维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0720－04

幽门螺杆菌细胞空泡毒素基因毒性片段的克隆与表达

刘 森，杨致邦，林珊珊，吴利先

(重庆医科大学基础医学院微生物学教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：通过基因于程技术获得具有良好抗原性的重组细胞空泡毒素毒性亚单位蛋白。方法：利用 PCR 从幽门螺杆菌(Hp)空泡毒素基因中扩增毒性片段 V，克隆及序列分析后在大肠杆菌中高效表达，用免疫印迹法(Western blotting)检测其抗原性。结果：序列分析所得片段完整，与标准株 AF361700 比较有 1.5% 的 bp 及一个氨基酸发生变异。与文献报道的中国菌株相比有高度的同源性。SDS－PAGE 显示表达产物相对分子量为 27000，表达量为 30% 以上，Western blotting 显示该蛋白可被 HP 全菌抗血清所识别。结论：基因重组 Hp 细胞空泡毒素毒性蛋白具有良好的抗原性，可用于制备 Hp 感染的诊断试剂与疫苗。

【关键词】幽门螺杆菌；空泡毒素；基因克隆；表达

【中国图书分类法分类号】R378.2；R392.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－01－24

Cloning and expressing of vacA gene related segment with vacuolating activity of Helicobacter pylori

LIU Miao, et al

(*Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To obtain the antigen of recombinant vacuolating segment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxing by gene－engineering. *Methods*: The objective gene was cloned into PQE－30, sequenced and expressed using PCR and recombinant techniques. After expression, the antigenicity of recombinant protein was analyzed by Western blotting. *Results*: DNA sequence analysis identified that the sequence was integrated. Compared with standard strain AF361700, 1.5% of the cloned gene was mutated, one amino acid radicle was changed. SDS－PAGE revealed the molecular weight of objective recombinant protein was 27 000 as it was predicted; the level of expression product was over 30%. Western blotting results showed the objective protein could be recognized by anti－serum against HP. *Conclusion*: This recombinant protein has perfect antigenicity, so it may be used as a protective antigen in preventing HP infection.

【Key words】 Helicobacter pylori; Vacuolating cytotoxin; Gene clone; Expression

大量研究表明幽门螺杆菌(Helicobacter pylori；Hp)与慢性、活动性胃炎和消化性溃疡密切相关，同时也是胃肿瘤的危险因素。1994 年，国际癌症研究机构已将其列为 1 类致癌原。Hp 的致病因素有尿素酶、毒素相关蛋白、细胞空泡毒素(vaculating antigen；VacA)等，其中，VacA 是一种重要的致病物质，在体外能够导致哺乳细胞空泡样变性，同时能够在细胞浆膜上形成通道与增强极化上皮单层细胞的渗透性，导致细胞死亡。最近有学者证实 VacA 还对细胞的增殖有影响[1－3]。由于对上皮细胞明显的损伤作用，被认为是 Hp 毒力分型的标志，与 Hp 感染者的临床症状有极其密切的关系。为此，本研究以临床菌株为模板，经 PCR 扩增，构建高效表达的重组载体并表达，为临床制备 Hp 感染的诊断试剂与疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Top10、DH5α 菌株和 PQE－30 载体，为本校病毒性肝炎研究所惠赠。

1.2 工具酶

T_4 DNA 连接酶和限制性内切酶(SaLI、BamH Ⅰ)购自

作者介绍：刘 森(1976－)，男，助教，硕士，
主要研究方向：幽门螺杆菌基因工程疫苗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

TaKaRa 生物公司，Pfu 酶为 MBI 公司产品。dNTP 为上海生物工程公司产品。

1.3 其它

硝酸纤维素膜(NC 膜)、HRP 标记的羊抗人二抗与 DAB 显色剂为武汉博士德公司产品。

1.4 方法

1.4.1 Hp 菌株的获取

将临床所取脲素酶(+)胃窦黏膜标本，接种于 7% 羊血琼脂平板上，在微需氧环境下(5% O_2 10% CO_2 85% N_2)，37℃ 培养 3～4 天后，挑取可疑菌落按常规方法鉴定，确认为 Hp 后传代培养。

1.4.2 Hp 菌株基因组 DNA 提取

从固体培养基上刮取生长良好的菌落，按细菌基因组 DNA 小量制备法制备，详见参考文献[4]。

1.4.3 目的基因 PCR 扩增

根据文献，用引物设计软件设计引物，在上游加上合适的酶切位点与起始密码子，在下游加上合适的酶切位点与终止密码子。序列如下：为 p1：5′－CCGGATCCATG－CATTATTGGGTCAAAGG－3′(BamH Ⅰ)，p2：5′－GGGTCGACCTA—GTTACTATCTTGTTTGTCG－3′(SaL Ⅰ)扩增条件为：95℃ 预变性 5min，95℃ 变性 45s，53℃ 退火 50s，72℃ 延伸 90s，共 35 个循环，最后 1 个循环结束后 72℃ 延伸 7min，所获 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳，鉴定后 1% 琼脂糖凝胶回收。

1.4.4 重组载体构建

将纯化的 PCR 产物和 PQE－30 质粒分别以 SaL Ⅰ 和 BamH Ⅰ 双酶切，并用试剂盒进行纯化。将酶切纯化的目的基因和 PQE－30 按 10∶1(浓度数)进行连接，在 16℃ 条件下连接 2h。用改进的 $CaCl_2$ 法[5]将连接产物转化至 E. coli Top10，LA 培养基筛选后，双酶切鉴定以筛选出阳性克隆。增菌后送至上海博亚进行基因测序分析。

1.4.5 重组载体的表达

以酶切鉴定的重组载体转化 E. coli DH5α，随后挑选含重组载体的单个菌落接种于盛有 LA 培养基的 6 支试管以及 DH5α/PQE－30 菌一起。于 37℃ 培养至 OD 值为 0.5 时，加入终浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.8 及 1.0 mmol/L 的 IPTG，诱导表达 4h，离心 2min。收集菌体，加入蛋白上样缓冲液煮沸 5min，12% SDS－PAGE，筛选高表达的含重组质粒的单个菌落，以获得大量的重组蛋白。然后，以最适浓度的分别诱导 1、3、4、5 和 24h，以确定最适诱导时间。

1.4.6 Western blotting 检测重组蛋白的抗原性

将诱导菌的全菌做 12% SDS－PAGE。用半干湿法将凝胶上蛋白电转移至 NC 膜，加封闭液室温封闭 2h，PBS 洗膜后，加上 Hp 患者血清室温作用 2h，然后再用 PBS 洗膜，加上 HRP 标记的羊抗人二抗室温作用 2h，PBS 振洗后，将 NC 膜浸泡在 DAB 显色剂中 10～15min，后用双蒸水冲洗，以终止染色。

2 结 果

2.1 PQE－30－V 重组质粒的构建

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳，在 720bp 左右有一条带，大小与预想一致，结果见图 1。重组质粒 PQE－30－V 与 PQE－30 用 SaL1 和 BamH1 双酶切后，经 1% 琼脂糖电泳，可见 PQE－30－V 被切下 720bp 左右的一条带，大小与预计一致，结果如图 2。

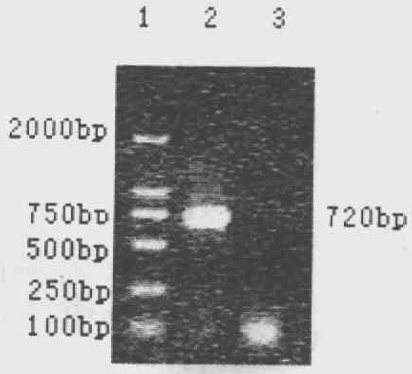


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1. DNA marker 2. PCR product 3. control

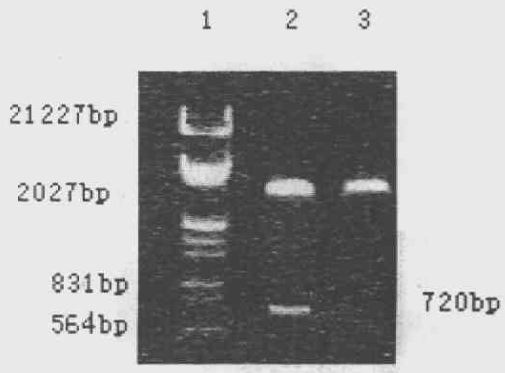


图 2 重组质粒 PQE－30－V 限制性酶切分析

1. DNA marker lane 2. PQE－30－V/SaL1＋BamH1 3. PQE－30/SaL1＋BamH1

2.2 重组质粒 PQE－30－V 的序列分析

利用 T5 启动子对重组质粒进行测序分析，采用 genebank blast 对测定的 DNA 序列进行同源性分析。结果所得序列完整，与标准株 AF361700 序列比较有 1.5% 的 bp 发生变异，以及一个氨基酸发生变异。与文献中国菌株相比有高度的同源性。用 ExPASY Proteomics tools 蛋白组分析软件包对所得序列与标准株 AF361700 的蛋白质二级结构进行预测与比较，两者的二级结构完全相同，而蛋白质的三级结构不易预测。

2.3 目的蛋白表达的检测

维普资讯 http://www.cqvip.com

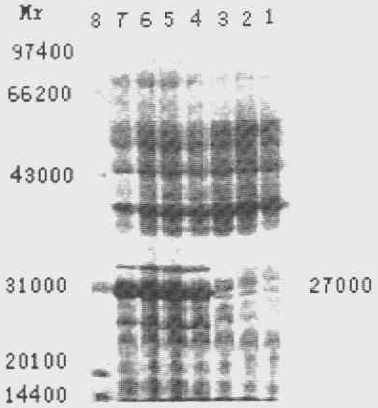


图 3 表达蛋白最适诱导浓度

8. Protein marker 1. PQE－30 induction with IPTG 2. PQE－30－V induction without IPTG 3－7. PQE－30－V induction with different concentration of IPTG(0.1、0.3、0.5、0.8 及 1.0 mmol/L)

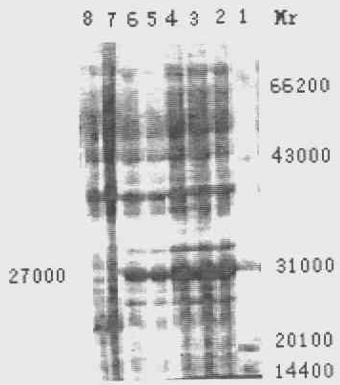


图 4 表达蛋白最适诱导时间

1. Protein marker 8. PQE－30 induction with IPTG 7. PQE－30－V induction without IPTG 2－6. PQE－30－V induction with 0.5mmol/L IPTG(1、3、4、5 和 2h)

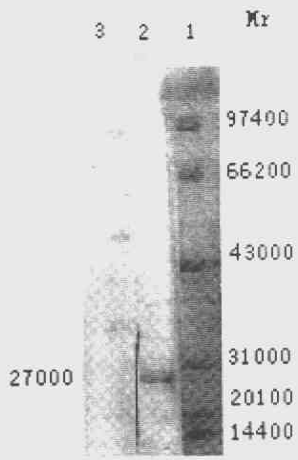


图 5 表达产物的 Western blotting 分析

1. Protein marker 2. induced protein exhibited with anti－serum against Hp Ab－HRP 3. Noninduced protein exhibited with anti－serum against HP Ab－HRP

将鉴定正确的重组质粒 PQE－30－V 转化至大肠杆菌 DH5α，经 IPTG 诱导表达，其全菌蛋白 SDS－PAGE 图谱如图 3，在相对分子量 27000 处可见明显的外源蛋白的表达。调整 IPTG 的浓度至 0.5mmol/L，诱导 4h 可得到最大的表达量，薄层扫描分析表明，目的蛋白表达量为 35% 以上，如图 3 和图 4。

2.4 目的蛋白免疫活性的鉴定

将以 12% SDS－PAGE 分离的重组菌电转移到 NC 膜上，依次加上 Hp 患者血清和 HRP 标记的羊抗人二抗，显色后出现一条和预期大小一致的带，如图 5。

3 讨 论

自从发现 VacA 后，VacA 基础与临床一直是国内外研究的热点。流行资料表明 50%－60% 人群感染 Hp，但临床上仅有 15% 的感染者发病，因 Hp 的其他毒力因子如鞭毛的动力、黏附因子、尿素酶、蛋白水解酶等，几乎存在所有的 Hp 菌株。因此不能解释 Hp 感染出现不同的临床症状。只有 VacA 与 CagA 不存在所有的菌株中。感染是否发病，一方面与宿主的易感性与环境因素有关；另一方面与感染的 Hp 菌株的毒力有关。编码 VacA 的基因存在所有的菌株中，但只有 50%－60% 菌株表达。因此诊断毒力株感染在临床上具有重要意义，针对 VacA 的预防措施也显得特别重要。

Atherton 等利用通用引物对 VacA 进行基因分型发现 VacA 的基因由 s 区(编码信号肽)和 m 区(编码中间区域)两部分组成 s 区有 sla、slb、slc 和 s2 四种类型，m 区有 m1、m2a 和 m2b 三种类型，因而，VacA 基因有多种基因型的组合，不同的菌株可能有不同的 VacA 基因型的组合[6]。许多学者发现 VacA 基因在 S 区与 C 末端有较高的同源性，而在 m 区的变异较大，特别在 m 区的 0.7kb 区变异性可以达到 70%。Vinion－Dubiel 等用 s1m1 型的 Hp 的 VacA 免疫 BALB/C 鼠筛选出 10 个 B 细胞克隆，即获得 10 种 VacA 的单克隆抗体。发现仅有 5G5 这种单抗既能中和 slm1 型 VacA，又能中和 slm2 型的 VacA，其余的对 slin2 型的 VacA 都没有作用[7]。故以标准株为模板对 VacA 进行克隆与表达获取的重组蛋白应用可能受到其基因型的限制。后来，Arnele 等又通过嵌合蛋白的方法进行表位的定位，结

维普资讯 http://www.cqvip.com

果发现 5G5 结合的位置位于 VacA 的 300 位氨基酸左右[7]，也就是 VacA 基因的 900bp 位左右，位于毒性亚单位上。Manettt. R 等用 PCR 的方法分别扩增出 Hp 标准菌株 NCTC11637VacA 的基因、毒性亚单位及结合亚单位的基因，将这些基因克隆到质粒 PQE－30 中。最后，在大肠杆菌中表达它们的重组蛋白。结果发现重组蛋白免疫血清能够通过 E-lASA 的方法检测出相应基因型别天然的 VacA[8]。Telford 等以 CCUGl7874 为模板表达了 5 个 VacA 的片段，其中 C 末端的两个片段无活性，信号肽与 C 末端之间的 3 个片段有活性。[9]

2000 年，纪等对五株有代表性中国 Hp 菌株的 VacA 基因测序与同源性的比较(现这五株的基因序列已存档于 genebank 中)，发现毒性亚单位与跨膜输出段相对保守，各菌的相似性达到 99. 7%与 98. 4%。由上可知，VacA 毒性亚单位的基因高度保守[10]。slml 型与 slm2 型 HP 的在毒性亚单位高度同源的部分具有相同的表位，可能在 900 位 bp 左右。我们通过 genebank 的 biast 对纪测序五株有代表性中国 Hp 的毒性亚单位进行同源性的比较，找出一个位于 361－1081bp 的高度同源基因片段，以标准株 AF050320 为模板设计引物，克隆此片段，以获得有活性的重组蛋白。

从 HP 临床株的 DNA 中，扩增出 VacA 基因的毒性片段，并进行了测序，序列分析表明该片段序列完整，与标准株 AF361700 序列比较有 1. 5%的 bp 发生变异，以及一个氨基酸发生变异。与文献其他中国菌株相比有高度的同源性。在此基础上，我们构建了原核表达载体 PQE－30－V。PQE－30 编码 6 个组氨酸的接头，使表达的重组蛋白易于纯化。于大肠杆菌中表达时，在 IPTG 终浓度为 0. 5mmol/L 时表达量最大。SDS－PAGE 分析显示目的蛋白的表达量占全菌总蛋白的 30%以上。Western blotting 分析表明，表达的蛋白能与 HP 全菌抗血清相结合，有良好的抗原性。可作为诊断 Hp 毒力株感染的抗原。并为进一步制备预防毒力株感染的疫苗打下基础。

参 考 文 献

[1] Papini E, De Bernard M, Milia E, et al. Cellular vacuoles induced by Helicobacter pylori originate from late endosomal compartments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(21): 9720－9724.

[2] 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: 1401－1409.

[3] Papini E, Satin B, Norais N, et al. Helicobacter pylori vacuolating toxin increases the permeability of polarized epithelial cells monolayers[J]. J Clin Invest, 1998; 102: 813－820.

[4] Ausube FM, Brent R, Kingston RE, et al. 颜子颖，王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 第 1 版，北京：科学出版社，1999: 39－40.

[5] Ausube FM, Brent R, Kingston RE, et al. 颜子颖，王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 第 1 版，北京：科学出版社，1999: 22－23.

[6] Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration[J]. J Biol Chem, 1995; 270(30): 17771－17777.

[7] Vinion－Dubiel AD, McClain MS, Cao P et al. Antigenic diversity among Helicobacter pylori vacuolating toxins[J]. Infect immun, 2001; 69(7): 4329－4336.

[8] Manetti R, Massari P, Burroni D, et al. Helicobacter pylori cytotoxin: importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies[J]. Infect Immun, 1995; 63: 4476－4480.

[9] Telford JL, Ghiara P, Dell Orco M, et al. Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease[J]. J Exp Med, 1994; 179: 1653－1658.

[10] 纪徐淮，许国铭，屠振兴，等. 中国幽门螺杆菌 vacA 基因的等位变异[J]. 中华消化杂志，2000; 20(3): 151－154.