)。

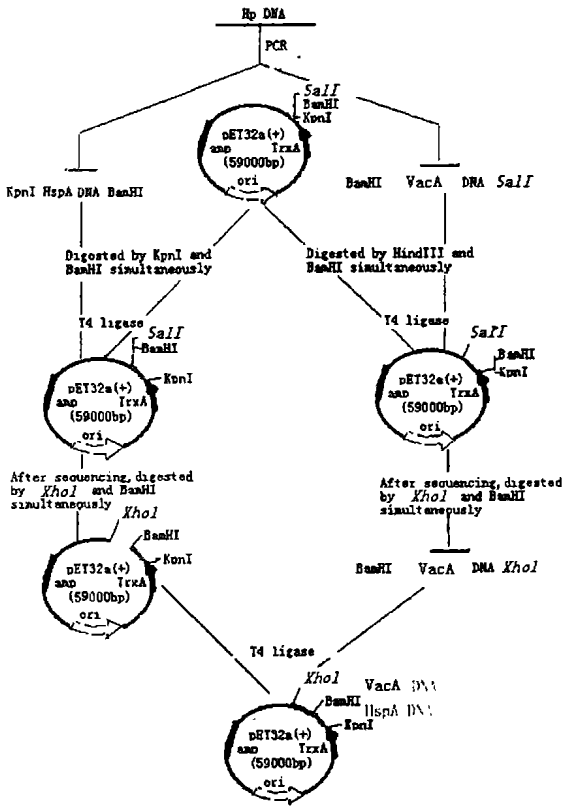


图 1 重组质粒 pET32a(+)/HspA－VacA 的构建示意图

2 结 果

2.1 HspA 和 VacA 编码基因的扩增

以 Hp 基因组 DNA 为模板分别进行 HspA 和 VacA 编码基因的 PCR 扩增。所获 PCR·产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明，PCR 扩增产物分别位于 250bp～500bp 以及 500bp～750bp 之间。序列分析证实，PCR 扩增产物，即为所需要的目的基因片段，其大小约为 357bp 和 720bp。

2.2 重组载体鉴定

①pET32a(+)/HspA 的 PCR 鉴定 分别以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板，按照上述 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增，反应体系 25μl，共 35 个循环。所获 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示：以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为

维普资讯 http://www.cqvip.com

模板均能扩增出 1 条约为 357bp 的带(图 2)。②pET32a(+)/VacA 的酶切鉴定　将 pET32a(+)/VacA 分别进行 Sal Ⅰ、*BamH* Ⅰ单、双酶切,双酶切能够切出 720bp DNA 片段(图 3)③pET32a(+)/HspA－VacA 的酶切鉴定　将 pET32a(+)/HspA－VacA 分别进行 kpn Ⅰ,Xho Ⅰ,BamH Ⅰ单、双酶切,能够切出 720bp、1080bpDNA 片段(图 4),与实验设计相一致,说明重组载体构建成功。

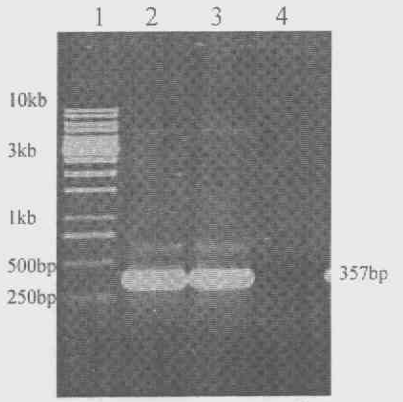


图 2　重组载体的 PCR 鉴定

1:DNA marker; 2: PCR product with the template of pET32a (+)/Hspa; 3: PCR product with the template of Top10/pET32a(+)/HspA; 4: Negative control

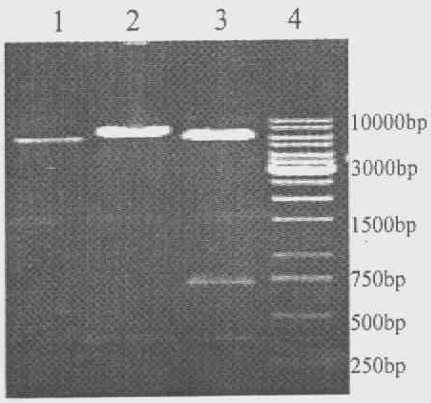


图 3　重组载体 pET32a(+)/VacA 的酶切鉴定

1:pET32a(+)digested by *BamH*1; 2:pET32a(+)/VacA digested by *BamH*1; 3:pET32a(+)/VacA digested by *BamH*1 and Xhol silmultaneouly; 4:DNA marker

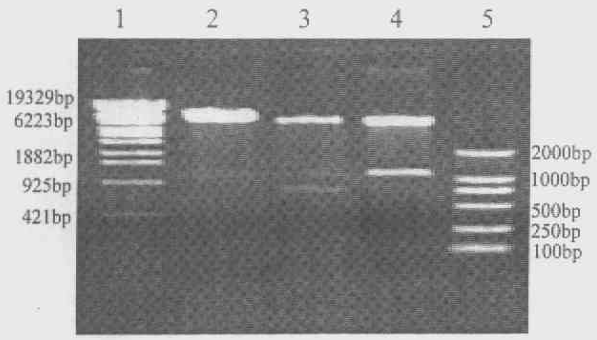


图 4　重组载体 pET32a(+)/HspA－VacA 的酶切鉴定

1:DNA Marker(λ－EcoT14I digest); 2:pET32a(+)/HspA－VacA digested by *BamH* Ⅰ; 3:pET32a(+)/HspA－VacA digested by *BamH* Ⅰ and Xhol silmultaneouly; 4:pET32a(+)/HspA－VacA digested by kpnI and Xhol silmultaneouly; 5: DNA marker.

2.3　HspA－VacA 基因片段的序列分析

将重组载体以 T7 为引物进行序列分析(上海基康生物有限公司),并采用电脑 DNA 分析辅助软件,对所测定的 DNA 序列进行同源性分析。结果发现,插入的基因片段为编码 HspA 和 VacA 基因的片段,两者以 BamH Ⅰ酶切位点相连,其中 HspA 有 5 个 bp 发生变异,另有 2 处编码的氨基酸残基发生变化,一处由 G→D,一处由 A→S; VacA 编码基因有 31 个 bp 发生变异,另有 2 处编码的氨基酸残基发生变化,但 HspA－VacA 的特性无明显改变,其同源性高达 98%。

3　讨　论

热休克蛋白是当生物细胞在某些环境因素、或多种应激条件下,诱导合成或合成增加的一类进化上高度保守的应激蛋白质。Hp 热休克蛋白编码基因属于双顺反子操纵子包括 HspA 和 HspB 基因,分别编码 118 和 545 个氨基酸残基,相应的相对分子质量为 13.0×10^3 和 58.2×10^3,HspA 包括两个区域:N 区与 GroES 家族同原高度保守,是免疫显性区,C 区有 27 个氨基酸残基,其中 8 个组氨酸残基,4 个半胱氨酸残基,上述结构为金属镍离子结合区,对镍离子的转运、呈递起着重要的作用,它可以增强尿素酶的活性,同时又是一种有效的抗原成分。Hp 合成的热休克蛋白 HspA、B,Hsp60,Hsp70 等,在细菌的致病机制中起着重要的角色,它可介导免疫调节,触发胃上皮细胞的自身免疫反应,在胃粘膜慢性病变的发展和持续中充当启动因子;介导病原与宿主的识别与粘附。有研究认为,热休克蛋白 HspA、B 是 Hp 定植的又一类重要因子,在极端不利的理化条件下,能维持 Hp 活性蛋白的稳定,显著增强 Hp 尿素酶的活性,同时还发现,Hsp60 和 HopZ(HP outer membrane protein Z)与 Hp 的粘附有关。动物实验证明,以热休克蛋白喂养小鼠可引起冠状动脉粥样硬化[18],但用其免疫动物能够使动物获得对 Hp 的免疫力。Todoroki et al[19]采用 pcDNA3.1－hspA 接种的 C57BL 小鼠产生了 IgG2a,而 pcDNA3.1－hspB 则产生 IgG1/IgG2a,它们都显著地减

维普资讯 http://www.cqvip.com

少 Hp 在胃内的定植，同时减轻因 Hp 存在的炎症反应。因而，作者认为，以热休克蛋白为基础的(核酸 DNA，或蛋白质)疫苗不失为一种有效的 Hp 疫苗。

而 VacA 基因存在于所有 Hp 菌株的基因组中，目前发现 VacA 有多种不同的组合体。在体外，只有 50%～60% Hp 产生具有活性的 VacA。研究认为，VacA 毒素能粘附靶细胞，并被靶细胞内化，在细胞内表达而产生空泡作用；也有可能是通过作用于细胞膜上的 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶，影响离子间转运而引起细胞的空泡样变性。有文献报道，VacA 毒素能够抑制表皮生长因子(EGF)与其受体的结合，从而引起酪氨酸磷酸化，扰乱了上皮细胞的信号传导，使上皮损害；研究还表明，去毒的空泡毒素(VacA)免疫小鼠，能够使小鼠免受产 VacA 毒素的 Hp 感染。从而认为以 VacA 和 CagA 为基础的抗原疫苗对小鼠慢性 Hp 感染具有确切的治疗和预防作用，这为该疫苗应用于人类的临床研究奠定了基础。

鉴于此，为了增强 Hp 抗原免疫原性，以获得较好的免疫效果。有学者建议以两种抗原成分制作疫苗抗原，可以增强其相互的抗原性。我们特地比较中国的流行株 AF050320，AF050319，AF050326，AF050327，AF050328，其中四株为 S1M2 型，S1M2 型为中国的主要的流行株，根据基因库 BLAST 的比较而知这五株 Hp 在 S 区后的 P37 区的基因序列基本一致，P37 区为 VacA 的毒性片段，以 AF050320 标准株的 P37 区的片段为模板进行引物设计。将 HpHspA 与 VacA 编码基因进行克隆，以粘端将其连接构建双价候选疫苗重组载体并进行表达，其结果为：克隆 HspA 编码基因有 1.6%(6/357)的碱基发生变异，约 1.6%(2/119)的氨基酸残基发生改变，而 VacA 编码基因有 4.3%(31/720)的碱基发生变异，约 0.083%(2/240)的氨基酸残基发生改变，据文献[17]报道，可能的原因有：(1)所采用的 Hp 菌种不同；(2)Hp 具有转化能力，能够通过已死亡的 Hp DNA 转化而致基因组发生重排导致基因变异。(3)由 Hp 菌株间的变异引起。不同的患者感染的 Hp 具有其特殊的限制性片段长度多态性(RFLP)谱型，尤其是不同地区差别更加明显，通常有好几个片段的差异，但其高度的同源性又决定了不同菌株间编码蛋白的主要抗原决定簇的一致性，从而保证了重组载体的表达。(4)PCR 扩增所致的错配现象，为此，我们采用了高保真的 DNA 聚合酶，同时采用了原核表达载体 pET32a(+)，为融合表达的外源蛋白的稳定性做好了充分的准备，而且由于 Mr 增大，用 SDS-PAGE 更容易分析鉴定。我们成功地构建了能够同时表达 HspA 和 vacA 编码的氨基酸残基的重组载体，拟在 BL21 中表达，并通过 western blot 方法检测融合蛋白表达产物的抗原性，为以后制备安全、高效的疫苗，以及制备 ELISA 快速诊断试剂盒奠定了基础。

参 考 文 献

[1] li MF, li Z, Ma AY, el al. Cloning, expression and immunogenic of Hp UreB gene[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7:596-600.

[2] Vandenplas Y. Helicobacter pylori infection[J]. World J Gastroenterol, 2000;6:20-31.

[3] Xia Harry HX, Fan XG, Talley Nicholas J. Clarithromycin resistance in Helicobacter pylori and its clinical relevance[J]. World J Gastroenterol, 1999;5263-5265.

[4] Peng ZS, Liang ZC, Liu MC, et al. Studies on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in Hp associated gastric ulcer[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7:218-219.

[5] Xiao SD, Liu WZ. Current status in treatment of Hp infection[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7:3-4.

[6] Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, et al. Helicobacter pylori and early duodenal ulcer status post-treatment: a review [J]. Helicobacter, 2001;6:84-92.

[7] Casella G, Buda CA, Maisano R, et al. Complete regression of primary gastric MALT-lymphoma after double eradication Helicobacter pylori therapy: role and importance of endoscopic ultrasonography[J]. Anticancer Res, 2001;21(2B):1499-1502.

[8] Guo CQ, Wang YP, Ma SW, et al. Study on Helicobacter pylori infection and p^{53}, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7:313-315.

[9] Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, et al. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001;16:734-739.

[10] Hu PJ. Hp and gastric cancer: challege in the research [J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;1-2.

[11] Quqn J, Fan XG. Progress in experimental research of Helicobacter pylori infection and gastric cancinoma[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7:1068-1069.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[12] Delchier JC, Lamarque D, Levy M, et al. Helicobacter pylori and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B - cell lymphoma but not in low - grade lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue type[J]. Am J Gastroenterol, 2001; 96: 2324 - 2328.

[13] Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, et al. Complete remission of primary high - grade B - cell gastric lymphoma after cure of Helicobacter pylori infection[J]. J Clin Oncol, 2001; 19: 2041 - 2048.

[14] Zhang XQ, Lin SR. Progress in research on the relationship between Hp and stomach cancer[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2000; 8: 206 - 207.

[15] Hua JS. Effect of Hp: cell proliferation and apoptosis on stomach cancer[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999; 9: 647 - 648.

[16] Gotto T, Nishizono A, Fujioka T, et al. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlated with protection against Helicobacter pylori infection after oral vaccination of mice[J]. Infect Immun, 1999; 67(5): 2531 - 2539.

[17] Jiang Z, Huang AL, Tao XH, et al. A study of recombinant protective H. pylori antigen[J]. World J Gastroenterol, 2002; 8: 308 - 3011.

[18] Metzler B, Mayr M, Bietrich H, et al. Inhibition of arteriosclerosis by T - cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein 65[J]. Arterioscler thromb vasc boil, 1999; 19: 1905 - 1911.

[19] Todoroki I, Joh T, Watanabe K, et al. Suppressive effects of DNA vacines encoding heat shock protein on Helicobacter pylori - induced gastritis in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 277: 159 - 163.

(上接第 691 页)稳定，且逆转录需大量昂贵的 RNA 酶抑制剂和逆转录酶，而用稳定的 cDNA 作模板，操作简便、省时，也易于储存、运输和标准化。本实验采用基因克隆方法构建 BDV P24 基因片段的 cDNA 定量模板，有纯度高、可大量生产及定量准确等优点。用于检测并了解 BDV 在我国的流行情况，开展对 BDV 的深入研究，无疑将具有重要的实用价值。本研究检测神经精神病人和健康人共 108 例，发现 4 例神经精神疾病患者样本呈 BDV 基因片段阳性。表明中国的神经精神疾病患者存在 BDV 感染。而 BDV 感染与神经精神疾病发病是否相关有待深入研究。

(本实验有部分在中山大学达安基因诊断中心完成，感谢程钢博士、胡斌博士、王毅博士、高劲松博士和刘晓东的协助和指导)

参 考 文 献

[1] Lipkin WI, Hornig M, Briese T. Borna disease virus and neuropsychiatric disease - a reappraisal[J]. Trends Microbiol, 2001; 9(7): 295 - 298.

[2] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Methods Appl, 1995; 4(6): 357 - 362.

[3] Cubitt B, Oldstone C, de - la - Torre JC. Sequence and genome organization of Borna disease virus[J]. J Virol, 1994; 68(3): 1382 - 1396.

[4] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996; 6(10): 986 - 994.

[5] Gibson UE, Held CA, Willims PM. A novel method for real time quantitative RT - PCR[J]. Genome Res, 1996; 6(10): 995 - 1001.

[6] Carbone KM. Borna disease virus and human disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2001; 14(3): 513 - 527.

[7] Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription - PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system[J]. J Clin Microbiol, 1996; 34(12): 2933 - 2936.

[8] 曹丽萍，王 斌，郁知非. 多耐药基因 QRT - PCR 检测中内标准 DNA 和 RNA 模板的构建[J]. 实验血液学杂志, 1997; 5(4): 393 - 398.