

- excision. *Acta Chir Iugosl* 2002; 49: 7-8
- 14 Wang Z, Zhou ZG, Wang C, Zhao GP, Chen YD, Gao HK, Zheng XL, Wang R, Chen DY, Liu WP. Microscopic spread of low rectal cancer in regions of mesorectum: pathologic assessment with whole-mount sections. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2949-2953
- 15 Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1307-1320
- 16 Roeb E, Matern S. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 763-770
- 17 万远廉, 潘义生, 刘玉村, 郭源, 魏群. RT-PCR方法诊断大肠癌淋巴结微转移. *中国实用外科杂志* 2000; 20: 47-48
- 18 Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 145-152
- 19 王小林, 卿三华, 黄祥成, 吴承堂, 宋京翔, 姚学清. 直肠癌直肠系膜播散的临床病理观察. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5: 210-212
- 20 Zhao GP, Zhou ZG, Lei WZ, Yu YY, Wang C, Wang Z, Zheng XL, Wang R. Pathological study of distal mesorectal cancer spread to determine a proper distal resection margin. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 319-322

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 BRIEF REPORT •

幽门螺杆菌vacA基因重组表达的包涵体复性及ELISA方法的建立

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004

通讯作者: 党双锁, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学第二医院感染科. shuang suo640212@sohu.com

电话: 029-83036998

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Disease, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, 157 West 5th Road, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. shuang suo640212@sohu.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Renaturation of *Helicobacter pylori* vacA gene recombined expressive inclusion body and construction of ELISA method

Shuang-Suo Dang, Hong-Cang Wang, Xiao-Li Jia, Li-Chao Yuan, Bao-Feng Wang, Xin Zhang, Zheng-Guo Zhang, Yan-An Cheng

Shuang-Suo Dang, Hong-Cang Wang, Xiao-Li Jia, Li-Chao Yuan, Bao-Feng Wang, Xin Zhang, Zheng-Guo Zhang, Yan-An Cheng, Department of Infectious Disease, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Shuang-Suo Dang, Department of Infectious

Abstract

AIM: To increase the biological activity of the expressive product through denaturation and renaturation of *H pylori* vacA gene recombined expressive inclusion body, and to discuss the feasibility of mass production of VacA antigen.

METHODS: The VacA antigen expressed engineering bacterium was induced by Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressed inclusion body was denatured, renatured and dialyzed, and its activity was identified. The plates of ELISA were folded by the produced antigen. Then the ELISA method was constructed to determine the biological activity of the

antigen.

RESULTS: The recombinant engineering bacterium expressed M_r 3 300 target protein in the form of inclusion body. SDS-PAGE showed the purity of the optimized inclusion body was above 95%. The accordant rate was 97.1% between ELISA and blot electrophoresis after the activity examination was performed in 126 healthy people.

CONCLUSION: The biological activity of *H pylori* vacA gene recombinant expressive inclusion body can be significantly and stably improved after denaturation and renaturation. So the inclusion body can be used as a candidate for the production of *H pylori* vaccine.

Key Words: *Helicobacter pylori*; VacA gene; Inclusion body; Renaturation; Denaturation

Dang SS, Wang HC, Jia XL, Yuan LC, Wang BF, Zhang X, Zhang ZG, Cheng YA. Renaturation of *Helicobacter pylori* vacA gene recombinant expressive inclusion body and construction of ELISA method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2500-2503

摘要

目的: 通过对vacA重组工程菌表达产物包涵体的变性、复性,提高表达产物的生物学活性,建立ELISA方法,讨论VacA抗原规模生产的可行性。

方法: 利用已经构建的表达VacA抗原的工程菌,用IPTG诱导,表达的包涵体通过系列条件的变性、复性、透析,并经活性鉴定。所制抗原用以包被ELISA板,建立ELISA方法并确定抗原的生物学活性。

结果: 重组工程菌可表达 M_r 3 300的目的蛋白,表达形式为包涵体,条件优化后的包涵体经SDS-PAGE显示纯度达95%以上,活性经ELISA法测定正常人126例和blot电泳测定结果符合率为97.1%。

结论: 包涵体变性复性后生物活性大幅度提高,并且具有良好的重复性和稳定性,可作为幽门螺杆菌疫苗制备的候选抗原及临床检测的诸多方法的抗原原料。

关键词: 幽门螺杆菌; vacA基因; 包涵体; 变性; 复性

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安. 幽门螺杆菌vacA基因重组表达的包涵体复性及ELISA方法的建立. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2500-2503

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2500.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)为革兰氏阴性细菌,螺杆菌状,与多种胃病密切相关,细胞空泡毒素

A(vacuolating cytotoxin A, vacA)存在于所有*H pylori*菌株,但仅在50-60%的菌株中表达^[1-9]。我们以*H pylori*菌株11 638总DNA为模板扩增了vacA基因的一个片段,通过重组技术表达VacA抗原。该抗原主要以包涵体形式存在,包涵体一级结构(即氨基酸序列)虽然正确,但其立体结构是错误的,所以没有生物活性^[10-12]。因此,为获得天然状态的目标蛋白,我们在分离回收包涵体后,溶解包涵体并使其中的目标蛋白质恢复应有的天然构象和活性。用复性后的蛋白建立ELISA检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料 正常人血清126例取自西安市中心血站; *H pylori*菌株11 638为西京医院消化内科惠赠。

1.2 方法

1.2.1 构建vacA重组表达载体 vacA引物按照菌株11 638 vacA的基因序列设计,采用pRSETA His6表达载体,转化大肠杆菌BL21(DE3),酶切鉴定重组克隆, IPTG诱导目的蛋白表达;采用分级分离的方法,对诱导全菌的外周质,胞质及沉淀进行分析,判断目的蛋白表达形式。

1.2.2 包涵体变性和复性 变性液为20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 6 mol/L盐酸胍; 20 mmol/L 2-巯基乙醇(pH8.5); 1 mmol/L EDTA·2Na; 10 mL/g包涵体,室温过夜充分溶解包涵体。复性液为20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.4 mol/L L-精氨酸; 1 mmol/L还原型谷胱甘肽; 0.1 mmol/L氧化型谷胱甘肽,透析液为0.1 mol/L盐酸胍; 20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 25 mmol/L NaCl, 4℃下透析,离心,取上清浓缩。

1.2.3 复性蛋白检测 活性鉴定用ELISA方法检测,以复性蛋白为包被抗原, 0.05-15 μg/孔,血清按1:100稀释,博士德酶标羊抗人IgG 1:10 000稀释, TMB显色;深圳伯劳特公司的*H pylori* blot电泳测定临界阳性血清, PBS为空白对照。

1.2.4 血清抗体检测 用复性蛋白为包被抗原, 1 μg/孔,血清按1:100稀释,博士德酶标羊抗人IgG 1:10 000稀释, TMB显色,以 $A_{450nm} > 0.5$ 为阳性,设立阳性对照和阴性对照,确定ELISA方法,检测血清的抗vacA抗体,结果和blot电泳测定结果相比较。

2 结果

2.1 vacA基因重组表达载体的构建 重组质粒可切出903 bp的外源片段。

2.2 表达形式鉴定 表达vacA相对分子质量为 M_r 3 300,主要以包涵体形式存在。

2.3 复性蛋白的活性鉴定 经纯化的vacA倍比稀释后包被ELISA板,用抗vacA抗体阳性血清(深圳伯劳特*H pylori*抗原筛出)测定其活性,可见复性的vacA具有良好的抗原活性。

2.4 ELISA方法 检测正常人血清抗vacA抗体,和blot电泳

测定结果相比, 特异性为97.6%, 敏感性为96.5%, 符合率97.1%(表1).

表1 ELISA法和blot电泳对比检测结果比较

| | blot电泳阳性 | blot电泳阴性 | 合计 |
|---------|----------|----------|----|
| ELISA阳性 | 40 | 3 | 43 |
| ELISA阴性 | 1 | 82 | 83 |

3 讨论

幽门螺杆菌为定植于人胃部的革兰氏阴性螺杆菌, 和慢性胃炎、消化性溃疡、黏膜相关淋巴样组织性淋巴瘤和胃癌等疾病的发生密切相关. 它是世界性分布的病菌, 在人群中约有半数受到*H pylori*的感染. 细胞空泡毒素A基因存在于所有的*H pylori*菌株中, 编码可损伤上皮细胞的空泡毒素A, 但仅在50-60%的菌株中表达^[13].

*vacA*基因编码的蛋白质, 是*H pylori*所特有的分泌性毒素, 能使哺乳动物的上皮细胞发生空泡变化, 最终导致细胞死亡. 是一种重要致病因子^[16], 也是*H pylori*毒力分型的标志^[14-17], 感染*H pylori*的个体是否发病, 与宿主基因易感性、环境因素及所感染*H pylori*菌株的型别有关, 在感染了*H pylori*的人群中约有15%的人发病^[18-21], 因而对*H pylori*的菌株型别的检测就尤为重要.

*vacA*作为*H pylori*的一种与疾病发生密切相关的重要抗原, 在制备*H pylori*的疫苗方面有很大的应用价值. 我们以*H pylori*菌株11 638总DNA为模板扩增了*vacA*基因的一个片段, 并选择pRSETA His6表达载体, 高水平的表达His6-*vacA*. 由于许多外源蛋白质在大肠杆菌细胞内表达时, 不能自发折叠生成一定的空间结构和特定生物功能的蛋白质, 而是以包涵体形式存在于细胞内, 虽然包涵体具有富集目标蛋白、抗蛋白酶及对宿主毒性小等特点, 但由于没有生物活性, 不能直接应用, 目前对包涵体形成和复性过程中发生聚集的机制尚不清楚, 许多已建立的高效复性方法是在反复实验和优化的基础上建立的, 且没有普遍性^[22-25]. 本研究中所表达的外源蛋白以包涵体形式存在, 上清中可溶性目的蛋白极少, 因此, 解决包涵体的复性成为获得具有天然构象的目的蛋白的关键.

我们根据His6与金属离子Ni²⁺高亲和力结合的特性^[26], 通过镍柱直接一步纯化并进行重折叠, 纯度可直接达到98%, 并具有较高的生物学活性.

但由于亲和柱的特点, 获得大量的抗原比较困难, 我们通过更换不同的变性剂(脲素、盐酸胍、SDS等)使包涵体彻底溶解, 改变pH值、温度、蛋白浓度、变性剂浓度等, 确立复性条件, 采用稀释复性的方法, 获得大量的目的蛋白, 和阳性对照抗原比较具有良好的活性和抗原性.

利用该抗原来建立检测血清抗体的ELISA方法, 和blot电泳测定结果相比, 特异性为97.6%, 敏感性为96.5%, 符合率97.1%. 可作为筛查幽门螺杆菌*vacA*感染的有效的

方法. 该抗原可以大批量生产, 满足临床检测的需要.

4 参考文献

- Murakita H, Hirai M, Ito S, Azuma T, Kato T, Kohli Y. Vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, atrophic gastritis and gastric carcinoma patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: S29-S31
- Konturek PC, Bielanski W, Konturek SJ, Hahn EG. *Helicobacter pylori* associated gastric pathology. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 695-710
- Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999; 59: 6124-6131
- Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52: 215-218
- Hirai M, Azuma T, Ito S, Kato T, Kohli Y, Fujiki N. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric-carcinoma patients. *Int J Cancer* 1994; 56: 56-60
- Zhang ZW, Farthing MJ. Molecular mechanisms of *H pylori* associated gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 369-374
- Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GN, van der Ende A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-1175
- McNamara D, O'Morain C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: S294-298
- Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58: 603-610
- 宁云山, 李妍, 王小宁. 包含体蛋白质的复性研究进展. *生物技术通讯* 2001; 12: 237-240
- 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性. *生物化学与生物物理进展* 2001; 28: 482-485
- Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 1512-1515
- Cover TL, Vaughn SG, Cao P, Blaser MJ. Potentiation of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin activity by nicotine and other weak bases. *J Infect Dis* 1992; 166: 1073-1078
- Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999; 18: 5517-5527
- McGee DJ, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 241: 155-180
- Mahachai V, Tangkijvanich P, Wannachai N, Sumpathanukul P, Kullavanijaya P. CagA and VacA: virulence factors of *Helicobacter pylori* in Thai patients with gastroduodenal diseases. *Helicobacter* 1999; 4: 143-147
- 韩锋产, 阎小君, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A及细胞空泡毒素A的研究. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 160-161
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131
- Atherton JC. *Helicobacter pylori* unmasked-the complete genome sequence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1137-1140
- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut* 1999; 45: 499-502

- 21 Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995; 27: 559-563
- 22 Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett* 1994; 345: 125-130
- 23 Goldberg ME, Expert-Bezancon N, Vuillard L, Rabilloud T. Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate *in vitro* protein renaturation. *Fold Des* 1996; 1: 21-27
- 24 Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 157-163
- 25 Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E.coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 1997; 66: 197-238
- 26 Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2000; 2: 155-164

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1) 介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2) 结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3) 中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4) 中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5) 中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6) 采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7) 肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8) 介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1) 广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编: 518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, Email: kewei1968@126.com; (2) 深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, Email: ssshqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育 I 类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。