

幽门螺杆菌 AlpA 基因中四种黏附素基因保守区的克隆、表达、纯化及鉴定*

白 杨¹⁾ 但汉雷¹⁾ 王继德¹⁾ 张兆山²⁾ S. ODENBREIT³⁾ 周殿元¹⁾ 张亚历¹⁾**

(¹⁾ 第一军医大学南方医院全军消化病研究所, 广州 510515; ²⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;

³⁾ Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Infektionsbiologie, Tübingen, Germany.)

摘要 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 与胃腺癌、胃黏膜相关淋巴样组织 (MALT) 淋巴瘤的发生亦密切相关。鉴于 Hp 已证实的四种粘附素保守区 (AB) 是外膜蛋白 (OMP) 和膜孔素 (porin) 样成分, 而外膜蛋白和膜孔素样成分是优秀的疫苗候选抗原。用 PCR 技术扩增 AB 基因, 将其定向插入 pET-22b (+) 载体, 在 BL21 (DE3) 大肠杆菌中表达。测序显示 AB 基因长 588 bp, 编码 195 个氨基酸。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶扫描分析, AB 基因表达的蛋白质分子质量约为 22.5 ku, 其重组蛋白质表达量占菌体总蛋白质的 29%, 表达产物经亲和层析纯化后蛋白质纯度达 96%。经免疫印迹证实该重组蛋白可以被 AlpA 免疫兔血清所识别。AB 蛋白的获得为进一步研究 Hp 黏附素保守区的分子黏附机制和免疫防治作用提供了基础。

关键词 幽门螺杆菌, 黏附素保守区, 克隆, 表达, 纯化, 鉴定

学科分类号 Q78, R739

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 与胃腺癌、胃黏膜相关性淋巴样组织 (MALT) 恶性淋巴瘤的发生亦密切相关^[1,2]。世界卫生组织 (WHO) 已将其列为一类致癌因子^[3]。此外, 血清流行病学研究表明 Hp 感染与循环、呼吸以及自身免疫疾病的发生也有关^[4,5]。因此, 控制 Hp 感染是上述疾病病因防治的根本措施之一。目前临床上采取的抗菌疗法由于 Hp 耐药性的产生和再次感染等原因, 不能长期、彻底根除 Hp 感染。Hp 疫苗兼具预防和治疗作用^[6], 已引起人们的极大兴趣。

在 Hp 的疫苗研制方面, 我们发现目前采用的基因重组抗原尿素酶^[7]、细胞空泡毒素^[8]、过氧化氢酶^[9]等, 基本上着眼于阻断 Hp 的毒力因素, 而与 Hp 定植密切相关的黏附素评价较少。如从黏附素出发寻找保护性抗原也许是一种有益的尝试。目前文献报道的 Hp 黏附素较多, 其中已经证实的有 4 种, 包括迄今为止唯一明确受体的 Hp 黏附素 BabA^[10], 和经体外黏附及其相应抗体的抑制实验证明的黏附素 AlpA^[11]、AlpB^[11]和 HopZ^[12]。然而这 4 种黏附素并不是存在于所有菌株中, 如 BabA 存在于 CagA 致病岛阳性的菌株中^[10], 而且它们在不同的菌株中存在一定程度的变异, 因此究竟选取哪种或哪些黏附素一直是困扰我们的问题。Kleanthous 等^[13]早在 1998 年就提出作为 Hp 疫苗

的抗原成分应是保守的, 即不是特异地存在于某些菌株中。基于这一思路, 本研究拟对 4 种黏附素进行同源性分析, 试图发现保守区, 并对其克隆、表达、纯化及鉴定, 为进一步研究其免疫防治作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 BL21 (DE3) 及质粒 pET-22b (+) 由军事医学科学院生物工程研究所提供。幽门螺杆菌 SS1 为本所保存。限制性内切酶 *Not* I、*Nco* I 及 T4 DNA 聚合酶、*Vent* DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司, Taq DNA 聚合酶、DNA 分子质量标准 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III 购自华美生物工程公司, 琼脂糖、dNTPs、DNA 快速纯化试剂盒购自 Promega 公司, 测序质粒纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司。AlpA 兔抗血清由 Odenbreit S 制备^[11]。其他试剂为国产分析纯。

1.2 Hp 染色体 DNA 的提取

固体培养基上刮取生长良好的 Hp 菌落, 按基

* 国家高技术“863”计划资助项目 (102-07-03-06)、国家自然科学基金 (30270078) 和军队“十五”医药卫生科研课题 (OIMA-132) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85141532, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

收稿日期: 2002-04-24, 接受日期: 2002-05-28

因组 DNA 小量制备法制备, 详见参考文献 [14].

1.3 4 种黏附素保守区 DNA 序列的确定及扩增

利用 ANTHEPROT V4.3c 软件分析已证实的 Hp 4 种黏附素 (BabA2、AlpA、AlpB 和 HopZ) 的氨基酸序列, 发现 4 种黏附素的 C 端氨基酸存在保守区, 并具有良好的抗原性和疏水性. 进一步 BLAST 分析了 GenBank 中 836 767 个序列, 与其具有同源性者均为 Hp 外膜蛋白序列. 我们根据 AlpA 的 C 端结构基因序列 (命名为 AB) 设计引物, 在其 5' 端加上合适的限制性酶切位点, 由上海博亚公司合成.

保守区 1: 5'-TG GCC ATG GAT AAC GCG CTC

Nco I

AAC AAT CAG-3';

保守区 2: 5'-AG TGC GGC CGC GAA TGA ATA

Not I

CCC ATA AGA-3'.

热启动法进行 PCR, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环后再延伸 10 min. 0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果.

1.4 质粒的提取及纯化

质粒的快速抽提及大量制备均采用碱变性法, 详见参考文献 [15].

1.5 DNA 片段的酶切、连接、转化和克隆的鉴定

详见参考文献 [14]. 质粒和目的基因 DNA 经 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切, 玻璃奶回收酶切片段, T4 连接酶作用下 16 °C 连接 12 h, 转化宿主菌 BL21 (DE3), 双酶切鉴定筛选出阳性克隆.

1.6 序列测定及分析

碱裂解法大量抽提经双酶切鉴定的重组克隆质粒, 用自动测序仪进行序列测定.

1.7 诱导表达和纯化

AB 阳性克隆经 IPTG 诱导表达后, 用金属螯合亲和层析介质 (Ni-NTA) 树脂纯化 AB 蛋白.

1.8 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献 [14].

1.9 免疫印迹分析

参考文献 [14].

2 结 果

2.1 保守区基因的扩增

PCR 结果电泳分析发现在 588 bp 左右有一条带, 大小与预计相符.

2.2 重组质粒的构建及酶切鉴定

将 PCR 产物经 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切后, 定向插入经同样双酶切的 pET-22b (+) 载体中, 获得重组质粒命名为 pET-22b (+) /AB. 重组质粒经 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切后电泳初步鉴定结果与预计相符.

2.3 保守区基因片段的序列分析

直接以重组质粒 pET-22b (+) /AB 为模板进行测序, 得到了克隆片段的 DNA 序列, 经 ANTHEPROT V4.3c 软件分析, 与 alpA 的 C 端结构基因序列一致, 与其他 3 种黏附素 babA、alpB 和 hopZ 保守区的同源性分别为 53%、75% 和 59%.

2.4 AB 基因在大肠杆菌中的表达及纯化

将 AB 阳性克隆株在 LB 培养液 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 中 37 °C 培养过夜. 然后将过夜培养物以 1:100 比例稀释, 加入含氨苄青霉素的新鲜 LB 培养液中, 继续培养至 A_{600} 值为 0.6~0.8, 加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导表达 3 h, 离心收集菌体, 进一步取其周质的渗透休克液和菌体超声后的上清, 用 Ni-NTA 树脂纯化 AB. 取其周质的渗透休克液和菌体超声后的沉淀和上清以及纯化的 AB, 进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 (图 1 和图 2). 结果发现, 经诱导后高效表达相对分子质量为 22 500 的蛋白质, 与预期分子质量大小一致, 凝胶自动扫描分析, AB

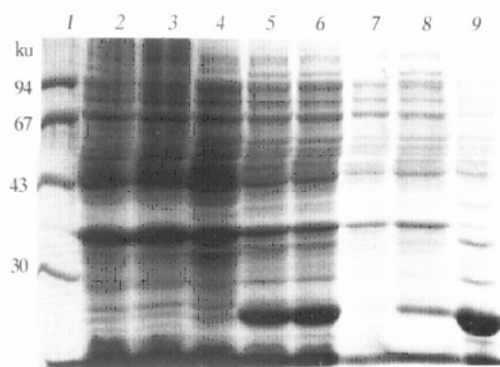


Fig. 1 SDS PAGE analysis of AB recombinant protein expressed in BL21 (DE3)

1: molecular mass marker; 2: control strain BL21 (pET) before induction; 3: control strain BL21 (pET) after 3 h induction with IPTG; 4: BL21 (pET-AB) cells before induction; 5: BL21 (pET-AB) cells after 3 h induction with IPTG; 6: BL21 (pET-AB) cells after 5 h induction with IPTG; 7: BL21 (pET-AB) cells periplasm protein after 3 h induction with IPTG; 8: sonicate supernatant of BL21 (pET-AB) cells after 3 h induction with IPTG; 9: inclusion body of BL21 (pET-AB) cells after 3 h induction with IPTG.

占菌体总蛋白的 29.6%，其中可溶性表达占上清的 21.9%，包涵体占沉淀的 72.6%，纯化后的 AB 纯度为 96%。

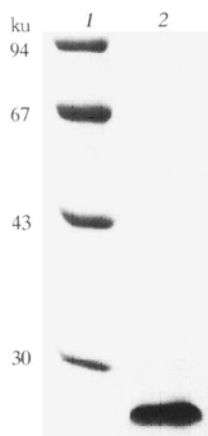


Fig. 2 SDS PAGE analysis of the purified rAB

1: molecular mass marker; 2: purified rAB.

2.5 AB 表达蛋白的免疫印迹分析

用兔抗 Hp 4 种黏附素之一的 AlpA 作一抗，在相对分子质量约 22 500 处出现一条阳性反应带（图 3），而对照组免疫前兔血清无此条带。

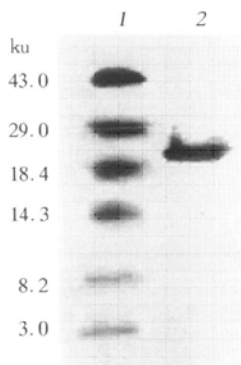


Fig. 3 Western blot analysis of AB recombinant protein detected

1: molecular mass marker; 2: the anti-Hp AlpA polyclonal serum from the rabbit immunized with purified AlpA.

3 讨 论

幽门螺杆菌只有黏附于宿主细胞，才能进一步发挥其致病作用，而 Hp 与宿主细胞的特异性黏附是由黏附素-受体系统介导的，因此，免疫防治 Hp 感染的一个新策略是，选用黏附素作为 Hp 疫苗候选抗原从而阻断 Hp 对于胃黏膜的黏附，使之在胃蠕动时随食物一起被排空。另外，Hp 黏附素作为

疫苗候选抗原还具备以下几个优点：a. 位于细菌表面从而为免疫反应提供靶位；b. 尽管是 Hp 致病的必需成分，但本身无毒性；c. 因其成分通常为蛋白质，从而能够通过构建基因工程疫苗实现大规模生产和纯化。

由于 Hp 黏附素具有菌种差异和变异，本研究对 Hp 的 4 种黏附素基因 babA2、alpA、alpB 和 hopZ 进行了序列分析，发现 4 种黏附素基因同属于 Hp 标准株 26 695 全基因序列中已被证实的外膜蛋白超基因家族^[16]，分别与外膜蛋白超基因家族中的 HP1243、HP0912、HP0913 和 HP0009 高度相似，4 种蛋白质在 N 端有 1 个相似保守区，在 C 端的近 200 个氨基酸包含有 7 个相似保守区。应用 INTERNET ExPASy、NNPREDICT、ISREC 等生物信息软件分析 C 端近 200 个氨基酸，发现其为跨膜区膜外区域的重要表位组成部分，与膜孔素（porin）样结构相似，BLAST 分析与其具有同源性者均为 Hp 外膜蛋白序列，具有严格的种属特异性。有关文献表明^[16,17]，外膜蛋白（OMP）和膜孔素也许是优秀的疫苗候选成分。因此，我们确定上述 C 端的近 200 个氨基酸为候选抗原，选用黏附性强并能稳定植于小鼠胃内的 Hp ss1 染色体 DNA 为模板，根据 AlpA 的上述 C 端结构基因设计特异引物，成功钓出了保守区基因。为便于下一步的表达和纯化工作又将其装入了带有 6 个组氨酸尾巴的融合表达载体，酶切鉴定和测序结果显示获得了一段 588 bp 的基因，完整的包含了上述 7 个保守区。蛋白质电泳分析和凝胶扫描表明获得了高效表达 AB 的克隆株，其分子质量为 22.5 ku，占菌体总蛋白的 29.6%。

对于一种基因重组抗原来说，其免疫原性并不依赖于生物活性的有无^[18]。因此，在最初的蛋白质纯化研究中，我们拟对占沉淀的 72.6% 包涵体进行纯化，只要经初步纯化其纯度便可达 85% 以上从而用于免疫研究。然而，基于具有生物活性的重组蛋白倾向于保持更完整和肯定的抗原性的认识，以及对 AB 活性的进一步研究的需要，我们最终取具有活性的周质渗透休克液和菌体超声后的上清用 Ni-NTA 树脂对 AB 进行了反复纯化，获得了纯度为 96% 的具有活性的 AB，为进一步研究其免疫保护作用 and 分子黏附机制奠定了重要的实验基础。

应用 Odenbreit 教授提供的 AlpA 兔抗血清为一抗，进行了免疫印迹实验，结果与所克隆表达的产物发生阳性结合，在约 22.5 ku 处出现一条明显

的阳性反应带; 而对照组免疫前兔血清无阳性反应带。这表明所克隆表达的黏附素基因保守区蛋白多肽保持了天然免疫活性, 可以作为良好的疫苗候选抗原, 但其是否具有免疫防治作用还有待进一步的动物实验研究。

参 考 文 献

- Forman D, Sitas F, Newell D G, *et al.* Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int J Cancer*, 1990, **6** (4): 608~ 611
- Hussell T, Isaacson P G, Crabtree J E, *et al.* The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 1993, **42** (8871): 571~ 574
- NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J Am Med Assoc*, 1994, **272** (1): 65~ 69
- Tsang K W, Lam S K. *Helicobacter pylori* and extra-digestive diseases. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, **14** (9): 844~ 850
- Fireman Z, Trost L, Kopelman Y, *et al.* *Helicobacter pylori*: seroprevalence and colorectal cancer. *Isr Med Assoc J*, 2000, **2** (1): 6~ 9
- Doidge C, Crust I, Lee A, *et al.* Therapeutic immunization against helicobacter infection. *Lancet*, 1994, **343** (8902): 94~ 95
- Weltzin R, Guy B, Thomas W D, *et al.* Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun*, 2000, **8** (5): 2775~ 2782
- Marchetti M, Rossi M, Giannelli V, *et al.* Protection against *Helicobacter pylori* infection in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant. *Vaccine*, 1998, **6** (1): 33~ 37
- Radcliff F J, Hazell S L, Kolesnikow T, *et al.* Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infect Immun*, 1997, **65** (11): 4668~ 4674
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, *et al.* *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 1998, **279** (5349): 373~ 377
- Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, *et al.* Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol*, 1999, **31** (5): 1537~ 1548
- Peck B, Ortkamp M, Diehl K D, *et al.* Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (16): 3325 ~ 3333
- Kleanthous H, Lee C K, Monath T P. Vaccine development against infection with *Helicobacter pylori*. *Br Med Bull*, 1998, **54** (1): 229~ 241
- 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学指南. 北京: 科学出版社, 1998. 39~ 369
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Translated by Yan Z Y, Wang H L. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1998. 39~ 369
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 35~ 66
- Tomb J F, White O, Kerlavage A R, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1997, **388** (6642): 539~ 547
- Doig P, Trust T J. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 1994, **62**: 4526~ 4533
- Michetti P, Cortesby-Theulaz I, Davin C, *et al.* Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology*, 1994, **107** (4): 1002~ 1011

Cloning, Expression, Purification and Identification of Conservative Region of Four *Helicobacter pylori* Adhesin Genes in AlpA Gene*

BAI Yang¹⁾, DAN Han-Lei¹⁾, WANG Ji-De¹⁾, ZHANG Zhao-Shan²⁾,
S. ODENBREIT³⁾, ZHOU Dian-Yuan¹⁾, ZHANG Ya-Li¹⁾**

¹⁾ PLA Institute for Digestive Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

²⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

³⁾ Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Infektionsbiologie, Tübingen, Germany.)

Abstract *Helicobacter pylori* infection is the major etiological factor of chronic active gastritis and most peptic ulcer disease, and is closely associated with gastric cancers such as adenocarcinoma and MALT lymphoma. Since the Hp adhesin conservative region (AB) is outer membrane protein and porin type component, while these two kinds of protein are the excellent immunogen candidates of vaccination. The gene ab was amplified by PCR and inserted into the prokaryotic expression vector pET-22b (+) and expressed in the BL21 (DE3) *E. coli* strain. DNA sequenced showed one open reading frame of 588 bp, which encoded polypeptides of 195 amino acids. SDS-PAGE and scan analysis show the AB molecular mass is 22.5 ku and recombinant protein amounted to 29% of the total bacterial protein. The AB purity amounted to 96% through affinity chromatography. Western blot analysis of AB confirmed it could be specially recognized by serum from rabbit immunized with

AlpA. Acquire of AB established foundation for further studying the molecular adhesin, prevention and cure immunity mechanism of the adhesin.

Key words *Helicobacter pylori*, adhesin conservative region, cloning, expression, purification, identification

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R & D Project of China (102-07-03-06), The National Natural Sciences Foundation of China (30270078) and Military 'ter five' Commanding Project.

** Corresponding author. Tel: 86-20-85141532, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

Received: April 24, 2002 Accepted: May 28, 2002

更正启事

因本刊工作失误,《脂肪细胞分化过程中影响 PAF-1 基因转录表达的 Dex 和 C/EBPs 顺式调控元件的分析》一文(2002, 29 (4): 550~ 555) 中图 6 有误, 现进行更正(正确图 6 如下所示), 并向陈可洋等作者和广大读者表示歉意。

《生物化学与生物物理进展》编辑部

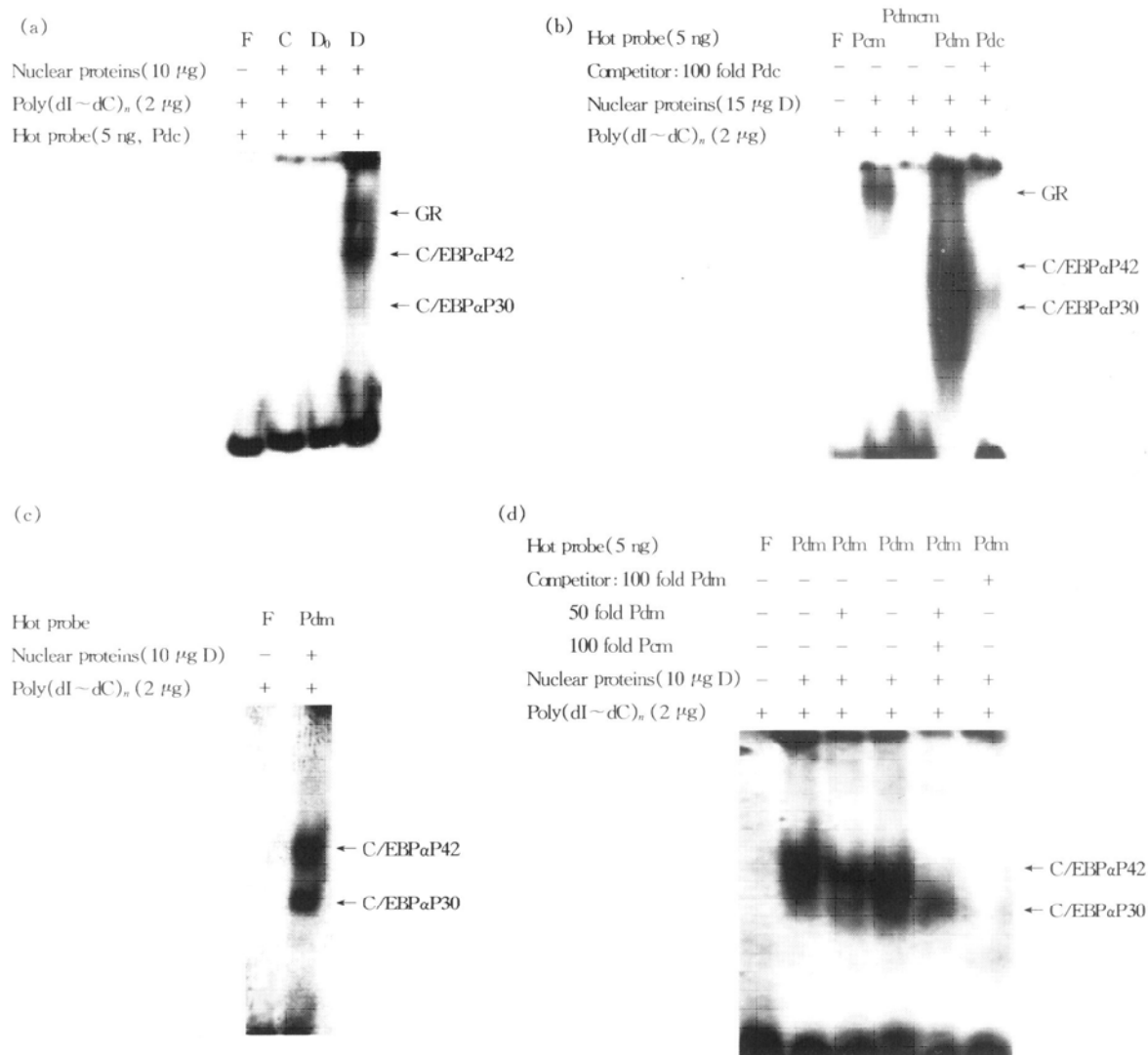


Fig. 6 Identification of DexRE and C/EBPs cis-motif in mouse PAF-1 promoter by GMSA and competitive GMSA