

重组幽门螺杆菌多表位疫苗工程菌株的构建及其微生物学特性研究^{*}

王保宁¹, 潘兴^{1,2}, 黄筱钧¹, 周永君², 祝捷², 高礼珍², 牛晓娟², 李婉宜¹, 李明远¹, 王红仁^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 微生物学教研室(成都 610041); 2. 四川万可泰生物技术有限责任公司(成都 610041)

【摘要】 目的 构建含有幽门螺杆菌尿素酶(*ureI*、*ureB*)及霍乱毒素 B 亚单位(*ctB*)融合片段的多表位疫苗工程菌,并研究其微生物学特性。**方法** 通过生物信息学方法从 *ureI* 和 *ureB* 基因中筛选出 T 细胞和 B 细胞优势表位,通过柔性 Linker 相连,并在其 N 端加入分子内佐剂序列 *ctB*,按照大肠杆菌 BL21(DE3)的密码子偏好性进行密码子优化,即为 BIB 序列。人工合成之后,插入原核表达质粒 pET28a(+)中,构建 pET28a(+)/*ctB-ureI-ureB* [pET28a(+)/BIB]重组质粒。经限制性内切酶酶切鉴定及 DNA 测序鉴定正确后,将质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中。BIB 工程菌经乳糖诱导表达后,SDS-PAGE 检测重组蛋白 BIB 的表达情况,并对其 N 端氨基酸序列和相对分子质量进行测定,Western blot 对其进行抗原性鉴定。**结果** 原核表达质粒 pET28a(+)/BIB 经双酶切和测序鉴定构建正确,SDS-PAGE 电泳显示在相对分子质量 33×10^3 处有一条明显条带,其 N 端氨基酸序列和相对分子质量与设计序列 100%一致,Western blot 结果显示 BIB 可以与抗幽门螺杆菌悉尼株(SS1 株)小鼠血清及鼠抗 CTB 单抗产生特异性反应。**结论** 成功构建了幽门螺杆菌多表位重组原核表达工程菌,该工程菌表达的 BIB 蛋白抗原性良好。

【关键词】 幽门螺杆菌 多表位疫苗 尿素酶 B 亚单位 尿素酶 I 亚单位 霍乱毒素 B 亚单位

The New Bacteria Expressing Recombinant Multi-epitope Vaccine against *Helicobacter pylori* and Its Microbiological Characteristics WANG Bao-ning¹, PAN Xing^{1,2}, HUANG Xiao-jun¹, ZHOU Yong-jun², ZHU Jie², GAO Lizhen², NIU Xiao-juan², LI Wan-yi¹, LI Ming-yuan¹, WANG Hong-ren^{1△}. 1. Department of Microbiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Vac Technology Co. Ltd, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wanghongren@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct the engineering bacteria with recombinant plasmid expressing the multi-epitope vaccine which composed of *Helicobacter pylori* urea membrane channel protein (UreI), *Helicobacter pylori* urease B subunit (UreB) and cholera toxin B subunit (CTB), and then to study its microbiological characteristics. **Methods** The sequence contains some dominant epitopes of *Helicobacter pylori* *UreI* and *UreB* was designed, and *ctB* was added at the N-terminal, all the sequence were linked by flexible linkers. Codon optimization was done according to *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) bias, the optimized sequence was designated BIB. BIB sequence was synthesized and cloned into plasmid pET28a(+). The recombinant plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant protein BIB was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and analyzed by Western blot. **Results** The plasmid of pET28a(+)/BIB was constructed successfully, confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant protein BIB with relative molecular mass about 33×10^3 could be produced by *E. coli* BL21 (DE3) and was detected by Western blot. The relative molecular mass and N-terminal amino acid sequence of BIB were 100% identity with the design. **Conclusion** The engineering bacteria with recombinant plasmid expressing the multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* was constructed successfully. The recombinant protein BIB can be identified by anti-Sydney strain 1 of *Helicobacter pylori* (*H. pylori* SS1) polyclonal antibody and anti-CTB monoclonal antibody, which demonstrated that BIB has the expected antigenicity.

【Key words】 *Helicobacter pylori* Multi-epitope vaccine Urease B subunit Urease I subunit Cholera toxin B subunit

随着对抗原表位认识的深入,表位疫苗已成为新型疫苗研究的热点,被认为是继灭活疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗之后的第四代疫苗,其具有免疫反

^{*} 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014SZ0036)资助

△ 通讯作者, E-mail: wanghongren@scu.edu.cn

应特异、副作用小和针对性强等优点^[1,2]。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染导致机体对 *H. pylori* 自身天然抗原产生免疫耐受,选择 *H. pylori* 保护性抗原的优势表位来构建表位疫苗,有可能打破免疫耐受,从而达到免疫预防和清除 *H. pylori* 感染的目的^[3]。

H. pylori 感染免疫机制尚未完全阐明,所设计的不同类型 *H. pylori* 疫苗的免疫应答机制也存在着较大差异。随着对 *H. pylori* 疫苗保护效果及机制研究的深入,逐渐认识到机体抵抗 *H. pylori* 感染的保护性机制可能为一种 Th1/Th2/Th17 同时存在的平衡应答模式,可能还有特异性体液免疫应答的作用^[4-6]。*H. pylori* 主要通过消化道感染,因此激发机体产生特异性消化道黏膜免疫,对于疫苗研究至关重要。基于对 *H. pylori* 感染免疫机制的进一步认识,本研究在前期研究基础上^[7-9],将 *H. pylori* 尿素酶亚单位 *ureI*、*ureB* 基因中筛选的 T 细胞和 B 细胞优势表位基因序列和黏膜免疫佐剂霍乱肠毒素 B 亚单位即 *ctB* 基因串联,构建了重组幽门螺杆菌多表位疫苗 BIB,并对其工程菌生物学特性和重组蛋白(BIB)的抗原性作了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 幽门螺杆菌悉尼株(*H. pylori* SS1)来自于河北医科大学。

1.1.2 主要仪器与试剂 原核表达载体 pET28a(+)购自 Novagen;大肠杆菌 BL21(DE3)购于 TansGen;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Earth;鼠抗 *H. pylori* SS1 血清、鼠抗 CTB 单抗由四川万可泰生物技术有限责任公司自制;AKTA purifier 100 蛋白纯化仪、HiTrap SP Sepharose XL 层析柱购自 GE 公司;其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组 BIB 基因序列设计与合成 在前期研究并获得专利的多表位基因序列 *ureI-ureB* 的基础上,在其 N 端添 *ctB* 基因序列,串联成新基因序列 BIB,5'端引入 *Nco* I 酶切点,3'端引入 *Xho* I 酶切点,并利用在线密码子优化工具 JCAT,按照大肠杆菌 BL21(DE3)的密码子偏好性优化密码子,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.2 BIB 原核表达工程菌的构建与鉴定 将合成的 BIB 序列通过 *Nco* I、*Xho* I 酶切位点插入到 pET28a(+)载体中,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)

感受态细胞中,卡那霉素抗性筛选阳性克隆,*Nco* I、*Xho* I 进行酶切鉴定,鉴定正确后再将其交付苏州金唯智生物科技有限公司进行 DNA 测序确认。

1.2.3 重组质粒 pET28a(+)/BIB 稳定性研究 鉴定正确的 BIB 工程菌于 LB 固体平板上划线接种(卡那霉素,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),挑取阳性菌落接种至无抗性培养基中传代培养,每 12 h 为 1 代,共传 40 代。每 5 代收集菌液 1 次,适当稀释后涂布接种至无抗性和卡那霉素抗性的 LB 固体平板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。分别挑取 100 个菌落,接种到 LB 固体培养皿中(卡那霉素,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,计数菌落数,计算质粒保有率(plasmid retention, PR)。PR = K^{+}/K^{-} , K^{+} 指在含卡那霉素抗性培养基中生长的菌落, K^{-} 指在无抗性培养基中生长的菌落。

1.2.4 BIB 工程菌诱导表达与 BIB 蛋白可溶性分析 挑选鉴定正确的阳性菌落接种到 3 mL LB 培养基中(卡那霉素,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后按 1:100(V/V)的比例接种到 100 mL LB 培养基中(卡那霉素,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至液体吸光度 A_{578} 为 0.6 时,加入终浓度为 5 mmol/L 的乳糖诱导 7 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 1 min,收集沉淀和上清,沉淀经超声裂解液充分溶解后,置冰上超声波破碎(200 W;开 2 s、停 2 s;20 min),4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 20 min,分别收集裂解上清与沉淀。沉淀用含 8 mol/L 尿素的 PB 缓冲液溶解,SDS-PAGE 检测超声裂解液上清和沉淀中 BIB 的表达量。BIB 表达量 = 目的蛋白含量/菌体总蛋白含量。

1.2.5 阳离子交换层析纯化 BIB 利用 BIB 高等电点特性($\text{pI}=9.05$),在 pH 为 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液中目的蛋白带正电荷,选择阳离子交换层析进行纯化。将步骤 1.2.4 中超声破碎离心后得到的沉淀,经包含体洗涤液 I 和包含体洗涤液 II 各洗涤 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 20 min,再将收集的沉淀经包含体溶解液充分溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$ 离心 30 min,收集上清,0.45 μm 滤膜过滤,Lowry 法测其蛋白浓度后,进行纯化。纯化条件为:采用 1 mL HiTrap SP Sepharose XL 层析柱,上样 10 mL、样品蛋白浓度 2.5 mg/mL、上样流速 1 mL/min;线性洗脱 20 min。SDS-PAGE 检测纯化后 BIB 的蛋白纯度。计算公式同 1.2.4。

1.2.6 BIB 蛋白 N 端测序及相对分子质量测定 将纯化后的 BIB 送中国科学院上海分院国家蛋白质科学中心检测。样品用 TripleTOFTM5600+质谱仪(AB SCIEX)进行质谱分析。

1.2.7 Western blot 分析 BIB 的抗原性 纯化后的 BIB 经 SDS-PAGE 电泳分离后,转至 PVDF 膜,进行 Western blot 分析。所用一抗分别为鼠抗 *H. pylori* SS1 多克隆抗体(1 : 1 000 稀释)及鼠抗 CTB 单抗(1 : 5 000 稀释),二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 5 000 稀释)。用不含目的基因的空质粒大肠杆菌工程菌 BL21(DE3)的诱导物作对照,分析 BIB 的抗原性。

2 结果

2.1 重组 BIB 基因序列设计与密码子优化

重组 BIB 基因序列全长为 884 bp,利用在线密码子优化工具 JCAT 共优化了 179 个碱基。优化后其密码子适应指数(CAI)由 0.33 增加至 1.00;GC 含量由 38.92 增加至 46.62。

2.2 BIB 原核表达工程菌的构建与鉴定

重组质粒经 *Nco* I、*Xho* I 双酶切后,琼脂糖电泳时出现一条约为 900 bp 的片段,与预期结果一致。测序发现与设计序列 100% 一致,重组质粒 pET28a(+)/BIB 构建正确(图 1)。

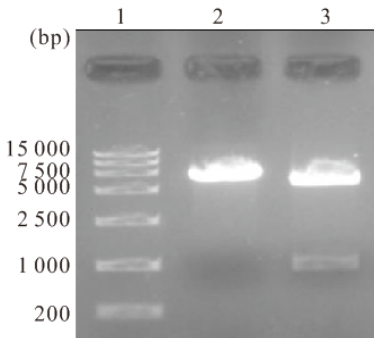


图 1 重组质粒 pET28a(+)/BIB 酶切鉴定

Fig 1 Restriction enzyme digestion result of pET28a(+)/BIB

1: Marker; 2: pET28a(+)/BIB digested by *Xho* I; 3: pET28a(+)/BIB digested by *Xho* I and *Nco* I

2.3 BIB 工程菌质粒传代稳定性

BIB 工程菌共传代 40 代,其质粒保有率结果如图 2 所示。

2.4 BIB 工程菌诱导表达与 BIB 蛋白可溶性分析

工程菌经乳糖诱导后,SDS-PAGE 电泳在相对分子质量 33×10^3 处出现与目的条带相符的蛋白条带,与理论预测值相符(图 3),表明该工程菌可表达 BIB 蛋白,其表达量占菌体总蛋白的 35.6%。诱导后的细菌裂解液在上清中未出现目的条带,而在沉淀中具有明显目的条带,故认为 BIB 蛋白是以包含体形式存在。

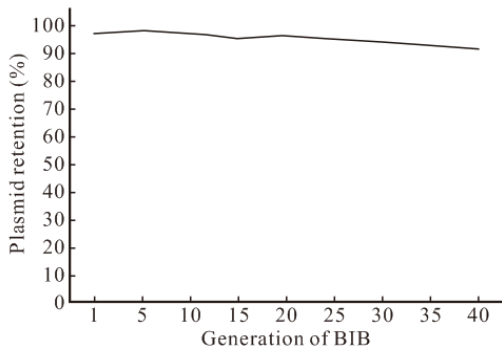


图 2 BIB 工程菌质粒传代稳定性分析

Fig 2 The plasmid retention (PR) of the recombinant pET28a(+)/BIB plasmid in engineering bacteria

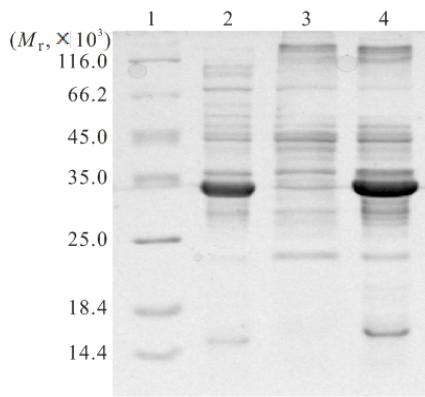


图 3 BIB 蛋白可溶性分析

Fig 3 Soluble analysis of the recombinant protein BIB

1: Protein marker; 2: Inducible expression of total bacterial protein; 3: Expression of cell supernatant after crushing; 4: Expression of cell disruption after precipitation

2.5 阳离子交换层析纯化 BIB

见图 4。BIB 经包含体洗涤液 I、II 洗涤后,其纯度为 58.9%,复性后再经层析柱纯化,穿透液中全是杂蛋白,无目的蛋白洗出,纯化后的样品纯度为 91.8%,浓度为 1.2 mg/mL。

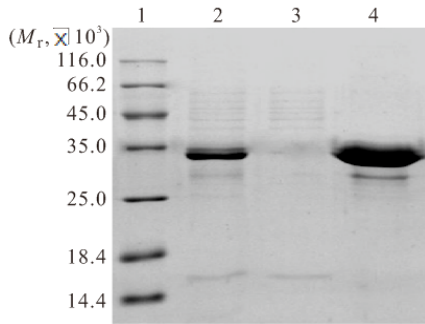


图 4 阳离子交换层析纯化 BIB 纯度分析

Fig 4 SDS-PAGE fractionation for analysis of recombinant protein BIB purity

1: Protein molecular mass standards; 2: BIB was washed by inclusion body purgation buffer; 3: SP chromatography through peak; 4: SP chromatography purified sample

2.6 BIB 蛋白 N 端序列及相对分子质量测定

见图 5。BIB 蛋白 N 端测定的序列为甘氨酸-天冬酰胺-异亮氨酸-苏氨酸-天冬氨酸-亮氨酸,与设计序列 100%一致。BIB 测定的相对分子质量分别为 32.951×10^3 、 32.990×10^3 、 33.033×10^3 和 33.074×10^3 ,与其理论值大小(33×10^3)一致。

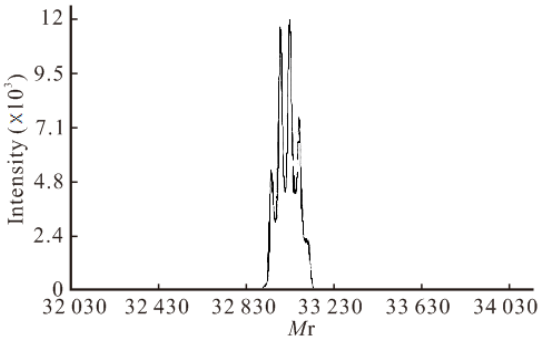


图 5 BIB 相对分子质量大小分析

Fig 5 The distribution of relative molecular mass of BIB

2.7 BIB 的抗原性分析

见图 6。BIB 蛋白经阳离子交换层析纯化后,分别以鼠抗 *H. pylori* SS1 血清、鼠抗 CTB 单抗为一抗

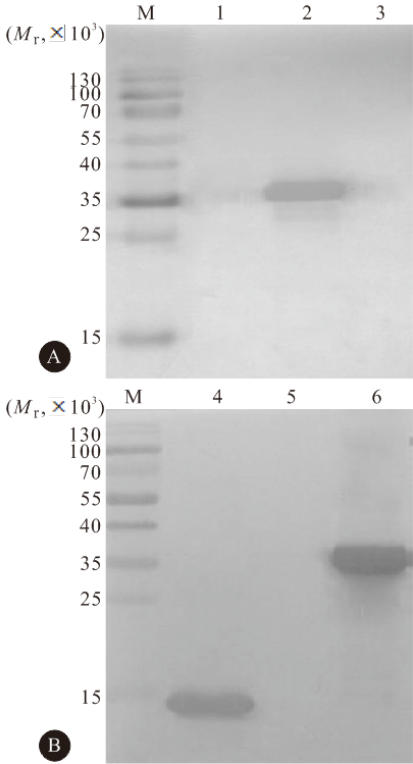


图 6 BIB 抗原性分析

Fig 6 Result of the recombinant protein BIB with Western blot

Anti-*H. pylori* SS1 polyclonal antibody (A) and anti-CTB monoclonal antibody (B) were used as primary antibodies and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG was used as the secondary antibody. M: Protein molecular mass standards; 1, 5: pET28a(+)/BIB/BL21 (DE3) before IPTG inducing; 2, 6: BIB; 3: Inducible expression of BL21 (DE3); 4: CTB

进行 Western blot 分析,在相对分子质量 33×10^3 左右出现特异反应条带,说明该工程菌表达的 BIB 能与相应的特异性抗原结合,抗原性良好。

3 讨论

H. pylori 是人类感染率最高的慢性致病菌之一,严重危害人类健康,在全球成年人中感染率已超过 50%,发展中国家感染率更高,因此,研发安全、有效的疫苗对于防治 *H. pylori* 感染具有重要的意义。

H. pylori 感染之后,能导致机体对其自身天然抗原产生免疫耐受,因此天然感染后并不能获得牢固的保护性免疫。在 *H. pylori* 复杂的抗原成分中,尿素酶(urease)是 *H. pylori* 的主要致病因子,对 *H. pylori* 在人胃黏膜定植起着至关重要的作用,在胃中强酸性环境中,*H. pylori* 的尿素酶能够水解尿素释放氨,在菌体周围形成“氨云”以抵抗胃中的酸性环境,且释放的氨对胃黏膜组织具有损害作用^[10]。尿素酶占菌体蛋白的 5%~10%,菌体细胞膜及细胞质中均有分布,由 A、B 两个亚单位组成,其中 B 亚单位(ureB)为尿素酶的活性亚基,保守性较高,具有较好的免疫原性,是 *H. pylori* 最佳的疫苗候选抗原之一^[11, 12]。幽门螺杆菌尿素酶 I 亚单位(ureI)为 *H. pylori* 尿素膜通道分子,既是 *H. pylori* 细胞内尿素进出的开关,也是 *H. pylori* 定植存活的关键因子^[13]。

根据 *H. pylori* 的感染特点,如何激发胃肠道产生有效的免疫对于研发 *H. pylori* 疫苗至关重要。胃肠道分泌的特异性 sIgA 能够与相应的抗原特异性结合,阻止相关细菌或病毒定植黏膜表面或侵袭机体。黏膜研究发现,霍乱毒素具有很强的黏膜免疫佐剂效应,可以去除其 A 亚单位(毒性亚单位),保留其 B 亚单位(结合亚单位),作为黏膜免疫佐剂用于疫苗研发^[14]。为了避免其它无效抗原对免疫应答的影响,选择 *H. pylori* 保护性抗原的特异性表位设计表位疫苗,借助有效的黏膜免疫佐剂,可能会激发更强、更特异的、不同于自然感染时的黏膜黏膜免疫应答,从而打破机体对 *H. pylori* 的免疫耐受,达到预防或治疗 *H. pylori* 感染的目的。

前期研究发现,将 *ureI* 和 *ureB* 优势抗原表位基因集结串联起来,与 *ctB* 相连,通过基因工程表达的蛋白免疫产蛋鸡,生产出的特异性卵黄抗体体内均具有抑制和杀灭 *H. pylori* SS1 的作用^[15]。本研究在前期的研究基础上^[7-9],进一步对表达抗原

的密码子进行了优化,构建了原核表达工程菌 BIB,其表达的重组蛋白 BIB 占菌体蛋白的 35.6%,经阳离子交换层析纯化后其纯度大于 90%,N 端测序及相对分子质量测定结果显示 BIB 蛋白与设计序列 100%一致,且 Western blot 证实 BIB 具有良好的抗原性,为进一步探讨 BIB 蛋白在 BALB/c 小鼠体内预防、治疗 *H. pylori* 感染的效果及其作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Zhang L, Yang Y, Yang X, *et al.* T cell epitope-based peptide-DNA dual vaccine induces protective immunity against *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6J mice. *Microbes Infect*,2008;10(3):251-259.
- 2 Goldstein G, Chicca JJ 2nd. A universal anti-HIV-1 Tat epitope vaccine that is fully synthetic and self-adjuvanting. *Vaccine*,2010;28(4):1008-1014.
- 3 Chen L, Li B, Yang WC, *et al.* A dominant CD4⁺ T-cell response to *Helicobacter pylori* reduces risk for gastric disease in humans. *Gastroenterology*,2013;144(3):591-600.
- 4 Del Giudice G, Malfetheriner P, Rappuoli R. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev Vaccines*, 2009;8(8):1037-1049.
- 5 Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, *et al.* *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol*,2010; 184(9):5121-5129.
- 6 Zhou WY, Shi Y, Wu C, *et al.* Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine*,2009;27(36):5013-5019.
- 7 王保宁,杨 远,邝 玉等. *ureI* 和 *ctB-ureI* 真核质粒构建及表达分析. *细胞与分子免疫学杂志*,2010;26(8):764-766.
- 8 丁娜娜,杨 靖,潘 兴等. 幽门螺杆菌多表位重组原核表达工程菌的构建及表达特性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2014;45(3):367-370.
- 9 Wang B, Pan X, Wang H, *et al.* Immunological response of recombinant *H. pylori* multi-epitope vaccine with different vaccination strategies. *Int J Clin Exp Pathol*,2014;7(10): 6559-6566.
- 10 Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*,2006;19 (3):449-490.
- 11 Figura N, Franceschi F, Santucci A, *et al.* Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2010;15(Suppl 1):60-68.
- 12 Smythies LE, Novak MJ, Waites KB, *et al.* Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection. *Vaccine*,2005;23(7): 901-909.
- 13 Gray LR, Gu SX, Quick M, *et al.* Transport kinetics and selectivity of HpUreI, the urea channel from *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*,2011;50(40):8656-8663.
- 14 Arêas APM, Oliveira MLS, Miyaji EN, *et al.* Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. *Biochem Bioph Res Co*,2004;321(1):192-196.
- 15 Wang BN, Yang J, Cao SZ, *et al.* Preparation of specific anti-*Helicobacter pylori* yolk antibodies and their antibacterial effects. *Int J Clin Exp Pathol*,2014;7(10):6430-6437.

(2014-08-06 收稿,2015-03-10 修回)

编辑 吕 熙

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届全国期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS,BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS,CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部