

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710009200.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 5 日

[11] 公开号 CN 101082623 A

[22] 申请日 2007.7.12

[21] 申请号 200710009200.3

[71] 申请人 福建医科大学

地址 350004 福建省福州市交通路 88 号福建
医科大学

[72] 发明人 余菲菲 林旭 李妮 李能
陈豪

权利要求书 9 页 说明书 24 页 附图 3 页

[54] 发明名称

幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备

[57] 摘要

本发明公开了一种幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备,属人类疾病临床诊断的试剂。即通过分子生物学手段及基因的克隆表达和表达产物的纯化,获得重组 OipA 抗原,利用此抗原检测临床血清标本中的相应抗体,同时分离培养胃活检标本的 Hp,对 Hp 菌株进行 oipA 信号区基因的扩增和测序,比较抗体与基因检测的结果,从而评价重组抗原检测血清相应抗体的敏感性和特异性。获得幽门螺杆菌 oipA 毒力基因片段—oipA6 的重组子: oipA6-pET-42a,将重组子转化 BL-21 细胞,获得高效表达的 OipA6 融合蛋白,分子量为: 42KD,经鉴定具有良好的抗原性,用于检测病人血清 OipA 抗体的敏感性和特异性分别达到 95.16%和 95.83%。

1、幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备材料，其特征是：

1) 菌株、质粒：幽门螺杆菌 NCTC11637，大肠杆菌 BL-21、载体 pET-42a；

2) 引物：带有酶切位点的六对引物，下游相同，上游不同，将 oipA 基因截断为依次减小的六个不同的片断；PCR 产物及其相应引物分别为：oipA1: pF-1/pR；oipA2: pF-2/pR；oipA3: pF-3/pR；oipA4: pF-4/pR；oipA5: pF-5/pR；oipA6: pF-6/pR；PCR 扩增产物大小分别为：oipA1: 863bp；oipA2: 803bp；oipA3: 743bp；oipA4: 683bp；oipA5: 443bp；oipA6: 204bp。

2、根据权利要求 1 所述的幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备材料，其特征是：所述的引物，序列如下：

pF-1: 5' CGGGATCCGATTTTATTTAGGTTTA 3'

pF-2: 5' CGGGATCCGGCAAAAAAGCTTTAGCAG 3'

pF-3: 5' CGGGATCCTTATTCCCCGAACAAAACAC 3'

pF-4: 5' CGGGATCCAAAGATTCAACAAAGATCGC 3'

pF-5: 5' CGGGATCCCGAGCGTCCCAAGAATATGTTG 3'

pF-6: 5' CGGGATCCGGCGTTCGTTGGAGCGGTG 3'

pR: 5' CGGAATTCATGTTTGTGTTTTAAAGTTA 3'

另设计 oipA 信号区引物 SF/SR

oipA SF 5' TCTTAAACCAAAGAAAAACC 3'

SR 5' ACAGAACCAACGCCACCAA 3'。

3、幽门螺杆菌 oipA 基因片断原核表达重组子的构建制备方法，其特征是：

1) oipA 基因片断的获得：以幽门螺杆菌 NCTC11637 DNA 为模板，通过 PCR 法获得 oipA 基因片断，按照胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物，于 -20℃ 保存备用；

2) 表达载体的获得：将含质粒 pET-42a 的菌株划线分离接种于 LB 选择培养基上，37℃ 培养 10h，挑取单菌落接种于适量 LB 选择培养液中，振荡培养 8-10h，用质粒抽提试剂盒，提取质粒 pET-42a；

3) oipA 基因片断及载体的酶切和载体去磷酸化

以 BamH I 和 EcoR I 双酶切 oipA 基因片断和 pET-42a 载体，按照纯化试剂

盒纯化酶切产物，纯化的载体去磷酸化，反应体系：CIP $1\mu\text{l}$ 、载体 $25\mu\text{l}$ 、Buffer3 $5\mu\text{l}$ 、ddH₂O $19\mu\text{l}$ 、total $50\mu\text{l}$ ，反应条件：37℃水浴 1h；65℃水浴 20min 终止反应，用纯化试剂盒对去磷酸化后的载体进行纯化；

4) 目的基因与表达载体的连接：各取 $3\mu\text{l}$ 纯化后的目的片段和载体于1%的琼脂糖凝胶中100V电泳20min，根据电泳条带大致确定连接反应体系，载体和插入片段的摩尔比3:1到1:3；连接反应体系：

	oipA1	oipA2	oipA3	oipA4	oipA5	oipA6
目的片段	$4\mu\text{l}$	$3\mu\text{l}$	$3\mu\text{l}$	$5\mu\text{l}$	$6\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$
载体	$8\mu\text{l}$	$6\mu\text{l}$	$6\mu\text{l}$	$7\mu\text{l}$	$8\mu\text{l}$	$4\mu\text{l}$
T4 Ligase	$1\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$
T4 Ligase Buffer	$1\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$	$2\mu\text{l}$
ddH ₂ O	$5\mu\text{l}$	$8\mu\text{l}$	$8\mu\text{l}$	$5\mu\text{l}$	$1\mu\text{l}$	$11\mu\text{l}$
total	$20\mu\text{l}$	$20\mu\text{l}$	$20\mu\text{l}$	$20\mu\text{l}$	$20\mu\text{l}$	$20\mu\text{l}$

反应条件：4℃，16h；65℃水浴10min终止反应；

连接产物分别为：pET-42a /oipA1；pET-42a /oipA2；pET-42a /oipA3；pET-42a /oipA4；pET-42a /oipA5；pET-42a /oipA6；

5) 重组子的转化与筛选：将 6 个重组质粒，分别转化入感受态细胞 BL-21，挑取转化单菌落，用质粒抽提试剂盒提取重组质粒，以重组质粒为模板，pET-42a 为阴性对照的模板，HpNCTC11637 为阳性对照的模板；以 pF-1/pR；pF-2/pR；pF-3/pR；pF-4/pR；pF-5/pR；pF-6/pR 为引物，PCR 扩增鉴定重组质粒，同时重组质粒用 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定，将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组子送测序。

4、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征是：

幽门螺杆菌 oipA 基因片段的表达及产物纯化

1) 重组子的表达、鉴定及表达条件优化

用 IPTG，6 个重组子的表达，诱导 6 个重组子的表达，诱导后，收集菌液，10000rpm，离心 10min，弃去上清；细菌沉淀，加 1XSDS 上样缓冲液重悬混匀，沸水浴 10min，10000g 离心 2min。取上清 $20\mu\text{l}$ 进行 SDS-PAGE 电泳，将凝胶上

的蛋白条带电转移至硝酸纤维素 NC 膜, 用抗 GST Tag 抗体, Western Breeze 化学发光法试剂盒检测融合蛋白中的 GST 标签;

分别以终浓度 0.5、1、1.5、2mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳 IPTG 浓度;

分别用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子的表达, 诱导时间分别定为 0.5、1、2、3、4、5、6h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳诱导时间;

2) 重组蛋白肽段的纯化

用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 提取细菌包涵体, 用 8mol/L 尿素裂解缓冲液彻底溶解包涵体, 10000g 离心 20min, 弃沉淀, 上清加入 2XSDS 上样缓冲液混匀, 100℃水浴 10min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 继而用 Ni-NTA His. Bind 树脂亲和纯化, 用 Bradford 方法测定纯化的重组蛋白的浓度;

3) 重组蛋白肽段的抗原性鉴定

用 Western-blot 方法, 以羊抗 Hp 多克隆抗体检测重组蛋白肽段的抗原性, 取诱导表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移、丽春红染色; NC 膜用 5%脱脂牛奶 4℃封闭 8 小时以上; 以 5%脱脂牛奶 1:400 稀释羊抗 Hp 多克隆抗体, 37℃, 孵育 2h; 以 5%脱脂牛奶 1:2000 稀释 AP 标记的兔抗羊 IgG, 37℃, 孵育 1h; 加入显色液 NBT/BCIP 孵育数 min, 条带出现后用双蒸水漂洗;

4) 筛选抗原性强的重组蛋白肽段

用间接 ELISA 法检测重组蛋白肽段抗原性的强弱, 将纯化的重组蛋白肽段, Hp NCTC11637 水煮蛋白以及大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白以包被液调整至相同浓度, 各取 100μl 包被酶标反应孔, 同时以 100μl 包被液包被一个酶标反应孔做空白对照, 置于 4℃包被 24h, 弃去包被液, 加封闭液 37℃封闭 2h, 以洗涤液加满孔洗涤 3 次, 每次 3min, 将羊抗 Hp 多克隆抗体用 PBS 做 1:500 稀释, 取 100μl 加入酶标反应孔, 37℃孵育 1h, 洗涤 3 次, 每次 3min, 将 AP 标记的兔抗羊 IgG 用 PBS 做 1:4000 稀释, 取 100μl 加入反应孔, 37℃孵育 40min, 洗涤每孔加入 100μl NBT/BCIP 显色液, 室温反应 10-15min, 采用 450nm 波长, 测定 OD 值, 以空白对照孔调零。

5、OipA6 重组抗原检测血清相应抗体及其评价, 其特征是:

1) 收集临床标本

收集活检胃组织标本和相应的血清标本及资料, 同时收集患者的临床资料和病理诊断结果, 活检标本取胃窦部粘膜组织, 0.5ml 布氏培养液中用于细菌分离培养, 同时抽取相应病人外周静脉血 5ml, 离心收集血清, 分装后-20℃保存备用, 用于检测血清抗体;

2) Hp 临床分离菌株 oipA 和 cagA 基因 PCR 检测

以分离获得的 Hp DNA 为模板, 通过 PCR 法获得 oipA 基因信号区 DNA, 反应体系:

10Xbuffer	5 μ l
dNTP (10mmol/L each)	1 μ l
primer SF (20-40 μ mol/L)	0.5 μ l
primer SR (20-40 μ mol/L)	0.5 μ l
template (0.15 μ g)	5 μ l
DNA Polymerase (5u/ μ l)	0.5 μ l
MgCL ₂ (25mmol/L)	4 μ l
ddH ₂ O	33.5 μ l
total	50 μ l

反应条件: 94℃5min, (94℃30s, 55℃1min, 72℃1min) ×30, 72℃5 min

3) oipA 信号区 PCR 产物测序分析

用 PCR 纯化试剂盒对 oipA 信号区 PCR 产物进行纯化, 纯化后的 PCR 产物送测定序列, 测序结果用 Clustalx 和 Bioedit 软件进行分析;

4) 病人血清 OipA 抗体

血清 OipA 抗体检测: 以纯化的 OipA6 蛋白肽段 (0.95mg/ml), Hp11637 水煮蛋白、大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白以及包被液各 100 μ l 包被酶标反应孔; 一抗孵育: 将收集的血清标本用 PBS 做 1: 100 稀释, 取 100 μ l 加入反应孔, 37℃孵育 1h; 二抗孵育: 将 HRP 标记的抗人 IgG 用 PBS 做 1: 4000 稀释, 取 100 μ l 加入反应孔, 37℃孵育 40min; 显色及结果判断: 以 TMB 为显色液, 每孔加入 100 μ l

反应 10-15min, 当阳性对照孔出现明显颜色变化后, 立即加入 50 μ l 终止液终止反应, 采用 450nm 波长, 测定 OD 值, 以空白对照孔调零; 标本 OD 值大于等于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阳性, 标本 OD 值小于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阴性。

6、oipA 基因片段重组表达质粒的构建, 其特征是:

1) 重组质粒 PCR 扩增产物, 大小分别约为 oipA1: 860bp; oipA2: 800bp; oipA3: 740bp; oipA4: 680bp; oipA5: 440bp; oipA6: 200bp; 重组质粒 BamH I 和 EcoR I 双酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 均有 2 条带, 大的条带均处于相同位置, 大于 3000bp; 小的条带位置各不相同, 依次减小, 大小变化与相应的目的基因片断一致。

7、根据权利要求 6 所述的 oipA 基因片段重组表达质粒的构建, 其特征是: 测得序列如下:

oipA1:

```
GGATTTTATTTAGGTTTAAATTTTCTAGAAGGAAGCTATATTCAAGGACAAGGTAGTATCGGCAAAAA
AGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAAATTCATTATTCCCCGAACAAA
ACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGATCGCTAAC
CGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAATATTTTTT
GGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTT
CTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTTACTTATTAATTGG
ACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTTCTATATTTTACAA
AGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAAT
CTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCT
TTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGA
TGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCTAGTGTTGAATTGGGGGTTA
AAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATAAAAGAGTG
GTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA
```

oipA2:

```
GGCAAAAAAGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAAATTCATTATTCCC
CGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGA
```

TCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAA
TATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGG
CGTTGGTTCTGTTTCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTTACTTA
TTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTTCTATA
TTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAGCATCAAGGCACATAAT
CAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATC
TCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGG
AGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCTAGTGTTGAATT
GGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATA
AAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA3:

TTATTCCCCGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTC
AACAAAGATCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGG
GGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAA
CTTGGTGGCGTTGGTTCTGTTTCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGA
TTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGC
TTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAGCATCAAGG
CACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAG
TAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCG
TTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCTAGT
GTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATT
GGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA4:

AAAGATTCAACAAAGATCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACT
CAGCTTGGGGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCG
GTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTTCTGTTTCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTC
AATACGGATTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGT
AAAAGGGCTTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAG

CATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGG
TTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAA
ATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGG
GTTCTAGTGTGTAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGG
GATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACA
TTAA

oipA5:

CGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGG
CAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTG
TAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTC
AAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATAT
TGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTGTAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGT
TTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTAT
CTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA6:

GGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTC
TAGTGTGTAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATA
AATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

8、幽门螺杆菌 oipA 基因片段的表达及产物纯化，其特征是：

1) 蛋白表达：六个 oipA 基因片断表达后的预测大小分别为：32KD；30KD；
27KD；25KD；16KD；7.5KD，含 GST 以及 His 的融合蛋白肽段预测大小分别约为
67KD；65KD；62KD；60KD；51KD；42KD，经 IPTG 表达量分别占菌体总蛋白的 30.10
%；30.22%；30.01%；30.48%；30.58%；44.44%；

2) 表达产物鉴定

重组蛋白肽段经 SDS-PAGE 电泳并转膜后，经过 Western-Breeze 化学发光的
X 光片上相应；

3) 表达条件的优化

终浓度0.5、1、1.5、2mmol/L的IPTG均能诱导重组蛋白的表达，SDS-PAGE

电泳分析显示, 当IPTG终浓度为1.5mmol/L时, 表达量最大, 分别诱导0.5、1、2、3、4、5、6h, 重组蛋白均有表达;

4) 重组蛋白肽段的纯化

包涵体的粗纯

对重组蛋白包涵体进行初步纯化, SDS-PAGE 电泳分析显示, 当尿素浓度为8mol/L 时, 包涵体的溶解度最大, 各蛋白肽段的纯度分别达到 80%; 82%; 84%; 83%; 81%; 90%;

亲和纯化

经初步纯化的包涵体进行亲和层析纯化, 分别洗脱 4 次后, SDS-PAGE 电泳分析显示, 纯度分别可以达到: 93%-96%;

5) 重组蛋白肽段浓度测定

用 Bradford 方法测得的重组蛋白肽段的浓度;

重组蛋白浓度

重组蛋白	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6
浓度 (mg/ml)	0.80	0.68	0.84	0.60	0.98	0.95

6) 重组蛋白肽段的抗原性

Western blot结果显示, NC膜上各有一条特异性条带, 条带位置与重组蛋白肽段位置一致;

7) 筛选抗原性强的重组蛋白肽段;

间接ELISA法检测重组蛋白肽段的抗原性, 重组蛋白的吸光度从大到小依次为OipA6>OipA5>OipA4>OipA3>OipA2>OipA1; OipA6的抗原性最强;

重组蛋白 ELISA 的吸光度

蛋白	BL-21	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6	Hp11637
吸光度	0.000	0.042	0.044	0.049	0.051	0.058	0.059	0.104

9、oipA6 基因序列，其特征是：

GGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTC
TAGTGTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATA
AATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA 。

幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备

技术领域

本发明涉及人类疾病临床诊断的试剂，具体的说是一种幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备。

背景技术

人群中幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 的感染率高，西方国家达 50%，发展中国家可高达 90%，但只有 10% 的感染者发展为消化性疾病。Hp 感染的不同结局与 Hp 菌株间的毒力不同有关，毒力基因的异质性，决定 Hp 感染后是否导致炎症以及溃疡的发生。因而，应用重要的 Hp 毒力标志，进行高毒力菌株的鉴定，对于临床诊断及是否需要进行 Hp 根除性治疗具有极其重要的指导意义。

目前对于 Hp 感染的诊断可以分为两种：即侵入性检查和非侵入性检查。侵入性检查主要是通过胃镜取胃粘膜标本作快速尿素酶诊断、细菌培养、PCR 和组织学检查；非侵入性检查包括血清抗体的检测、尿素呼气试验、粪便抗原检测等。因侵入性检查造成的创伤性，尤其不能被儿童所接受，故而非侵入性检查更多受到青睐。但是这些非侵入性的检查方法，如尿素呼气试验、粪便抗原和血清 UreB 抗体检测仅是对 Hp 感染进行诊断，不能对高毒株进行鉴定，目前对高毒株 Hp 感染的鉴定主要是通过检测血清中抗 Hp CagA 抗体。

越来越多的流行病学调查发现，CagA 阳性菌的感染率极高，在西方国家约占 60%~80%，国内感染率更高，有些地区甚至达到 90% 以上，Lazebnik LB 等的研究也提示 *cagA*⁺ *vacAs1* 感染率高，很难确定其与疾病的关系。可见，以 CagA 来标志毒力株，已不能很好地满足临床的需要，加上目前的检测试剂盒敏感性和特异性不理想，阻止了临床上的广泛应用。

发明内容

为了克服现有的技术不足，本发明的目的是要提供一种幽门螺杆菌毒力基因 *oipA* 的重组抗原，为临床幽门螺杆菌高毒力株感染的诊断提供敏感、特异的检测试剂。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：将通过分子生物学手段，通过基因的克隆表达及表达产物的纯化，获得重组 OipA 抗原，利用此抗原检测临床血清标本中的相应抗体，同时分离培养胃活检标本的 Hp，对 Hp 菌株进行 oipA 信号区基因的扩增和测序，比较抗体与基因检测的结果，从而评价重组抗原检测血清相应抗体的敏感性和特异性的幽门螺杆菌高毒力株试剂的制备，其特征是：

一、材料和方法

1. 菌株、质粒：幽门螺杆菌 NCTC11637，大肠杆菌 BL-21、载体 pET-42a；

2. 引物：根据 GeneBank 的 oipA 的全长基因序列，经同源性分析，在开放读码框架之内设计带有酶切位点的六对引物，下游相同，上游不同，将 oipA 基因截断为依次减小的六个不同的片断；PCR 产物及其相应引物分别为：oipA1：pF-1/pR；oipA2：pF-2/pR；oipA3：pF-3/pR；oipA4：pF-4/pR；oipA5：pF-5/pR；oipA6：pF-6/pR；PCR 扩增产物大小分别为：oipA1：863bp；oipA2：803bp；oipA3：743bp；oipA4：683bp；oipA5：443bp；oipA6：204bp；引物，序列如下：

pF-1: 5' CGGGATCCGATTTTATTTAGGTTTA 3'

pF-2: 5' CGGGATCCGGCAAAAAAGCTTTAGCAG 3'

pF-3: 5' CGGGATCCTTATTCCCCGAACAAAACAC 3'

pF-4: 5' CGGGATCCAAAGATTCAACAAAGATCGC 3'

pF-5: 5' CGGGATCCCAGCGTCCCAAGAATATGTTG 3'

pF-6: 5' CGGGATCCGGCGTTCGTTGGAGCGGTG 3'

pR: 5' CGGAATTCATGTTTGTTTTAAAGTTA 3'

另设计 oipA 信号区引物 SF/SR

oipA SF 5' TCTTAAACCAAAGAAAAACC 3'

SR 5' ACAGAACCAACGCCACCAA 3'

3. 幽门螺杆菌 oipA 基因片断原核表达重组子的构建

3.1 oipA 基因片断的获得：以幽门螺杆菌 NCTC11637 DNA 为模板，通过 PCR 法获得 oipA 基因片断。按照胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物，于 -20℃ 保存备用。

3.2 表达载体的获得：将含质粒 pET-42a 的菌株划线分离接种于 LB 选择培养

基上, 37℃培养10h。挑取单菌落接种于适量LB选择培养液中, 振荡培养8-10h。用质粒抽提试剂盒, 提取质粒pET-42a。

3.3 oipA基因片断及载体的酶切和载体去磷酸化

以 BamH I 和 EcoR I 双酶切 oipA 基因片断和 pET-42a 载体。按纯化试剂盒纯化酶切产物; 纯化的载体去磷酸化, 反应体系:

CIP 1 μ l、载体 25 μ l、Buffer3 5 μ l、ddH₂O 19 μ l、total50 μ l, 反应条件: 37℃水浴 1h; 65℃水浴 20min 终止反应, 用纯化试剂盒对去磷酸化后的载体进行纯化。

3.4 目的基因与表达载体的连接: 各取3 μ l纯化后的目的片段和载体于1%的琼脂糖凝胶中100V电泳20min, 根据电泳条带大致确定连接反应体系, 载体和插入片段的摩尔比3:1到1:3。连接反应体系:

	oipA1	oipA2	oipA3	oipA4	oipA5	oipA6
目的片段	4 μ l	3 μ l	3 μ l	5 μ l	6 μ l	2 μ l
载体	8 μ l	6 μ l	6 μ l	7 μ l	8 μ l	4 μ l
T4 Ligase	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
T4 Ligase Buffer1 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
ddH ₂ O	5 μ l	8 μ l	8 μ l	5 μ l	1 μ l	11 μ l
total	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

反应条件: 4℃, 16h; 65℃水浴10min终止反应。

连接产物分别为: pET-42a /oipA1; pET-42a /oipA2; pET-42a /oipA3; pET-42a /oipA4; pET-42a /oipA5; pET-42a /oipA6。

3.5 重组子的转化与筛选: 将获得的 6 个重组质粒, 分别转化入感受态细胞 BL-21, 挑取若干个转化单菌落, 用开瑞质粒抽提试剂盒提取重组质粒。以重组质粒为模板, pET-42a 为阴性对照的模板, HpNCTC11637 为阳性对照的模板; 以 pF-1/pR; pF-2/pR; pF-3/pR; pF-4/pR; pF-5/pR; pF-6/pR 为引物, PCR 扩增鉴定重组质粒, 同时重组质粒用 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定, 将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组子送测序。

4. 幽门螺杆菌 oipA 基因片段的表达及产物纯化

4.1 重组子的表达、鉴定及表达条件优化

用 IPTG (终浓度为 1.0mmol/L) 诱导 6 个重组子的表达, 诱导后, 收集菌液, 10000rpm, 离心 10min, 弃去上清。细菌沉淀(1.0ml 菌液量)加 1XSDS 上样缓冲液重悬混匀, 沸水浴 10min, 10000g 离心 2min。取上清 20 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳 (分离胶浓度 10%), 将凝胶上的蛋白条带电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜, 用抗 GST Tag 抗体, Western Breeze 化学发光法试剂盒检测融合蛋白中的 GST 标签。

分别以终浓度 0.5、1、1.5、2mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳 IPTG 浓度。

分别用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子的表达, 诱导时间分别定为 0.5、1、2、3、4、5、6h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳诱导时间。

4.2 重组蛋白肽段的纯化

用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 提取细菌包涵体, 用 8mol/L 尿素裂解缓冲液彻底溶解包涵体。10000g 离心 20min, 弃沉淀 (含不被尿素溶解成分), 上清加入 2XSDS 上样缓冲液混匀, 100℃水浴 10min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 继而用 Ni-NTA His.Bind 树脂亲和纯化, 用 Bradford 方法测定纯化的重组蛋白的浓度。

4.3 重组蛋白肽段的抗原性鉴定

用 Western-blot 方法, 以羊抗 Hp 多克隆抗体检测重组蛋白肽段的抗原性。取诱导表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移、丽春红染色; NC 膜用 5%脱脂牛奶 4℃封闭过夜; 以 5%脱脂牛奶 1:400 稀释羊抗 Hp 多克隆抗体, 37℃, 孵育 2h; 以 5%脱脂牛奶 1:2000 稀释 AP 标记的兔抗羊 IgG, 37℃, 孵育 1h; 加入显色液 NBT/BCIP 孵育数 min, 条带出现后用双蒸水漂洗数次。

4.4 筛选抗原性强的重组蛋白肽段

用间接 ELISA 法检测重组蛋白肽段抗原性的强弱。将纯化的重组蛋白肽段, Hp NCTC11637 水煮蛋白 (阳性对照) 以及大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白 (阴性对照) 以包被液调整至相同浓度, 各取 100 μ l 包被酶标反应孔, 同时以 100 μ l 包被液包被一个酶标反应孔做空白对照。置于 4℃包被 24h。弃去包被液, 加封闭液 37℃封闭 2h, 以洗涤液加满孔洗涤 3 次, 每次 3min, 尽量弃尽孔内的液体。将羊抗

Hp 多克隆抗体用 PBS 做 1:500 稀释, 取 100 μ l 加入酶标反应孔, 37℃ 孵育 1h, 洗涤 3 次, 每次 3min, 将 AP 标记的兔抗羊 IgG 用 PBS 做 1:4000 稀释, 取 100 μ l 加入反应孔, 37℃ 孵育 40min, 洗涤每孔加入 100 μ l NBT/BCIP 显色液, 室温反应 10-15min, 采用 450nm 波长, 测定 OD 值, 以空白对照孔调零。

5. OipA6 重组抗原检测血清相应抗体及其评价

5.1 收集临床标本

收集活检胃组织标本和相应的血清标本及资料。活检标本取胃窦部粘膜组织, 一份作快速尿素酶实验 (临床常规检查), 一份置 0.5ml 布氏培养液中用于细菌分离培养 (常规分离培养与鉴定)。同时抽取相应病人外周静脉血 5ml, 离心收集血清, 分装后 -20℃ 保存备用, 用于检测血清抗体。

5.2 Hp 临床分离菌株 oipA 和 cagA 基因 PCR 检测

以上述分离获得的 Hp (83 株) DNA 为模板, 通过 PCR 法获得 oipA 基因信号区 DNA。反应体系:

10Xbuffer	5 μ l
dNTP (10mmol/L each)	1 μ l
primer SF (20—40 μ mol/L)	0.5 μ l
primer SR (20—40 μ mol/L)	0.5 μ l
template (0.15 μ g)	5 μ l
DNA Polymerase (5u/ μ l)	0.5 μ l
MgCL ₂ (25mmol/L)	4 μ l
ddH ₂ O	33.5 μ l
total	50 μ l

反应条件: 94℃5min, (94℃30s, 55℃1min, 72℃1min) ×30, 72℃5 min

5.3 oipA 信号区 PCR 产物测序分析

用 PCR 纯化试剂盒对 oipA 信号区 PCR 产物进行纯化, 纯化后的 PCR 产物送测定序列, 测序结果用 Clustalx 和 Bioedit 软件进行分析。

5.4 病人血清 OipA 抗体

血清 OipA 抗体检测: 以纯化的 OipA6 蛋白肽段 (0.95mg/ml), Hp11637 水煮蛋白 (阳性对照)、大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白 (阴性对照) 以及包被液 (空白

对照)各 100 μ l 包被酶标反应孔;一抗孵育:将收集的血清标本用 PBS 做 1:100 稀释,取 100 μ l 加入反应孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;二抗孵育:将 HRP 标记的抗人 IgG 用 PBS 做 1:4000 稀释,取 100 μ l 加入反应孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 40min;显色及结果判断:以 TMB 为显色液,每孔加入 100 μ l 反应 10-15min,当阳性对照孔出现明显颜色变化后,立即加入 50 μ l 终止液终止反应,采用 450nm 波长,测定 OD 值,以空白对照孔调零。标本 OD 值大于等于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阳性,标本 OD 值小于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阴性。

二、结果

1. oipA 基因片段重组表达质粒的构建

重组子 (pET-42a/oipA1-6) 的 PCR 和酶切鉴定结果,重组质粒 PCR 扩增产物,大小分别约为 oipA1: 860bp; oipA2: 800bp; oipA3: 740bp; oipA4: 680bp; oipA5: 440bp; oipA6: 200bp。重组质粒 BamH I 和 EcoR I 双酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见均有 2 条带,大的条带均处于相同位置,大于 3000bp;小的条带位置各不相同,依次减小,大小变化与相应的目的基因片断一致。

经 PCR、酶切鉴定为阳性重组子,送测序,经 DNAMAN 软件分析,与相应的序列一致。

测得序列如下:

oipA1:

```
GGATTTTATTTAGGTTTAAATTTTCTAGAAGGAAGCTATATTCAAGGACAAGGTAGTATCGGCAAAAA
AGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAAATTTCATTATTCCTCGAACAAA
ACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGATCGCTAAC
CGATTTCGAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAATATTTTTT
GGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTT
CTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTTACTTATTAATTGG
ACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTTCTATATTTTACAA
AGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAAAAAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAAT
CTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCT
TTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGA
TGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTTGAATTGGGGGTTA
```

AAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAAATTGGATTATAAAAAGAGTG
GTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA2:

GGCAAAAAGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAATTTCATTATTCCC
CGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGA
TCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAA
TATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGG
CGTTGGTCTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTACTTA
TTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTCTATA
TTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGGCACATAAT
CAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATC
TCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGG
AGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTTGAATT
GGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATA
AAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA3:

TTATTCCCCGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATT
AACAAAGATCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGG
GGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAA
CTTGGTGGCGTTGGTCTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGA
TTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGC
TTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGG
CACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAG
TAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCG
TTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGT
GTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATT
GGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA4:

AAAGATTCAACAAAGATCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACT

CAGCTTGGGGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACCTCTCTTTTTTCG
GTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTTCTGTTCTGGCAGCGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTC
AATACGGATTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGT
AAAAGGGCTTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAAG
CATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGG
TTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAA
ATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGG
GTTCTAGTGTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGG
GATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACA
TTAA

oipA5:

CGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGG
CAGAACGCTAGACGCTAACACATTAATAAAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTG
TAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTCAATCAAGTC
AAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATAT
TGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGT
TTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTAT
CTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA6:

GGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTC
TAGTGTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATA
AATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

2. 幽门螺杆菌 oipA 基因片段的表达及产物纯化

2.1 蛋白表达: 六个 oipA 基因片断表达后的预测大小分别为: 32KD; 30KD; 27KD; 25KD; 16KD; 7.5KD, 含 GST 以及 His 的融合蛋白肽段预测大小分别约为 67KD; 65KD; 62KD; 60KD; 51KD; 42KD。经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳可见, 各重组菌均有一条表达增加的条带, 分子量与预期的融合蛋白一致; 经图像分析系统测定, 表达量分别占菌体总蛋白的 30.10%; 30.22%; 30.01%; 30.48%; 30.58%; 44.44%。表达的融合蛋白分别命名为 OipA1; OipA2; OipA3; OipA4;

OipA5; OipA6, 空载体转化菌蛋白命名为 OipAK。

2.2 表达产物鉴定

重组蛋白肽段经 SDS-PAGE 电泳并转膜后, 经过 Western-Breeze 化学发光的 X 光片上相应位置各有一条特异性条带, 可见各蛋白肽段均可以被 GST 单克隆抗体识别, 证明所表达的乃是预期的融合蛋白肽段。

2.3 表达条件的优化

终浓度0.5、1、1.5、2mmol/L的IPTG均能诱导重组蛋白的表达, SDS-PAGE 电泳分析显示, 当IPTG终浓度为1.5mmol/L时, 表达量最大。分别诱导0.5、1、2、3、4、5、6h, 重组蛋白均有表达。以OipA6为例, SDS-PAGE电泳后图像分析显示, 表达量分别占菌体总蛋白41.08%; 46.8%; 49.3%; 52.47%; 54.33%; 47.74%和46.87%。其中, 以诱导4h, 含量54.33%为最高。即当诱导时间为4h 时, 重组蛋白的表达量最大。

2.4 重组蛋白肽段的纯化

包涵体的粗纯

对重组蛋白包涵体进行初步纯化, SDS-PAGE 电泳分析显示, 当尿素浓度为 8mol/L 时, 包涵体的溶解度最大, 各蛋白肽段的纯度分别达到 80%; 82%; 84 %; 83%; 81%; 90%。

亲和纯化 (His-Tag)

经初步纯化的包涵体进行亲和层析纯化, 分别洗脱 4 次后, SDS-PAGE 电泳分析显示, 纯度分别可以达到: 93%-96%,

2.5 重组蛋白肽段浓度测定

用 Bradford 方法测得的重组蛋白肽段的浓度见表 1。

表 1: 重组蛋白浓度

重组蛋白	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6
浓度	0.80	0.68	0.84	0.60	0.98	0.95
(mg/ml)						

2.6 重组蛋白肽段的抗原性

Western blot结果显示，NC膜上各有一条特异性条带，条带位置与重组蛋白肽段位置一致。说明重组蛋白肽段可以被羊抗Hp多克隆抗体识别，具有抗原性。

2.7 筛选抗原性强的重组蛋白肽段

间接ELISA法检测重组蛋白肽段的抗原性，结果见表2。阳性对照Hp NCTC 11637蛋白的吸光度最大，阴性对照大肠杆菌BL-21蛋白的吸光度最小，重组蛋白的吸光度从大到小依次为OipA6>OipA5>OipA4>OipA3>OipA2>OipA1。表明同样条件下，OipA6的抗原性最强。

表 2：重组蛋白 ELISA 的吸光度

蛋白	BL-21	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6	Hp11637
吸光度	0.000	0.042	0.044	0.049	0.051	0.058	0.059	0.104

3. OipA6 重组抗原检测血清相应抗体及其评价

3.1 临床标本分离 oipA 基因信号区序列分析

临床标本分离培养获得 83 株 Hp，PCR 扩增 其 oipA 信号区基因，66 株细菌获得阳性结果，（随机显示 6 株细菌 PCR 结果）。将 66 株细菌的 oipA 基因 PCR 扩增产物进行序列分析，根据信号区 AG（CT）重复数目的多少，判断 oipA 基因的开关状态：当信号区有 6、9、（1+3）、（2+3）、（1+2）、（1+1+1）、（1+1+2）个 CT 双核苷酸重复时，基因为“开放”状态，可编码 OipA 蛋白，使机体产生相应的抗体；当信号区有 5 个或 7 个 CT 双核苷酸重复时，基因为“关闭”状态，不编码 OipA 蛋白。依此判断在 66 株细菌中，基因处于开放状态的有 62 株；基因处于关闭状态的 0 株；无法判断开关状态的有 4 株。相应信号区的 CT（AG）重复数目、序列、基因的开关状态如表 3。

表 3: 66 株 Hp 信号区 AG (CT) 重复序列分析结果

AG (CT) 重复数目	AG (CT) 重复区序列	基因状态	合计
6	AACG (AA) <u>AGAGAGAGAGAG</u> TTAG	on	6
9	AACG <u>AGAGAGAGAGAGAGAGAGAG</u> TTAG	on	1
1+3	AACGAGAAAA <u>AGAGAG</u> CTAG	on	37
1+1+1	AACGAGAA <u>AGACAG</u> AAAGAG	on	8
2+3	AACGAGAGAA <u>AGAGAG</u> TTAG	on	4
1+1+2	AACGAGAA <u>AGACAGAG</u> TGAG	on	2
1+2	AACGAGAAAA <u>ACAGAG</u> TTAG	on	4
2+2	AACGAGAGAA <u>AGAGAA</u> AGAG	?	1
1/ (1+1)	AACGAAAAAA <u>AGAAAG</u> TTAG	?	3

3.2 抗原检测 OipA 抗体的敏感性和特异性

检测 62 例 oipA 信号区基因为开放状态（即可编码 OipA，机体可产生抗体）的血清标本，及信号区 PCR 结果阴性和未感染 Hp(Hp 培养、血清 CagA 抗体、胃粘膜快速尿素酶检测同时阴性)的 48 例(即功能性 oipA 阴性)血清标本的 OipA 抗体，比较血清 OipA 抗体与 oipA 基因检测结果，如表 4，结果显示，以 OipA6 作为抗原检测 OipA 抗体的敏感性为 95.16%(59/62)，特异性为 95.83%(46/48)，约登指数 (Youden's index) = 90.99%。

表 4: OipA 抗体检测与 oipA 基因检测结果比较

OipA 抗体	功能性 oipA		合计
	阳性	阴性	
阳性	59	2	61
阴性	3	46	49
合计	62	48	110

本发明的有益效果是：获得幽门螺杆菌 oipA 毒力基因片段—oipA6 的重组子：oipA6-pET-42a (oipA6 序列如下)，将重组子转化 BL-21 细胞，获得高效表达的 OipA6 融合蛋白，分子量为：42KD，经鉴定具有良好的抗原性，用于检测病人血清 OipA 抗体的敏感性和特异性分别达到 95.16%和 95.83%。oipA6 基因序列：

```
GGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTC
TAGTGTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATA
AATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA
```

附图说明

以下结合附图及实施例对本发明进行进一步的描述。

图 1 是重组质粒 PCR 鉴定结果。

图中 M: DNA Marker DL3000 ;

1-6:pET-42a/oipA1-6; K: pET-42a。

图 2 是重组质粒酶切产物电泳。

图中 M: DNA Marker DL3000; 1-6:pET-42a/oipA1-6。

图3是OipA1-6 融合蛋白肽段的SDS-PAGE电泳图。

图中 1~6:OipA1~6, respectively; K: OipAK; M: Protein Marker。

图 4 是重组融合蛋白肽段的鉴定。

图中 1:OipA1; 2: OipA2; 3: OipA3; 4: OipA4; 5: OipA5; 6: OipA6。

图 5 是不同时间诱导 OipA6 的表达。

图中0: induced for 0h; 0.5: induced for 0.5h;

1~6: induced for 1~6h respectively。

图 6 是重组蛋白肽段包涵体初步纯化。

图中 K:OipAK after induction; K' :inclusion body of OipAK; 1~6:OipA1~6 after induction ; 1' ~6' :inclusion body of OipA1-6; M:Marker。

图 7 是重组蛋白肽段亲和纯化。

图中 1,5,6:OipA1、5、6 after induction;

1', 5', 6': OipA1、5、6 after affinity purification.

图 8 是重组蛋白肽段抗原性检测。

图中 1:OipA1 ; 2: OipA2; 3: OipA3;

4: OipA4; 5: OipA5; 6: OipA6。

图 9 是 oipA 基因信号区 PCR 扩增产物。

图中 M: Marker; 1~6:clinical sample。

具体实施方式

实施例 1:

一、材料和方法

1. 菌株、质粒: 幽门螺杆菌 NCTC11637 购自中国疾病预防控制中心传染病研究所, 大肠杆菌 BL-21、载体 pET-42a 购自 Invitrogen 公司

2. 引物: 由上海博亚生物工程有限公司合成。根据 GeneBank 公布的 oipA 的全长基因序列, 经同源性分析, 在开放读码框架之内设计带有酶切位点的六对引物, 下游相同, 上游不同, 将 oipA 基因截断为依次减小的六个不同的片断。PCR 产物及其相应引物分别为: oipA1: pF-1/pR; oipA2: pF-2/pR; oipA3: pF-3/pR; oipA4: pF-4/pR; oipA5: pF-5/pR; oipA6: pF-6/pR。PCR 扩增产物大小分别为: oipA1: 863bp; oipA2: 803bp; oipA3: 743bp; oipA4: 683bp; oipA5: 443bp; oipA6: 204bp。引物, 序列如下:

pF-1: 5' CGGGATCCGGATTTTATTTAGGTTTA 3'

pF-2: 5' CGGGATCCGGCAAAAAAGCTTTAGCAG 3'

pF-3: 5' CGGGATCCTTATTCCCCGAACAAAACAC 3'

pF-4: 5' CGGGATCCAAAGATTCAACAAAGATCGC 3'

pF-5: 5' CGGGATCCCGAGCGTCCCAAGAATATGTTG 3'

pF-6: 5' CGGGATCCGGCGTTCGTTGGAGCGGTG 3'

pR: 5' CGGAATTCATGTTTGTGTTTTAAAGTTA 3'

另设计 oipA 信号区引物 SF/SR

oipA SF 5' TCTTAAAACCAAAGAAAAACC 3'

SR 5' ACAGAACCAACGCCACCAA 3'

3. 幽门螺杆菌 oipA 基因片断原核表达重组子的构建

3.1 oipA基因片断的获得：以幽门螺杆菌NCTC11637 DNA为模板，通过PCR法获得oipA基因片断。按照上海中科开瑞工程有限公司胶回收试剂盒回收并纯化PCR产物，于-20℃保存备用。

3.2 表达载体的获得：将含质粒pET-42a的菌株划线分离接种于LB选择培养基上，37℃培养10h。挑取单菌落接种于适量LB选择培养液中，振荡培养8-10h。用上海中科开瑞工程有限公司质粒抽提试剂盒，提取质粒pET-42a。

3.3 oipA基因片断及载体的酶切和载体去磷酸化

以 BamH I 和 EcoRl I 双酶切 oipA 基因片断和 pET-42a 载体。按照上海中科开瑞工程有限公司纯化试剂盒纯化酶切产物。纯化的载体去磷酸化，反应体系：CIP 1μl、载体 25μl、Buffer3 5μl、ddH₂O 19μl、total50μl，反应条件：37℃水浴 1h；65℃水浴 20min 终止反应，用纯化试剂盒对去磷酸化后的载体进行纯化。

3.4 目的基因与表达载体的连接：各取3μl纯化后的目的片段和载体于1%的琼脂糖凝胶中100V电泳20min，根据电泳条带大致确定连接反应体系，载体和插入片段的摩尔比3:1到1:3。连接反应体系：

	oipA1	oipA2	oipA3	oipA4	oipA5	oipA6
目的片段	4μl	3μl	3μl	5μl	6μl	2μl
载体	8μl	6μl	6μl	7μl	8μl	4μl
T4 Ligase	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
T4 Ligase Buffer	1μl	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl
ddH ₂ O	5μl	8μl	8μl	5μl	1μl	11μl
total	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl	20μl

反应条件：4℃，16h；65℃水浴10min终止反应。

连接产物分别为：pET-42a /oipA1；pET-42a /oipA2；pET-42a /oipA3；pET-42a /oipA4；pET-42a /oipA5；pET-42a /oipA6。

3.5 重组子的转化与筛选：将上述获得的 6 个重组质粒，分别转化入感受态细胞 BL-21，挑取若干个转化单菌落，用上海中科开瑞质粒抽提试剂盒提取重组质粒。以重组质粒为模板，pET-42a 为阴性对照的模板，HpNCTC11637 为阳性对照的模板；以 pF-1/pR；pF-2/pR；pF-3/pR；pF-4/pR；pF-5/pR；pF-6/pR

为引物, PCR 扩增鉴定重组质粒, 同时重组质粒用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定, 将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组子送上海博亚生物技术有限公司测序。

4. 幽门螺杆菌 *oipA* 基因片段的表达及产物纯化

4.1 重组子的表达、鉴定及表达条件优化

用 IPTG (终浓度为 1.0mmol/L) 诱导上述 6 个重组子的表达, 诱导后, 收集菌液, 10000rpm, 离心 10min, 弃去上清。细菌沉淀(1.0ml 菌液量)加 1XSDS 上样缓冲液重悬混匀, 沸水浴 10min, 10000g 离心 2min。取上清 20 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度 10%), 将凝胶上的蛋白条带电转移至硝酸纤维素(NC)膜, 用抗 GST Tag 抗体, Western Breeze 化学发光法试剂盒检测融合蛋白中的 GST 标签。

分别以终浓度 0.5、1、1.5、2mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳 IPTG 浓度。

分别用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子的表达, 诱导时间分别定为 0.5、1、2、3、4、5、6h, 收集菌体进行 SDS - PAGE 电泳, 图像分析系统分析表达量, 确定最佳诱导时间。

4.2 重组蛋白肽段的纯化

用终浓度 1.5mmol/L 的 IPTG 诱导重组子表达 4h, 提取细菌包涵体, 用 8mol/L 尿素裂解缓冲液彻底溶解包涵体。10000g 离心 20min, 弃沉淀 (含不被尿素溶解成分), 上清加入 2XSDS 上样缓冲液混匀, 100℃水浴 10min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 继而用 Ni-NTA His.Bind 树脂亲和纯化, 用 Bradford 方法测定纯化的重组蛋白的浓度。

4.3 重组蛋白肽段的抗原性鉴定

用 Western-blot 方法, 以羊抗 Hp 多克隆抗体检测重组蛋白肽段的抗原性。取诱导表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移、丽春红染色; NC 膜用 5%脱脂牛奶 4℃封闭过夜; 以 5%脱脂牛奶 1:400 稀释羊抗 Hp 多克隆抗体, 37℃, 孵育 2h; 以 5%脱脂牛奶 1:2000 稀释 AP 标记的兔抗羊 IgG, 37℃, 孵育 1h; 加入显色液 NBT/BCIP 孵育数 min, 条带出现后用双蒸水漂洗数次。

4.4 筛选抗原性强的重组蛋白肽段

用间接 ELISA 法检测重组蛋白肽段抗原性的强弱。将纯化的重组蛋白肽段,

Hp NCTC11637 水煮蛋白（阳性对照）以及大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白（阴性对照）以包被液调整至相同浓度，各取 100μl 包被酶标反应孔，同时以 100μl 包被液包被一个酶标反应孔做空白对照。置于 4℃ 包被 24h。弃去包被液，加封闭液 37℃ 封闭 2h，以洗涤液加满孔洗涤 3 次，每次 3min，尽量弃尽孔内的液体。将羊抗 Hp 多克隆抗体用 PBS 做 1:500 稀释，取 100μl 加入酶标反应孔，37℃ 孵育 1h，洗涤 3 次，每次 3min，将 AP 标记的兔抗羊 IgG 用 PBS 做 1:4000 稀释，取 100μl 加入反应孔，37℃ 孵育 40min，洗涤每孔加入 100μl NBT/BCIP 显色液，室温反应 10-15min，采用 450nm 波长，测定 OD 值，以空白对照孔调零。

5.0 ipA6 重组抗原检测血清相应抗体及其评价

5.1 收集临床标本

收集 285 份活检胃组织标本和相应的血清标本，同时收集患者的临床资料（性别、年龄、临床诊断、既往消化道疾病史）和病理诊断结果。285 份标本中男 157 例、女 128 例，平均年龄 44.4 岁。活检标本取胃窦部粘膜组织，一份作快速尿素酶实验（临床常规检查），一份置 0.5ml 布氏培养液中用于细菌分离培养（常规分离培养与鉴定）。同时抽取相应病人外周静脉血 5ml，离心收集血清，分装后 -20℃ 保存备用，用于检测血清抗体。

5.2 Hp 临床分离菌株 oipA 和 cagA 基因 PCR 检测

以上述分离获得的 Hp（83 株）DNA 为模板，通过 PCR 法获得 oipA 基因信号区 DNA。反应体系：

10Xbuffer	5μl
dNTP (10mmol/L each)	1μl
primer SF (20—40μmol/L)	0.5μl
primer SR (20—40μmol/L)	0.5μl
template (0.15μg)	5μl
DNA Polymerase (5u/μl)	0.5μl
MgCL ₂ (25mmol/L)	4μl
ddH ₂ O	33.5μl
total	50μl

反应条件：94℃ 5min, (94℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 1min) × 30, 72℃ 5 min

5.3 oipA 信号区 PCR 产物测序分析

用上海中科开瑞工程有限公司 PCR 纯化试剂盒对 oipA 信号区 PCR 产物进行纯化，纯化后的 PCR 产物送上海博亚生物技术有限公司测定序列，测序结果用 Clustalx 和 Bioedit 软件进行分析。

5.4 病人血清 OipA 抗体

血清 OipA 抗体检测：以纯化的 OipA6 蛋白肽段 (0.95mg/ml)，Hp11637 水煮蛋白（阳性对照）、大肠杆菌 BL-21 水煮蛋白（阴性对照）以及包被液（空白对照）各 100 μ l 包被酶标反应孔；一抗孵育：将收集的血清标本用 PBS 做 1:100 稀释，取 100 μ l 加入反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；二抗孵育：将 HRP 标记的抗人 IgG 用 PBS 做 1:4000 稀释，取 100 μ l 加入反应孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 40min；显色及结果判断：以 TMB 为显色液，每孔加入 100 μ l 反应 10-15min，当阳性对照孔出现明显颜色变化后，立即加入 50 μ l 终止液终止反应，采用 450nm 波长，测定 OD 值，以空白对照孔调零。标本 OD 值大于等于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阳性，标本 OD 值小于 2.1 倍阴性对照 OD 值为阴性。

二、结果

1. oipA 基因片段重组表达质粒的构建

图 1、2 分别为重组子 (pET-42a/oipA1-6) 的 PCR 和酶切鉴定结果，重组质粒 PCR 扩增产物，大小分别约为 oipA1: 860bp; oipA2: 800bp; oipA3: 740bp; oipA4: 680bp; oipA5: 440bp; oipA6: 200bp，与之前所得的目的基因片断大小基本一致。重组质粒 BamH I 和 EcoR I 双酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，可见均有 2 条带，大的条带均处于相同位置，大于 3000bp；小的条带位置各不相同，依次减小，大小变化与相应的目的基因片断一致。

经 PCR、酶切鉴定为阳性重组子，送测序，经 DNAMAN 软件分析，与相应的序列一致。

测得序列如下：

oipA1:

```
GGATTTTATTTAGGTTTAAATTTTCTAGAAGGAAGCTATATTCAAGGACAAGGTAGTATCGGCAAAAA
AGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAAATTCATTATTCCCCGAACAAA
ACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGATCGCTAAC
```

CGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAATATTTTTT
GGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTT
CTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTACTTATTAATTGG
ACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTCTATATTTTACAA
AGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAaaaaaAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAAT
CTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCT
TTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGA
TGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTGAATTGGGGTTA
AAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATAAAAGAGTG
GTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA2:

GGCAAAAAAGCTTTAGCAGAAAACACCTTAAATGAAGCGATCAATAACGCAAAAAATTCATTATTCCC
CGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTCAACAAAGA
TCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGGGGTATAAA
TATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAACTTGGTGG
CGTTGGTTCTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGATTACTTA
TTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTCTATA
TTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAaaaaaAGCATCAAGGCACATAAT
CAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATC
TCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTTCAGTTACAAGGGAATTTGGCGTTCGTTGG
AGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTCTAGTGTGAATT
GGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATA
AAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA3:

TTATTTCCCGAACAAAACACAAAAGCCATAAGAGATGCGCAAAACGCCTTAAATGCAGTGAAAGATTC
AACAAAGATCGCTAACCGATTTCGCAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACTCAGCTTGG
GGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCGGTTACCAA
CTTGGTGGCGTTGGTTCTGTTCCCTGGCAGCGGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTCAATACGGA
TTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGC

TTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGG
CACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAG
TAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCG
TTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCTAGT
GTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATT
GGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA4:

AAAGATTCAACAAAGATCGCTAACCGATTTCGAGGAAATGGCGGGTCGGGCGGTATTTTCAATGAACT
CAGCTTGGGGTATAAATATTTTTTGGGTAAAAAAGGGATTATAGGGTTTAGGCACTCTCTTTTTTTCG
GTTACCAACTTGGTGGCGTTGGTTCTGTTTCCTGGCAGCGTTTAATAGCTTTTTTACCCTATGGTTTC
AATACGGATTTACTTATTAATTGGACTAACGATAAACGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGT
AAAAGGGCTTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGGCAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAG
CATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTGTAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGG
TTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTCAAGAGCCACACAATTTTTCAGTTACAAGGGAA
ATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGG
GTTCTAGTGTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGG
GATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACA
TTAA

oipA5:

CGAGCGTCCCAAGAATATGTTGAACGAAGGGTAAAAGGGCTTTCTATATTTTACAAAGATATGACCGG
CAGAACGCTAGACGCTAACACATTAAAAAAGCATCAAGGCACATAATCAGAAAATCTTCAGGACTTG
TAATTGGCATGGATATAGGGGCTAGCACTTGGTTTGCAAGTAACAATCTCACCCCTTTCAATCAAGTC
AAGAGCCACACAATTTTTCAGTTACAAGGGAAATTTGGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATAT
TGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCTAGTGTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGT
TTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATAAATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTAT
CTCAACTATACATATAACTTTAAAAACAAACATTAA

oipA6:

GGCGTTCGTTGGAGCGGTGATGAATACGATATTGATCGCTATGGCGATGAAATCTATCTTGGGGGTTCT
TAGTGTTGAATTGGGGGTAAAGTACCAGCGTTTAAAGTCAATTACTATGGCGATGATTATGGGGATA

AATTGGATTATAAAAGAGTGGTGAGCGTTTATCTCAACTATACATAATAACTTTAAAAACAAACATTAA

2. 幽门螺杆菌 oipA 基因片段的表达及产物纯化

2.1 蛋白表达：六个 oipA 基因片断表达后的预测大小分别为：32KD；30KD；27KD；25KD；16KD；7.5KD，含 GST 以及 His 的融合蛋白肽段预测大小分别约为 67KD；65KD；62KD；60KD；51KD；42KD。经 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 电泳可见，各重组菌均有一条表达增加的条带，分子量与预期的融合蛋白一致；经图像分析系统测定，表达量分别占菌体总蛋白的 30.10%；30.22%；30.01%；30.48%；30.58%；44.44%，如图 3。表达的融合蛋白分别命名为 OipA1；OipA2；OipA3；OipA4；OipA5；OipA6，空载体转化菌蛋白命名为 OipAK。

2.2 表达产物鉴定

重组蛋白肽段经 SDS-PAGE 电泳并转膜后，经过 Western-Breeze 化学发光的 X 光片上相应位置各有一条特异性条带，可见各蛋白肽段均可以被 GST 单克隆抗体识别，证明所表达的乃是预期的融合蛋白肽段。如图 4。

2.3 表达条件的优化

终浓度 0.5、1、1.5、2mmol/L 的 IPTG 均能诱导重组蛋白的表达，SDS-PAGE 电泳分析显示，当 IPTG 终浓度为 1.5mmol/L 时，表达量最大。分别诱导 0.5、1、2、3、4、5、6h，重组蛋白均有表达。以 OipA6 为例，SDS-PAGE 电泳后图像分析显示，表达量分别占菌体总蛋白 41.08%；46.8%；49.3%；52.47%；54.33%；47.74% 和 46.87%。其中，以诱导 4h，含量 54.33% 为最高。即当诱导时间为 4h 时，重组蛋白的表达量最大。如图 5。

2.4 重组蛋白肽段的纯化

包涵体的粗纯

对重组蛋白包涵体进行初步纯化，SDS-PAGE 电泳分析显示，当尿素浓度为 8mol/L 时，包涵体的溶解度最大，各蛋白肽段的纯度分别达到 80%；82%；84%；83%；81%；90%。如图 6。

亲和纯化 (His-Tag)

经初步纯化的包涵体进行亲和层析纯化，分别洗脱 4 次后，SDS-PAGE 电泳分析显示，纯度分别可以达到：93%-96%，如图 7。

2.5 重组蛋白肽段浓度测定

用 Bradford 方法测得的重组蛋白肽段的浓度见表 1。

表 1: 重组蛋白浓度

重组蛋白	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6
浓度 (mg/ml)	0.80	0.68	0.84	0.60	0.98	0.95

2.6 重组蛋白肽段的抗原性

Western blot结果显示, NC膜上各有一条特异性条带, 条带位置与重组蛋白肽段位置一致。说明重组蛋白肽段可以被羊抗Hp多克隆抗体识别, 具有抗原性。如图8。

2.7 筛选抗原性强的重组蛋白肽段

间接ELISA法检测重组蛋白肽段的抗原性, 结果见表2。阳性对照Hp NCTC 11637蛋白的吸光度最大, 阴性对照大肠杆菌BL-21蛋白的吸光度最小, 重组蛋白的吸光度从大到小依次为OipA6>OipA5>OipA4>OipA3>OipA2>OipA1。表明同样条件下, OipA6的抗原性最强。

表 2: 重组蛋白 ELISA 的吸光度

蛋白	BL-21	OipA1	OipA2	OipA3	OipA4	OipA5	OipA6	Hp11637
吸光度	0.000	0.042	0.044	0.049	0.051	0.058	0.059	0.104

3. OipA6 重组抗原检测血清相应抗体及其评价

3.1 临床标本分离 oipA 基因信号区序列分析

临床标本分离培养获得 83 株 Hp, PCR 扩增 其 oipA 信号区基因, 66 株细菌获得阳性结果。将 66 株细菌的 oipA 基因 PCR 扩增产物进行序列分析, 根据信号区 AG (CT) 重复数目的多少, 判断 oipA 基因的开关状态: 当信号区有 6、9、(1+3)、(2+3)、(1+2)、(1+1+1)、(1+1+2) 个 CT 双核苷酸重复时, 基因

为“开放”状态，可编码 OipA 蛋白，使机体产生相应的抗体；当信号区有 5 个或 7 个 CT 双核苷酸重复时，基因为“关闭”状态，不编码 OipA 蛋白。依此判断在 66 株细菌中，基因处于开放状态的有 62 株；基因处于关闭状态的 0 株；无法判断开关状态的有 4 株。相应信号区的 CT (AG) 重复数目、序列、基因的开关状态如表 3。

表 3: 66 株 Hp 信号区 AG (CT) 重复序列分析结果

AG (CT) 重复数目	AG (CT) 重复区序列	基因状态	合计
6	AACG (AA) <u>AGAGAGAGAGAG</u> TTAG	on	6
9	AACG <u>AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG</u> TTAG	on	1
1+3	AACG <u>AGAAAAAGAGAG</u> CTAG	on	37
1+1+1	AACG <u>AGAAAGACAGAAAGAG</u>	on	8
2+3	AACG <u>AGAGAAAGAGAG</u> TTAG	on	4
1+1+2	AACG <u>AGAAAGACAGAG</u> TGAG	on	2
1+2	AACG <u>AGAAAAACAGAG</u> TTAG	on	4
2+2	AACG <u>AGAGAAAGAGAAAGAG</u>	?	1
1/ (1+1)	AACG <u>AAAAAAAGAAAG</u> TTAG	?	3

3.2 抗原检测 OipA 抗体的敏感性和特异性

检测 62 例 oipA 信号区基因为开放状态（即可编码 OipA，机体可产生抗体）的血清标本，及信号区 PCR 结果阴性和未感染 Hp(Hp 培养、血清 CagA 抗体、胃粘膜快速尿素酶检测同时阴性)的 48 例(即功能性 oipA 阴性)血清标本的 OipA 抗体，比较血清 OipA 抗体与 oipA 基因检测结果，如表 4，结果显示，以 OipA6 作为抗原检测 OipA 抗体的敏感性为 95.16%(59/62)，特异性为 95.83%(46/48)，约登指数 (Youden's index) = 90.99%。

表 4: OipA 抗体检测与 oipA 基因检测结果比较

OipA 抗体	功能性 oipA		合计
	阳性	阴性	
阳性	59	2	61
阴性	3	46	49
合计	62	48	110

。

SEQUENCE LISTING

<110> 福建医科大学

<120> 幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 203

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 1

```

GGC GTT CGT TGG AGC GGT GAT GAA TAC GAT ATT GAT CGC TAT GGC GAT GAA ATC  54
Gly Val Arg Trp Ser Gly Asp Glu Tyr Asp Ile Asp Arg Tyr Gly Asp Glu Ile
1           5           10           15
TAT CTT GGG GGT TCT AGT GTT GAA TTG GGG GTT AAA GTA CCA GCG TTT AAA GTC  108
Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Val Glu Leu Gly Val Lys Val Pro Ala Phe Lys Val
20          25          30          35
AAT TAC TAT GGC GAT GAT TAT GGG GAT AAA TTG GAT TAT AAA AGA GTG GTG AGC  162
Asn Tyr Tyr Gly Asp Asp Tyr Gly Asp Lys Leu Asp Tyr Lys Arg Val Val Ser
40          45          50
GTT TAT CTC AAC TAT ACA TAT AAC TTT AAA AAC AAA CAT TAA  204
Val Tyr Leu Asn Tyr Thr Tyr Asn Phe Lys Asn Lys His
55          60          65

```

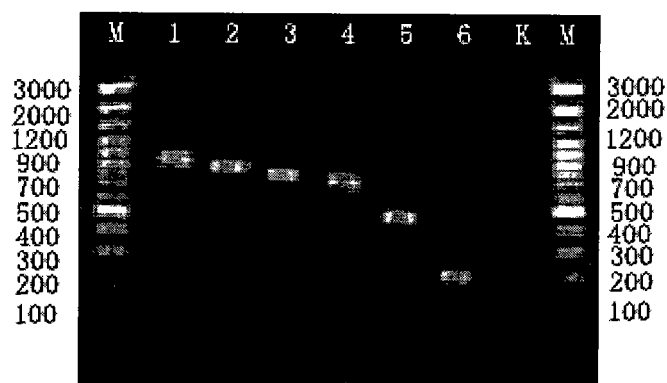


图 1

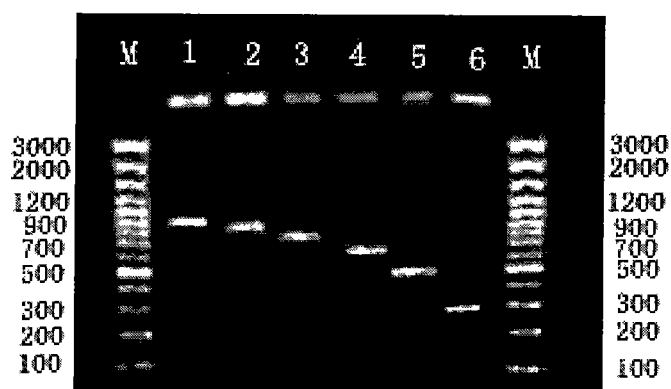


图 2

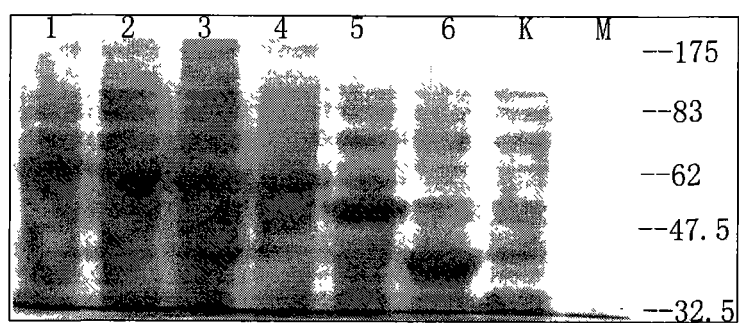


图 3

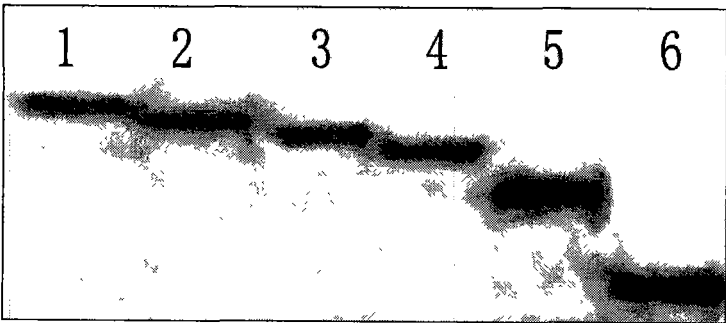


图 4

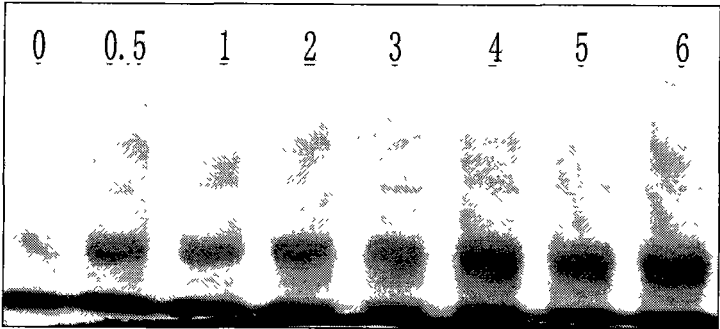


图 5

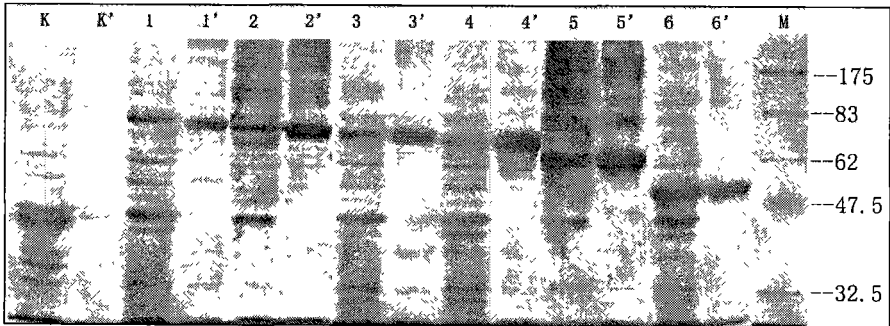


图 6

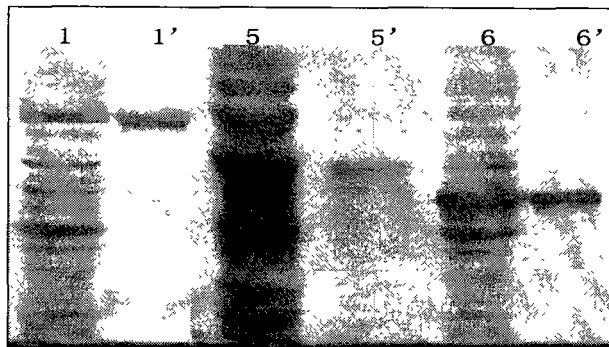


图 7

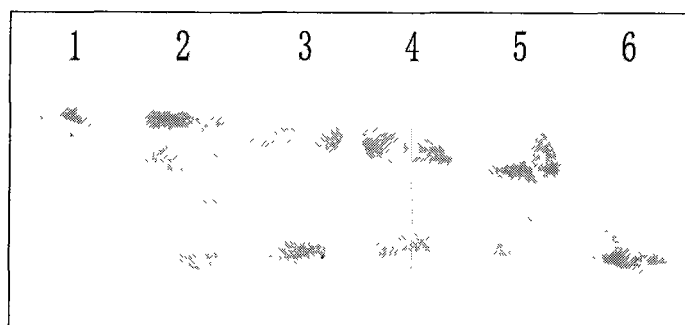


图 8

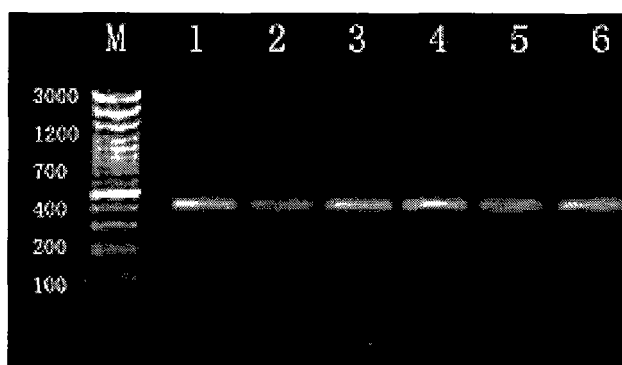


图 9

专利名称(译)	幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备		
公开(公告)号	CN101082623A	公开(公告)日	2007-12-05
申请号	CN200710009200.3	申请日	2007-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
[标]发明人	余菲菲 林旭 李妮 李能 陈豪		
发明人	余菲菲 林旭 李妮 李能 陈豪		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/561 C12Q1/68		
其他公开文献	CN101082623B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种幽门螺杆菌高毒力株检测试剂的制备,属人类疾病临床诊断的试剂。即通过分子生物学手段及基因的克隆表达和表达产物的纯化,获得重组OipA抗原,利用此抗原检测临床血清标本中的相应抗体,同时分离培养胃活检标本的Hp,对Hp菌株进行oipA信号区基因的扩增和测序,比较抗体与基因检测的结果,从而评价重组抗原检测血清相应抗体的敏感性和特异性。获得幽门螺杆菌oipA毒力基因片段—oipA6的重组子:oipA6 - pET - 42a,将重组子转化BL - 21细胞,获得高效表达的OipA6融合蛋白,分子量为:42KD,经鉴定具有良好的抗原性,用于检测病人血清OipA抗体的敏感性和特异性分别达到95.16%和95.83%。

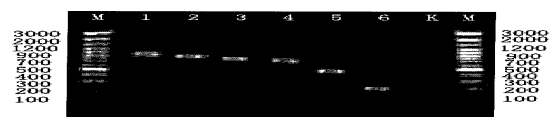


图 1

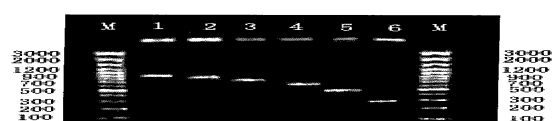


图 2

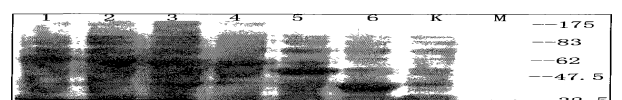


图 3