

· 论 著 ·

幽门螺杆菌重组 1188 蛋白的表达*

韩 飞¹, 杨致邦²

(1. 重庆三峡中心医院微生物免疫科, 万州 404000; 2. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室 400016)

摘要:目的 表达幽门螺杆菌(*H. pylori*)重组 1188 蛋白,为研究幽门螺杆菌的黏附机制奠定基础。方法 用聚合酶链反应(PCR)技术从 *H. pylori* 标准株 NCTC 11637 的基因组 DNA 中扩增 hp1188 基因片段,插入原核表达载体 pQE-30,构建重组载体 pQE30-hp1188,经 DNA 测序分析确认后,转化大肠杆菌 DH_{5α},异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达。Ni²⁺-NTA 树脂纯化表达蛋白,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表达形式和表达量。结果 重组表达质粒 pQE30-hp1188 构建成功,所得序列完整,插入的基因片段全长 810 bp,与基因文库中的 hp1188 基因同源性达 98%。SDS-PAGE 显示表达产物相对分子质量约为 30.6 kD,与预期一致,蛋白表达量占全菌总蛋白的 47%,上清液和沉淀中均有表达,重组蛋白纯化后纯度达 90%以上。结论 成功克隆 hp1188 基因,并在大肠杆菌 DH_{5α} 中获得高效表达。

关键词:螺杆菌,幽门;hp1188 基因;克隆;表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.03.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)03-0218-03

Expression of recombinant *Helicobacter pylori* 1188 protein*Han Fei¹, Yang Zhibang²

(1. Department of Microbiology and Immunology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China;

2. Department of Pathobiology of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To express the recombinant *Helicobacter pylori* 1188 protein in order to lay a foundation for the study on its adhesion. **Methods** The hp1188 gene was amplified from chromosomal DNA of strain NCTC 11637 by PCR. The PCR product was inserted into the expression vector pQE-30. And the recombinant vector pQE30-hp1188 was identified by DNA sequencing and transformed to *E. coli* DH_{5α} for expression under IPTG induction. The recombinant protein was purified by Ni²⁺-NTA agarose and identified by SDS-PAGE. **Results** The recombinant expression vectors pQE30-hp1188 was successfully constructed. It was found that the total length of gene cloned was 810 bp with 98% sequence homology with hp1188 genes in GenBank. The molecular weight of its expression products was found to be about 30.6 kD as determined by SDS-PAGE, the percentage of expression was about 47% of total cell proteins, and the supernatant and pellet had both expressed. Its purity was over 90% after purified with Ni²⁺-NTA agarose. **Conclusion** hp1188 gene is successfully cloned and highly expressed in *E. coli* DH_{5α}.

Key words: helicobacter pylori; hp1188 gene; clone; expression

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌和黏膜相关性淋巴瘤组织淋巴瘤密切相关,被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌^[1-2]。目前,关于 *H. pylori* 的致病机制尚不明了,但 *H. pylori* 必须首先定植于人胃黏膜才能进一步发挥其致病作用,而黏附是 *H. pylori* 定植在胃黏膜表面的前提。决定 *H. pylori* 黏附的因素包括动力、尿素酶和黏附素。黏附素是 *H. pylori* 黏附的物质基础。目前国内外文献报道的 *H. pylori* 黏附素较多^[3-6],其中已经证实的有 HpA、AlpA、AlpB、BabA 和 HopZ,尚有 SabA、OipA 等仍待确认^[7]。2005 年 Rubinsztein-Dunlop 等^[8]利用一种新方法即镍珠模型筛选出一种新的蛋白 1188,该蛋白存在于 *H. pylori* 细菌表面,表达量很高,并与黏附有关。Rubinsztein-Dunlop 等^[8]研究发现编码该蛋白的 hp1188 基因为 *H. pylori* 所特有,且相当保守,与已知的黏附素序列无同源性。本实验根据基因文库中提供的 hp1188 序列,以标准菌株 *H. pylori* NCTC 11637 基因组为模板,利用基因工程技术克隆和表达重组 hp1188 蛋白,为进一步研究 *H. pylori*

感染的黏附机制、防治 *H. pylori* 感染奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒 *H. pylori* 标准菌株 NCTC 11637 由重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室保存,大肠杆菌 DH_{5α} 菌株和 pQE-30 质粒均为重庆三峡中心医院微生物免疫科保存。

1.2 试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物公司,质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司,胶回收试剂盒为上海华舜公司产品,聚合酶链反应(PCR)试剂盒、蛋白质 Marker 为 Fermentas 公司产品,DL-2000 DNA Marker、T4 连接酶试剂盒、限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho*I)购自 Takara 公司, Ni²⁺-NTA 层析柱为 Invitrogen 产品,琼脂糖、IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R250 均为 Sigma 公司产品。

1.3 *H. pylori* 菌株的获取 将 *H. pylori* 标准菌株 NCTC 11637 接种于 7% 羊血琼脂平板上,用产气袋法形成微需氧环境,37℃ 培养 3~4 d 后,挑取可疑菌落按常规方法鉴定,确认

* 基金项目:重庆市教委项目(渝教科 2003-7-3);重庆市科委攻关项目(CSTC,2005EA5020)。

后传代培养。

1.4 *H. pylori* 基因组 DNA 的提取 从固体培养基上刮取生长良好的菌落,按细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书提取 *H. pylori* 基因组 DNA。

1.5 引物设计及合成 根据 GeneBank 公布的 hp1188 基因序列(GeneID:899950),利用 Premier Premier5.0 软件设计引物,引物序列为 P1: 5'-CGC-CTCGAG-ATGAAGAGAGT-TAGAGAA-3'(引入 *Xho* I 酶切位点),P2: 5'-CCC-GGA TCC-TCA GCA AAT ATT TTT T-3'(引入 *Bam*H I 酶切位点)。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.6 hp1188 基因的 PCR 扩增 以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,47 °C 30 s,72 °C 58 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增片段经终浓度 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳纯化切胶回收。

1.7 重组质粒 pQE30-hp1188 的构建 参照文献[9]方法,将质粒 pQE-30 和纯化回收的 hp1188 基因片段分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收酶切片段,在 T4 连接酶试剂盒作用下 16 °C 连接 6 h。将连接产物转化大肠杆菌 DH₅ α ,氨苄抗性筛选阳性重组子,抽提质粒,经 PCR 和双酶切鉴定,筛选出阳性克隆,并送上海英骏生物科技有限公司测序。

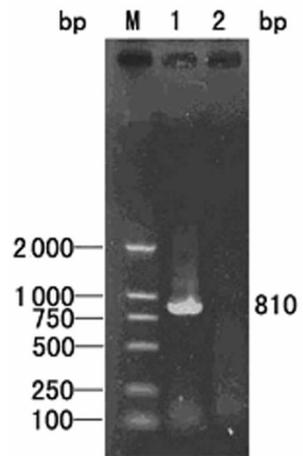
1.8 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒转化菌的单菌落接种于 LB(含氨苄西林 100 mg/L)液体培养基中,于 37 °C 培养过夜,以 1:20 的比例接种上述过夜菌于新鲜的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至菌浓度为 A₆₀₀ = 0.4~0.6。加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L,37 °C 诱导表达,分别收集诱导表达 1、3、4、5、24 h 菌体进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,确定最佳诱导表达条件。在最佳条件诱导下,收集菌液 1 mL 进行全菌蛋白的 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,通过诱导前、后全菌蛋白染色条带的对照,检测相应分子质量的外源性蛋白表达条带。将诱导表达的菌液在 4 °C,5 000×g 离心 10 min 收集菌体,按每克湿菌 3 mL 比例加入超声破碎缓冲液(每 100 mL 含 2 mol/L Tris-HCl 1 mL、 β -巯基乙醇 0.03 g)重悬菌体,冰浴下超声破碎细菌,条件为功率 280 W,破碎 3 s,间隔 3 s,总破碎时间为 40 min。然后 4 °C,10 000×g 离心 20 min,分别收集裂解后所得到的沉淀与上清液,经 12% SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达形式。

1.9 重组蛋白的纯化 收集 2 L 诱导表达的菌液,在冰浴下超声裂解后的上清液中加 2 mL 50% Ni²⁺-NTA 树脂溶液,0 °C 冰浴 1 h,其间不断振荡。将混合物转入下垫滤纸的注射器中,自然流干。用洗涤液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑)洗柱。分别收集洗涤液 W1~4。用洗脱液(50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑)洗柱,分别收集洗涤液 E1~11。取适量样品进行 SDS-PAGE 分析,收集目的蛋白管,PEG 8000 浓缩,最后将纯化样品分装,低温保存。采用 Bradford 法对纯化的重组蛋白进行定量。

2 结 果

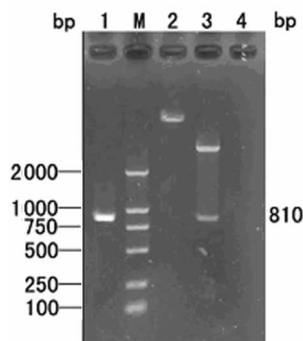
2.1 hp1188 基因的 PCR 扩增 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析可见约 810 bp 的单一一条带,片段大小与预期一致,见图 1。

2.2 重组质粒 pQE30-hp1188 的鉴定 重组质粒 pQE30-hp1188 转化大肠杆菌 DH₅ α 后,经 PCR 及双酶切鉴定,均可见约 810 bp 的目的条带,见图 2。阳性克隆 DNA 测序结果显示,插入的基因片段全长 810 bp,与 GenBank 公布的 *H. pylori* 菌株 26695 相应序列进行核苷酸序列比对分析,基因序列的同源性为 98%。



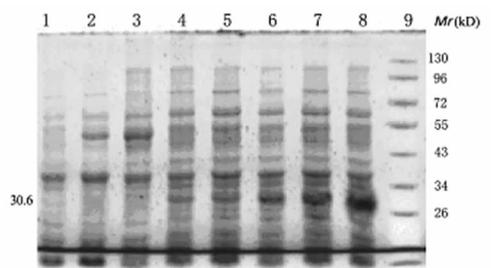
M: DNA 标记(DL2000);1: hp1188 基因的 PCR 产物;2:对照(pQE30 转化大肠杆菌 DH₅ α)

图 1 hp1188 基因片段的 PCR 扩增结果



M: DNA 标记(DL2000);1:pQE30-hp1188 PCR 产物;2:pQE30-hp1188;3:pQE30-hp1188/*Bam*H I + *Xho* I;4:pQE30 PCR 产物。

图 2 重组质粒 pQE30-hp1188 的 PCR 及酶切鉴定



1:IPTG 诱导 pQE30;2:IPTG 诱导大肠杆菌 DH₅ α ;3:IPTG 未诱导 pQE30-hp1188;4~8:不同浓度的 IPTG(0.1、0.3、0.5、0.8 及 1.0 mmol/L)诱导 pQE30-hp1188;9:蛋白质标记。

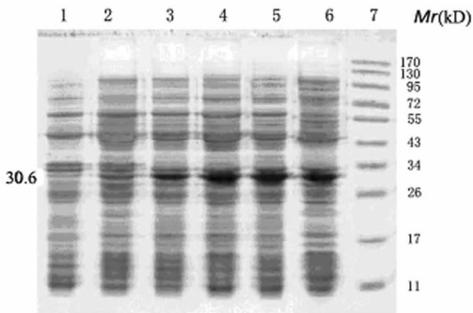
图 3 重组蛋白最佳 IPTG 诱导浓度的测定

2.3 重组蛋白的最佳表达条件 收集诱导前、后的细菌全菌蛋白进行 SDS-PAGE 分析,诱导后的细菌较诱导前在相对分子质量约 30.6 kD 处可见明显增加的外源蛋白表达条带。最

佳诱导表达条件为 37 °C, IPTG 浓度 1.0 mmol/L, 诱导时间 4 h, 可得到最大的表达量, 见图 3、4。

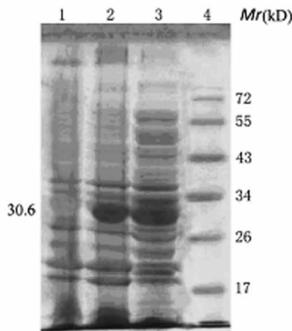
2.4 重组蛋白的表达形式 SDS-PAGE 分析表明, 超声破碎菌的上清液与沉淀中均可见目的蛋白表达条带, 见图 5。用图像软件分析表明可溶性蛋白占全菌蛋白的 47%。

2.5 重组蛋白纯化产物的鉴定 SDS-PAGE 分析表明, 纯化产物主要存在于第 2~7 管洗脱液中, 纯度可达 90%, 见图 6。用 Bradford 法测定纯化重组蛋白的含量为 1.0 mg/mL。



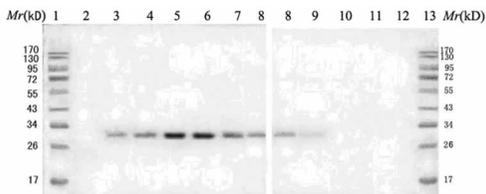
1: IPTG 未诱导 pQE30-hp1188; 2~6: 1.0 mmol/L IPTG (1、3、4、5、24 h) 诱导 pQE30-hp1188; 7: 蛋白质标记。

图 4 重组蛋白最佳诱导时间的测定



1: IPTG 未诱导 pQE30-hp1188; 2: IPTG 诱导 pQE30-hp1188 的上清液; 3: IPTG 诱导 pQE30-hp1188 的质粒; 4: 蛋白质标记。

图 5 重组蛋白表达形式的鉴定



1、13: 蛋白质标记; 2~12: 纯化重组蛋白 (E1~11)。

图 6 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨论

H. pylori 在胃内集中定植于胃窦部, 生长于胃黏膜上皮表面与黏液层之间, 是组织细胞外的寄生菌。*H. pylori* 的高感染率及其对人类健康的危害越来越引起广泛关注, 目前 *H. pylori* 治疗主要应用抗生素和质子泵抑制剂, 但 *H. pylori* 感染存在治疗后易复发和再感染、易产生耐药性、患者对药物依从性差, 以及药物不良反应和价格昂贵等问题。因此, 学者们认识到有必要研制 *H. pylori* 疫苗^[10-11], 疫苗的成功研制及应用在 *H. pylori* 感染的防治策略中意义重大。

合理选择抗原是疫苗成败的关键。对 *H. pylori* 的研究表明, *H. pylori* 在胃内定植的关键环节是黏附, 宿主细胞的特异性黏附由黏附素受体系统介导, 依赖于黏附分子上某些特定的氨基酸位点与受体的结合。随着对黏附素^[12-14]本质的认识不断加深和黏附素在 *H. pylori* 定植过程中的决定性作用, 黏附素作为保护性抗原可能成为一个新的疫苗研究尝试, 可以从黏附素出发寻找保护性抗原, 从而在感染的初期就能通过阻断黏附将 *H. pylori* 清除出人体。黏附素能够成为 *H. pylori* 疫苗候选抗原是由于其具备以下几个优点: 位于细菌表面从而为免疫反应提供靶位; 具有较高的保守性, 而保守性抗原通常是疫苗成分的要求之一; 蛋白质成分能够通过基因工程大规模生产和纯化。

Rubinsztein-Dunlop 等^[8]从 *H. pylori* 的全基因组中挑选出 5 个可能编码膜蛋白的开放阅读框 (ORF), 分别在 *E. coli* BL21 中表达出带组氨酸标签的这 5 种蛋白, 研究发现经 hp1188 基因编码的蛋白 hp1188 具有黏膜结合特性, 其包被的镍珠能够与人 AGS 细胞结合, 且 hp1188 蛋白在 *H. pylori* 菌体表面表达量很高。hp1188 基因全长 810 bp, 其核苷酸或氨基酸序列高度保守, 为 *H. pylori* 所特有, 编码蛋白的相对分子质量为 30.6 kD。因此, 研究 hp1188 的功能以及作为抗 *H. pylori* 感染的保护性抗原都具有重要意义。本研究选择 *H. pylori* 的 hp1188 基因, 将全长 hp1188 基因克隆入原核表达质粒 pQE30, 成功构建了 pQE30-hp1188 重组载体, 并在 DH₅ α 中获得高效表达, 为下一步表达产物的特性分析, 进一步研究 *H. pylori* 黏附的分子机制和免疫保护作用、制备防治 *H. pylori* 定植的疫苗奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Penta R, De FM, Iaquinto G, et al. Helicobacter pylori and gastric epithelial cells; from gastritis to cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3): 337-345.
- [2] Fireman Z, Trost L, Kopelman Y. Helicobacter pylori; seroprevalence and colorectal cancer [J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2(1): 6-9.
- [3] 吴利先, 杨致邦, 林姗姗, 等. 幽门螺杆菌临床株黏附素 HpaA 基因的克隆表达及在诊断中的价值 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(4): 275-278.
- [4] Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue [J]. Int J Med Microbiol, 2002, 292(3-4): 247-256.
- [5] Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, et al. Infection by Helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype [J]. J Pathol, 2008, 215(3): 308-316.
- [6] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, et al. Helicobacter pylori infection in mice; role of outer membrane proteins in colonization and inflammation [J]. Gastroenterology, 2002, 123(6): 1992-2004.
- [7] Hennig EE, Mernaugh R, Edl J, et al. Heterogeneity among Helicobacter pylori strains in exp- (下转第 223 页)

- [2] Atreya I, Neurath MF. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(4):561-572.
- [3] Prechtel AT, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells[J]. *Arch Dermatol Res*, 2007, 299(2):59-69.
- [4] 贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 等. 树突状细胞对裸鼠结肠癌移植瘤的抗癌效应[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2009, 30(1):60-62.
- [5] Yilmaz T, Gedikoglu G, Celik A, et al. Prognostic significance of langerhans cell infiltration in cancer of the larynx[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 132(2):309.
- [6] Rouard H, Leon A, Klonjkowski B, et al. Adenoviral transduction of human 'clinic grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity[J]. *J Immunol Method B*, 2000, 241(1/2):69.
- [7] Inoue Y, Nakavama Y, Minaqawa N, et al. Relationship between interleukin-12-expressing cells and antigen-presenting cells in patients with colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(5):3541-3546.
- [8] 詹俊, 孙小娟, 李楚强, 等. S100 和 CD83 阳性树突状细胞与大肠肿瘤微环境的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(29):3061-3065.
- [9] Saito H, Osaki T, Murakami D, et al. Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters[J]. *J Surg Oncol*, 2007, 95(2):123-128.
- [10] Coventry BJ, Morton J. CD1a appositve infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer[J]. *BRJ Cancer*, 2003, 89(3):533-538.
- [11] Iwamoto M, Shinohara H, Migamoto A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2002, 104(1):92-97.
- [12] MaYL, Penq JY, Zhang P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer[J]. *Med Oncol*, 2009, 27(2):304-309.
- [13] 王建设, 顾超, 叶宣光. 乳腺癌淋巴结转移与 Ki67、VEGF 表达的相关性及临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2009, 24(5):450-451.
- [14] 林妙霞, 文卓夫, 冯智英, 等. Bmj-1、Ki67 在大肠癌中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2008, 27(12):1321-1326.
- [15] 朱晓玲, 李蓉, 黄裕, 等. P16 及 Ki67 在子宫颈癌及癌前病变中的表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(8):2041-2043.

(收稿日期:2010-06-18 修回日期:2010-09-09)

(上接第 220 页)

- ression of the outer membrane protein BabA[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(6):3429-3435.
- [8] Rubinsztein-Dunlop S, Guy B, Lissolo L, et al. Identification of two new *Helicobacter pylori* surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines[J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 5):427-434.
- [9] Ausubel FM. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 3 版. 北京:科学出版社, 1998:22.
- [10] 李晶, 张建中. 幽门螺杆菌黏附素及受体研究与疫苗发展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(6):580-582.
- [11] 吕琳, 王丕龙. 重组幽门螺杆菌疫苗的研究现状[J]. *重庆医学*, 2009, 38(8):984-987.
- [12] Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, et al. *Helicobacter Pylori* vaccine development: facing the challenge[J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295(5):343-353.
- [13] Odenbreit S. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host[J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295(5):317-324.
- [14] Sugiyama T, Asaka M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer[J]. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(3):149-157.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-09)

启 事

《重庆医学》开设博士论坛专栏,此专栏专为各院(校)博士服务,本刊将开设绿色通道。欢迎全国医学院校博士投稿。本刊收稿网址: <http://cqyx.journalserv.com>, 投稿后注明:博士论坛文章。

《重庆医学》编辑部