

幽门螺杆菌GGT基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

张尤历, 唐 炜, 王文兵, 陈慧娟, 周武松

■背景资料

*H. pylori*是一种革兰染色阴性的微需氧菌, 世界范围内约有50%的人群感染有*H. pylori*, 其感染是消化性溃疡的主要病因之一, 也是胃癌的主要危险因素。GGT是一种催化肽基转移作用的酶, 在*H. pylori*诱导的线粒体介导的程序性细胞死亡中, 主要是通过诱导线粒体释放细胞色素C进入细胞质和激活Caspase家族成员起作用。

张尤历, 唐炜, 陈慧娟, 江苏大学附属医院 江苏省镇江市 212001

王文兵, 江苏大学生命科学研究院 江苏省镇江市 212013

周武松, 安徽农业大学生命科学研究院 安徽省合肥市 230036

江苏省社会发展基金资助项目, No. BS2006041

作者贡献分布: 张尤历与唐炜对此文所作贡献均等; 此课题由张尤历与王文兵共同设计; 研究过程由张尤历、唐炜及周武松操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张尤历提供, 数据分析由唐炜、陈慧娟及周武松完成, 本论文写作由张尤历与唐炜完成。

通讯作者: 张尤历, 教授, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化内科。zjtangwei@163.com

电话: 0511-85011787

收稿日期: 2009-04-11 修回日期: 2009-05-15

接受日期: 2009-05-21 在线出版日期: 2009-06-18

Cloning of *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase gene and its expression in *E. coli*

You-Li Zhang, Wei Tang, Wen-Bing Wang,
Hui-Juan Chen, Wu-Song Zhou

You-Li Zhang, Wei Tang, Hui-Juan Chen, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Wen-Bing Wang, Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Wu-Song Zhou, Institute of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

Supported by: the Project from Social Development of Jiangsu Province, No. BS2006041

Correspondence to: Dr. You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjtangwei@163.com

Received: 2009-04-11 Revised: 2009-05-15

Accepted: 2009-05-21 Published online: 2009-06-18

Abstract

AIM: To clone and express *H. pylori* γ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli*.

METHODS: The strains of *H. pylori* were isolated from human gastric mucosa with gastric cancer. The GGT amplified by PCR from *H. pylori* DNA was cloned into apMD18-T vectors. The recombinant plasmids were confirmed by enzyme digestion and were sequenced. The prokaryotic expression vector pET-28a (+)-GGT was constructed and GGT gene was expressed in *E. coli* BL21 strain. The fusion protein was produced by

IPTG induction and analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

RESULTS: The GGT gene was obtained and its sequence was proved to be correct. The prokaryotic expression vector pET-28a (+)-GGT was constructed. The fusion protein with relative molecule mass of 68 kDa was highly expressed.

CONCLUSION: The GGT is successfully expressed in *E. coli*, which is of importance to research of the relationship between the GGT and mitochondria-mediated apoptosis.

Key Words: *Helicobacter pylori*; γ -Glutamyl transpeptidase; Clone; Prokaryotic expression

Zhang YL, Tang W, Wang WB, Chen HJ, Zhou WS. Cloning of *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase gene and its expression in *E. coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(17): 1768-1771

摘要

目的: 克隆幽门螺杆菌(*H. pylori*) γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)基因, 实现GGT基因在大肠杆菌中的表达。

方法: 从胃癌患者胃黏膜组织中分离培养获得*H. pylori*, 提取其基因组DNA, 对GGT基因进行PCR扩增, 克隆进pMD18-T载体, 酶切和测序验证, 构建原核表达载体 pET-28a(+)-GGT, 转化大肠杆菌BL21, 经IPTG诱导表达重组融合蛋白, SDS-PAGE及Western blot分析检测表达产物。

结果: 成功克隆了GGT基因, 经酶切和测序验证正确, 成功构建了pET-28a(+)-GGT质粒, 高效表达出了68 kDa的融合蛋白。

结论: 在大肠杆菌中成功表达了GGT重组融合蛋白, 为进一步研究GGT与线粒体介导的细胞凋亡之间的关系奠定了基础。

关键词: 幽门螺杆菌; γ -谷氨酰转肽酶; 克隆; 原核表达

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

张尤历, 唐炜, 王文兵, 陈慧娟, 周武松. 幽门螺杆菌GGT基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(17): 1768-1771
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1768.asp>

0 引言

自从1983年Warren和Mashall首次分离获得幽门螺杆菌(*H pylori*)以来, *H pylori*感染与慢性胃炎(chronic gastritis, CG)、胃溃疡(gastric ulcer, GU)、十二指肠溃疡(duodenal ulcer, DU)和胃癌(gastric cancer, GC)等疾病的关系逐步被认识^[1]. *H pylori* γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)在分泌和成熟后通过离子键与细胞膜结合, 将细菌和宿主细胞直接连接起来^[2]. GGT在*H pylori*诱导的线粒体介导的程序性细胞死亡中, 主要是通过诱导线粒体释放细胞色素C进入细胞质^[3]和激活Caspase家族成员^[4]起作用, 其可能是一个较好的抗肿瘤因子^[5]. 但程序性细胞死亡的持续发生, 破坏了新细胞生成和细胞消亡之间的平衡产生病理作用, 凋亡调节基因的转变和突变频繁的发生, 反而增加了胃癌发生的危险性^[6]. 有关GGT的生物学机制和在体内的效应还需要进一步研究. 为研究GGT蛋白在胃癌细胞中的表达, 进一步研究该蛋白的功能以及与线粒体之间的作用机制, 我们将从胃癌患者胃黏膜组织分离培养获得*H pylori*菌株, 提取其基因组DNA, 克隆GGT基因, 并对其原核表达进行研究.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*从本院内镜室活检标本(距幽门5 cm内)分离培养获得, 尿素酶试验阳性, 行常规病理检查明确为GC. 大肠埃希菌*E. coli* DH5 α 、BL21受体菌株和原核表达质粒pET-28a(+)质粒均由江苏大学生命科学院实验室提供. Kanamycin购自上海华舜公司; His单抗购自Sigma公司; 羊抗鼠IgG和荧光剂购自Pierce公司; *H pylori*基础培养基、微需氧环境发生袋、选择性抗生素及厌氧培养罐购自德国Merck公司; 改良布氏肉汤培养基由上海腹泻疾病控制中心提供; 无菌羊全血购自金坛欣迪公司; pMD18-T质粒、试验中所用的限制性内切酶和配套的缓冲液、T4 DNA ligase、Taq酶、dNTPs、DL2000标准分子质量核酸、 λ -HindIII标准分子质量核酸、质粒抽提试剂盒为TaKaRa公司产品; TRIzol购自Invitrogen公司; X-gal、IPTG为Gibco公司产品; 酵母提取物、蛋白胨为Oxoid公司产

品. 其他常规试剂为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*培养: 将活检新鲜组织用接种环均匀涂于固体琼脂培养基, 在微需氧环境, 37℃培养, 约96 h后收集细菌.

1.2.2 *H pylori*基因组DNA提取: 刮取菌落, 提取其基因组DNA, 保存于-20℃备用.

1.2.3 引物设计与合成: 根据GenBank中*H pylori* 26695标准株(GenBank登录号: NC_000915)的GGT全序列, 设计PCR引物: 上游引物P1: 5'-CCG GAA TTC ATG AGA CGG AGT TTT TTG AA-3'; 下游引物P2: 5'-CCG CTC GAG TTA AAA TTC TTT CCT TGG AT-3'. 在上游引物5'端加EcoR I酶切位点; 在下游引物5'端加Xho I酶切位点. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2.4 PCR扩增: 以获得的*H pylori*基因组DNA为模板, P1和P2为引物, 用LA-Taq聚合酶进行PCR扩增. 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 59℃ 45 s, 72℃ 3 min; 35个循环, 最后72℃延伸10 min. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.5 TA克隆及鉴定: 将PCR产物与pMD18-T载体连接, 转化DH5 α 感受态菌. 采取蓝白斑筛选试验筛选阳性克隆, 提取质粒, 用Xho I和EcoR I双酶切分析鉴定转化重组质粒. 阳性克隆的DNA序列由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.2.6 表达载体的构建及鉴定: 用Xho I和EcoR I酶切阳性质粒pMD18-T-GGT后, 回收GGT片段, 并将GGT片段与pET-28a(+)载体连接, 转化DH5 α 感受态菌, 接种于含卡那霉素的LB培养基中, 酶切鉴定重组质粒.

1.2.7 诱导表达: 选取构建正确的重组质粒, 转化BL21感受态菌, 挑取单菌落过夜培养后取1/10体积接种于含卡那霉素的LB培养基中, 振荡至吸光度值(A_{600})为0.6-1.0后, 加入IPTG至终浓度为1 mmol/L, 28℃继续振荡2-6 h诱导表达目的蛋白.

1.2.8 分析检测表达产物: 分别取诱导表达2、4、6 h的菌液1 mL, 离心后收集菌体, 进行SDS-PAGE凝胶电泳分析及Western blot检测.

2 结果

2.1 目的基因片段的扩增及序列分析 PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见1条清晰、单一、大小约1700 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合, 序列测定正确.

2.2 GGT基因的表达 经诱导后, 在约68 kDa处有

■ 研发前沿

*H pylori*被发现以来, 其感染与消化系统疾病密切相关, 其致病机制一直是研究的焦点, 尤其是与胃癌的相关性. GGT已经被证实与细胞凋亡途径有关, 但是其具体作用机制还有待进一步研究.

■相关报道

Kim *et al* 已经证实 GGT 参与 *H pylori* 诱导的线粒体介导的程序性细胞死亡。GGT 作用时间越长, Caspase-3 和 Caspase-9 的活性越大, Bax 的活性上调而抗凋亡的 Bcl-2 和 Bcl-xL 的活性下调。凋亡信号引起线粒体的改变, 细胞色素 C 释放进入细胞质中。相反, GGT 缺陷的突变体不能诱导凋亡。这些结果显示 *H pylori* GGT 通过线粒体介导的通路诱导细胞凋亡。

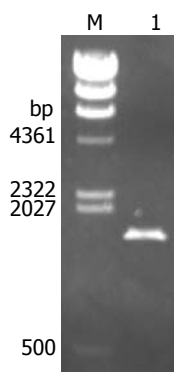


图 1 GGT 基因 PCR 产物。M: DNA 标准(λ -Hind III); 1: GGT 基因全长 PCR 产物。

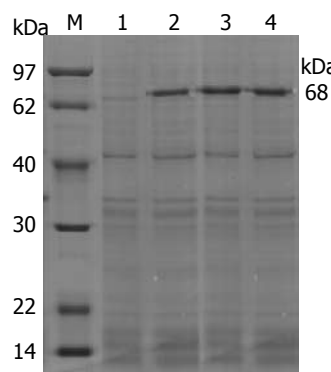


图 2 SDS-PAGE 分析表达产物。M: 蛋白标准; 1: pET-28a(+)(阴性对照); 2-4: 分别为诱导 2 h, 4 h 和 6 h。

特异蛋白条带(图2), 其大小与理论推算的融合蛋白相对分子质量相符合。

2.3 Western blot 分析 为了进一步验证表达产物, 采用 Western blot 进行检测, 结果在约 68 kDa 处有明显示带(图3), 与 SDS-PAGE 的结果一致, 说明插入的 GGT 基因已经成功在大肠杆菌中表达。

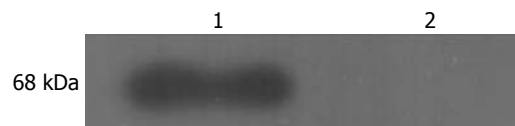


图 3 Western blot 分析表达产物。1: pET-28a(+)-GGT; 2: pET-28a(+).

3 讨论

GGT 广泛存在于原核和真核细胞中^[7], 在动物体内主要存在于肾、肝、胰等脏器, 在谷胱甘肽的新陈代谢中起到了重要的作用^[8]。GGT 是谷氨酰循环中的关键酶, 可特异性催化 γ -谷氨酰基的转移反应, *H pylori* GGT 被发现也具有相似的特点, 但是 *H pylori* GGT 的成熟过程仍然不十分清楚。

与其他病原体相比, *H pylori* 的感染是终生的, 目前持续感染的原因还不清楚。有研究表明, CD4⁺ T 细胞对于 *H pylori* 的清除有作用, 但是 GGT 作为一个新发现的免疫抑制剂通过诱导细胞周期停滞在 G₁ 时相抑制了 T 细胞的增殖, 对 *H pylori* 的定植有一定的作用^[9]。

正常胃黏膜的结构功能依赖于黏膜上皮细胞增殖和凋亡之间的动态平衡, *H pylori* 感染能够引起细胞增生与凋亡之间的平衡失调, 从而导致病变的发生, 增加胃癌发生的风险。目前, 已经对 *H pylori* 的凋亡诱导因素做了一些研究^[10-12]。有报道 GGT 具有诱导细胞凋亡的活性, 目前被广泛接受的观点是线粒体在凋亡的调节中起到了关键的作用^[13]。细胞凋亡的线粒体通路由含 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员 Bid、Bad、Bim、Harikari、Noxa 等在接收到胞内的死亡信号后激活。这些含 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员与另外的 Bcl-2 家族成员(Bax 亚家族成员 Bax、Bak 等, 主要松散的结合在线粒体外膜面或存在于胞质)作用, 导致后者的寡聚并插入线粒体膜, 引起线粒体膜通透性改变, 跨膜电位丢失, 释放细胞色素 C 和其他蛋白。细胞色素 C 的释放是线

粒体凋亡路径的主要步骤^[14]。在 ATP/dATP 存在的情况下, 细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease-activating factor, Apaf-1) 形成多聚复合体, 通过 Apaf-1 氨基端的 Caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 募集胞质中的 Caspase-9 前体, 并使其自我剪切活化并启动 Caspase 级联反应, 激活下游的 Caspase-3 和 Caspase-7^[15], 完成其相应底物的剪切, 引起细胞凋亡。GGT 在胃癌细胞中能够诱导线粒体释放细胞色素 C 进入细胞质, 激活 Caspase-9 和 Caspase-3, 引起 Bax 的上调以及 Bcl-2 和 Bcl-xL 的下调^[16], 引起凋亡级联反应, 最终导致程序性细胞死亡。诱导的细胞凋亡在致胃癌过程中可能起到了重要作用^[17]。相反, GGT 缺陷的突变体不能诱导细胞凋亡。这些结果显示 *H pylori* GGT 参与了线粒体介导的程序性细胞死亡。

为了进一步弄清 *H pylori* GGT 在线粒体介导的细胞凋亡中的作用及临床上如何根治 *H pylori*。我们成功克隆了来源于胃癌菌株的 *H pylori* GGT 基因, 利用大肠杆菌高密度生长的优势和易于表达蛋白、纯化简单等特点, 进行了 *H pylori* GGT 基因在原核系统的表达, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。

4 参考文献

- 1 Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 299-305
- 2 Shibayama K, Doi Y, Shibata N, Yagi T, Nada T,

- linuma Y, Arakawa Y. Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions. *Infect Immun* 2001; 69: 3181-3189
- 3 Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 639-647
- 4 Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157: 729-735
- 5 Kim KM, Lee SG, Park MG, Song JY, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH, Youn HS, Baik SC. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 562-567
- 6 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 16-26
- 7 Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, Thompson SA, Manning G, Newell DG. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* 2007; 43: 198-207
- 8 Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol* 2005; 401: 468-483
- 9 Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Voland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007; 132: 1820-1833
- 10 Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 2001; 69: 5080-5087
- 11 Le'Negrate G, Ricci V, Hofman V, Mograbi B, Hofman P, Rossi B. Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the *cag* pathogenicity island phenotype. *Infect Immun* 2001; 69: 5001-5009
- 12 Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 231-238
- 13 Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004; 149: 19-23
- 14 Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39: 615-647
- 15 Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 2000; 129: 346-358
- 16 Choi IJ, Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway on apoptosis and bcl-2 expression in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells. *Infect Immun* 2003; 71: 830-837
- 17 Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, linuma Y, Arakawa Y. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2003; 47: 443-451

■同行评价

本研究方法正确, 结果可靠, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1) 题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2) 作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3) 单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4) 基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5) 通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6) 收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-18)