

幽门螺杆菌儿童分离株尿素酶基因 B 的克隆及序列分析

周珍文, 邓秋连, 夏慧敏, 耿岚岚, 梁伟河, 谢永强, 黄勇, 龚四堂

(广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510120)

【摘要】 目的 克隆幽门螺杆菌(Hp)临床儿童分离株尿素酶 B(*UreB*)基因入 pGEX-4T-1 表达载体, 并进行测序及基因比对分析, 为以 *UreB* 作为 Hp 疫苗分子的口服疫苗研制奠定基础。方法 根据 GenBank 中 Hp *UreB* 序列, 设计一对特异性引物 PCR 扩增 Hp 临床儿童分离株 *UreB* 全长基因, EcoR I 及 Not I 酶切后与做相应酶切的 pGEX-4T-1 连接, 转化大肠杆菌 BL21, 提取质粒进行双酶切鉴定及基因测序, 并对测序结果进行比对分析。结果 以 Hp 儿童分离株 GZCH1 为模板, 成功扩增了 *UreB* 基因, 基因大小为 1 710 bp, 重组 pGEX-4T-1-*UreB* 双酶切鉴定可见目的片段, 测序结果显示 *UreB* 在正确阅读框中, 序列比对分析显示其与相关报道序列核苷酸和氨基酸一致性达 98%。Hp 儿童分离株 GZCH1 *UreB* 序列已登录 GenBank(登录号:FJ455126)。结论 从 Hp 儿童分离株 GZCH1 中成功克隆了 *UreB* 基因, 为 *UreB* Hp 口服疫苗研制奠定了基础。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(11):877-880]

【关键词】 幽门螺杆菌; 尿素酶 B 基因; 克隆; 儿童

【中图分类号】 R394-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2009)11-0877-04

Cloning and sequence analysis of *UreB* of *Helicobacter pylori* isolated from children

ZHOU Zhen-Wen, DENG Qiu-Lian, XIA Hui-Min, GENG Lan-Lan, LIANG Wei-He, XIE Yong-Qiang, HUANG Yong, GONG Si-Tang. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, China (Email:zhouzhenwen28@126.com)

Abstract: Objective To clone *UreB* gene of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) isolated from children to pGEX-4T-1 expression plasmid, and do sequence analysis. **Methods** A pair of specific primer was designed according to *H. pylori UreB* gene in the GenBank. Using *H. pylori* strains isolated from children as a template, a *UreB* gene was obtained by PCR. After EcoR I and Not I digestion, the PCR production was linked with pGEX-4T-1 which was digested with the same enzymes. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and identified by double enzyme digestion and sequence analysis. The sequence results were compared with the gene sequence in the GenBank. **Results** A *UreB* gene was successfully amplified from children's *H. pylori* strain GZCH1. It was 1 710 bp in size. The objective band was identified by double enzyme digestion. DNA sequence showed that *UreB* was in the correct open reading frame. The sequence comparison analysis showed that DNA and amino acid sequence identities of *UreB* gene with other strains were 98%. The sequence of *UreB* of *H. pylori* strain GZCH1 was submitted to GenBank (accession number: FJ455126).

Conclusions *UreB* of *H. pylori* strain GZCH1 is successfully cloned to pGEX-4T-1, which provides a basis for research of oral *H. pylori* vaccine. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(11):877-880]

Key words: *Helicobacter pylori*; *UreB*; Clone; Child

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)为上消化道疾病的主要致病菌,它的感染不但与胃炎、胃溃疡及非溃疡性消化不良有关,而且与黏膜相关性淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌也有重要关系^[1,2]。Hp在全球人群的慢性感染率达50%以上^[3],我国人群的平均感染率高达58.07%^[4],儿童也占有一定比例^[5-7],其严重危害着人类的健康安全。

Hp感染的治疗多采用质子泵抑制剂外加两种抗生素的“三联”疗法。尽管此方案能有效地清除

已感染的Hp,但存在诱导耐药菌株流行、药物副作用、费用较高和病人依从性差等问题。因此,接种Hp疫苗是预防和控制Hp感染最为有效的措施。

Hp含丰富尿素酶(Ure),约占全菌体蛋白的5%~10%,并在细菌表面广泛表达,具有相对分子质量大、可形成颗粒状结构等特点,便于实行黏膜免疫接种,是Hp亚单位疫苗中最有希望的保护性抗原之一。*Ure*基因共有9个亚基,其中*UreA*和*UreB*为结构基因,由于*UreB*缺乏尿素酶活性,具有免疫

[收稿日期]2009-03-13; [修回日期]2009-05-16

[基金项目]国家自然科学基金(30801054);广东省自然科学基金(8451012001001570);广州市医药卫生科技基金(2008-YB-067);广州市妇女儿童医疗中心博士启动基金(30307-3200818)。

[作者简介]周珍文,男,博士,副主任检验师。主攻方向:疫苗研究。

原性,在胃螺杆菌种中高度保守,是细菌定植所必须因子,因此其为 Hp 亚单位疫苗的最佳候选抗原^[8]。本研究从临床儿童胃炎患者胃粘膜分离出一株 Hp, PCR 扩增 *UreB* 基因,并成功将其克隆入 pGEX-4T-1 原核表达载体,进行了基因测序及序列比对分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 Hp 分离株来源 分离自我院消化内科一名 9 岁男性胃炎患者胃窦粘膜。

1.1.2 试剂与仪器 pGEX-4T-1 质粒载体购自法国马西亚公司;微需氧发生袋购自法国生物梅里埃公司;Ex-Taq DNA 聚合酶,EcoRI 和 NotI 限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,DNA Marker 等购自 Takara 公司;胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司;还包括德国 Biometra 公司的 PCR 仪,英国 Uvitec 公司的 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统,上海力申公司的 HF safe-1200 型生物安全柜及德国 Sorvall 公司的 Micro 17R 台式高速冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 Hp 的培养及鉴定 胃镜检查时在胃窦部取小块粘膜,立即插入 Cary-Blair 转送培养基送检,将胃黏膜标本直接涂布于 Hp 选择性培养基,将其装进微需氧发生袋后置 37℃ 培养 4 ~ 5 d,挑取清澈、透明菌落进行革兰氏染色及尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶实验。

1.2.2 *UreB* 的克隆及验证 根据 GenBank Hp *UreB*(DQ674278) 序列,设计特异性引物一对:*UreB* P1:5'GCGGAATTCATGAAAAAGATTAGCAGAAAAG3' P2:5'AAAGCGGCCCGCCTAGAAAATGCTAAAGAGT-TGTG 3'。引物序列分别加入 EcoR I 和 Not I 酶切位点。挑取幽门螺杆菌单菌落于 50 μL 蒸馏水中,煮沸 8 min,12 000 rpm 离心 1 min,取上清作为 PCR 模板。PCR 反应条件:94℃ 热变性 5 min,94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 EcoR I 和 Not I 酶切纯化后与相应酶切纯化的 pGEX-4T-1 经 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 BL21。挑取经氨苄筛选的阳性菌落提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定。

1.2.3 *UreB* 的序列分析 将鉴定含 *UreB* 基因的质粒菌送 Invitrogen 公司,采用双脱氧链末端终止法在 ABI PRISM DNA 序列分析仪上测定插入片段的核苷酸序列。登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

网站,将测序结果进行 BLAST 比对分析,分析其与其他 Hp 株氨基酸序列的同源性。

2 结果

2.1 Hp 的培养、鉴定

挑取 Hp 选择性培养基中清澈、透明单个菌落进行形态及生化鉴定:分离的 Hp 为革兰染色阴性,S 形、弧形或海鸥形;尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶实验阳性,能与 Hp 抗体发生凝集,暂将菌株命名为 Hp GZCH1 株。

2.2 Hp GZCH1 *UreB* 基因的 PCR 扩增

琼脂糖凝胶电泳显示,以 Hp GZCH1 株为模板,P1/P2 为引物扩增出约 1 710 bp 的 DNA 片段,与预期目的片段大小一致(图 1)。

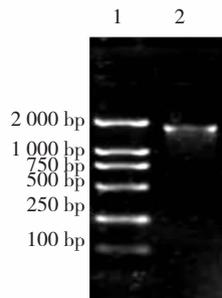


图 1 *UreB* 基因的 PCR 扩增 Lane 1:DNA Marker DL 2 000;Lane 2:*UreB* PCR 产物

2.3 重组 pGEX-4T-1-*UreB* 质粒的鉴定

挑取转化后氨苄青霉素抗性 LB 平板上生长单克隆,提取质粒,以重组质粒为模板,用 *UreB* 特异性引物进行 PCR,都获与目的基因大小一致的片段(约 1 710 bp)。将筛选出的重组质粒进行 EcoR I 和 Not I 双酶切鉴定,切下大小约 1 710 bp 的目的片段(图 2),与 *UreB* 基因片段大小一致。

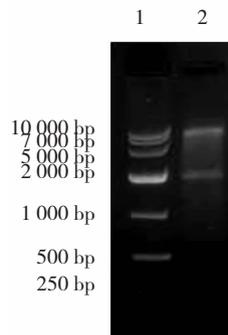


图 2 重组质粒 pGEX-4T-1-*UreB* 的双酶切鉴定 Lane 1: DNA Marker DL10 000; Lane 2: 重组 pGEX-4T-1-*UreB* 质粒 EcoR I 和 Not I 双酶切

2.4 阳性克隆测序

测序结果显示,临床分离菌株 GZCH1 株 *UreB* 基因全长 1 710 bp, 起始于 ATG, 终止于 TAG。预测的分子量为 61 715. 28, 等电点为 5. 64。其序列已

登录 GenBank, 登录号为 FJ455126。

基因同源性分析显示其与 GenBank 报道的 HpG27 株相比仅微细差别, 氨基酸一致性达 98% (图 3)。

GENE ID: 6962949 ureB | urease B [Helicobacter pylori G27]

Score = 1075 bits (2781), Expect = 0.0
Identities = 562/569 (98%), Positives = 565/569 (99%), Gaps = 0/569 (0%)
Frame = +1

Query	1	MKKISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDDTLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLREGMSQSNN	180
Sbjct	1	MKKISRKEYVSMYGPTTGDKVRLGDDTLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLREGMSQSNN	60
Query	181	PSKEELDLIITNALIVDYTGiykadigikdgkiagigkgnkdmQDGVKNNLSVGPATEA	360
Sbjct	61	PSKEELDLIITNALIVDYTGiykadigikdgkiagigkgnkdmQDGVKNNLSVGPATEA	120
Query	361	LAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPPQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTIAPGRRNLK	540
Sbjct	121	LAGEGLIVTAGGIDTHIHFISPPQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTI PGRRNLK	180
Query	541	WMLRAAEEYSMNGLFLAKGNTSDDASLADQIEAGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADK	720
Sbjct	181	WMLRAAEEYSMNGLFLAKGNTS+DASLADQIEAGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADK	240
Query	721	YDVQVAIHDTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMHTFHTEGAGGGHAPDI IKVAGEHNILPAST	900
Sbjct	241	YDVQVAIHDTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMHTFHTEGAGGGHAPDI IKVAGEHNILPAST	300

图 3 幽门螺杆菌儿童分离株 GZCH1 *UreB* 与幽门螺杆菌 G27 株基因同源性比较

3 讨论

流行病学调查显示,50% 以上成人 Hp 相关疾病患者是在儿童期感染 Hp^[9]。在 Hp 感染诊断的众多方法中唯有细菌培养法是“金标准”,是研究其致病机制、耐药检测、疫苗、分型等的基础。但是进行 Hp 分离培养的标本要求采集后及时处理,处理条件严格,生长条件苛刻,培养设备复杂、昂贵,培养技术要求高。

Hp 进入体内主要定居在胃粘膜,细菌分布密度最高为胃窦部。本研究将胃镜检查时所采集胃窦粘膜插于 Cary-Blair 半固体转送培养基立即送检, Cary-Blair 半固体培养基可起到隔离空气的作用。将黏膜标本接种于 Hp 选择性培养基,使用微需氧发生袋进行 37℃ 长时培养(4 d),可见单个 Hp 菌落,此方法无需特殊仪器装置,实用性强。我们已从临床儿童胃黏膜标本中分离了多株 Hp 菌株。

本研究直接采用 Hp 单菌落煮沸裂解基因组 DNA,以其为模板,PCR 扩增 *UreB* 全长基因,并未进行常规方法离心大量菌体进行基因组 DNA 提取,也

取得较好的扩增效果。可能由于 *UreB* 基因丰度较高,无需富集,直接挑取菌落煮沸裂解的少量 DNA 即可满足 Hp *UreB* 基因的扩增。本研究所克隆的 Hp *UreB* 基因与相关报道序列比较,核苷酸和氨基酸一致性高达 98%,表明 Hp *UreB* 基因的核苷酸序列具有高度的保守性,符合疫苗候选分子原则。

为获得 Hp *UreB* 蛋白的原核表达,本研究选用了带谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S transferase, GST) 的融合表达载体 pGex-4T-1,核苷酸序列测定表明,克隆的 Hp GZCH1*UreB* 在其开放阅读框中, *UreB* 与 GST 标签的融合表达,将便于 *UreB*-GST 融合蛋白分离、纯化。

Hp 尿素酶 B 亚单位 (*UreB*) 抗原性较强并能产生较强的保护性免疫反应,是 Hp 疫苗或诊断抗原的主要候选基因之一。重组尿素酶以热不稳定毒素 (LT) 为佐剂,可保护 63% ~ 100% 的小鼠免受 Hp 的攻击^[10]。使用尿素酶构建的重组伤寒沙门菌 SL3261 株,口服免疫小鼠 12 周后,胃黏膜中出现大量 IgA 抗体,而且可致体内 γ 干扰素等细胞因子升高,胃黏膜炎症在免疫后没有进一步发展^[11]。Michetti 等^[12] 报告 26 位志愿者口服重组 *UreB* 和佐

剂大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)后,胃粘膜寄生的Hp密度明显降低。现Hp疫苗研制中最常用的两种黏膜佐剂为霍乱毒素(CT)和大肠杆菌热不稳定毒素(LT),都有腹泻、痉挛等不良反应。使用适宜胃肠道定植微生物作为口服疫苗载体,为研制Hp疫苗的有效途径。而目前Hp疫苗研制所采用的消化道疫苗递送系统(载体系统),一般是消化道减毒细菌(如伤寒)或病毒,但它们仍然存在回复突变和安全性问题。枯草杆菌芽孢具有良好的抵抗性,储存时间长,可顺利通过胃肠屏障,并且芽孢载体抗原能直接靶向抗原提呈细胞及周围淋巴器官,诱导并调节机体的特异性免疫反应^[13~15]。

本研究成功克隆了Hp儿童株(GZCH1)UreB基因,为以UreB为疫苗分子的口服枯草芽孢Hp疫苗的研制提供了条件。

[参 考 文 献]

[1] Warren J, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium inactive chronic gastritis[J]. Lancet, 1983, 1(8336): 1273-1275.

[2] Stephenie CS, Alfonso JB. Helicobacter pylori strikes again-gastric mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma[J]. Gastroenterol Nurs, 2007, 30(5):348-354.

[3] Danesh J. Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of epidemiological studies[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1999, 13(7):851-856.

[4] 王娟,王润. 中国幽门螺杆菌感染流行病学杂志 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(6):443-446.

[5] 耿岚岚,龚四堂,区文玟,潘瑞芳,陈宝心,丘小汕. 两种非侵入性诊断方法在儿童幽门螺杆菌感染中的应用[J]. 实用儿科临

床杂志, 2003, 18(7):538-539.

[6] 关克涛,徐文泉,刘云锋,卢铭江,颜幕霞. 酶联免疫吸附测定检测儿童粪便幽门螺杆菌抗原[J]. 广州医学院学报, 2006, 34(4):43-45.

[7] 黄烈平,庄满利,顾承萍. 36株青少年幽门螺杆菌耐药分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(3):210-212.

[8] 袁小澎,邹全明,柏杨,杨珺,郭鹰,张卫军,等. 幽门螺杆菌B亚单位功能片段的纯化及活性研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7):959-962.

[9] 赵煜,徐晓华,刘凤霖,张书红,司徒爱明. 儿童幽门螺杆菌感染与相关性疾病的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3):403-404.

[10] Myers GA, Ermak TH, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, et al. Oral immunization with recombinant Helicobacter pylori urease confers long-lasting immunity against Helicobacter felis infection[J]. Vaccine, 1999, 17(12):1394-1403.

[11] Liu X, Hu J, Zhang X, Fan D. Oral immunization of mice with attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori urease B subunit[J]. Chin Med J, 2002, 115(10):1513-1516.

[12] Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Pota N, Bachmann D, Herranz M, et al. Oral immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults[J]. Gastroenterology, 1999, 116(4):804-812.

[13] 周珍文,胡旭初,余新炳. 枯草杆菌芽孢载体疫苗的研究及其在寄生虫病防治中的应用前景[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(9):935-937.

[14] Zhou ZW, Xia HM, Hu XC, Huang Y, Li YW, Li L, et al. Oral administration of a Bacillus subtilis Spore-based vaccine expressing Clonorchis sinensis tegumental protein 22.3 kDa confers protection against Clonorchis sinensis[J]. Vaccine, 2008, 26(15):1817-1825.

[15] Zhou ZW, Xia HM, HuXC, Huang Y, Ma CL, Chen XX, et al. Immunogenicity of recombinant Bacillus subtilis spores expressing Clonorchis sinensis tegumental protein[J]. Parasitol Res, 2008, 102(2):293-297.

(本文编辑:王庆红)