DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.009
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
644 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0644-03

# 大肠杆菌LTB与幽门螺杆菌HSPA融合表达载体的构建与表达

郭 红[1],邹全明[2],赵晓晏[1],吴 超[2],毛旭虎[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院消化内科,重庆 400037;[2]医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的包涵体形式融合表达载体。方法 PCR扩增LtB基因,并在其5'端去掉信号肽,3'端去掉终止子,引入编码YPQD接头,通过*Pst*I+*BamH*I酶切位点重组于PinPoint™ Xa-III载体上,转化*E. coli* JM109,SDS-PAGE及Western-blot分析其表达。结果 成功构建了LTB融合表达质粒,并将幽门螺杆菌热休克蛋白A亚单位与之融合获得了表达。结论 LTB融合表达载体的成功构建为研究分子内粘膜佐剂特性奠定了基础。

关键词:不耐热肠毒素B亚单位;融合表达;载体
中图法分类号:R377;R378.21;R394-33 文献标识码:A

# Construction and expression of fusion expression vector of *Escherichia coli* LTB and *Helicobacter pylori* HSPA

GUO Hong, ZOU Quan-ming, ZHAO Xiao-yan, WU Chao, MAO Xu-hu (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To construct a fusion expression vector of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit. Methods Gene encoding LtB without signal peptide and stop codon was added to the linker TAPI by PCR. It was cloned into PinPoint™ Xa-III with *Pst*I and *BamH*I sites. The recombinant plasmid was transfected in *E. coli* JM109. The expression of LTB was analysed by SDS-PAGE and Western-blot. Results The fusion expression plasmid was successfully constructed. The subunit A of heat shock protein of *Helicobacter pylori* was fused with LTB and expressed, and display both the ability of binding $GM_1$ and the immunogenicity with polyclonal antibodies against *H. Pylori*. Conclusion The vector founds a basis for the study of intramolecular adjuvant.

**Key words:** subunit B of heat labile enterotoxin; fusion expression; vector

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)是由1个A亚单位(LTA)和5个B亚单位(LTB)组成,其中A亚单位具有GTP依赖的ADP-核糖基转移酶活性,通过G蛋白介导的ADP-核糖基化反应破坏胞内cAMP的降解与平衡,刺激cAMP水平升高,从而引发毒素效应;B亚单位具有与真核细胞表面的$GM_1$-神经节苷脂受体特异性结合的能力,以利于A亚单位进入靶细胞。LTA、B亚单位均在胞浆合成携带信号肽前体,切下21个氨基酸残基的信号肽后形成分子量约$11.8\times10^3$的成熟单体分子分泌到胞周质与A亚单位按A∶B=1∶5比例组装成寡六聚体的LT全毒素分子。LT不仅是强烈的免疫原,也是一种强有力的粘膜免疫佐剂[1],但本身强烈的肠毒性限制了它在临床的推广和应用;LTB亚单位以其无毒性和具有良好的辅佐功能而成为研究的热点。为了使LTB能与各种外源抗原基因融合表达分子内佐剂疫苗,我们构建了与LTB羧基末端融合表达的载体pLV2.0,以分泌蛋白的形式表达,但存在表达量不高和容易被降解等问题,本研究构建了以包涵体形式表达的LTB羧基末端融合表达的载体pPLtB,并用它成功地表达了LTB与幽门螺杆菌热休克蛋白A亚单位的融合蛋白。

基金项目:国家"九五"重点科技攻关课题(96-901-01-54);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98D004)
作者简介:郭 红(1971-),女,湖南省湘潭市人,硕士研究生,医师,主要从事幽门螺杆菌方面的研究。电话:(023)68755604
收稿日期:2001-02-08;修回日期:2001-04-16

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 JM109 *E. coli*本室保种,PinPoint™ Xa-III为Promega公司产品,ltB基因来自含有lt基因的质粒pFS2.2[2](由Schodel F博士惠赠);幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)标准株NCTC11637购自中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所。

1.1.2 工具酶 各种限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、$T_4$ DNA连接酶小牛肠碱性磷酸酶均购自华美生物工程公司;IPTG、$GM_1$神经节苷脂为Sigma产品,其它化学试剂均为分析纯。

兔抗LT多抗血清购自上海市卫生防疫站,兔抗Hp多抗血清本室制备,羊抗兔HRP酶标二抗,PCR Marker以及蛋白分子量标准购自华美公司和Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA、质粒提取、DNA片段回收纯化 采用上海Sangon公司UNIQ10小量质粒抽提kits和Silver Beads胶回收kits,按操作说明进行。

1.2.2 PCR根据Genbank公布的hLT基因序列[3],设计了两条引物分别为:上游引物5' ATCTGCAGGGAGTTACTCACATGG-

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

CTCCCCAGTCTATTAC 3', 下游引物 5' CGCGGATCCATCCTGAGGGTAGTTTT 3'。上游引物位于 LTB DNA 序列 ATG 下游 64 bp 位置, 下游引物位于 LTB 3' 端终止子前面部分序列, 同时引入 *Pst*I 和 *BamH*I 酶切位点, 并在 LTB 最后一氨基酸(Asn)残基密码子 AAC 与 *BamH*I 酶切位点之间设计增加了编码 Tyr-Pro-Gln-Asp 的 12 个核苷酸。以含有 ltB 基因的质粒 pFs2.2 为模板进行 PCR 扩增。

根据 Genbank 公布的幽门螺杆菌 hspA 基因序列, 设计了 2 条引物分别为: 上游引物 5' GCGGATCCAAGTTTCAACCATTAGG 3', 下游引物 5' GCGATATCACAGCGTCATGGAGTTT 3'。下游引物是以 hspA 终止密码子后 100 bp 处的一段序列做的模板设计的, 由于靠近终止密码子的碱基含有多个的重复, 对 PCR 和引物设计造成不便所致。以幽门螺杆菌 NCTC11637 基因组 DNA 为模板。

分别以含有 ltBDNA 的质粒 pFS2.2 和幽门螺杆菌 NCTC11637 基因组 DNA 为模板, 按常规 PCR 条件进行扩增。反应条件: 94 ℃预变性 5 min, 加入 Taq DNA 聚合酶, 然后按如下参数循环: 94 ℃, 1 min, 55 ℃, 1 min, 72 ℃, 1 min, 最后一个循环结束后 72 ℃反应 5 min。

1.2.3　DNA 酶切反应、连接、转化　　按文献[4]进行。

1.2.4　SDS-DAGE 和 Western-blot　　采用 Bio-Rad 电泳系统, 5%浓缩胶, 12%分离胶, TAE 电泳缓冲液。电泳完后, 一部分考马斯亮蓝染色, UVP 扫描; 另一部分电转移(40 mA, 3 h)至硝酸纤维膜上, TTBS(100 mmol/L Tris·Cl, pH 7.5; 0.9%NaCl 的 TBS; 内含 0.1%Tween 20)封闭, 4 ℃过夜; 加入一抗, 37 ℃温育 1 h, TTBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 再加入酶标二抗, 37 ℃ 30 min, TTBS 洗 3 遍, 最后加入底物显色。

1.2.5　DNA 序列分析　　采用双脱氧法, 由上海 Sangon 公司完成。

1.2.6　$GM_1$-ELISA　　以 $GM_1$ 神经节苷脂包被聚乙烯塑料板, 4 ℃过夜, 加入细菌沉淀包涵体, 37 ℃, 30 min; 洗涤液洗 3 次, 10 min/次; 加入抗 LT 多抗血清, 37 ℃, 30 min; 洗 3 次; 加底物显色。

## 2　结果

### 2.1　PCR 扩增 LtB 和 hspA 基因

扩增产物经 1%的琼脂糖电泳鉴定, 分别得到了一条长约 330 bp 的 LtB 和约 470 bp 的 hspADNA 扩增产物, 见图 1。

### 2.2　LTB 基因的克隆及融合表达质粒的构建

PCR 产物经 *Pst*I+ *BamH*I 双酶切并纯化后与同样 *Pst*I+ *BamH*I 双酶切的 PinPoint$^{TM}$Xa-Ⅲ载体相连接, 构建 LTB 融合表达质粒 pPltB, 见图 2, 转化 JM109, 氨苄青霉素抗性 LB 平板筛选, 采用 *Pst*I 单酶切, *Pst*I 和 *BamH*I 双酶切鉴定阳性重组子。取阳性克隆经全自动测序仪进行序列分析, LTB 基因与 Genbank 报道的相比, 有 0.9%(3/330bp)的编码碱基出现差异, 由于氨基酸简并性的存在, 仅有 0.9%(1/110)的氨基酸序列不同, 为缬氨酸 Val-74 变为苏氨酸 Thr-74, 同源性高达 99.09%。

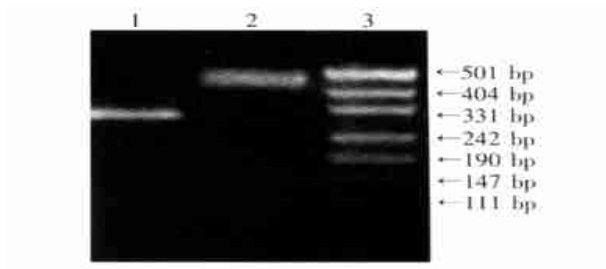



图 1　琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

**Fig 1　Analysis of the PCR product by DNA agarose gel electrophoresis**

1: Product of LtB PCR; 2: Product of hspA PCR; 3: PCR marker

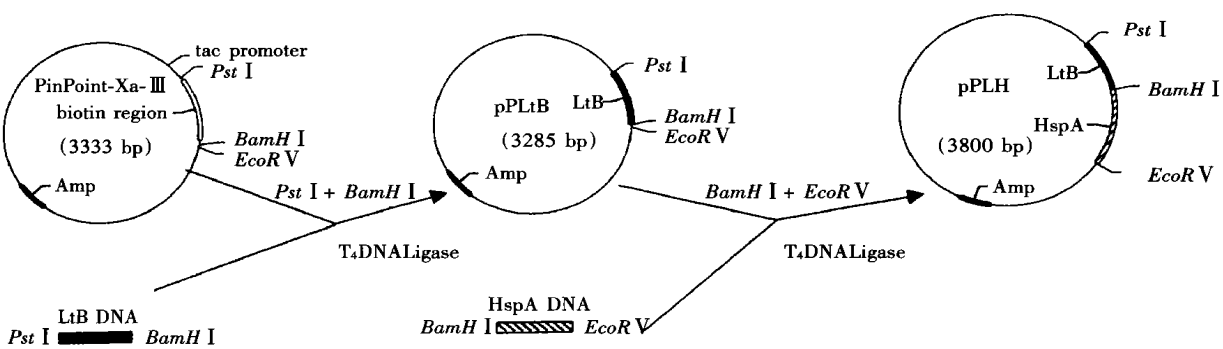



图 2　重组质粒 pPLH 的构建示意图

**Fig 2　Scheme of the construction of the recombinant plasmid pPLH**

### 2.3　融合表达质粒在 *E. coli* JM109 中的表达

pPltB 转化 *E. coli* JM109 IPTG 诱导, 收集细菌沉淀, 包涵体沉淀经 $GM_1$-ELISA 检测结果表明重组菌以包涵体形式表达了能与 $GM_1$ 结合的蛋白, 经 SDS-PAGE, 再转移至硝酸纤维膜上, 免疫印迹亦证实了 LTB 在 JM109 中的表达, 如图 3, 估计其分子量大小约 $12\times10^3$, 与成熟的 LTB 单体分子理论上估计的大小基本一致。

### 2.4　LTB-HspA 的融合表达

将扩增的 hspA 基因片段与同样用 *BamH*I+ *EcoR* V 酶切的 pPltB 连接, 构建 ltB-hspA 的重组质粒 pPLH, 如图 2。同样的, 转化 *E. coli* JM109, IPTG 诱导, SDS-PAGE, 如图 4, 以兔抗 Hp 多抗血清和兔抗 LT 多抗血清作免疫印迹证实在分子量约 $24\times10^3$ 位置表达了与抗 Hp 和抗 LT 抗体反应的重组蛋白。$GM_1$-ELISA 亦证明重组蛋白具有与 $GM_1$ 结合的能力。

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

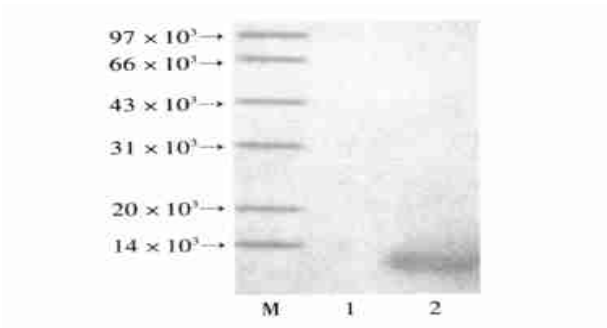



图 3 大肠杆菌 LtB 重组蛋白质的免疫印迹分析
(兔抗 LT 多抗血清作一抗检测)
M: Marker; 1: 诱导前重组菌; 2: 诱导 5 h 后重组菌
**Fig 3 Western blotting of recombinant LtB protein**
M: Protein marker; 1: Recombinant cells before induction; 2: Recombinant cells 5 h after induction with IPTG

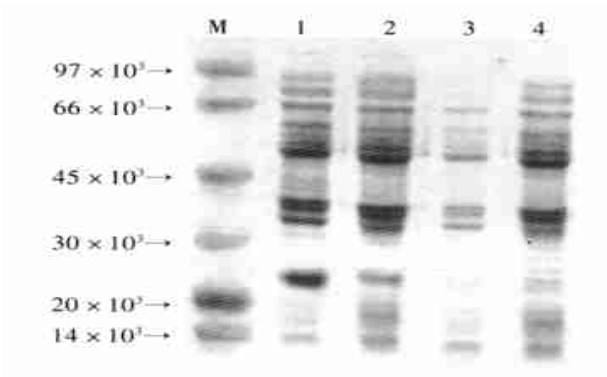



图 4 LtB-HspA 融合蛋白表达产物 SDS-PAGE 分析
**Fig 4 Analysis of expression product of recombinant LtB-HspA fusion protein in *E. coli* JM109 by SDS-PAGE**
M: Molecular weight marker; 1: *E. coli* JM109/pPLH after induction with IPTG; 2: *E. coli* JM109/pPLH before induction; 3: *E. coli* JM109/PinPoint™ Xa-Ⅲ after induction with IPTG; 4: *E. coli* JM109/PinPoint™ Xa-Ⅲ before induction

## 3 讨论

LTB 亚单位既缺乏 LT 全毒素分子的毒性, 又保留了粘膜免疫佐剂的作用, 故研究者们选用它作为口服疫苗的粘膜免疫佐剂。Weltzin 等[5] 将重组 LTB 作为佐剂与尿素酶共同免疫小鼠, 发现可产生特异性的血清抗尿素酶 IgG1 和 IgG2a 以及唾液中的抗尿素酶 IgA, 以及对 Hp 的保护性免疫。Rask 等[6] 将重组 LTB 作为佐剂与人丙种球蛋白(HGG)共同免疫后, 发现 LTB 可提高抗原的粘膜免疫原性, 还能介导针对它的体液和粘膜 B 细胞和 T 细胞的长期记忆反应。Jobling 等[7] 利用 LTB 基因与肺炎链球菌表面蛋白 A(PSPA)的基因融合表达了具有免疫活性的重组蛋白。由于 LTB 不易获得, 故我们设计并构建了能使 LTB 与多种外源抗原(表位)基因融合并以包涵体形式表达的 LTB 通用融合表达载体 pPLtB。该质粒具有如下特点: ①利用了高效表达载体 PinPoint™ Xa-Ⅲ的强大、可调节启动子、核糖体位点和转录终止子, 去掉了其本身的担体蛋白部分; ②去掉了 ltB 的信号肽部分以使外源蛋白以包涵体形式表达; ③去掉了 LTB 自身的终止子, 在其后引入了多个专一限制性酶切的多克隆位点; ④在 LTB 与被融合蛋白之间设计了 4 个氨基酸 YPQD 的接头(Linker), 目的是干扰 α-螺旋的形成以最大保持 LTB 与被融合蛋白二者的天然构象。

人幽门螺杆菌为上消化道疾病的重要致病菌, 与 B 型(胃窦)胃炎, 消化性溃疡, 胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤以及胃癌发生等密切相关, WHO 已将其列为一级致癌物质[8]。热休克蛋白 A 亚单位(HspA)为所有 Hp 共同的且有效的抗原成分, 作为疫苗免疫动物已取得良好的免疫预防和治疗效果, 以 Hsp 为抗原的疫苗可使 70% ~ 80% 试验小鼠获得保护[9]。以构建的 pPLtB 载体, 选择多克隆位点中的 *BamH* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅴ酶切位点, 融合幽门螺杆菌热休克蛋白 A 亚单位全长基因, 构建了 Hp hspA 的分子内佐剂疫苗, $GM_1$-ELISA 及 Western-blot 证实了其表达。因此, 此融合表达载体的成功构建为研究以 LTB 作分子内佐剂之疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] Rollwagen F M, Pacheco N D, Clements J D, *et al*. Killed *Campylobacter elicits* immune response and protection when administered with an oral adjuvant[J]. Vaccine, 1993, 11(3): 1 316—1 320.
[2] Schodel F, Will H. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes[J]. Infect Immun, 1989, 57(4): 1 347—1 350.
[3] Tamura S, Yamanaka A, Shimohara M, *et al*. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as adjuvant for nasal influenza vaccine[J]. Vaccine, 1994, 12(12): 1 083—1 089.
[4] 丁·萨姆布鲁克, EF·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 34—55.
[5] Weltzin R, Guy B, Thomas W D Jr, *et al*. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2 775—2 782.
[6] Rask C, Fredriksson M, Lindblad M, *et al*. Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co-administration with free toxin as adjuvant[J]. APMIS, 2000, 108(3): 178—186.
[7] Jobling M G, Palmer L M, Erbe J L, *et al*. Construction and characterization of versatile cloning vectors for the efficient delivery of native foreign proteins to the periplasm of *Escherichia coli*[J]. Plasmid, 1997, 38(3): 158—173.
[8] Murray C J L, Lopez A D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020-global burden of disease study[J]. Lancet, 1997, 349(9 064): 1 498—1 504.
[9] Marchetti M, Arico B, Burroni D, *et al*. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease[J]. Science, 1995, 267(5 204): 1 655—1 658

(编辑 王 红)

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