

# 幽门螺杆菌 oipA 基因的克隆及其生物信息学分析

陈 阳, 李健峰, 姬秋彦, 闫玲梅, 龙海亭, 徐维明

陈阳, 李健峰, 姬秋彦, 闫玲梅, 龙海亭, 徐维明, 中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所 云南省昆明市 650118  
陈阳, 男, 1979-09-02 生, 广东海丰人, 汉族. 中国医学科学院中国协和医科大学 2002 级硕士生.  
通讯作者: 徐维明, 650118, 云南省昆明市茭菱路 379 号, 中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所. xuwm@imbcams.com.cn  
电话: 0871-8334579 传真: 0871-8335702  
收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-02-02

## Cloning and bioinformatics analysis of gene oipA of *Helicobacter pylori*

Yang Chen, Jian-Feng Li, Qiu-Yan Ji, Ling-Mei Yan, Hai-Ting Long, Wei-Ming Xu

Yang Chen, Jian-Feng Li, Qiu-Yan Ji, Ling-Mei Yan, Hai-Ting Long, Wei-Ming Xu, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science Peking Union Medical College, No. 379, Jiaoling Road, Kunming 650118, Yunnan Province, China  
Correspondence to: Wei-Ming Xu, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science Peking Union Medical College, No. 379, Jiaoling Road, Kunming 650118, Yunnan Province, China. xuwm@imbcams.com.cn  
Received: 2004-12-31 Accepted: 2005-02-02

## Abstract

**AIM:** To clone and characterize the oipA gene of *Helicobacter pylori* (*H pylori*).

**METHODS:** The primers were designed based on the sequence in GenBank. PCR was used to amplify the oipA gene. The amplified fragment was inserted into plasmid pGEX-5X-1 for nucleotide sequencing. The bioinformatics analysis was carried out by using databases of Blast, NCBI CDD, Swiss-model, Propred and software of Omega v2.0 and Antheprot v5.0.

**RESULTS:** The oipA gene was successfully cloned with the same sequence as that published in GenBank. No homeotic gene was found in other species through the Blast, and no conserved domain was found through NCBI CDD. Potential hydrophobicity and antigenicity were predicted by software Omega v2.0 and Antheprot v5.0. The epitopes were predicted by comparing the results from Omega v2.0, Antheprot v5.0 and Propred.

**CONCLUSION:** Bioinformatics analysis of gene oipA may help to elucidate the pathogenesis of *H pylori* related diseases and to develop *H pylori* vaccines.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; oipA; Bioinformatics analysis

Chen Y, Li JF, Ji QY, Yan LM, Long HT, Xu WM. Cloning and bioinformatics analysis of gene oipA of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(7):867-870

## 摘要

**目的:** 克隆幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)前炎症外膜蛋白基因 oipA, 并对其进行生物信息学分析.

**方法:** 利用 GenBank 已公布序列设计引物, 用 PCR 进行扩增后, 酶切, 连入载体 pGEX-5X-1, 并进行序列测定. 用数据库 Blast, NCBI CDD, Swiss-model, Propred 以及生物学软件 Omega v2.0 和 Antheprot v5.0 分析其生物学特性.

**结果:** 克隆片段与 GenBank 公布序列完全一致. 经 Blast 比对未发现与 oipA 同源的其他种属基因, 通过 NCBI CDD 未找到已知保守区域和 oipA 编码氨基酸序列相关. 应用 Omega v2.0, Antheprot v5.0 软件预测显示该蛋白具有良好的疏水性和抗原性, 将该分析结果和 Propred 结果比对得到预测的抗原表位.

**结论:** 应用生物信息学技术, 对幽门螺杆菌基因 oipA 进行分析, 将为 *H pylori* 与相关致病发生机制研究, *H pylori* 疫苗的开发等工作奠定一定基础.

**关键词:** 幽门螺杆菌; oipA; 生物信息学分析

陈阳, 李健峰, 姬秋彦, 闫玲梅, 龙海亭, 徐维明. 幽门螺杆菌 oipA 基因的克隆及其生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2005;13(7):867-870  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/867.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 与胃腺癌、胃黏膜相关性淋巴样组织恶性淋巴瘤的发生亦密切相关<sup>[1]</sup>. 在 *H pylori* 定植和致病的过程中各种外膜蛋白起着重要作用. 近年来的临床统计研究中发现幽门螺杆菌 oipA 基因所编码的外膜蛋白和宿主高水平的 IL-8 分泌, 严重地中性粒细胞聚集以及消化性溃疡密切相关<sup>[2]</sup>. 在体外实验中亦发现 oipA 能有效提高胃表皮细胞 IL-8 的分泌<sup>[3]</sup>. 还有报道认为 oipA 和 Cag PAI 能够分别独立的影响宿主 IL-8 的分泌<sup>[4]</sup>. 对

oipA基因的克隆和生物信息学的分析将有助于对其理化特性、同源性以及结构和功能的进一步认识,为研究 *H. pylori* 致病机制和 *H. pylori* 疫苗的开发等工作打下一定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 幽门螺杆菌 Hp 26695 购自中国预防医学科学院传染病预防控制所. 菌株 *E. coli* DH $\alpha$ , 质粒 pGEX-5x-1 为本所保存. 限制性内切酶 *Bam*H I, *Eco*R I, Taq 酶, T4 DNA 聚合酶、DL2000 购自 Takara 公司, 脑心浸液培养基购自 BD Difco 公司, 幽门螺杆菌选择性添加剂购自 Oxoid 公司, 细菌 DNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, DNA 片段快速提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 其他试剂为国产分析纯。

**1.2 方法** *H. pylori* 染色体 DNA 的提取, 通过在 37℃ 下, 50 mL/L O $_2$ , 850 mL/L N $_2$ , 100 mL/L CO $_2$  气体环境下已培养 72 h 的 *H. pylori* 固体培养基上刮取生长良好的 *H. pylori* 菌落, 用细菌 DNA 抽提试剂盒制备. 具体操作按说明书指导进行. 质粒的提取及纯化使用质粒快速提取试剂盒制备. 具体操作按说明书指导进行. 目的基因的 PCR 扩增根据 GenBank 公布序列 NC\_000915 REGION: 684774. 685691 用 Prime Primer 5.0 设计引物, 由上海生工公司合成. 序列如下: oipA sense: 5' -CG GGATCC CCA TGA AAA AAA GCT CTC TTA CT-3'; oipA anti-sense: 5' -CG GAATTC TTA ATG TTT GTT TTT AAA GTT-3' *Eco*R I. 热启动法进行 PCR, 94℃ 变性 60 s, 52℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 70 s, 30 个循环后再 72℃ 延伸 10 min. 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果. DNA 片段的酶切、连接、转化和阳性克隆的鉴定详见参考文献[5]. 用质粒快速抽提试剂盒抽提经双酶切鉴定的重组克隆质粒, 送交上海生工公司测序. 基因片段同源性分析登陆 NCBI 使用 Blastn 2.2.10 在 nr 数据库中对 oipA 基因的同源性进行比对分析; 使用 Blastp 在 nr 数据库中对 oipA 编码氨基酸序列的同源性进行比对, 使用保

守序列数据库 (conserved domain database CDD) 寻找 oipA 编码氨基酸序列是否和已知保守序列相关. 编码蛋白理化特性应用序列分析软件包 Omega 2.0 分析 oipA 编码氨基酸序列. 编码蛋白结构预测应用蛋白质序列分析软件包 Antheptrot v5.0 采用 GORI, Gibrat, Homologue, DPM, Predator 共 5 种算法对 oipA 的二级结构进行预测分析. 登陆 Swiss-Model 自动蛋白同源建模数据库进行 3D 结构预测. 编码蛋白免疫表位分析应用序列分析软件包 Omega v2.0 和 Antheptrot v5.0 采用 Parker 算法对其潜在的免疫表位进行预测分析. 登陆 Propred (www.imtech.res.in/raghava/propred) 分析可能被 MHC II 所呈递的 oipA 肽段<sup>[6]</sup>.

## 2 结果

PCR 产物电泳分析后发现在 750-1 000 bp 间有一明显条带 (图 1), 大小与预计 oipA 基因相符. 重组质粒酶切后电泳鉴定结果 (图 2), 酶切片断大小和预期一致. oipA 基因片段序列分析结果与 GenBank 公布序列一致.

**2.1 基因片段同源性分析** 使用 Blastn 2.2.10 在目前 nr 数据库 2, 793, 175 条非冗余序列中分析, 得到 153 个期望值小于 10 的 oipA 基因同源序列, 但均为 *H. pylori* 不同菌种间的相关序列. 使用 Blastp 2.2.10 在目前 nr 数据库 2, 244, 936 条蛋白序列中分析, 得到 172 个期望值小于 10 的 oipA 同源蛋白, 但均为 *H. pylori* 不同菌种间的所属蛋白, 且主要为外膜蛋白和黏附蛋白. 使用 NCBI 保守序列搜索服务器 (CD-Search service v2.02) 在数据库 CDD v2.02-10897 PSSMs 和 Smart v4.0-663 PSSMs 中分析, 得到 oipA 编码氨基酸序列和目前已知的氨基酸保守序列无关联.

**2.2 oipA 编码蛋白的理化特性分析** 应用序列分析软件包 Omega 2.0 分析得到 oipA 的分子质量为 34.187 ku, 等电点为 10.118, 280 nm 紫外摩尔消光系数为 1.340 (1 mg/L), 在 pH 7.0 时所带电荷为 18.358. 应用 Antheptrot v5.0 对其疏水性进行分析 (图 3), oipA N' 末端 3-14 残基, 蛋白中部 117-144 残基以及 C' 末端 258-272 为 3 个较明显的疏水片段. oipA 中 128-140 残基为 Antheptrot 预测的跨膜区.

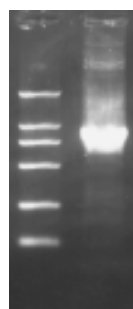


图 1 PCR 电泳结果.

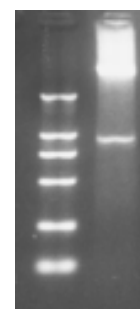


图 2 BamH I *Eco*R I 酶切鉴定结果.

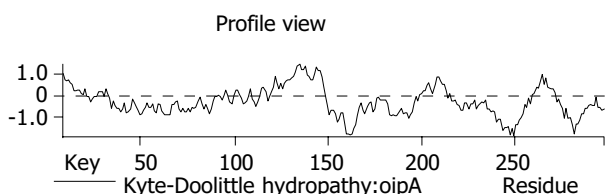


图3 oipA 疏水性示意图.

2.3 编码蛋白结构预测应用蛋白质序列分析软件包 Antheprot v5.0 采用 GOR1, Gibrat, Homologue, DPM, Predator 共 5 种算法对 oipA 的二级结构进行预测分析. 得到 oipA 可能存在 4 个较明显的  $\alpha$  螺旋片段, 他们大约位于 1-20 位残基, 40-90 位残基, 100-115 位残基和 157-196 位残基间. oipA 中没有明显的  $\beta$  折叠区, 4 个由较小  $\beta$  折叠串联构成的区域位于 20-40 位残基, 116-144 位残基, 197-218 位残基和 236-269 位残基间. 转角和无规则卷曲主要散布于 4 个  $\beta$  折叠区中. 总体上看 oipA 在靠近 N 末端一侧结构较为简单, 除在 20-40 位残基间存在部分  $\beta$  折叠和无规则卷曲外, 其他部分主要以  $\alpha$  螺旋为主, 而 oipA 的 C 末端一侧则有各种二级结构间或出现. 在使用 Swiss-Model 自动蛋白同源建模数据库进行 3D 结构预测时, 由于没有找到和 oipA 有较高同源性的已知 3D 结构的蛋白序列, 预测没能得以进行.

2.4 编码蛋白免疫表位分析应用 Antheprot v5.0 和 Omiga v2.0 预测后得到 7 个预测分值较高的区域 (图 4). 登陆 Propred 后将 oipA 序列和 51 个 HLA 等位基因序列进行分析后得到 107 个可能的 MHC II 呈递片段. 将 107 个表位与 Antheprot v5.0, Omiga v2.0 所分析的高免疫原性区域比对得到结果 (表 1).

表1 oipA 表位预测结果

Parker 算法	同 51 个等位 HLA 比对分析所得表位
13-56 aa	WLHAERNGF(2/51) LNFLEGSYI(2/51)
75-95 aa	No Peptides were predicted
150-166 aa	LLINWTNDK(14/51) WTNDKRASQ(7/51) YVERRVKGLS(5/51)
174-200 aa	FYKDMTGRT(4/51)
215-238 aa	FNQVKSRTI(4/51) VKSRTIFQL(1/51) FQLQGKFGV(12/51)
240-260 aa	YLGGSVEL(2/51)
272-301 aa	YKRWVSYYL(4/51) VYLNITYNF(4/51)

括号中表示和 51 个等位 HLA 序列比对分析可能有效的表位比例数.

### 3 讨论

自 1999 年 Yamaoka *et al*<sup>[7]</sup> 推测在分离的 *H pylori* 外膜蛋白中分子质量约为 3.4 ku 的条带很可能是和

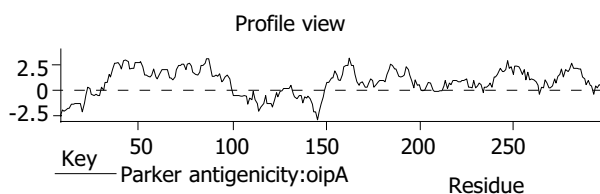


图4 oipA 抗原性示意图.

严重的嗜中性粒细胞浸润和高浓度 IL-8 密切相关的 oipA 以来, 又有进一步的临床统计和实验结果表明 oipA 可能引起宿主 T 细胞免疫偏移引发消化性溃疡. 但目前在国内外对 oipA 的研究还多集中于临床统计研究和体外实验, 关于 oipA 结构与功能以及免疫性评价的具体实验性结果还未见报道, 这可能和外膜蛋白 oipA 本身疏水性强, 等电点高, 不易表达和分离纯化有关. 使用数据库对 oipA 基因的同源性和保守性进行分析, 将有助于对其未知功能做进一步推测. 在使用 Blastn 对 oipA 基因进行分析后并未得到与其密切相关的其他种属基因, 这可能是因为 Blastn 以寻找较高分值匹配的策略, 对较远关系不太适用. 但是在使用 Blastp 应用取代矩阵策略寻找 oipA 较远关系时, 也未得到与其密切相关其他种属的蛋白. 应用 NCBI CDD 分析也没能得到 oipA 基因编码氨基酸序列和目前数据库中保守序列匹配. 这可能是因为以上数据库的信息相对物种的多样性与变化性还显得比较有限, 这也可能意味着 oipA 通过某种特殊的尚未知的信号传导方式引起了宿主的病变. 而这有待实验的进一步证明.

对蛋白基本理化特性, 2 级结构, 3D 结构以及抗原表位的分析与预测, 将有助于蛋白克隆表达, 分离纯化和功能区域的分析, 有效的辅助研究者对实验的设计和实验结果的分析. 由于 oipA 疏水性强, 等电点高等原因本实验室在调整各相关条件后亦未能实现 oipA 的表达. 目前在国内外报道中也还未见关于 oipA 全蛋白的表达. 但 oipA 是临床统计上和各种胃肠道疾病密切相关的因子, 很可能是抗 *H pylori* 的重要保护性抗原, 应用 Antheprot v5.0 和 Omiga v2.0 Parker 算法根据 oipA 基因编码氨基酸序列得到的分析结果和 Propred HLA 数据库通过 oipA 基因序列和 HLA 等位基因序列比对分析预测结果进行比较, 是对 oipA 免疫表位预测的一种较为有效的方法. 然而 *H pylori* 致病过程并非为单一因子所致, 有效地应用当前不断丰富的序列同源性分析, 结构功能预测, 表位分析, 信号通路分析等生物信息学技术将会在 *H pylori* 的诊断与治疗, *H pylori* 与相关致病发生机制研究, *H pylori* 疫苗的开发等领域发挥积极作用.

#### 4 参考文献

- 1 Lamarque D, Peek Jr RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):21-30
- 2 Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002;123:414-424
- 3 Yamaoka Y, Kudo T, Lu H, Casola A, Brasier AR, Graham DY. Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2004;6:1030-1043
- 4 Lamarque D, Tran Van Nhieu J, Breban M. What are the gastric modifications induced by acute and chronic *Helicobacter pylori* infection? *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27(3 Pt 2):391-400
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999:233-292
- 6 Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 2001;17:1236-1237
- 7 Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative factions of *Helicobacter pylori*: the low-molecular weight(33-35kDA)antigen. *Dig Dis Sci* 1998;43:1482-1487

编辑 潘伯荣 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

• 消息 •

## WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于2003-04-15开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

### 2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

### 3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. [yuemx@ns.cetin.net.cn](mailto:yuemx@ns.cetin.net.cn)

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

### 论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004 年 5 月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

### 4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

### 5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)