

利用杆状病毒表达幽门螺杆菌 *cagA* 基因

梁 钧, 龚 岷, 袁志明**, 梁布锋

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Expression of *Helicobacter pylori cagA* gene in Insect Cells by *Baculovirus*

LIANG Jun, GONG Min, YUAN Zhi-ming**, LIANG Bu-feng

(Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: A recombination transposing vector pBlueBacHis2-CagA was constructed by inserting *Helicobacter pylori cagA* gene into pBlueBacHis2A vector of baculovirus expression system. Co-transfecting Sf9 cells with Bac-N-blue DNA and pBlueBacHis2-CagA, recombinant viral DNA was obtained by purification of recombinant plaques. PCR result showed *cagA* gene intergrating in correct position of baculovirus genome. The expression of *Helicobacter pylori cagA* gene was confirmed by SDS-PAGE and Westernbolt. Using indirect ELISA assay, it was found that the protein exhibited good specific reactivity with sera of HP-infected individuals.

Key words: *Helicobacter pylori*; *cagA* gene; Expression; Insect Cells

摘要: 幽门螺杆菌 *cagA* 基因克隆到杆状病毒表达系统的 pBlueBacHis2A 转移载体中, 将重组质粒 pBlueBacHis2A-CagA 与亲本病毒 Bac-N-blue DNA 共转染 Sf9 细胞, 以空斑法纯化获得的重组杆状病毒。经 PCR 法鉴定后进行扩增培养, SDS-PAGE 和 Western bolt 检测结果证实所表达的蛋白为 CagA 蛋白, 间接 ELISA 分析表明, 表达产物可与 Hp 感染者血清发生特异性的免疫反应。

关键词: 幽门螺杆菌; *cagA* 基因; 表达; 昆虫细胞

中图分类号: R373 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0336-04

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 简称 Hp) 是一种微需氧, 弯曲呈 S 状或螺旋状, 专性寄生于人胃粘膜上的革兰氏染色阴性杆菌。自从 1983 年 Warren 等人首次发现以来, 经胃粘膜组织样品培养及针对性治疗确证, Hp 是慢性活动性胃炎的病原菌和消化性溃疡的重要致病因子, 同时与胃癌的发生密切相关^[1]。通过对 Hp 毒力因子的研究表明: 细胞毒素相关蛋白 A (CagA), 是引起人类严重胃部疾病的主要致病因素之一^[2]。该基因已被克隆并进行了序列分析^[3]。经研究证实 CagA 蛋白能够诱导胃上皮细胞产生 IL-1 β , IL-6 及 TNF- α , IL-8 等细胞因子, 然后分别诱导中性粒细胞和淋巴细胞的趋化性以及单核细胞和多核巨细胞浸润。上述免疫炎症反应细胞释放的各种蛋白酶及胶原酶是导致胃组织

损伤的重要因素。因此目前一致认为含 *cagA* 基因的 Hp 菌株是高毒株。本文利用杆状病毒表达系统对 *cagA* 基因片段进行表达, 同时检测了表达产物的抗原活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供体质粒 pET-CagA 含幽门螺杆菌 ATCC43526 株 *cagA* 基因部分片段由本室构建^[4]。杆状病毒转移载体 pBlueBacHis2A, 线性化亲本 AcMNPV 病毒 Bac-N-blue DNA 为 Invitrogen 公司产品。草地夜蛾 Sf9 细胞由本室保存。

细胞转染试剂 Insectin-plus Liposomes, 低温琼脂糖 Baculovirus Agarose, 免疫印迹法检测表达产物

收稿日期: 2002-04-08, 修回日期: 2002-05-09

作者简介: 梁 钧 (1977-), 男, 广东省籍, 硕士生, 从事分子生物学研究。

** 通讯作者: 袁志明 (1963-), 男, 湖北浠水籍, 研究员, 从事分子生物学研究。Correspondence author.

的 Anti-Xpress 单抗均为 Invitrogen 公司产品。工具酶以及酶标二抗等为华美公司产品。患者血样经过胃黏膜活检组织培养检测确证为 Hp 感染,由上海瑞金医院和上海第八人民医院提供,阴性对照血清来自健康人。

1.2 构建含 *cagA* 基因的杆状病毒表达载体

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切质粒 pET-CagA, 分离出 1 280bp 的 *cagA* 基因片段后,以低熔点琼脂糖法回收该片段,并连接到 pBacblue-His2A 转移载体的相应位点。转化 DH5 α 宿主菌后,提取质粒,用 *Bam*H I, *Hind* III 进行酶切鉴定,得到重组质粒 pBlueBacHis2A-CagA。

1.3 表达 CagA 蛋白重组杆状病毒的获得

利用上述转化后的提纯质粒按试剂盒手册说明,同 Insectin-plus Liposomes 脂质体及线性化亲本病毒 Bac-N-blue DNA 共转染 Sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养 5d。观察到典型的细胞病变特征后,收集细胞培养物上清液。将转染后上清液经系列稀释,感染贴壁良好的 Sf9 细胞单层,然后以浓度为 1.25% 的低熔点琼脂糖 Baculovirus Agarose 覆盖(含 150 μ g/mL X-gal),27 $^{\circ}$ C 培养 7d 后挑取蓝色空斑。

1.4 PCR 检测 *cagA* 基因在重组杆状病毒中的整合

蓝斑病毒经 Sf9 细胞扩增培养后,取重组杆状病毒培养上清液,与等体积 PEG8000 20% (w/v) 含 1mol/L NaCl 混匀后室温静置,离心后弃上清,用等体积酚-氯仿抽提,重组杆状病毒 DNA 经乙醇沉淀,洗涤后晾干,溶于 10 μ L ddH $_2$ O 取 5 μ L 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物为:

正向引物:5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTT TTG-3';

反向引物:5'-CGCTAGATTCTGTGCGTTGTT G-3'。

在 50 μ L 反应体系,依次加入各组份,设置循环参数,94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 1min,55 $^{\circ}$ C 复性 2min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3min 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。取 10 μ L 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后在紫外光下观察结果。

1.5 *cagA* 基因在 Sf9 细胞中的表达及鉴定

重组病毒感染 Sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养 96h。将培养液于 5 000g 离心 5min, PBS 洗涤沉淀 3 次,细胞沉淀经细胞裂解液裂解(50mmol/L Tris-HCl, 5% 2-巯基乙醇,0.4% SDS, 10mmol/L EDTA),同时培养

液上清经 10 倍浓缩,分别上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 分析检测 CagA 的表达。

1.6 表达产物的免疫活性检测

重组病毒感染单层培养 1×10^6 个 Sf9 细胞 27 $^{\circ}$ C 培养,96h 后收获细胞,用 PBS 洗涤 3 次,悬于 100 μ L PBS,取 5 μ L 加 5 μ L 2X 溶胞缓冲液(0.2% SDS, 0.2% Triton X-100, 100mmol/L Tris-Cl, pH 8.0),室温作用 5min,超声波作用 5min。加入 90 μ L 包被液包被,加酶标二抗及底物显色,酶标仪检测 OD 值(波长为 492nm)根据 $OD_{492} \geq$ 阴性 OD_{492} 两倍以上者判为阳性这一标准,进行血清样品 CagA 阴、阳性判定。

2 结果

2.1 杆状病毒转移载体的构建

将获得的重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定,双酶切结果表明所获重组质粒 *Bam*H I / *Hind* III 位点之间有插入片段,其大小约 1.28kb,与用低熔点琼脂糖法回收的 pET-CagA 双酶切小片段大小相当(图未示出)。以上结果证实 *cagA* 基因片段被亚克隆到质粒 pBacblueHis2A 上。

2.2 重组杆状病毒的获得

重组表达质粒与线性化亲本病毒 DNA 以脂质体法共转染 Sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养 5d,观察到典型的细胞病变;细胞变圆,肿大,细胞折光性增强,逐渐破碎脱落,收集上清。经 10 倍系列稀释,以空斑法纯化重组病毒,27 $^{\circ}$ C 培养 7d,随机挑取蓝色空斑,即为重组杆状病毒。

2.3 重组杆状病毒的鉴定

提取病毒 DNA 模板用 PCR 扩增,电泳结果可见:对照病毒(即亲本病毒与空载体重组获得)在 330bp 处有特异扩增带,而重组杆状病毒在 1.6kb 处有特异扩增带(图 1),PCR 反应阳性,且重组杆状病毒与对照病毒扩增产物分子量相差 1.28kb,是由于重组杆状病毒基因组整合了外源片段 *cagA* 基因所致,因此获得的重组杆状病毒为目的病毒。

2.4 重组杆状病毒表达 CagA 蛋白

重组病毒感染 Sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养 96h,收获细胞,经 12% 的 SDS-PAGE 检测可见重组病毒感染的细胞在 58kD 处有清晰条带与预期 CagA 蛋白的分子量大小相符,正常 Sf9 细胞对照则无上述条带,说明 *cagA* 基因得到了表达(图 2)。以 Anti-Xpress 单抗进行 western blot 检测结果显示,在 58kD 处有 1

条特异带,证明所表达蛋白为 CagA 蛋白。SDS-PAGE 分别检测培养上清和细胞沉淀 CagA 表达情况,结果表明 CagA 主要存在胞浆于内,上清则未发现,说明 CagA 的表达是不分泌的。

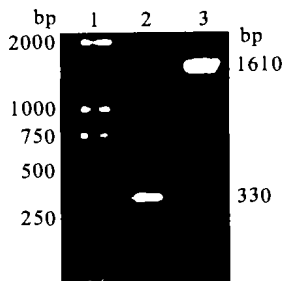


图1 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR Analysis of recombinant baculovirus

1, DNA Marker; 2, Control Baculovirus PCR result; 3, Recombinant baculovirus PCR result

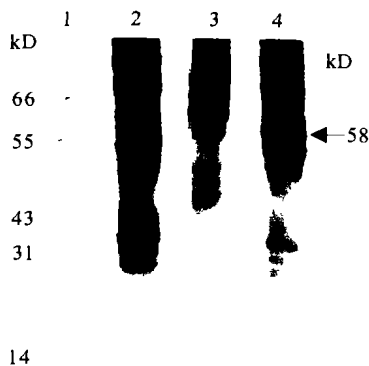


图2 Sf9 细胞表达的 CagA 蛋白的 SDS-PAGE 分析

泳道 1, 分子量标准; 2, 野生病毒感染 Sf9 细胞裂解液; 3, 正常 Sf9 细胞裂解液; 4, 重组病毒感染 Sf9 细胞裂解液。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of CagA protein expressed in Sf9 cells

1, Molecular weight marker; 2, Lysate of Sf9 cells Infected with wild virus AcMNPV3, Lysate of uninfected Sf9 cells; 4, Lysate of Sf9 cells Infected with CagA recombinant baculovirus.

2.5 抗原活性分析

对收集到的 35 份临床血样用 PBS 作 1:50 倍稀释, 10 份健康人血清按同样比例稀释后作为对照, 结果表明在上述 45 份血样中, 35 份 Hp 阳性血样中检测出 CagA 阳性 31 份, 健康人血样反应结果呈阴性, Hp 阳性血样中的 CagA 阳性检出率为 88.6%, 和其他文献中报道的检出率大致相同, 而正常细胞裂解液包被物则无反应, 因此初步表明所获得的目的蛋白具有 CagA 活性^[5]。

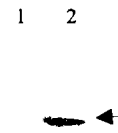


图3 Sf9 细胞表达的 CagA 蛋白 Western bolt

1, 正常 Sf9 细胞裂解液; 2, 重组病毒感染 Sf9 细胞裂解液。

Fig. 3 Western bolt analysis of CagA protein expressed in Sf9

1, Uninfected Sf9 cells; 2, Sf9 cells Infected with CagA recombinant baculovirus.

3 讨论

本文以昆虫细胞 Sf9 和杆状病毒为表达系统, 通过共转染获得含幽门螺杆菌 *cagA* 基因片段的重组病毒。利用纯化的重组病毒感染 Sf9 细胞后, 检测到细胞内含有 *cagA* 基因的表达产物, 说明昆虫细胞能正确的表达出一定水平的 CagA 蛋白。间接 ELISA 结果显示, 重组病毒感染 Sf9 细胞裂解液可与 Hp 感染者血清发生特异性的免疫反应, 而正常细胞裂解液则无反应, 同时健康人血样反应呈阴性, 初步表明所获得的目的蛋白具有抗原活性。本研究所用亲本 AcMNPV 病毒 Bac-N-blue DNA 是经过基因工程改造缺失 ORF1629 复制必需片段的致死突变株。必须与转移载体 pBlueBacHis2A 进行同源重组后获得完整的 ORF1629 片段的重组病毒才能复制, 因此保证了较高的重组率。仅用一轮空斑筛选, 即可获得含外源基因的重组病毒。另外本文采用 PCR 法验证外源基因在重组病毒的整合状态, 仅需提微量的病毒 DNA 作为模板, 而无需提取大量的病毒材料做酶切图谱分析。

作为重要的病原菌 Hp 的全基因组序列于 1997 年测定完成,^[6] 根据测序结果将编码毒素蛋白 *cagA* 基因的上游序列约 40kb 毒素蛋白集中排列的区域定义为 Hp 的基因群致病岛 Cag-PAI (Cag Pathogenicity Island)。Hp 强毒株的 *cag* 基因群致病岛中除编码 CagA 抗原外, 还编码能引起免疫炎症反应细胞产生分裂增生因子的诱导蛋白, 以及将亲水性免疫显性蛋白 CagA 向胃粘膜细胞内传递的 typeIV 分泌系统。因此在感染 Hp. pylori CagA⁺ 株的患者血清及局部胃粘膜中可检测到相应的 IgG 和 IgA 抗体存在^[7]。CagA 蛋白是微生物与真核生物细胞

间相互作用分子,利用杆状病毒所表达的产物具有天然构象和适当的翻译后修饰可能更有利对抗血清的识别。另外 *cagA* 基因是 Hp 高毒株成功感染宿主细胞的分子标志,因此表达 CagA 蛋白并确定其免疫原性对建立免疫学诊断系统有重要意义。

参考文献

- [1] Pan Z J, Hulst M, Feller S, *et al.* Equally high prevalence of infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35:1344 - 1347.
- [2] Figura M. *Helicobacter pylori* factors involved in the development of gastroduodenal mucosal damage and ulceration[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1997, 25(Suppl):149 - 163.
- [3] Covacci A, Censini S, Bugnoli M, *et al.* Molecular characterization of the 128-Kda immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5791 - 5795.
- [4] 龚 岷, 梁 钧, 梁布锋. 高效表达幽门螺杆菌 CagA 蛋白工程菌的构建[J]. *中华消化杂志*, 2001, 21:318 - 319.
- [5] Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, *et al.* Assessment of *Helicobacter pylori* VacA and CagA Genotypes and Host Serological Response[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:1339 - 1344.
- [6] Tomb J F, White O, Kerlavage A R, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Nature*, 1997, 388(6642):539 - 547.
- [7] Odenbreit S, Puls J, Sedlmair B, *et al.* Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion[J]. *Science*, 2000, 287:1497 - 1500.