

· 研究快报 · 文章编号 1000-2790(2004)16-1531-02

球形幽门螺杆菌 *cagA* 基因原核表达质粒的构建及表达

王克霞, 汪雪峰, 陈琳, 李朝品 (安徽理工大学医学院病原生物学教研室, 安徽淮南 232001)

【关键词】螺杆菌, 幽门, *cagA* 基因, 基因表达

【中图分类号】R573.9 【文献标识码】A

0 引言 球形幽门螺杆菌是 *H. pylori* 为抗逆生存而形成的多形性改变, 其致病性尚存在争议, 多数学者认为 *H. pylori* 球形体可能与 *H. pylori* 感染迁延不愈、反复发作及流行传播密切相关^[1]。目前有关球形 *H. pylori* 致病力和毒力基因方面的研究尚未见有系统的报道。我们曾成功地克隆了球形 *H. pylori* 的 *cagA* 全长基因并进行了测序, 证明球形 *H. pylori* 具有完整的 *cagA* 基因。为进一步研究球形 *H. pylori* *cagA* 蛋白的生物学特性及为 DNA 疫苗奠定基础, 我们构建了球形 *H. pylori* *cagA* 基因的原核表达质粒并在大肠杆菌中获得了高效表达。

1 材料和方法

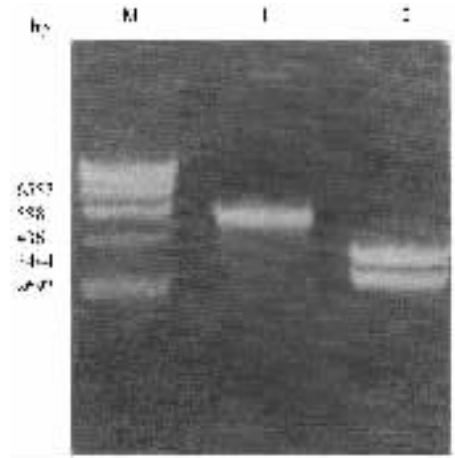
1.1 材料 *E. coli* BL21 菌株和含有 *cagA* 基因的克隆测序质粒 pMD-18T-*cagA* 由本室构建保存, 原核表达质粒 pET32a(+), *Bam*H I, *Sac* I, *LA Taq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶、4 种 dNTP, IPTG、丙烯酰胺、DNA 凝胶回收试剂盒、QIAprep Spin Miniprep Kit 等均购自大连宝生物公司。

1.2 方法 用 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切重组质粒 pMD-18T-*cagA* 回收 *cagA* 基因片段, 同时用 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切载体 pET32a(+), 目的基因与载体摩尔比为 6:1, 在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃ 连接过夜。取 3 μL 连接产物转化到感受态细菌 BL21, 在含氨苄青霉素的 LB 培养基上挑取 24 个单菌落, 使用 Mini Best DNA Purification Kit 提取质粒 DNA, 10 g/L 琼脂糖电泳进行初步筛选。疑重组质粒进一步用 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切、PCR 扩增鉴定。原核表达质粒 pET32a(+)-*cagA* 送大连宝生物公司进行序列测定。测序结果与 GenBank 中的相关基因及蛋白序列(登录号: AB015416)进行 BLAST 分析, 比较同源性。含 pET32a(+)-*cagA* 的工程单菌落接种于 3 mL 卡那霉素 LB 培养基中 37℃ 恒温摇床培养过夜, 按 1% 转接至新的 LB 培养管中, 继续培养至 A 值为 0.4~0.6, 加诱导剂 IPTG (Code No. D9030A) 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 3 h。将经 IPTG 诱导和未经 IPTG 诱导的菌体分别集菌后, 沉淀分别进行 30 s 间歇超声波破碎, 离心, 上清取出, 沉淀溶于 S-Buffer, 进行 120 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶于考马斯

亮蓝 R250 液中染色。用岛津公司 Dual wavelength flying spot Scanner CS 9000 型薄层扫描仪扫描 SDS-PAGE 后的蛋白条带。

2 结果

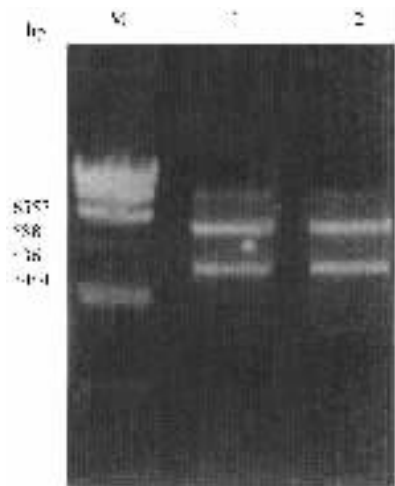
2.1 目的基因的获得 用 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切重组质粒 pMD-18T-*cagA* 及表达质粒 pET32a(+), 获得的目的基因片段约 3444 bp, 载体片段约 5881 bp, 符合预期值(图 1)。



M: λ -Hind III DNA marker; 1: pET32a(+) digested with *Bam*H I + *Sac* I, resulting in 5881 bp vector fragment; 2: Recombinant plasmid pMD-18T-*cagA* digested with *Bam*H I + *Sac* I, resulting in 3444 bp *cagA* gene fragment.

图 1 重组质粒 pMD-18T-*cagA* 及载体 pET32a(+) 的双酶切结果

2.2 重组质粒 pET32a(+)-*cagA* 的酶切鉴定 用 *Bam*H I + *Sac* I 双酶切重组质粒 pET32a(+)-*cagA*, 可获得 3444, 5881 bp 的目的基因片段及载体片段, 其片段大小均与预期值相符(图 2)。



M: λ -Hind III DNA marker; 1, 2: Two plasmids pET32a(+)-*cagA* cut with *Bam*H I + *Sac* I, resulting in 5881 bp vector fragment and 3444 bp *cagA* gene fragment.

图 2 重组质粒 pET32a(+)-*cagA* 的双酶切鉴定

收稿日期 2004-02-10; 修回日期 2004-03-01

基金项目 安徽省教育厅自然科学研究项目(No. 2003kj111)

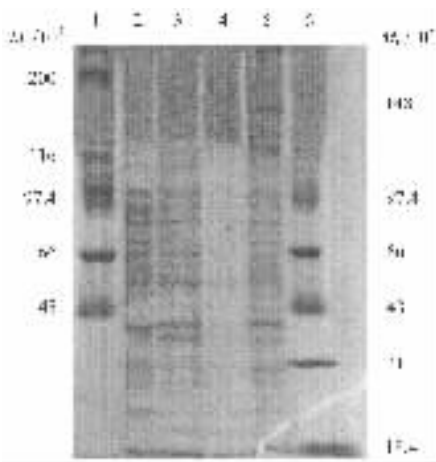
通讯作者 王克霞(1954-), 女(汉族), 安徽省淮南人, 硕士生导师, 副教授. Tel. (0554) 6659942 Email. kexwang@aust.edu.cn

2.3 测序及同源性分析 重组质粒中的 *cagA* 基因与 GenBank 中 *H. pylori-cagA* 基因序列同源性达到 99.6%, 蛋白同源性达到 98.7%。部分核酸序列测定(图 3)。



图 3 *cagA* 基因部分核酸序列测定结果

2.4 重组质粒 pET32a(+)-*cagA* 在 *E. coli* 中表达产物分析 含 pET32a(+)-*cagA* 的工程菌经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色凝胶, 出现一条约 148 ku 的蛋白条带, 与 *CagA* 蛋白分子质量相符(图 4)。薄层扫描分析显示 *CagA* 蛋白占菌体蛋白总量的 15.5%。



1, 6: Standard protein marker; 2: pET32a(+) vector; 3, 4: Recombinant plasmid noninduced with IPTG; 5: Recombinant plasmid induced with IPTG for 3 hours.

图 4 *E. coli* 表达 *CagA* 重组蛋白的 SDS-PAGE

3 讨论 *CagA* 作为 *H. pylori* 重要的毒力因子, 一直是学者们研究的重点。有人认为, *CagA* 阳性 *H. pylori* 为毒力菌株, 与消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃癌的发生极为密切。有人根据是否表达 *vacA* 和 *cagA* 将 *H. pylori* 划分为 I 型(*vacA*⁺, *cagA*⁺)和 II 型(*vacA*⁻, *cagA*⁻)并证明 I 型与较严重的胃十二指肠疾病发生相关^[2,3]。*H. pylori* *CagA* 蛋白是 *H. pylori* 重要抗原成分, 具有较强的免疫原性及免疫保护性。Crabtree^[4]曾

报道, 利用 *CagA* 蛋白配合免疫佐剂喂食小鼠, 可预防 *H. pylori* 感染且可根治 *H. pylori*, 因而得出, 利用 *CagA* 蛋白作为抗原疫苗防治 *H. pylori* 感染具有可行性。

原核表达系统中常选用大肠杆菌作为表达宿主, 其优点是遗传背景清楚, 转化和表达效率高, 易发酵且易于操作, 可以快速大量生产重组蛋白。pET32a(+)是一种高效原核表达系统, 其特点: ①根据插入基因片段的 DNA 阅读框架选择不同载体便可表达; ②含有硫氧环蛋白基因, 易于与目的蛋白形成融合蛋白, 因而不被大肠杆菌蛋白酶降解; ③N 端含 6 个组氨酸标签(6×His tag), 使重组蛋白的纯化步骤可使用金属螯合亲和层析的方法, 从而使纯化蛋白操作简便^[5]。

我们利用分子克隆方法, 成功地构建了重组质粒 pET32a(+)-*cagA* 因 pET32a(+)载体的 N 端含有 109 个氨基酸的硫氧环蛋白和 6 个组氨酸标签, 大约产生分子质量为 20 ku 的蛋白质, 故重组 *CagA* 蛋白是以融合蛋白的形式表达, 大约分子量为 148 ku, 符合预期值。测序分析比较发现 *cagA* 基因序列存在 0.4% 的突变, 其原因可能与 PCR 扩增过程以及测序过程中产生的突变有关, 也可能与 *H. pylori* 菌株本身存在变异有关。*CagA* 蛋白在大肠杆菌中的高效表达, 为大量获得 *CagA* 抗原, 深入开展 *H. pylori* *cagA* 基因的研究, 揭示 *H. pylori* 的致病机制, 对 *H. pylori* 感染的诊断、治疗及免疫预防均具有指导意义。其 *CagA* 蛋白的纯化及免疫原性分析的研究正在进行中。

【参考文献】

- [1] 牛风丽, 刘文忠. 类球形幽门螺杆菌的临床意义[M]. 见: 刘文忠. 幽门螺杆菌研究进展. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001: 237-242.
- [2] Chukov SZ, Morozov IA, Pasechnikov VD. Clinico-morphological and molecular-genetic correlations in the stomach pathology associated with *Helicobacter pylori* [J]. *Arkh Pathol*, 2002; 64: 37-40.
- [3] Yakoob J, Fan XG, Peng XN, et al. *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* cytotoxin genes in Changsha, China [J]. *Br J Biomed Sci*, 2002; 59: 150-153.
- [4] Crabtree-JE. Eradication of chronic *Helicobacter pylori* infection by therapeutic vaccination [J]. *Gut*, 1998; 43(1): 7-8.
- [5] Jiang Z, Huang AL, Tao XH, et al. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M_r 18 000 OMP from *Helicobacter pylori* [J]. *World J Gastroenterol*, 2003; 9(8): 1756-1761.

编辑 王 睿

· 期刊文摘 · 免疫亲和层析纯化大肠癌相关抗原

[杨勇, 李郁, 王贤辉, 商澎, 汪莉, 寿爱荣, 姚西英, 陈志南. 细胞与分子免疫学杂志, 2004 20(3): 348-351]

目的: 从培养的大肠癌细胞 Hce-8693 中分离纯化并鉴定大肠癌相关抗原。方法: 利用流式细胞术选择高表达大肠癌相关抗原的大肠癌细胞系, 分别用单去污及三去污裂解液裂解细胞。然后用 5 株抗大肠癌单克隆抗体(mAb)CYL~CYL-5 进行 Western blot 分析与大肠癌细胞结合反应最强烈的 mAb。以此 mAb 作为配基进行亲和层析纯化大肠癌相关抗原, 纯化结果利用 Western blot 法进行鉴定。结果: 大肠癌细胞系 Hce-8693 上相关抗原的表达量最高, 抗大肠癌 mAb CYL-2 与 Hce-8693 的结合力最强。纯化所获与 CYL-2 特异结合的大肠癌相关抗原, M_r 约为 13×10^3 。该抗原由 M_r 为 60×10^3 和 70×10^3 两种亚基组成。结论: 利用 mAb CYL-2 进行亲和层析, 从大肠癌细胞系 Hce-8693 中获得纯化的肿瘤相关抗原。