

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)03-0225-04

# 幽门螺杆菌外膜蛋白 omp22 和黏附素 hpaA 融合基因原核表达系统的构建与鉴定

黄学勇<sup>1,2</sup> 段广才<sup>1,2</sup> 范清堂<sup>2</sup> 郝园林<sup>1</sup> 黄志刚<sup>2</sup> 宋春花<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室, <sup>2</sup> 河南省分子医学重点学科开放实验室 河南 郑州 450052 )

## Construction and identification of prokaryotic expression system for omp22-hpaA fusion gene from *Helicobacter pylori*

HUANG Xue-Yong<sup>1,2</sup>, DUAN Guang-Cai<sup>1,2</sup>, FAN Qing-Tang<sup>2</sup>, XI Yuan-Lin<sup>1</sup>, HUANG Zhi-Gang<sup>2</sup>, SONG Chun-Hua<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, <sup>2</sup>Henan Key Open Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou 450052, China

**【Abstract】** AIM: To construct a prokaryotic high expression system which expresses fusion gene of outer membrane protein (omp22) gene and adhesion gene hpaA from *Helicobacter pylori*.

**METHODS:** The omp22-hpaA fusion gene with an adapter of 3 glycine residues was amplified by PCR, and cloned to the expression vector pMAL-c2X. The constructed recombinant plasmid was transformed in *E. coli* TB1 host bacterial strain and was induced by IPTG. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. **RESULTS:** Sequencing results showed that the omp22-hpaA fusion gene consisted of 1326 bp and encoded the polypeptides of 440 amino acids and that the sequence (GGTGGAGGC) encoding 3 glycine residues was inserted into omp22-hpaA fusion gene as an adapter. The relative molecular weight of the expression product of omp22-hpaA fusion gene was about 53 ku. The amount of the recombinant gene expression products accounted for 20% of the total proteins of the host bacteria.

**CONCLUSION:** The omp22-hpaA fusion gene has been cloned and a prokaryotic high expression system for omp22-hpaA fusion gene been successfully constructed.

**【Keywords】** *Helicobacter pylori*; omp22-hpaA fusion gene; cloning; gene expression

**【摘要】**目的 构建表达幽门螺杆菌(*Hp*)的外膜蛋白 omp22 和黏附素 hpaA 融合基因的重组蛋白质候选菌株,为 *Hp* 疫苗研究提供依据。方法 用 PCR 方法扩增出带 3 个甘氨酸残基柔韧接头的融合基因 omp22-hpaA,将其克隆到表达载体 pMAL-c2X 中转化大肠杆菌(*E. coli* TB1),用 IPTG 诱导目的基因表达,SDS-PAGE 方法对表达产物进行分析,Western Blot 鉴定其免疫原性。结果 测序结果显示,omp22-hpaA 融合基因片段由 1326 bp 组成,为编码 440 个氨基酸残基的多肽,接头序列 GGTGGAGGC 已成功地插入 omp22-hpaA 融合基因中;SDS-PAGE 结果显示表达产物相对分子质量约为 53 ku,融合蛋白的表达量约占全菌总蛋白的 20%。结论 成功克隆并构建了 omp22-hpaA 融合基因原核表达系统。

**【关键词】** 幽门螺杆菌; omp22-hpaA 融合基因; 克隆; 基因表达

**【中图分类号】** R183.4

**【文献标识码】** A

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)是人类最常见的致病菌。目前采用联合应用抗生素通常能有效地清除感染的 *Hp*,但存在患者耐受性差、费用高及药物副作用明显等缺点<sup>[1-2]</sup>,因此,接种疫苗是预防 *Hp* 感染、控制相关疾病最为有效的方法。黏附素(hpaA)是 *Hp* 鞭毛鞘膜蛋白,序列高度保守,作为基因工程疫苗的保护性候选抗原已被证实<sup>[3-4]</sup>; *Hp* 的外膜蛋白在人体保护性免疫反应中具有重要的作用,并为该菌的共有抗原成分,以其制备的抗原可使实验动物获得保护<sup>[5-6]</sup>。我们通过引入柔性接头构建了 omp22-hpaA 融合基因原核表达系统,为研究 *Hp* 基因工程组分疫苗和免疫检测试剂应用研究提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *Hp*MEL-HP27 株由本研究室分离保种;表达质粒 pMAL-c2X 和菌株 *E. coli* TB1( New England Biolabs 公司),含有 omp22 基因克隆质粒 pBS-omp22 和含有 hpaA 基因克隆质粒 pBS-hpaA(本实验室构建);Pyrobest DNA 聚合酶,限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* III, T4 DNA 连接酶(宝生物公司);DNA 纯化试剂盒(Vitagene 公司);*Hp* 患者血清采集于郑州市某

收稿日期 2006-08-24; 接受日期 2006-10-09

基金项目 河南省医学创新人才基金(2000-84)

通讯作者:段广才。Tel (0371) 66969270 Email: gduan@public.zz.ha.cn

作者简介:黄学勇,讲师,博士生(导师段广才)。Tel (0371) 66912869

Email: hxyzzu@163.com

厂职工体检(商品化试剂盒检测阳性)。

## 1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 参考 GenBank 收录的 *Helicobacter pylori* 国际标准株 J99 和 26695 的基因序列,应用 Primer 5.0 设计 *Hp* 外膜蛋白 *omp22*, 黏附素 *hpaA* 基因的 PCR 引物如下。P1 :5'-cgggatccatgaagagatcttc-3' ; P2 :5'-ttt gctccaccctcactaattt-3' ; P3 :5'-aag ggtggag gc aaagcaaataatc-3' ; P4 :5'-cgcaagctttatcggtttct-3'。该组引物由赛百盛公司合成,P1 和 P2 用于扩增上游的 *omp22* 基因,P3 和 P4 用于扩增下游的 *hpaA* 基因,并在 P1 的 5' 端加 *Bam*HI 酶切位点,在 P4 的 5' 端加 *Hind*III 酶切位点。在 *omp22* 下游和 *hpaA* 上游有 15 个碱基重叠,其中接头为 9 个碱基(引物中下划线部分为接头),并去除 *omp22* 基因的终止密码子和 *hpaA* 基因的起始密码子,以利于这两个基因互为引物和模板扩增出插入柔韧接头编码序列的融合基因 *omp22-hpaA*。① *omp22* 的 PCR 扩增体系 50  $\mu$ L :其中 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L, 4  $\times$  dNTP 4  $\mu$ L (各 200  $\mu$ mol/L), pBS-*omp22* 质粒(模板) 2  $\mu$ L,P1,P2 引物各 2  $\mu$ L (0.25  $\mu$ mol/L), Pyrobest DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L (1.25 U) 最后加 MilliQ H<sub>2</sub>O 至终体积。PCR 扩增条件 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后按以下参数进行 30 个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,45 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 反应 10 min。② *hpaA* 的 PCR 扩增:参照 *omp22* 扩增体系和条件。③ *omp22-hpaA* 融合基因 PCR 扩增体系 50  $\mu$ L :根据紫外分光光度计定量,模板 *omp22* PCR 产物和 *hpaA* PCR 产物分别为 1.5,2.0  $\mu$ L。P1,P4 引物各 2  $\mu$ L (0.25  $\mu$ mol/L),其它同 *omp22* 扩增体系。扩增条件 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后按以下参数进行 30 个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,46 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 反应 10 min。取 PCR 产物 3  $\mu$ L,在含 EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,切下目的 DNA 片段,用 Vitagene 凝胶回收试剂盒回收,凝胶图像分析仪照相。

1.2.2 *omp22-hpaA* 融合基因表达载体的构建 将以琼脂糖凝胶中回收的 *omp22-hpaA* 融合基因和空质粒 pMAL-c2X 分别用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切,酶切体系为 20  $\mu$ L,其中 10  $\times$  K buffer 2  $\mu$ L,PCR 产物或空质粒 pMAL-c2X 10  $\mu$ L,*Bam*HI 和 *Hind*III 各 1  $\mu$ L,加 MilliQ H<sub>2</sub>O 至终体积。37 $^{\circ}$ C 作用 2.5 h。酶切产物分别用 Vitagene 凝胶回收试剂盒回收,凝胶图像分析仪定量。*omp22-hpaA* 与 pMAL-c2X 以 6:1 的浓度比例进行混合,T4 DNA 酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。取连接产物 10  $\mu$ L 转化 *E. coli* TB1 感受态细胞,将转化菌均匀涂布于含 X-gal 和 IPTG 的 LB 氨苄青霉素固体培养基

上 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。挑选白色菌落,接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 培养过夜,碱裂解法提取质粒,进行单、双酶切和 PCR 扩增鉴定。阳性重组质粒命名为 pMAL-c2X-*omp22-hpaA*。

1.2.3 *omp22-hpaA* 融合基因序列测定 鉴定后的阳性重组克隆质粒 pMAL-c2X-*omp22-hpaA* 送上海生物工程技术有限公司,以 P1,P4 为引物进行核苷酸测序。

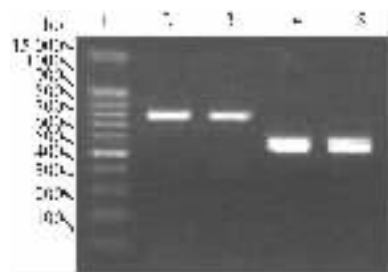
1.2.4 目的基因的诱导表达 将鉴定过的阳性克隆菌落接种到含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 摇菌过夜。取 50  $\mu$ L 菌液加入到 5 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 240 r/min 摇菌 2 h,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,诱导表达 6 h。

1.2.5 基因表达产物 SDS-PAGE 分析 取菌液样品 1 mL,10 000 g 离心 3 min,弃上清,加入 100  $\mu$ L 1  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,10 000 g 离心 10 min,取上清加样。用 0.5 mg/L 浓缩胶和 1.2 mg/L 分离胶电泳约 2.5 h。凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.6 表达产物的 Western Blot 分析 SDS-PAGE 电泳后,凝胶和硝酸纤维素膜在转移缓冲液中浸泡 15 min,于半干式电转印仪中 20V 转印 40 min。硝酸纤维素膜用蒸馏水洗 3 次,PBS 洗 1 次,转入封闭液,封闭 3 h,与 *Hp* 患者血清(1:50)反应 2 h,洗膜后与羊抗人血清(1:2000)反应 1 h,DAB 显色,同时以健康人血清做对照。

## 2 结果

2.1 PCR 扩增产物 PCR 产物分别经琼脂糖凝胶电泳,结果显示扩增产物长度分别为 550,790 bp(图 1)和 1326 bp(图 2)。

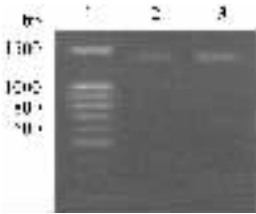


1 : DNA marker ; 2,3 : *hpaA* 基因的扩增产物 ; 4,5 : *omp22* 基因的扩增产物。

图 1 *Hp hpaA omp22* 基因的 PCR 扩增产物

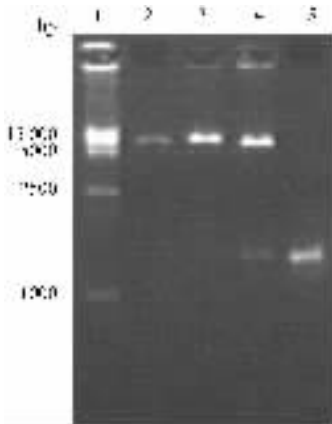
2.2 *omp22-hpaA* 融合基因表达质粒构建及鉴定 将重组表达质粒分别用 *Bam*HI 和 *Hind*III 单、双酶切

以及重组表达质粒的 PCR 产物同时在 10 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳(图 3), 均获得预期大小目的基因片段, 表明表达质粒构建成功。



1: DNA marker; 2, 3: omp22-hpaA 融合基因的扩增产物。

图 2 琼脂糖凝胶中回收到的 omp22-hpaA 融合基因



1: DNA marker; 2: pMAL-c2X 质粒 BamH I 和 Hind III 双酶切; 3: 重组质粒(pMAL-c2X-omp22-HpaA) Hind III 单酶切; 4: 重组质粒 BamH I 和 Hind III 双酶切; 5: 以重组质粒为模板的 PCR 扩增产物。

图 3 重组表达载体的酶切鉴定

**2.3 omp22-hpaA 融合基因测序** omp22-hpaA 融合基因中上游 omp22 和下游 hpaA 基因与以前所测核苷酸序列一致, 而且 3 个甘氨酸残基的编码序列 GGTGGAGGC 作为柔性接头已成功插入 omp22-hpaA 融合基因中, 图 4 下划线部分为接头。

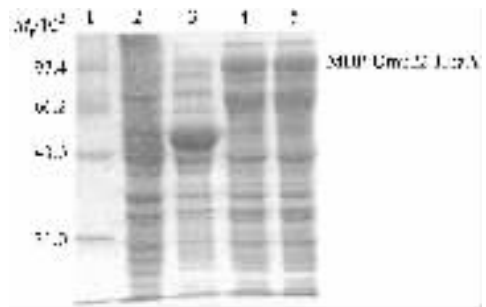


下划线部分为接头, 接头上游是 omp22 基因, 删除了终止密码子 TAA, 下游是 hpaA 基因, 删除了起始密码子 ATG。

图 4 融合基因部分测序结果

**2.4 诱导表达产物的 SDS-PAGE 结果** 将重组菌 TB1(pMAL-c2X-omp22-hpaA) 和对照菌 TB1(pMAL-c2X) 以及 TB1 诱导后的粗提蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 重组菌体蛋白在约 96 ku 处出现一条特异蛋白带

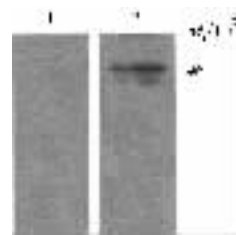
(图 5) 经 Gene Genius 凝胶图像分析仪分析, 融合蛋白的表达量约占全菌蛋白的 20%, 该蛋白分子质量与预期融合表达蛋白分子质量一致。初步证实所构建的重组表达质粒 pMAL-c2X-omp22-hpaA 可以高效表达融合蛋白 omp22-HpaA。



1: 低分子质量蛋白 marker; 2: *E. coli* TB1 诱导 6 h; 3: TB1(pMAL-c2X) 诱导 6 h; 4, 5: TB1(pMAL-c2X-omp22-hpaA) 诱导 6 h。

图 5 TB1(pMAL-c2X-omp22-hpaA) 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

**2.5 表达产物的 Western Blot 分析** 重组菌 TB1(pMAL-c2X-hpaA) 表达产物与 *Hp* 患者血清进行 Western Blot 分析, 在约 96 ku 处产生特异杂交带(图 6), 进一步证实获得了目的蛋白的表达。



1: TB1(pMAL-c2X-omp22-hpaA) 诱导后与健康人血清 Western Blot 反应; 2: TB1(pMAL-c2X-omp22-hpaA) 诱导后与 *Hp* 患者血清 Western Blot 反应。

图 6 omp22-HpaA 免疫原性的 Western Blot 分析

### 3 讨论

国内外大量的研究表明, 基因工程疫苗是防治 *Hp* 感染的一种很有前途的手段<sup>[7]</sup>。目前已经证实的 *Hp* 有效保护性抗原成分有 HspA, UreB, VacA, CagA, NAP, Lpp20, omp11 和过氧化氢酶等, 然而大量的动物实验研究显示这些抗原单独使用时免疫保护效果并不十分理想, 多种组分混合以及融合蛋白疫苗的研究已成为本领域的研究热点。黏附是 *Hp* 感染的先决条件, 也是致病的关键, 编码黏附素的 hpaA 基因为 *Hp* 所特有, 且序列高度保守, 编码蛋白产物 HpaA 的免疫原性已被动物实验证实, 并证实了在机体抗 *Hp* 感染中 sIgA 是黏膜免疫反应中重要的保护性抗体, 目前认为是仅次于 UreB 的疫苗候选抗原<sup>[8]</sup>。外膜是

革兰阴性细菌表面的一种连续性结构,有研究表明,革兰阴性细菌外膜中的一些蛋白成分具有良好的抗原活性,可诱导出很强的菌株特异性免疫反应,这些外膜蛋白作为抗体和免疫细胞攻击的主要靶标,可以介导对细菌最直接有效的杀灭作用,是决定免疫反应是否对人体具有保护性的关键因素。*Hp* 基因组中含有 34 个功能有待进一步研究的外膜蛋白(outer membrane protein, omp)基因,如 *Lpp20*, *omp25*, *omp26*, *omp27* 等具有良好的免疫活性<sup>[9-11]</sup>,提示外膜蛋白分子可以成为 *Hp* 疫苗研究良好的候选抗原。

我们选择 *Hp* 的 *omp22* 和 *hpaA* 基因,在 *omp22* 上游和 *hpaA* 下游加上合适的酶切位点,两基因中间通过柔韧接头连接,避免二者在折叠过程中空间结构的相互影响,从而保留各自抗原性<sup>[12]</sup>。通过 PCR 方法获得郑州分离 *Hp* 菌株 MEL-HP27 的 *omp22* 和 *hpaA* 基因,二者再互为模板和引物扩增出 *omp22-hpaA* 融合基因,成功插入表达载体 pMAL-c2X,测序结果证实了柔韧性接头正确插入和整个融合基因阅读框正确。通过 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 蛋白电泳,发现重组细菌在相对分子质量 95 ku 处出现一条特异带,正好是标签蛋白 MBP 相对分子质量(42.5 ku)与 *omp22* 的相对分子质量(24 ku), *HpaA* 的相对分子质量(29 ku)的总和,与预期融合蛋白相对分子质量相符,表明成功构建了 *omp22-HpaA* 融合蛋白重组原核表达系统,为进一步 *omp22-HpaA* 重组融合蛋白的抗原性和免疫保护性研究以及 *Hp* 基因工程疫苗和临床诊断试剂研制打下了基础。

## 【参考文献】

[1] Houben MH, Van der Beek D, Hensen EF, et al. A systematic review

of *Helicobacter pylori* eradication therapy: The impact of antimicrobial resistance on eradication rates [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(8): 1047-1055.

- [2] 马东瑞, 冯义超. 质子泵抑制剂三联疗法根除 *Hp* 的疗效 [J]. 第四军医大学学报 2006 27(6): 539.
- [3] Alm RA, Ling LS, Morr DT, et al. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1999, 397(6715): 176-180.
- [4] 白杨, 王继德, 陈焯, 等. 幽门螺杆菌黏附素 *babA2* 的克隆表达及定位 [J]. 第四军医大学学报 2004 25(2): 128-131.
- [5] 李良仁, 王继德, 白杨, 等. 幽门螺杆菌外膜蛋白 25 基因的克隆及序列分析 [J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(4): 763-765.
- [6] 张荣光, 段广才, 郝园林. 幽门螺杆菌 *omp11* 基因与麦芽糖结合蛋白基因融合表达载体的构建与表达 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(5): 749-752.
- [7] Metzger WG, Mansouri E, Kronawitter M, et al. Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers [J]. *Vaccine*, 2004, 22(17-18): 2273-2277.
- [8] Ferrero RL, Thiberge JM, Labigne A. Local immunoglobulin A antibodies in the stomach may contribute to immunity against *Helicobacter* infection in mice [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(1): 185-194.
- [9] Keenan J, Oliaro J, Domigan N, et al. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3337-3343.
- [10] 庞智, 朱红音, 徐蔚文, 等. 幽门螺杆菌 27kDa 外膜蛋白的基因克隆和特性鉴定 [J]. 胃肠病学 2002 7(5): 265-269.
- [11] 李良仁, 王继德, 白杨, 等. 幽门螺杆菌外膜蛋白 25 基因的克隆及序列分析 [J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(4): 763-765.
- [12] 朱森林, 陈昱湖, 陈洁, 等. 优化构建 *UreB/HpaA* 双价幽门螺杆菌减毒活菌疫苗的免疫保护作用 [J]. 中华消化杂志 2003 23(10): 583-587.

编辑 王睿