DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.038
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1332 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1332-04

从包涵体中纯化重组人幽门螺杆菌热休克蛋白A亚单位

王缚鲲,邹全明,张卫军,田文标,杨珺,郭学青,郭 红 (第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种有效的从包涵体中纯化重组人幽门螺杆菌热休克蛋白A亚单位HspA的方法。方法 重组基因工程大肠杆菌发酵后,表达的Hp的HspA包涵体经洗涤、变性、复性,采用Q Sepharose High Performance阴离子交换层析和Superdex 75凝胶过滤层析分离纯化。使用SDS-PAGE和HPLC检测纯度,选用ELISA和动物实验对纯化蛋白的免疫学活性和生物学活性进行鉴定。结果 Hp的HspA包涵体经洗涤和溶解后,Hp的HspA的纯度>60%。包涵体溶解液经阴离子交换层析和凝胶过滤层析后纯度超过95%。Hp的HspA纯品经检测具有良好的免疫学活性和生物学活性。结论 本研究建立的分离纯化方法可从包涵体中获得高纯度的重组HspA蛋白,为进一步的动物实验研究奠定了基础。

关键词:幽门螺杆菌;热休克蛋白;包涵体;蛋白纯化
中图法分类号:R341;R377;R394.3 文献标识码:A

High purification of recombinant *Helicobacter pylori* heats shock protein A from inclusion body

WANG Fu-kun, ZOU Quan-ming, ZHANG Wei-jun, TIAN Wen-biao, YANG Jun, GUO Xue-qing, GUO Hong (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish an effective method for obtaining recombinant *Helicobacter pylori* heat shock protein A (HspA of Hp) with biological activities from inclusion bodies of *E. coli*. **Methods** The inclusion bodies of HspA expressed in *E. coli* were washed, denatured and renatured. The two-step chromatographic procedure (Q Sepharose High Performance ion exchange and Superdex 75 size exclusion) were used for the purification. The purity of the Hp HspA was detected with SDS-PAGE and HPLC. Specific biological activity of the purified Hp HspA was detected with ELISA and animal test. **Results** Hp HspA was confirmed to have a purity of more than 95%, and a high specific biological activity. **Conclusion** The established method provides a sound purification effect for Hp HspA.

Key words: *Helicobacter pylori*; heat shock protein A; inclusion body; protein purification

热休克蛋白(Heat shook protein, Hsp)为幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)共同的抗原成分,分为A(Hp的HspA)、B(HspB)两个亚单位,其中Hp的HspA在幽门螺杆菌亚单位疫苗研究中尤为重要。目前,通过细菌培养获取大量Hp,并从中纯化出足量的亚单位抗原非常困难。因此,我们实验室采用基因工程技术克隆了Hp的HspA的基因,并将其在基因工程菌中以包涵体的形式成功表达[1,2]。本研究在此基础上对Hp的HspA蛋白纯化工艺进行探索。

1 材料与方法

1.1 菌种

Hp的HspA基因工程菌为本室构建,HpSS1、HpATCC11637、HpATCC11639、Hp98037、Hp98036、Hp98027和Hp98016由本室保种。

1.2 发酵培养基

改良M9-CAA由本室研制。

1.3 主要纯化介质(均为Pharmacia公司产品)

Q Sepharose High Performance、Q Sepharose Fast Flow、DEAE Sepharose Fast Flow、Phenyl Sepharose Fast Flow、Octyl Sepharose Fast Flow、Butyl Sepharose Fast Flow和Superdex75。

1.4 主要仪器

德国BIOSTAT C 10 L自控发酵罐、凝胶扫描分析仪、AKTA explorer-100、酶标分析仪和HPLC1100 Series。

1.5 主要试剂

包涵体鉴定液:含1 mg/ml溶菌酶、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris(pH 8.0)。

包涵体洗涤液:含1% Triton X-100、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris(pH 8.0)。

包涵体溶解液:含1 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris、8 mol/L尿素(pH 8.0)。

1.6 包涵体鉴定实验[3~5]

取3 ml细菌培养液离心获菌,然后加入0.5 ml包涵体鉴定液,室温作用15 min后12 000×g离心10 min留上清标本。沉淀用8 mol/L尿素0.5 ml重悬,50 ℃作用15 min后为沉淀标本,将上清标本和沉淀标本作SDS-PAGE电泳。如发现目的蛋白带主要在沉淀标本中,证明目的蛋白是以包涵体形式表达。

1.7 包涵体的分离、洗涤(A级纯化)[3~6]

将高效表达的菌体加入溶菌酶(终浓度为1 mg/ml)4 ℃作用3 h后,超声300 W 30 s间隔30 s共30次。4 ℃经12 000×g离心15 min得包涵体,用包涵体洗涤液按体积比9∶1与之混

基金项目:国家"九五"重点科技攻关项目(96-901-01-54)
作者简介:王缚鲲(1970-),男,河北石家庄市人,硕士,讲师,主要从事临床微生物及免疫学方面的研究,发表论文10篇。电话:(0311)7998422
收稿日期:2001-09-04;修回日期:2002-01-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合, 4 ℃搅拌 15 min, 然后 4 ℃12 000× *g* 离心 15 min 得包涵体, 共洗涤 2 次, 再用不同浓度的尿素以相同方法洗涤包涵体。

1.8　包涵体的溶解

将洗涤后的包涵体与包涵体溶解液按体积比 1∶9 混合, 4 ℃搅拌 3 h 后 30 000× *g* 离心 15 min 取上清。

1.9　上柱前的复性处理[7~9]

采用分步稀释法, 在 4 ℃每 10 min 将包涵体溶解液的尿素浓度降低 1 mol/L, 在尿素浓度降到 2 mol/L 时加入终浓度为 1 mmol/L 的还原型谷胱甘肽和 0.1 mmol/L 的氧化型谷胱甘肽, 作用 12 h。

1.10　B 级纯化

包涵体溶解液复性后, 4 ℃ 30 000× *g* 离心 15 min 取上清, 经 Sartorius 10× 10^3 膜包将尿素置换到 0.1 mol/L 以下。之后选用 Pharmacia 公司 3 种阴离子交换柱, 使用 50 mmol/L Tris 在 pH 7.0、7.5、8.0 三种条件下对 Hp 的 HspA 纯化条件进行摸索, 采用 NaCl 梯度洗脱。

1.11　C 级纯化

在 B 级纯化样本中加入 1 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 或 1~2 mol/L NaCl 后, 选用 Pharmacia 公司 3 种疏水层析柱, 使用 50 mmol/L Tris 缓冲液, 采用梯度洗脱。

使用 50 mmol/L Tris 缓冲液, 采用 Hiload 26/60 Superdex75 柱对 Hp 的 HspA 的 B 级纯化样本进行进一步分离纯化。

1.12　快速银染法

按文献[10]进行。

1.13　ELISA 检测系统

①兔抗 Hp 抗血清吸收实验: 用 *A* 约为 2.0 的 Hp 的 HspA 空载体菌 100 ml 超声 300 W 30 s 间隔 30 s, 共 30 次; 取兔抗 Hp 抗血清 2 ml 分别与以上 Hp 的 HspA 空载体菌超声混合液 8 ml 在恒温震荡器 37 ℃作用 2 h, 之后 14 000× *g* 离心 15 min, 留上清-70 ℃备用。②0.05 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将蛋白稀释至 7 μg/ml。每孔加入 100 μl, 4 ℃包被过夜, 同时用空工程菌、空载体菌超声混合物包被作为阴性对照, Hp 超声混合物作为阳性对照以及设空白对照; 用吸收过的兔抗 Hp 抗血清做一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗血清为二抗做 ELISA。

1.14　Western-blotting

① 家兔的免疫: 1.0 ml Hp 的 HspA 纯品(1 mg)与等体积 CFA 充分乳化后于家兔背部皮下、足多点注射, 间隔 1 周后以同样剂量抗原加等体积 IFA 充分乳化后同法加强免疫, 重复 2 次, 最后以 1.0 ml 无佐剂 Hp 的 HspA 再加强免疫 1 次。从第 4 周开始试血, 双向免疫扩散效价达 1∶16 以上时, 从心脏采血, 分离血清, 分装后-70 ℃保存备用。②Western-blotting: 不同 Hp 菌株、Hp 的 HspA 菌 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 以免疫的兔血清作一抗, 羊抗兔 IgG 作二抗, 按文献[11]进行 Western-blotting。

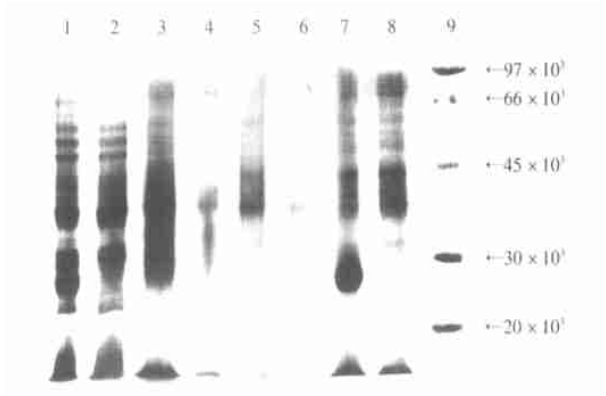
2　结果

2.1　发酵结果

发酵过程中种子菌 10% 接种, 保持 70% 溶氧、温度 37 ℃、pH 7.0, 在 A_{600}未达到 2 时不加补料, 之后每 3 h 流加补料 1 次使葡萄糖、胰化蛋白胨和 8% 酵母抽提物的终浓度分别为 0.5%、0.2%和 0.2%。在第 3 次补料后加入 IPTG 500 μmol/L 诱导 4 h 收菌。收获湿菌量可达 42.0 g/L, Hp 的 HspA 表达率为 38.5%。

2.2　包涵体鉴定、分离、洗涤(A 级纯化)

经包涵体鉴定实验发现 Hp 的 HspA 条带均在沉淀标本中, 证明 Hp 的 HspA 是以包涵体形式表达的。将发酵所得基因工程菌加入溶菌酶能够明显提高超声破菌效果, 革兰染色后油镜下观察, 每个视野内未破菌< 2。包涵体用 pH 8.0 的包涵体洗涤液清洗 2 次(离心上清标本分别记为 Tris1 和 Tris2), 因发现 2 mol/L 尿素可以使包涵体部分溶解, 所以采用 1.5 mol/L 的尿素洗涤 2 次(离心上清标本分别记为 1.5 mol/L 尿素 1 和 1.5 mol/L 尿素 2), 加入包涵体溶解液溶解包涵体, 之后 4 ℃ 30 000× *g* 离心 15 min(上清即为 A 级纯化样本, 沉淀记为 8 mol/L 尿素沉淀标本), 取上清经检测 Hp 的 HspA 纯度大于 60%, 见图 1。



1: Gene Engineering *E. coli* of Hp HspA; 2: Supernatant of supersonics; 3: Tris1; 4. Tris2; 5: 1.5 mol/L Urea1; 6: 1.5 mol/L Urea2; 7: Inclusion body solutein 8 mol/L Urea; 8: Precipitate of 8 mol/L Urea; 9: Protein Marker

图 1　Hp 的 HspA 包涵体分离纯化结果

Fig 1　Results purification of inclusion body

2.3　B 级纯化

使用 50 mmol/L Tris 在 pH 7.0、7.5、8.0 条件下, 分别对 Q Sepharose High Performance、Q Sepharose Fast Flow、DEAE Sepharose Fast Flow 3 种阴离子交换柱进行比较, 发现 Q Sepharose High Performance 对 Hp 的 HspA 纯化效果要优于其它两种填料, pH 7.0、7.5、8.0 3 种条件下纯化效果相似, pH 7.5 时稍好。电导在 15~25 ms/cm 的洗脱峰即为 Hp 的 HspA, 纯度> 85%, 得率约为 75%, 见图 2。

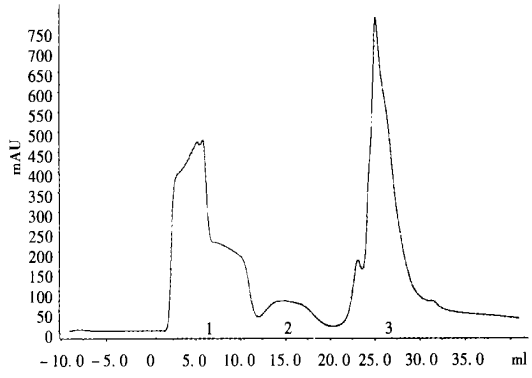


图 2　Hp 的 HspA Q Sepharose High Performance 层析峰形图

Fig 2　High performance chromatogram of Hp HspA with Q Sepharose (Peak 3 is Hp HspA)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 C级纯化

2.4.1 疏水层析 在Hp的HspA的B级纯化样本中加入1 mol/L $(NH_4)_2SO_4$和2 mol/L NaCl后，都出现了肉眼可见的沉淀，经SDS-PAGE电泳发现沉淀中含有目的蛋白，且上清不能被Phenyl Sepharose Fast Flow、Octyl Sepharose Fast Flow、Butyl Fast Flow任何一种疏水层析填料所吸附，流穿无明显纯化效果。

2.4.2 凝胶过滤 Hp的HspA采用Superdex75柱分离纯化效果良好，纯度高于95%，得率> 60%，见图3。

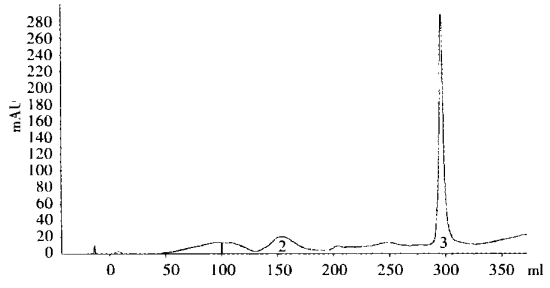
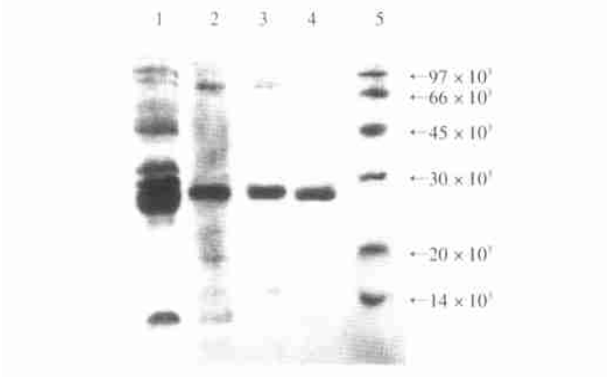


图3 Hp的HspA Superdex75层析峰形图

Fig 3 Filtration chromatogram of Hp HspA with Superdex 75 gel (Peak 3 is Hp HspA)

2.5 纯度分析结果

2.5.1 凝胶银染结果 采用快速银染法，将Hp的HspA菌A、B、C级纯化标本SDS-PAGE电泳凝胶染色，用凝胶扫描分析仪分析纯度。A、B、C级标本纯度分别大于60%、85%、95%，见图4。



1: Hp HspA from gene engineered *E. coli*; 2: Purified product of level A; 3: Purified product of level B; 4: Purified product of level C; 5: Protein marker

图4 Hp的HspA的各级纯化标本银染结果

Fig 4 SDS-PAGE of every stages in the purification of Hp HspA

2.5.2 HPLC结果 经HPLC检测Hp的HspAC级标本纯度分别为95.7%。

2.6 产物的免疫学鉴定

2.6.1 ELISA Hp的HspA菌超声混合液、A级、B级及C级纯化样品均能和吸收后的兔抗Hp抗体发生阳性反应，且反应强度随样品纯度增高有递增趋势。

2.6.2 Westem-blotting 在不同Hp菌株Hp的HspA相应分子量处出现单一显色条带。

3 讨论

通过研究，我们确定了基因工程菌较为合适的培养条件，达到了高密度、高表达发酵。之后通过研究证明了Hp的HspA为包涵体表达[3, 11]。包涵体的纯化包括工程菌的破碎和包涵体的洗涤、溶解过程。我们将溶菌酶的加入和超声相配合，取得了良好的破菌效果，并通过摸索确定了先用自配包涵体洗涤液洗涤2次，再用1.5 mol/L的尿素洗涤2次的包涵体洗涤方法。溶解后的包涵体经检测Hp的HspA纯度大于60%。

在采用分步稀释法将目的蛋白复性后，我们首选的色谱分离技术为吸附色谱方法，以便在分离纯化的同时，将样品浓缩，利于进一步的纯化[11, 12]。由于Hp的HspA的等电点为6.1，包涵体溶解液的pH为8.0，因此我们首先选择阴离子交换层析，选用Tris缓冲液，填料选择3种阴离子交换柱进行比较。实验发现Q Sepharose High Performance对Hp的HspA纯化效果最优，pH 7.0、7.5、8.0 3种条件下纯化效果相似，pH 7.5时稍好。

在C级纯化时我们首先选择疏水层析进行摸索。疏水层析高盐吸附低盐洗脱的特性非常适合与离子交换层析纯化步骤衔接。在Hp的HspA的B级纯化样本中加入1 mol/L $(NH_4)_2SO_4$和2 mol/L NaCl后，都出现了肉眼可见的沉淀，经SDS-PAGE电泳发现沉淀中含有目的蛋白，且上清不能被疏水层析填料所吸附，流穿也无明显纯化效果，所以Hp的HspA的C级纯化只能选择其它方法。Hp的HspA的B级纯化样本做SDS-PAGE电泳，发现目的蛋白条带附近无杂蛋白条带，杂蛋白以小分子量蛋白和大分子量蛋白为主，所以决定采用凝胶过滤做C级纯化，由于Superdex75的分离范围在(3~70)× 10^3，而Hp的HspA的分子量为26 × 10^3，所以选择Superdex75柱做C级纯化，实验证明分离纯化效果良好。

在蛋白纯化过程中如果最终纯化样品失去了生物学活性，即使纯度再高，工艺也是失败的[9, 10, 12]。我们在纯化过程中始终坚持这一原则，建立了ELISA方法，通过检测纯化产品与相应抗体的免疫反应情况来检测其免疫反应性。结果发现Hp的HspA菌超声混合液、A级、B级及C级纯化样品均能和吸收后的兔抗Hp抗体发生阳性反应，且反应强度随样品纯度增高有递增趋势。原因是我们包被蛋白总量是固定的，其中Hp的HspA含量随纯度的增加而增加，因而免疫反应也增强了。在得到Hp的HspA纯品后，注射免疫家兔以检测其免疫原性，取抗血清作一抗，以羊抗兔IgG为二抗做Western-blotting，结果发现在不同Hp菌Hp的HspA相应分子量处出现单一显色条带。从而证明我们所获得的纯品具有良好的免疫原性，能够作为有效亚单位蛋白用于Hp疫苗的动物实验研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] 郭学青，邹全明. 重组幽门螺杆菌热休克蛋白 A 亚单位在大肠杆菌中的表达及免疫学分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2000，20(3)：192－194.
[2] 郭学青，邹全明，张卫军. 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 亚单位的基因克隆及序列分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2000，20(3)：199－201.
[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 156－257.
[4] 范 慧，莫晓宁，张颖妹，等. 人重组粒细胞集落刺激因子突变体 rhG-CSF-Ala-17 的纯化及部分理化性质[J]. 北京医科大学学报，2000，32(4)：337－339.
[5] Sunitha K, Chung B H, Jang K H, *et al*. Refolding and purification of Zymomonas mobilis levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(3): 388－393.
[6] Lajmi A R, Wallace T R, Shin J A. Short, hydrophobic, alanine-based proteins based on the basic region/leucine zipper protein motif: overcoming inclusion body formation and protein aggregation during overexpression, purification, and renaturation[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(3): 394－403.
[7] Cho W K, Sohn U, Kwak J W. Production and in vitro refolding of a single-chain antibody specific for human plasma apolipoprotein A-I[J]. J Biotechnol, 2000, 77(2－3): 169－178.
[8] 晓 梅. 包涵体蛋白的复性技术[J]. 国外医学：临床生化与检验学分册，2000，21(2)：98－99.
[9] Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R, *et al*. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(2): 182－192.
[10] 颜子颖，王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 363－369.
[11] D. R. 马歇克，J. T. 门永，R. R. 布格斯，等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 160－161.
[12] Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky P F, *et al*. Escherichia coli expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2): 279－285.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)11-1335-01

个案与短篇

宫内外同时妊娠 3 例

Three cases report of heterotopic pregnancy

龙 玲，王 琳 （第三军医大学附属西南医院妇产科，重庆 40038）

例 1，患者 26 岁，停经 46 d，下腹剧痛 6 h 于 1991 年 6 月 30 日入院，查尿 HCG 阳性，B 超提示：宫内未见胚囊，子宫直肠窝液性暗区 3.2 cm×4.1 cm，左附件 3.2 cm×2.1 cm 不均质回声，查下腹压痛，反跳痛，以左侧为重，考虑宫外孕，立即行剖腹探查术，术中见腹腔积血 800 ml，左输卵管壶腹部妊娠流产，行左输卵管部份切除术，术后 6 d 患者仍感恶心，未引起重视，术后 4 个月一直未来月经，因感到胎动到医院就诊，诊断为中期孕，行引产术。

例 2，患者 32 岁，停经 43 d，下腹痛 1 d 多，于 1995 年 4 月入院，诊断为“宫外孕”即行剖腹探查术，术中见“右输卵管壶腹部妊娠破裂”，腹腔积血 1 200 ml，行右输卵管部份切除术，术后仍感恶心，呕吐，于术后第 5 天行 B 超，提示宫内妊娠，随即行人工流产术。

例 3，患者，24 岁，人流术后 9 d，下腹痛 2 d 入院，于 2001 年 10 月入院，9 d 前因停经 42 d，B 超提示“宫内早孕”，在我院门诊行人工流产术，吸出物见绒毛组织，2 d 前出现下腹疼痛伴肛门坠胀，后穹窿穿刺抽出不凝血 3 ml，考虑右输卵管妊娠，急诊手术，术中见腹腔积血 400 ml，诊断为右输卵管壶腹部妊娠流产，行右输卵管部份切除术，术后病理诊断：右输卵管壶腹部妊娠。

讨论

宫内外同时妊娠（Heterotopic pregnancy，HP）是指宫腔内妊娠与异位妊娠同时存在的一种病理妊娠性疾病，可能是双卵双胎分别位于宫内和宫外，也可能是先后发生于宫内和宫外的两次间隔很近的妊娠。国外报道其发生率为 1/10 000 次妊娠[1]。HP 的发生与慢性输卵管炎、促排卵药物的使用，辅助生殖技术的开展有关[2]。HP 的临床表现兼有宫腔内妊娠及异位妊娠的特征，又由于有宫腔内妊娠的存在，使得一些在单纯异位妊娠中常用的辅助检查不适用于 HP 的诊断，如β-HCG 的动态观察、诊断性刮宫等。B 超检查及腹腔镜检查或手术检查是目前诊断 HP 的主要手段，最后确诊取决于病理学证据。HP 由于发生率低，容易漏诊和误诊，尤其是已行宫外孕手术后，容易忽略其宫内妊娠。第 1 例患者在术后 5 d 出现的明显胃肠道反应，未引起重视，以致术后 4 月患者感胎动后才到医院行引产术。第 2 例患者宫外孕术后又出现早孕反应症状，立即行 B 超检查，发现了同时存在的早孕，立即行人工流产术。第 3 例患者因早孕行人流术后出现腹痛，最初考虑是否有子宫穿孔，术中证实为合并异位妊娠。因此在临床工作中有必要提高对本病的认识，做到早期诊断，及时处理，密切随诊。有怀疑时可行腹腔镜检查确诊，同时行镜下手术治疗。

关键词：异位妊娠；宫内外同时妊娠
中图法分类号：R714.22 文献标识码：B

参考文献：

[1] Reece E A, Petrie R H, Sivmans M F, *et al*. Combired intrauterine and extrauterine gestations: a review[J]. Am J Obstet Gynecol, 1983, 146(3) 323.
[2] 姚书忠，庄广伦，周灿权. 体外受精-胚胎移植后宫内外同时妊娠 3 例报道[J]. 中山医科大学学报，1997，18(4)：313

（编辑 张大春）

作者简介：龙 玲(1965－)，女，重庆市人，主管护师。电话：(023)68754412
收稿日期：2002-01-30；修回日期：2002-04-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net