维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0243-04

幽门螺杆菌低分子质量外膜蛋白编码基因的克隆与重组载体构建

姜 政[1]，蒲 丹[1]，黄爱龙[2]，王丕龙[1]，陶小红[1]
（1. 重庆医科大学临床学院消化内科 重庆 400016；2. 重庆医科大学肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：构建幽门螺杆菌18kDa外膜蛋白编码基因重组载体，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中扩增18kDa外膜蛋白的编码基因片段，将目的基因、pQE30质粒同时经BamHI、HindⅢ双酶切、纯化、连接、转染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Hp18kDa外膜蛋白编码基因，有2%碱基发生变异，以及1.68%氨基酸残基改变。与文献相比,有高度的同源性。结论：Hp外膜蛋白编码基因克隆、重组载体的构建为该基因编码的蛋白质有效表达提供了条件，同时也为疫苗开发和快速诊断试剂盒的制备打下了基础。

【关键词】幽门螺杆菌；外膜蛋白基因；原核表达
【中国图书分类法分类号】R377；Q[812] 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-10-12

The cloning and recombinant vector constructing of lower-weight outer membrane protein encoding gene of Helicobacter pylori

JIANG Zheng, et al
(Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To construct a recombinant vector which could express 18kDa outer membrane protein (OMP) from Helicobacter pylori (Hp), and explore the possibility to obtain the vaccine conferring protection from Hp infection and a diagnostic reagent kit quickly detecting Hp infection. *Methods*: The gene encoding the structural 18kDa outer membrane protein of Hp was amplified from Hp chromosomal DNA by PCR, and inserted in the prokaryotic expression vector pQE30. The recombinant vector was transformed into the Top10 E. coli strain, selected and identified in order to be transformed into DH5 a (PREP4) strain and expressed recombinant protein. *Results*: The gene of 18kDa OMP was amplified to be 528 base pairs, compared with Toom et al reports: 2% of the gene was mutated, 1.68% of amino acid residues was changed, but the homogenicity was about 98% between them. *Conclusion*: This result suggested that recombinant vector expressed 18kDa OMP may be a potential source for the vaccine and diagnostic reagent kit of Hp.

【Key words】Helicobacter pylori; Outer membrane protein gene; Prokaryotic expression

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、消化性溃疡、MALT淋巴瘤和胃癌的发生有密切关系，而且与肠道外疾病也有重要关系[1-4]，并已被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌[5]。Hp在我国普通人群的感染率较高50%～80%，并仍以每年1%～2%速度增加[6]。随着分子生物学技术的发展，幽门螺杆菌致病机理研究的进一步深入，有效抗原的筛选，以及基因工程菌株构建的运用，将预防和根治Hp的感染成为了可能。因此，本实验以Hp特异性基因-18kDa外膜蛋白编码基因，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。

1 材料和方法

1.1 材料

Hp由本校微生物学教研室提供。Top10 菌株和pQE30载体，为本校病毒性肝炎研究所提供。T_4DNA连接酶和限制性内切酶（*Hind* Ⅲ、BgL I和*Bam*H I）购自Promega公司。Taq DNA聚合酶购自北京医科大学免疫教研室。dNTP为上海生工生物工程公司产品。PE-9600型PCR为美国PE公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Hp基因组DNA提取 取1.5ml Hp培养物，以12 000r/min离心2 min。取沉淀，加入567 μl的TE缓冲液中混悬，再加入30 μl 10% SDS和3 μl 20g/L蛋白酶K，于37℃温育1h。

作者介绍：姜 政（1965- ），男，主治医师，博士。
主要研究方向：胃肠疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

依次加入100μl 5 mol/L NaCl 和 80μl 10% SDS，于65℃温育10 min。用酚及酚／氯仿各抽提3次，收集上清液转入EP管中，加入0.6倍于上清液的异丙醇，并以12 000r/min离心15s。取沉淀，加入1ml70%乙醇洗涤，再以12 000r/min 离心5min。弃上清，将沉淀溶于100μl TE中，于-20℃保存备用。

1.2.2 18kDa外膜蛋白编码基因的扩增 根据文献报道[7,8]，经微机分析设计18kDa外膜蛋白基因引物：P1 引物为 5'-CCGGATCCATGAAAAATCAAGTTAAAAA-3'，P2引物为P2'-CCAAGCTTCTACTTTTTAACCATGCCCA-3'，P1引物中引入*Bam*H I酶切位点，P2引物中引入*Hind* III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P1和P2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7min，然后94℃变性50 s，52℃退火45s，72℃延伸50 s，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。

1.2.3 重组载体构建 ①目的基因与载体的连接：将纯化的PCR产物和pQE30，分别以*Hind* III和*Bam*H 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pQE30按4:1（摩尔数）进行连接。反应体系为30μl，即加入目的基因60 ng、pQE30 100ng和T_4 DNA连接酶 3μl，在4℃条件下连接过夜。② 感受态菌Top10的制备：取50μl Top10菌的过夜培养物，加于2 ml的LB培养液中，以300r/min摇荡3h，然后在室温下以10 000r/min离心 2 min。弃上清，加入150μl 100 mmol/L$CaCl_2$混悬，置0℃冰水浴中2h，而后加入连接产物10μl混悬，依次于0℃冰水浴中30 min、42℃水浴中2 min及冰水浴中2 min。加入1ml LB培养液，于37℃孵育30 min；取200μl培养物，涂于LB+氨苄青霉素100 mg/L平皿，于37℃过夜。③ 重组载体的提取：挑选单个菌落，接种于2 ml LB+氨苄青霉素100 mg/L培养液中，于37℃ 以250r/min培养12 h。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 Hp OMP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500～600bp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528 bp。而空白对照管则出现了二聚体。

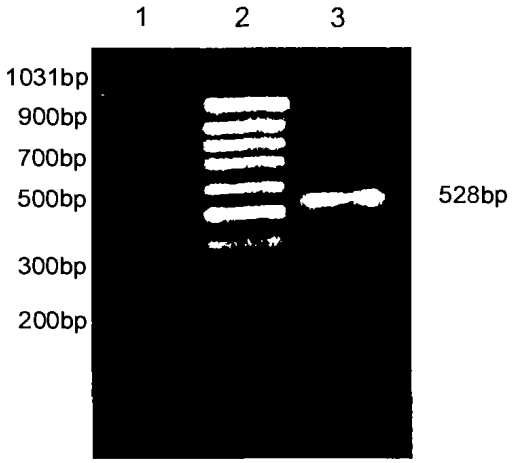


图1 PCR扩增的幽门螺杆菌18kDa外膜蛋白基因1%琼脂糖凝胶电泳

1: 阴性对照; 2: PCR marker; 3: PCR 产物

2.2 PCR筛选重组载体

挑选两个含重组质粒的Top10单菌落进行培养，分别取50μl过夜培养物，煮10 min；离心，取上清2μl作为PCR模板；同时提取重组质粒，分别取2μl作为PCR模板；反应体系25μl，按照上述PCR条件进行PCR扩增，扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，如图2所示。用细菌或从细菌中提取的质粒作为模板都能扩增出一条位于500bp附近的片段，说明质粒中含有目的基因片段。

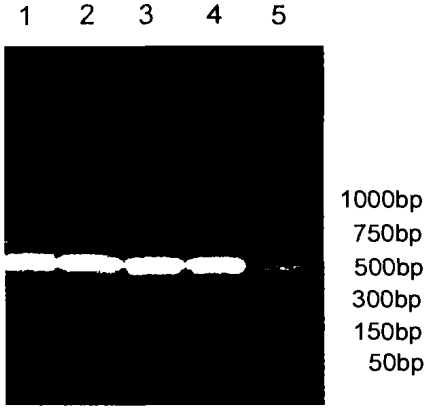


图2 重组载体PCR鉴定

1、2: 以重组载体为模板的PCR产物;

3、4: 以含重组载体Top10菌为模板的PCR产物;

5: PCR Marker

2.3 重组载体的酶切鉴定

用*Bam* H I、*Hind* III分别将重组质粒和质粒pQE30进行单酶切和双酶切，同时进行1%琼脂糖凝胶电泳，如图3所示。重组质粒能够被酶切下一条约为528bp的片段，与实验预想一致。

维普资讯 http://www.cqvip.com

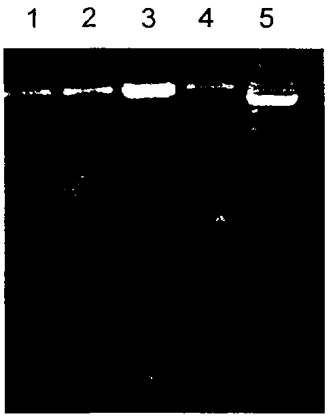


图3 重组载体的酶切鉴定

1: pQE30 质粒/*Hind*III酶切;

2: pQE30质粒/*Hind*III、*Bam* HI双酶切;

3: 重组质粒/*Hind*III、*Bam* HI双酶切;

4: 重组质粒/*Hind*III酶切;

5: 核酸分子marker.

2.4 重组载体的测序

将重组载体以T_5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18kDa外膜蛋白的基因片段，其中有11bp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。其基因和蛋白序列刊在GenBank（其登录号为AF374387)。

3 讨 论

革兰氏阴性杆菌具有不对称的连续的外膜结构，其内为磷脂层，外为糖脂的脂多糖。这种结构对细菌具有双重的作用：既具有诱导宿主产生保护性免疫作用，同时又具有逃避宿主免疫应答作用。外膜蛋白疫苗已证明能诱导保护性免疫，因此，Hp也不例外，目前研究较多的是UreB、VacA、CagA、HspA、HspB、Catalase等，而且，国内外研究发现，将上述基因构建的重组载体在大肠杆菌中表达，纯化的产物单独或联合应用都能使免疫的动物获得不同程度的保护[9,10]。由于VacA、HspA可产生粘膜炎症因子而加重消化道症状，同时有一半的Hp不产生CagA，因此由它们制作的疫苗，在临床应用方面就受到了限制。所以目前的研究工作主要集中在高效的、安全的低分子质量的Hp外膜蛋白的疫苗开发上。

Hp18kDa外膜蛋白属于Hp其他蛋白家簇类[11]。早期研究发现，所有的Hp都表达18kDa外膜蛋白，而且与其他菌群的外膜蛋白无交叉免疫反应，包括螺杆菌、弯曲菌以及其他类的细菌。据初步研究，18kDa外膜蛋白具有特殊的功能结构，是Hp特异性蛋白，不但可作为Hp检测的一种标志性抗原，而且具有免疫原性。文献报道，Hp的低分子量外膜蛋白对胃癌以及胃癌高发人群的筛选具有重要价值[12,13]，用其免疫动物可以获得清除体内Hp或防止Hp感染的作用[8]。因此，本文从实际出发，对Hp18kDa外膜蛋白编码基因进行了克隆，构建了重组载体，为在原核生物的表达创造了条件，同时为快速诊断试剂盒的开发以及疫苗的研究奠定了基础。

与文献报道相比，本实验所构建的重组载体，其目的基因—18kDa外膜蛋白编码基因有2%（11/528）编码碱基发生变异，约1.68%（3/178）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，从而发生了基因的变异。(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），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。pQE30载体属于PDS质粒，带有大肠杆菌T5启动子和转录终止信号，能够编码六个组氨酸残基，外源基因经多克隆位点插入后，表达的蛋白带有一个六聚组氨酸接头，六聚组氨酸接头对表达的蛋白的活性和结构影响非常小，但是对表达的蛋白的纯化具有重要的作用，由于组氨酸的咪唑环能够与金属Ni^{2+}形成螯合物，因此利用Ni-NTA树脂就可以方便地将外源蛋白从细菌蛋白中分离出来。为以后制作ELISA快速诊断试剂盒以及制备安全、高效的疫苗奠定了基础。关于重组质粒的表达正在研究之中。

参 考 文 献

[1] Chan AD, Wong BC, Lam SK. Gastric cancer: Past, Present and future [J]. Can J Gastroenterol, 2001;15(7): 469-474.

[2] Asghar RJ, Parsonnet J. Helicobacter pylori and risk for gastric adenocarcinoma[J]. Semin Gastrointest Dis, 2001;12(3): 203-208.

[3] Morgner A, Lehn N, Anderson LP, et al. Helicobacter

维普资讯 http://www.cqvip.com

Pylori ?associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: Complete remission after curing the infection[J]. Gastroenterology, 2000; 118(5):821-828.

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

[5] Goto 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.

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

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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(6):3581-3590.

[10] Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, et al. Oral immunization with Urease and escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults[J]. Gastroenterol, 1999;116:804-812.

[11] 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.

[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] Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, et al. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues[J]. J Clin Microbiol, 1999;37(3):772-774.

（上接第242页）

胎盘血管发育改变，致使胎盘发育不全，胎儿营养不良[3]。而纯合gp130突变体小鼠胚胎在妊娠12.5天后逐渐死亡[8]。LIF行使功能正是通过与LIF受体及gp130相作用的，这从侧面说明LIF对妊娠维持具有重要意义。本研究提示LIF是维持早期妊娠的重要细胞因子，子宫蜕膜LIF基因表达异常则可能导致妊娠异常，但子宫蜕膜LIF基因表达可否作为临床原因不明习惯性流产（或自然流产）病因诊断的检测指标之一，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Stewart CL, Raspar P, Brunet, LJ, et al. Blastocyst implantation depends on expression of leukemia inhibitory factor [J]. Nature, 1992;359:76-79.

[2] Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, et al. Recombinant human leukemia inhibitory factor enhance the development of preimplantation mouse embryo in vitro[J]. Fertil Steril, 1999;71: 722-725.

[3] Yoshida CL, Taga T, Saito M, et al. Targeted disruption of gp 130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:407-410.

[4] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory facor in human endometrium and placenta[J]. Biol Reprod, 1994;50:882-887.

[5] Okamoto Y, Yusuke H, Yayoik K, et al. A simple quantitative measurement of mRNA of human ? actin by reverse transcription competitive PCR wih a compact digital camera[J]. Biol Pharm Bull, 1997;20(9):1013-1014.

[6] Laird SM, Tuckerman EM, Delton CF, et al. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium:presence in uterine flushings and production by cells in culture[J]. Hum Reprod, 1997;12:569-574.

[7] Cheng LZ, Gearing DP, White LS, et al. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth[J]. Development, 1994;120:3145-3153.

[8] Davis S, Aldrich TH, Stahl N, et al. LIFR and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor[J]. Science, 1993;260:1805-1808.