维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0130-03

幽门螺杆菌26kDa外膜蛋白的基因克隆

蒲 丹[1]，姜 政[1]，黄爱龙[2]，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：构建幽门螺杆菌26kDa外膜蛋白的基因重组载体，为Hp的疫苗开发、快速诊断试剂盒的研究奠定基础。方法：用PCR从Hp染色体DNA基因组扩增26kDa外膜蛋白的基因片段，将26kDa目的基因、pET32a(+)载体同时经*Bam*HI、*Hind*Ⅲ双酶切、纯化，T4连接酶连接；转染Top10大肠菌以及筛选含插入片段的重组载体。结果：经酶切、测序分析插入的基因片段为表达Hp26kDa外膜蛋白基因，有1.1%bp发生变异，以及1.51%氨基酸残基改变。与文献相比：有高度的同源性。结论：Hp外膜蛋白的基因克隆、重组载体的构建将有可能为一种有效蛋白质疫苗的制备打下基础。

【关键词】幽门螺杆菌；26kDa；基因；重组载体；外膜蛋白

【中国图书分类法分类号】R378.2；R392-33 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-06-18

The cloning of 26kDa outer membrane protein gene of Helicobacter pylori

PU Dan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct a recombinant vector which could express 26kDa outer membrane protein(OMP) from Helicobacter pylori(Hp) ,and exploit the possibility obtaining the vaccine conferring protection from Hp infection and a diagnostic reagent kit quickly detecting Hp infection. *Methods*: The gene encoding the structural 26kDa OMP of Hp was amplified from Hp chromosomal DNA by PCR, and inserted in the prokaryotic expression vector pET32a(+), and transformed into the Top10 E. coli strain. Recombinant vector was selected and identified to be transformed into BL-21(DE3) E. coli strain and expressed recombinant protein. *Results*: The cloned gene of 26kDa OMP was amplified to be 594 base pairs(bp), 1.1% of the cloned gene was mutated , 1.51% of amino acid radicles was changed. Compared with reports: there was high homogenicity between them. *Conclusion*: This result suggested that recombinant vector expressing 26kDa OMP may be an potential source obtaining the vaccine conferring protection from Hp infection and a diagnostic reagent kit quickly detecting Hp infection.

【Key words】Helicobacter pylori; 26kDa; Gene; Recombinant vector; Outer membrane protein

幽门螺杆菌（Helicobacter pylori ,Hp）是上消化道疾病的主要致病菌，它的感染不但与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淋巴瘤和胃癌也有重要关系，并已被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌[1~3]。Hp在我国普通人群的感染率约为50%～80%，并仍以每年1%～2%速度增加[4]。Hp的低分子量外膜蛋白为所有Hp共有的抗原成分，以OMP为抗原的疫苗可使试验小鼠获得保护[5]，由于Hp属于微需氧菌，培养条件高、难以获得大量的天然的外膜蛋白，因此本实验采用Hp特异性基因——26kDa外膜蛋白基因，经PCR扩增、构建重组载体，为在原核生物表达创造条件，同时为疫苗的研究以及快速诊断试剂盒的开发奠定基础。

作者介绍：蒲 丹（1978- ），女，助教，硕士，

主要研究方向：消化系统疾病。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

幽门螺杆菌由重庆医科大学微生物教研室提供；菌株Top10、质粒pET32a(+)为重庆医科大学肝炎研究所保存。

1.2 限制性内切酶及T4 DNA连接酶

T4 DNA连接酶，限制性内切酶（*Hind*Ⅲ，*Bam*HI）购自Promega公司，TaqDNA聚合酶为北京医科大学免疫教研室的产品，dNTP为上海生工生物工程公司产品，PE-9600型PCR为PE公司产品。

1.3 Hp基因组DNA提取

将Hp培养物1.5ml离心2min，在其沉淀中加入567μl TE

维普资讯 http://www.cqvip.com

缓冲液、混悬，再加入30μl 10%SDS和3μl 20mg/ml 蛋白酶K，于37℃温育1 h；加入100μl 5mol/L Nacl，再加入80μl 10%SDS，于65℃温育10min；用酚、酚／氯仿各抽提3次；将上清液转入EP管中，加入0.6体积异丙醇，稍微离心，沉淀中加入1ml 70%乙醇洗涤；离心5 min，弃上清，沉淀溶于100μl TE中；-20℃保存，备用。

1.4 26kDa外膜蛋白基因扩增

在50μl反应体系中，分别加入1μl dNTP、2μl DNA模板、浓度各为18 μmol/L的P1、P2引物各1μl以及1μl Tag DNA聚合酶，按照PCR条件进行扩增，即94℃变性7min，然后按如下参数循环35次：94℃变性60s，52℃退火45s，72℃延伸90s，最后一个循环结束后72℃延伸7min。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，同时进行胶回收。

1.5 重组载体构建

(1) 目的基因与载体的连接 将纯化的PCR产物，pET32a(+)分别进行HindⅢ，BamHI双酶切，用PCR纯化试剂盒进行纯化；将酶切纯化的目的基因、pET32a(+)按4:1（摩尔数）进行连接，反应体系30μl，加入目的基因160ng，pET32a(+)600ng，T_4 DNA连接酶3μl，在4℃条件下过夜。

(2) 感受态Top10菌制备 取50μl Top10菌过夜培养物加入2ml的LB培养液中，摇荡300r/min，3h；在室温下离心10000r/min，2min，弃上清；加入150μl 100mmol/L $cacl_2$混悬，在0℃冰水浴2h，而后加入连接产物10μl，混悬，再在0℃冰水浴30min；在42℃水浴2min后，冰水浴2min；加入1ml LB培养液，37℃孵育30min；取200μl培养物涂于LB+氨苄青霉素100ug/ml平皿，37℃过夜。

(3) 重组载体提取 挑选单菌落，接种在2ml LB+氨苄青霉素100μg/ml培养液里，37℃ 250r/min，12h，然后提取重组载体(按照上海生工生物工程公司DNA抽提纯化操作手册操作)。

2 结 果

2.1 幽门螺杆菌26kDa外膜蛋白基因

根据文献报道[6,7]，经微机分析设计26kDa外膜蛋白基因引物：

P_1 5' -GCGGATCCATGTTAGTTACAAAACTTGCC 3'，

引物P_1引入*Bam*HI酶切位点、

P_2 5' -AAGCTTAATGGAATTTTCTTT 3'，

引物P_2引入*Hind*Ⅲ酶切位点，以Hp基因组为模板进行PCR扩增，得到目的基因片段，经1%琼脂糖凝胶电泳，如图1所示。

2.2 重组载体（质粒）酶切鉴定

将重组载体、pET32a(+)同时进行*Hind*Ⅲ、*Bam*HI单、双酶切，如下所示：反应体系10μl，37℃温育1.5h，进行1%琼脂糖凝胶电泳，如图2。由于pET32a（+）双酶切只切下25bp，因此与pET32a(+)单酶切条带几乎一致，而含有插入片段的重组载体经双酶切得到一条约594bp的目的DNA片段。

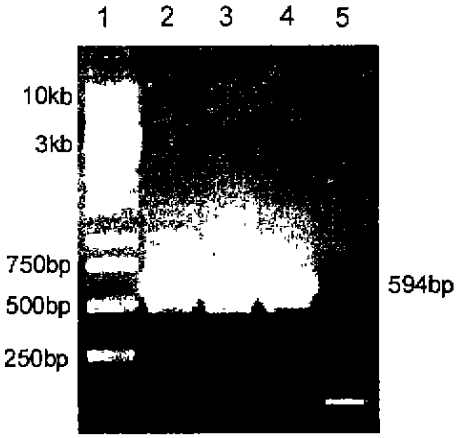


图1 Hp26kDa外膜蛋白PCR产物1%琼脂糖凝胶电脉

1.核酸分子Maker；2~4. PCR产物；5. 阴性对照

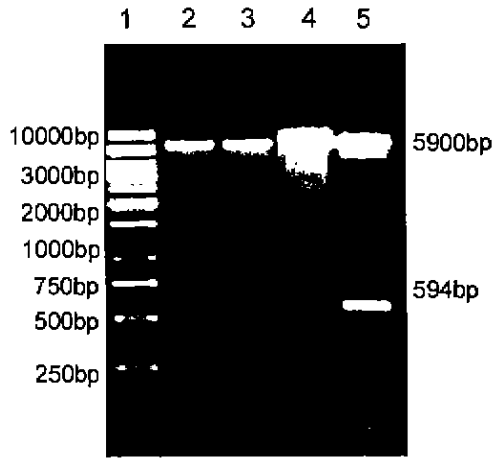


图2 重组质粒的酶切鉴定

1.核酸分子Maker；2. pET32a(+)/*Hind*Ⅲ单酶切；

3. pET32a(+)/*Hind*Ⅲ，*Bam*Hl双酶切；

4.重组质粒单酶切；5.重组质粒双酶切

2.3 重组载体的测序

将重组载体以T7为测序引物进行测序分析（上海基康生物有限公司），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26kDa外膜蛋白的基因片段，其中有6bp发生变异，有3处编码的氨基酸残基发生变化，但对外膜蛋白的特性无本质改变。关于基因序列已发表在GenBank。其序列号为AY033499。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

自1982年Marshall和Warren从慢性活动性胃炎患者的胃粘膜中分离出幽门螺杆菌以来，Hp与上消化道疾病之间的关系受到广泛关注，现已确认Hp是慢性胃炎的主要致病因子，且与消化性溃疡的发病有密切关系，根除Hp之后，可以显著降低或防止溃疡复发，同时可以使MALT淋巴瘤明显缩小或消退[8,9]。但是，近年来，由于抗生素广泛的、大剂量的应用，导致耐药菌株的产生；出现了一些药物毒副作用；患者耐受性、依从性以及承受力都受到了挑战；同时也无法解决其复发的问题。鉴于此，不少研究工作者正致力于开发研究新的有效控制和彻底消灭幽门螺杆菌的最佳方案：疫苗的接种。Hp疫苗需要至关重要的三种成分[10]：(1)必须发现能干扰粘附和毒性且存在于所有菌株的保护性抗原；(2)临床前试验需要能模仿感染和疾病的动物模型；(3)需要适合人体的粘膜佐剂。因此、首先寻找有效的保护性抗原，据文献报道，细菌的外膜蛋白是一种里外不对称的、半通透性的、完整的膜，具有刺激机体产生细胞和体液免疫以及逃避机体清除的能力。用其制作疫苗可以保护机体免受细菌的侵入，从而达到有效控制和彻底消灭病原菌的目的。Hp26kDa外膜蛋白属于Hp Hor 蛋白家簇类，是Hp特异性蛋白，它不但具有免疫刺激分子的作用，而且具有侯选疫苗的特征[11]。

据初步研究，26kDa外膜蛋白具有特殊的功能结构，作为Hp检测的一种标志性抗原，其敏感性和特异性高[12]。另据文献报道Hp的26kDa外膜蛋白对胃癌以及胃癌高发人群的筛选具有重要价值，而且用其免疫动物可以达到清除体内Hp或防止Hp再感染的能力[1,7,13]。因此、本实验从实际出发，将Hp的26kDa外膜蛋白基因进行克隆，构建重组质粒，为将来ELISA快速诊断试剂盒的开发和疫苗的研究奠定基础。与文献报道相比，克隆的26kDa外膜蛋白基因有1.1 %（6/594）编码碱基发生变异，约1.5%（3/198）氨基酸残基不同，研究其原因可能有(1)所采用的Hp菌种不同；(2) Hp具有转化能力，它能够通过死亡的Hp DNA的转化导致基因组的重排，从而导致了基因的变异[14]。(3) Hp的菌株间的变异引起，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，但其高度同源性又决定了不同的菌株间编码蛋白的主要抗原决定簇的一致性。本文采用的原核表达载体pET32a(+)，含T7启动子和转录终止信号，其特点除了能够编码6个组氨酸残基外，还带有大肠杆菌TrxA基因、TrxA基因编码109个氨基酸的硫氧还蛋白，外源基因经多克隆位点插入后与TrxA一起融合表达，外源蛋白与硫氧还蛋白融合表达不仅提高了表达产物的稳定性，而且由于分子量增大，经SDS-PAGE分析时更容易鉴定。此外，外源蛋白与硫氧还蛋白之间具有肠激酶和凝血酶的识别位点，从而为外源蛋白与硫氧还蛋白的分离也非常方便。这就为重组质粒的表达，提供了高免疫源性的保障。关于重组质粒的表达正在研究之中。

参 考 文 献

[1] Hocking D, Webb E, Radcliff F, et al. Isolation of recombinant protective Helicobacter Pylori antigens[J]. Infect Immun. 1999;67(9):4713-4719.

[2] Blaser M J. Perez-Perez, Kleanthous H, et al. Infection with Helicobacter pylori strain possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach [J]. Cancer Res, 1995;55:2111-2115.

[3] International agency for research on cancer . Schistosomes, liver flukes and Helicobacter Pylori .IARC monographs on the evalution on carcinogenic risks to human. Vo161, Lyon: IASC, 1994.

[4] Pounder RE, Ng D. The prevalence of Helicobacter Pylori infection in different countries[J]. Aliment Pharmacol ther,1995; 9(s) :33-39.

[5] Marta M. Development of a mouse model of Helicobacter pylori. Infection that mimic human disease[J]. science,1995;267: 17.

[6] Tomb JF, White O, kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter Pylori [J]. Nature.1997;388(7):739-747.

[7] Keenan J, Oliaro J, Domigan N, et al. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies Lipoprotien 20 as a Helicobacter Pylori vaccine candidate[J]. Infect Immun, 2000:68(6):3337-3343.

[8] Morgner A, Lehn N, Anderson LP, et al. Helicobacter Pylori ?associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: Complete remission after curing the infection[J]. Gastroenterol, 2000;118(5):821-828.

[9]Konturek PC, Konturek SJ, Starlyska T, et al. Helicobacter Pylori gastric link in MALT lymphoma[J].Aliment Pharmacol Ther. 2000;14(10):1311-1318.

（下转第135页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验研究40例2型糖尿病患者发现其单个核细胞膜上胰岛素受体TPK活性显著低于正常对照组（$P<0.01$）、下降约53%。同其他学者对不同组织细胞的研究结果一致。目前，糖尿病患者胰岛素受体TPK活性降低的原因尚未完全明确。可能与不具有TPK活性的胰岛素受体增加[4]、受体结构的改变[5]、胰岛素受体的磷酸化状态的改变[6]等有关。

胰岛素抵抗（IR）是2型糖尿病的重要特征。本研究发现糖尿病组FBG、FINS均显著高于正常对照组($P<0.01$)，ISI显著低于正常对照组($P<0.01$)，说明本文所选病人高血糖和高胰岛素血症并存，胰岛素敏感性下降，即存在IR。同时直线相关分析发现$[Ca^{2+}]i$与FBG、FINS显著正相关（$r=0.378$，$r=0.361$、P均<0.05），与ISI显著负相关($r=-0.482$，$P<0.05$)。这就提示$[Ca^{2+}]i$的升高与胰岛素抵抗有关。Draznin B等也得出相同结论。胰岛素生理作用的发挥是通过与效应细胞膜上的胰岛素受体结合后发生的，$[Ca^{2-}]i$升高使胰岛素的生物学效应不能正常发挥，可能发生在胰岛素与受体结合水平和/或受体后水平（包括受体自身磷酸化、受体TPK活性激活、各种蛋白底物磷酸化或去磷酸化的级联反应）。曾有学者研究发现胞内$[Ca^{2+}]i$升高对受体结合无影响，表明胞内$[Ca^{2+}]i$升高使效应细胞对胰岛素敏感性下降可能发生在受体后水平。国外大量实验表明胰岛素受体TPK活性降低、引起受体跨膜信号障碍是2型糖尿病发生IR的直接原因。本实验也发现胰岛素受体TPK活性与FBG、FINS显著负相关（$r=-0.311$、$r=-0.294$、P均<0.05），与ISI显著正相关($r=0.387$、$P<0.05$)。提示糖尿病患者胰岛素受体TPK活性降低可影响受体跨膜信号传递、导致胰岛素的生物学效应减弱、发生胰岛素抵抗。本研究还发现，胞内$[Ca^{2+}]i$与受体TPK活性显著负相关（$r=-0.756$，$P<0.05$）。表明胞内Ca^{2+}作为胰岛素受体TPK的调节因子影响受体TPK活性而减弱胰岛素功能发挥，参与胰岛素抵抗的发生。近来、人们发现高血糖时激活细胞蛋白激酶C（PKC）[7]，而PKC的激活改变了胰岛素受体的磷酸化状态，增加胰岛素受体β亚基上的某些Ser/Thr残基的磷酸化。胞内$[Ca^{2+}]i$升高进一步加强PKC的激活。已有实验表明Ser/Thr磷酸化可引起INSR的自身磷酸化减弱和受体TPK活性下降[6]。

综上所述，胞内$[Ca^{2+}]i$的变化在受体TPK介导的胰岛素信号传递中有一定的作用，可能通过影响受体TPK活性而减弱胰岛素功能发挥，参与胰岛素抵抗的发生。

参 考 文 献

[1] Missianen L, Robbrecht W, Vanden Bosch L, et al. Abnormal intracellular (Ca^{2+}) homeostasis and disease[J]. Cell Calcium, 2000;28(1):1-21.

[2] Draznin B, Sussman K E, Eckel R H, et al. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and byperinsulinemia[J]. J Clin Invest, 1988;28:1848-1852.

[3] Draznin B, Lewis D, Hoalder N, et al. Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes[J]. Endocrinology, 1989;125:23541-23549.

[4] Brillon D J, Freidenberg G R, Henry R R, et al. Mechanism of defective insulin receptor kinase activity in NIDDM[J]. Diabetes, 1989;38:397-443.

[5] Mosthaf L, Grako K, Dull T J, et al. Functionally distinct insulin receptors generrated by Tissue-specific alternative splicing[J]. EMBO J, 1990;9:2409-2413.

[6] Shaol, Catalano PM, Yamashita H, et al. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprdo-I overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus(GDM):evidence for increased serine/threonine phosphorylation in preynancy and GDM[J]. Diabetes, 2000;49(4):603-610.

[7] King G L, Banskota N K. Mechanism of diabetic vascular complications[J]. Diabetes, 1995;46:184-189.

（上接第132页）

[10] 罗治彬，徐采朴. 幽门螺杆菌工程免疫苗研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2000;8(4):449-451.

[11]Alm RA, Bina J, Andrews BM, et al. Comparative genomic of Helicobacter pylori: analysis of the outer membrane protein families[J]. Infect Immun, 2000;68(7):4155-4167.

[12] Raymond J, Sauvestre C, Kalach N, et al. Immunoblotting and serology for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000; 19(2):118-121.

[13] Shiesh SJ, Sheu BY, Yang SB, et al. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of Helicobacter pylori is related clinical outcome of Helicobacter pylori infection in Taiwmn[J]. Dig Dis Sci, 2000,45(4):781-788.

[14] 钟 平，吴昆祥，徐帆洪，等. 中国幽门螺杆菌cagA克隆和基因序列分析[J]. 世界华人消化杂志，1999;7(8):669-672.