维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0414－03

人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆及序列分析

姜 政[1], 黄爱龙[2], 蒲 丹[1], 陶小红[1], 王丕龙[1]

(1.重庆医科大学临床学院消化内科,重庆 400016;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:获取含人幽门螺杆菌(Hp)热休克蛋白 A 编码基因并构建其重组载体,进行核苷酸序列分析,为在 E. coli BL21 中表达,疫苗的开发奠定基础。方法:利用分子克隆技术从 Hp DNA 染色体中,扩增热休克蛋白 A 编码基因片段。将目的基因与 pET32a(+)同时经 kpn Ⅰ、*BamH* Ⅰ双酶切、纯化、连接后。转化含有目的基因的重组载体,进行序列分析。结果:经酶切、测序分析表明,插入的基因片段为 Hp 热休克蛋白 A 编码基因,与 GenBank 的报道相比较,有 1.4% 的 bp 发生变异,1.6% 的氨基酸残基改变。其同源性高达 98%。结论:成功地克隆了 Hp 热休克蛋白 A 编码基因,为 Hp 蛋白质疫苗的研制和快速诊断试剂盒的开发奠定了良好的基础。

【关键词】幽门螺杆菌;热休克蛋白 A;编码基因;重组载体;疫苗

【中国图书分类法分类号】R378.99;R392－33 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－10－10

Cloning and sequence analysis of human heat shock prote in encoding gene of Helicobacter pylori

JIANG Zheng, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To obtain DNA of human Helicobacter pylori heat shock protein A, and construct a recombinant vector containing gene encoding HspA for nucleotide sequence analysis. *Methods*: The target gene was amplified from Hp chromosome by PCR, and then digested by restricted endonuclease enzyme of kpn Ⅰ, *BamH* Ⅰ simultanously, and inserted into the prokaryotic expression vector pET32a(+) digested by corresponding restricted endonuclease enzyme. The recombinant vector was selected and transformed for nucleotide sequence analysis. *Results*: Enzyme digestion analysis and sequencing showed that the target gene had been inserted into recombinant vector, but as compared with gene reported by GenBank. 1.4 % of the gene mutation and 1.6% of amino acid residues change in Hp happened respectively. The DNA sequence analysis showed the sequence of HspA DNA was almost the same as that published by GenBank. *Conclusion*: The gene coding for Hp HspA is cloned successfully. The results obtained lay the foundation for research on development of Hp protein vaccine and a quickly diagnostic kit applying to detection of Hp infection.

【Key words】 Helicobacter pylori; Heat shock protein A; Encoding gene; Recombinant vector; Vaccine

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%,每年新增感染人数近千万。H. pylori 感染不但与 B 型胃炎和消化性溃疡的发生有密切关系,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[1－3],近年来研究发现,H. pylori 与胃肠外疾病的发生也有密切的关系[4]。HspA 为所有的 H. pylori 共同的抗原成分,以 HspA 为抗原的疫苗可使 70%～80%试验小鼠获得保护,由于 HP 属微需氧菌,培养条件高,难以获得大量天然的 HspA。因此本实验采用基因克隆技术,将 HspA 编码基因,经 PCR 扩增后,构建重组载体,为在 E. coli 中进行表达,H. pylori 疫苗的研制及快速诊断试剂盒的制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和试剂

Hp 由本校微生物学教研室提供。Top10、pET32a(+)载体,为本校病毒性肝炎研究所保存。T_4DNA 连接酶和限制性内切酶(kpn Ⅰ 和 BamH Ⅰ)购自 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶为 Takara 产品。dNTP 为上海生工生物工程公

作者介绍:姜 政(1965－),男,副教授,博士,主要研究方向:胃肠疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

司产品。PE－2400 型 PCR 为美国 PE 公司产品。

1.2 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增

根据文献的报道方法[5]，提取 Hp 基因组 DNA，通过 GenBank 查询，经微机分析设计热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增引物 P_1 和 P_2。P_1 的序列为 5′－CCGGTACC－ATGAAGTTTCAACCATTAGG－3′；P_2 为 5′－CCGGATCC－GTGTTTTTTGTGATCATGAC－3′。P_1 引物中引入 Kpn Ⅰ酶切位点，P_2 引物中引入 BamH Ⅰ酶切位点。在 50μl 反应体系中，分别加入 1μl dNTP，2μl DNA(作为模板)及浓度各为 18μmol/L 的 P_1 和 P_2 引物各 1μl，以及 1μl Taq DNA 聚合酶，按照以下条件进行 PCR 扩增。即 94℃ 变性 5min，然后 94℃ 变性 1min，52℃ 退火 50s，72℃ 延伸 50s，最后 1 个循环结束后再 72℃ 延伸 7min，共 35 个循环。所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，同时进行 1% 琼脂糖凝胶回收。

1.3 重组载体的构建

将纯化的 PCR 产物和 pET32a(＋)，分别以 kpn Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切，并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。将酶切纯化的目的基因和 pET32a(＋)按 4∶1(摩尔数)比例，并在 4℃ 条件下连接过夜，同时根据文献[5]制备 Top10 感受态菌：取 50μl Top10 菌的过夜培养物，加于 2ml 的 LB 培养液中，以 300r/min 摇荡 3h，然后在室温下以 10 000r/min 离心 2min，弃上清，加入 150μl 100mmol/L $CaCl_2$ 混悬，置 0℃ 冰水浴 2h，而后加入连接产物 10μl 混悬，依次于 0℃ 冰水浴 30min、42℃ 水浴 2min 及冰水浴 2min。加入 1 ml LB 培养液，于 37℃ 孵育 30min；取 200μl 培养物，涂于 LB＋氨苄青霉素 100mg/L 平皿，于 37℃ 过夜。于次日挑选单个菌落，接种于 2ml LB＋氨苄青霉素 100mg/L 培养液中，于 37℃ 以 250r/min 培养 12h。重组载体的提取，按照上海生物工程公司出版的 DNA 抽提纯化操作手册进行，同时进行酶切鉴定和基因测序分析。

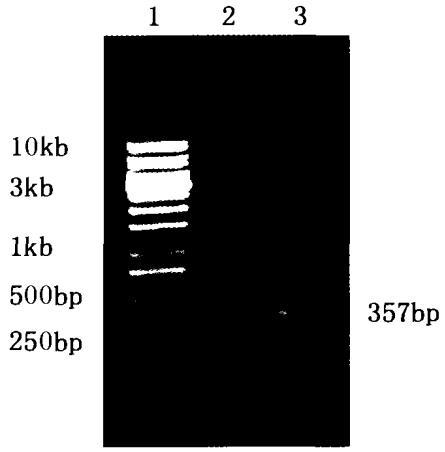
2 结 果

2.1 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增

以 Hp 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析(图 1)。结果表明，PCR 扩增产物位于 250bp～500bp 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。

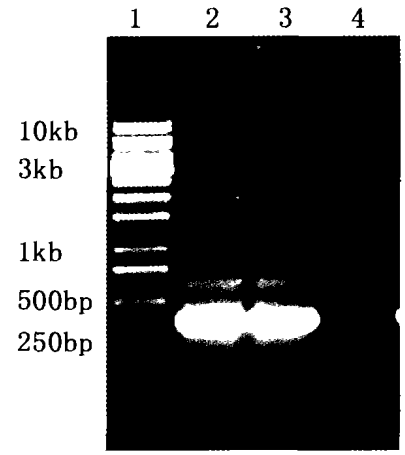
2.2 PCR 方法鉴定重组载体

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% 琼脂糖凝脉电泳，结果显示：以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板均能扩增出 1 条约为 357bp 的带，与实验设计相一致。说明重组载体构建成功。



1. DNA Marker 2. Negative control 3. PCR products of HspA gene

图 1 HspA 编码基因 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电脉分析



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 2 重组载体的 PCR 鉴定

2.3 HspA 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(重组载体送上海基康生物有限公司进行序列测定)，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 基因的片段，其中有 5bp 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，但 HspA 的特性无明显改变，其同源性高达 98%。关于克隆的编码 HspA 基因及表达的目的蛋白的序列见其后。

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
357a  1    ATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA    38
Hsp   477  ATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA    544

357a  39   AAGACTTGAAGAAGAGAACAAAACCAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT    106
Hsp   545  AAGACTTGAAGAAGAGAACAAAACCAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT    612

357a  107  TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT    174
Hsp   613  TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT    680

357a  175  GTGATCGCTTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA    242
Hsp   681  GTGATCGCTTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA    748

357a  243  ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGCTGTCATACAGGTAATCATGATCATAAAC    310
Hsp   749  ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGTTGTCATACAGATAGTCATGACCATAAAC    816

357a  311  ATGCTAAAGAGCATGAAGCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACTAA    357
Hsp   817  ATGCTAAAGAGCATGAATCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACGGATCCTCGAGCTCCGTCGA    884
```

注:357a 为 GenBank 中 HspA 的序列,Hsp 为本实验所得序列,划线部分为酶切位点。

3 讨 论

根除 H. pylori 的感染,目前采取的方式很多:如药物的二联、三联以及四联疗法,既可以达到治疗消化道疾病的目的,同时也不同程度的根除 H. pylori 的感染。但近年来,由于广泛的、大剂量的抗生素应用,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,欲求降低 H. pylori 感染率及其相应疾病的发生率,不少研究工作者正致力于开发研究新的 H. pylori 治疗以及预防方案。新近研究表明:H. pylori 的尿素酶、热休克蛋白 A(HspA)、中性粒细胞激活蛋白、粘附素、空泡细胞毒素、细胞毒素相关 A 蛋白和 Mr 为 18000、26000 的 Hp OMP 均是有效的抗原成分[6~8]。而热休克蛋白(Heat shock protein, Hsp)又称应激蛋白(Stress protein, SP),是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。而 H. pylori 合成的热休克蛋白 - HspA、B, Hsp60, Hsp70 等热休克蛋白家簇,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 H. pylori 定植的又一类重要因子,在极端不利的理化条件下,能维持 H. pylori 活性蛋白的稳定,显著增强 H. pylori 尿素酶的活性。研究还发现,这些蛋白质中 Hsp60 和 HopZ(HP outer membrane protein Z)与 Hp 的粘附有关,H. pylori 热休克蛋白 hspA、hspB,分别同源于大肠杆菌的 GroEs 和 GroEI,与自身免疫性反应相关,可能产生有害的自身反应性抗体;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,但用其免疫动物能够使动物获得对 H. pylori 的免疫力。Todoroki et al[9]制备了编码热休克蛋白 A、B 的 DNA(pcDNA3.1 - HspA 和 pcDNA3.1 - HspB)疫苗,对 C57BL 小鼠进行皮下接种,采用 pcDNA3.1 - HspA 接种的 C57BL 小鼠产生了 IgG2a, pcDNA3.1 - HspB 则产生 IgG1/IgG2a,它们都显著地减少 H. pylori 在胃内的定植,同时减轻因 H. pylori 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 H. plyori 疫苗。

H. pylori 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 个是组氨酸残基,4 个是半胱氨酸残基,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,因此可以作为基因工程疫苗的侯选抗原。

鉴于此,本实验将 H. pylori 热休克蛋白 A 编码基因进行了克隆、构建了重组载体。与文献报道不同的是,HspA 编码基因有 1.4%(5/357)的碱基发生变异,约 1.6%(2/119)的氨基酸残(下转第 420 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

用,还有待进一步实验证实。

(致谢 本研究获得美国纽约州 Rochester 大学医学中心消化和肝病中心 William Y. Chey 教授及李平教授在药品和技术上的大力支持,在此致以衷心感谢!)

参 考 文 献

[1] Li P, Chang TM, Chey WY. Neuronal regulation of the release and action of secretin releasing peptide and secretin[J]. Am J Physiol, 1995; 269: G305 - G312.

[2] Li Y, Owyang CH. Secretin at physiological doses inhibits gastric motility via a vagal afferent pathway[J]. Am J Physiol, 1995; 268: G1012 - 1016.

[3] Y Li, JX Zhu, Chung Owyang, et al. Secretin stimulates vagal nodose ganglia and cfos expression in rat brain stem[J]. Gastroenterology, 1999; 116(4): Part2. G2767.

[4] P Li, Chang TM, Chey WY. Secretin inhibits gastric acid secretion via a vagal afferent pathway in rats[J]. Am J Physiol, 1998; 275: G22 - 28.

[5] Raybould HE, Holzer HH. Secretin inhibits gastric emptying in rats via a capsaicin - sensitive vagal afferent pathway[J]. Eur. J. Pharmacol, 1993; 250: 165 - 167.

[6] 王志均,主编. 胃肠激素[M]. 北京:科学出版社, 1985: 129.

[7] Mathis C, Moran TH, Schwartz GJ. Load - sensitive rat gastric vagal afferents encode volume but not gastric nutrients [J]. Am J Physiol, 1998; 274: 280 - 286.

(上接第 416 页)基发生改变,据文献报道[5],可能的原因有:(1)所采用的 H. pylori 菌种不同;(2)H. pylori 具有转化能力,能够通过已死亡的 H. pylori DNA 转化而致基因组发生重排导致基因变异。(3)由 H. pylori 菌株间的变异引起。不同的患者感染的 H. pylori 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。我们采用的原核表达载体 pET32a(+)中,含有 T7 启动子和转录终止信号以及大肠杆菌的 TrxA 基因。外源基因经多克隆位点插入后,可与 TrxA 一起融合表达。融合表达的外源蛋白与硫氧还蛋白不仅提高了表达产物的稳定性,而且由于 Mr 增大,用 SDS - PAGE 更容易分析鉴定。由于载体 pET32a(+)表达的 6 个组氨酸可与 Ni - NTA 琼脂糖树脂中的 Ni^{2+} 结合,容易对表达产物进行纯化。

总之,本实验采用 PCR 技术获得了特异性的 H. pylori HspA 编码基因,并进行了序列分析,为制备特异性的核酸探针,重组表达 HspA 及基因工程疫苗的进一步研究奠定了重要的实验基础。

参 考 文 献

[1] Vandenplas Y. Helicobacter pylori infection[J]. World J Gastroenterol, 2000; 6(1): 20 - 31.

[2] Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, et al. Helicobacter pylori and early duodenal ulcer status post - treatment: a review [J]. Helicobacter, 2001; 6(1): 84 - 92.

[3] 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.

[4] Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, et al. Helicobacter pylori, gastrin and cyclooxygenase - 2 in lung cancer [J]. Med Sci Monit, 2000; 6: 1085 - 1092.

[5] Jiang Z, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective H. pylori antigen [J]. W J G, 2002; 8: 308 - 311.

[6] Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, et al. The neutrophil - activating protein (HP - NAP) of Helicobacter pylori is a protective antigen and a major virulence factor[J]. J Exp Med, 2000; 191: 1467 - 1476.

[7] Kim BO, Shin SS, Yoo YH, et al. Peroral immunization with Helicobacter pylori adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits[J]. Clin Sci (Lond), 2001; 100: 291 - 298.

[8] Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, et al. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole - cell Helicobacter pylori vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection[J]. Infect Immun, 2001; 69: 3581 - 3590.

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