

幽门螺杆菌 PPK 的纯化与功能分析 *

杨诏旭 夏 宁 金 成 窦科峰

(第四军医大学西京医院普通外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 表达纯化幽门螺杆菌多聚磷酸激酶,并测定其功能。方法 将幽门螺杆菌多聚磷酸激酶基因克隆入原核表达载体 PQE 80L 中,在大肠杆菌(E.coli) DH5- α 中表达。用 BD Talon resin 纯化目的蛋白。并在体外测定其合成多聚磷酸盐及转化多聚磷酸盐至 ATP 的能力。结果 成功构建了原核表达载体,得到高表达量的融合蛋白。经 BD Talon resin 纯化获得较高纯度的 His- 多聚磷酸激酶 N 端融合蛋白。体外实验证实该酶可以有效合成不同链长的多聚磷酸盐,并且在适当条件下可将多聚磷酸盐转化为 ATP。结论 利用原核表达载体可很好表达幽门螺杆菌多聚磷酸激酶,纯化后的蛋白具有良好生物活性,是一个具备合成多聚磷酸盐及转化其为 ATP 的双向功能的酶。

关键词 幽门螺杆菌;多聚磷酸激酶;多聚磷酸盐

中图分类号 R573.3, R37 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)06-1017-04

The Purification and Function Analysis of Helicobacter Pylori Polyphosphate Kinase*

YANG Zhao-xu, XIA Ning, JIN Cheng, DOU Ke-feng

(Xijing hospital of the fourth military university, Xi'an, Shanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To express and purify the polyphosphate kinase of Helicobacter pylori and analyze its function in vitro.

Methods: The polyphosphate kinase gene of Helicobacter pylori were inserted into prokaryotic expression vector PQE 80L. The expression of the gene was induced in E.coli DH5- α . Then the 6-His fused protein was purified by using BD Talon resin. The activity of synthesizing polyphosphate and transferring polyphosphate to ATP of PPK were detected. **Results:** The expression of PPK was constructed and His-fused PPK was induced. The N-His fused protein was purified by BD Talon resin. This protein can synthesize Polyphosphate of different length or transfer polyphosphate to ATP under certain condition. **Conclusions:** PPK had good expression in prokaryotic expression vector PQE 80L and the protein showed biological activity of synthesizing polyphosphate and transferring polyphosphate to ATP.

Key Words: Helicobacter pylori; Polyphosphate kinase; Polyphosphate

Chinese Library Classification(CLC): 573.3, R37 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)06-1017-04

前言

幽门螺杆菌是一种微需氧的、螺旋形、革兰氏阴性杆菌。世界上大约一半以上的人口存在幽门螺杆菌感染,其可终生在宿主体内存活,并可引起慢性胃炎,其中约 10% 的病人可发展为消化性溃疡^[1,2]。而且,幽门螺杆菌感染的病人其胃癌发生率明显高于无幽门螺杆菌感染者^[3]。研究发现多聚磷酸(Polyphosphate)在幽门螺杆菌内的积聚与幽门螺杆菌的侵袭致病性密切相关^[4,5],并可能与胃癌的发生相关^[6]。特定条件下,幽门螺杆菌内可聚集 Polyphosphate,并通过与转录因子 Sigma 80 相结合,调节幽门螺杆菌的基因表达^[7],可能是导致幽门螺杆菌致病性的一个关键因素。多聚磷酸激酶(Polyphosphate kinase, PPK)是幽门螺杆菌合成 Polyphosphate 的酶,但目前国内外并无将幽门螺杆菌内的 PPK 纯化并进行功能测定的报道。本研究旨在纯化幽门螺杆菌 PPK,并进行体外功能分析,为进一步研究

Polyphosphate 与幽门螺杆菌致胃癌的关系提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌(E.coli) DH-5 α 及幽门螺杆菌 G27 菌种为本室保存。pQE-80L 原核表达载体购自 Qiagen 公司。

1.1.2 主要仪器和试剂 荧光测定仪(Promega)。French press 细胞破碎仪(Thermo Spectronic)。BD Talon resin (BD Bioscience)。PolyP66 (平均链长为 66 的 Polyphosphate, Sigma)。ATP Luminescent Assay (Promega)。限制性内切酶 BamHI 和 PSTI(NEB 公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建 pQE-80L-PPK 原核表达载体 提取幽门螺杆菌 G27 基因组 DNA,作为 PCR 模板。引物设计为 NF 5'-CG GGATCCTTGAATCGTTTCTTTAACCGAG-3', NR :5'-CAACT

* 基金项目 国家自然科学基金项目(81000164)

作者简介 杨诏旭(1976-)主治医师,讲师。主要研究方向:胃癌、肝癌的发病机制及预防,

Tel: 029-84775260, E-mail yangzx@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-08-18 接受日期:2011-09-13)

GCAG AAAGGGTTTAAAGGGCTTGTT-3'(上游和下游引物分别加入 *Bam*HI 和 *PST*I 酶切位点)。进行 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳确定目的基因大小正确,而后纯化 PCR 产物。用 *Bam*HI 和 *PST*I 双酶切 PCR 产物及 pQE-80L 质粒,酶切产物再次凝胶电泳分离回收纯化后,将 PCR 产物与 pQE-80L 载体连接。转染 DH-5 α 感受菌,以含 100 μ g.ml⁻¹ AMP 的 LB 平板筛选单克隆菌。提取质粒测序证实无突变及读框正确,得到表达质粒 pQE-80L-PPK。

1.2.2 6-His 融合蛋白的表达纯化 接种含质粒 pQE-80L-PPK 的 DH-5 α 菌至含 100 μ g.ml⁻¹ AMP 的 LB 培养基中,37 °C 扩增培养,摇床摇至 OD 值约 0.6 时,加入 IPTG(isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside) 至终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹,32 °C 诱导 16 h 后,收集的菌体裂解后经 SDS-PAGE 电泳证实获得目的蛋白表达。随后大量扩增含质粒 pQE-80L-PPK 的 DH-5 α 菌,同样诱导后,收集的细菌用 Buffer A (50 mmol·L⁻¹ Tris-cl PH=7.5, 0.5 mmol·L⁻¹ PMSF) 重悬,使用 French press 细胞破碎仪裂菌。细菌裂解液加入 1 mmol·L⁻¹ KCl 和 0.1 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 4 °C 下搅拌 2 h。高速离心后取上清液,加入经预平衡的 BD Talon resin 中,洗涤去除非特异性结合蛋白后,以洗脱液洗脱 6-His 融合的 PPK 蛋白。分段收集洗脱液,以 SDS-PAGE 找到富含目的蛋白的洗脱液。以含 15%甘油的蛋白保存液透析蛋白洗脱液。

1.2.3 PPK 合成 Polyphosphate 的活性测定 在 0.7 ml 的反应体系内(包含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4, 40 mmol·L⁻¹ ammonium sulfate, 4 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 40 mmol·L⁻¹ creatine phosphate, 20 ng·L⁻¹ creatine kinase, 2 mol·L⁻¹ ATP: pH 7.2, 1% BSA) 加入 50 ng 纯化的 PPK 蛋白。在 37 °C 孵育 30 min。用酚氯仿纯化合成的 Polyphosphate。以 6% UREA-PAGE 鉴定,以 toluidine blue 染色。对照组设两组,一组加入 50 ng *E.Coli* 的 PPK, 另一组只加入不含 PPK 的蛋白保存液。

1.2.4 PPK 转化 Polyphosphate 至 ATP 的活性测定 在 0.1 ml 的反应体系内(包含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH7.4, 40 mmol·L⁻¹ ammonium sulfate, 4 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 20 μ mol·L⁻¹ ADP) 加入 50 ng PolyP66 及 5 ng PPK, 在 37 °C 孵育 30 min。加热至 90 °C 2 min 灭活 PPK。反应产物在 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)-4 mmol·L⁻¹ EDTA 溶液内稀释 100 倍。取上述 100 μ l 反应液与 100 μ l ATP Luminescent Assay 试剂混合,孵育 8min,在荧光测定仪读取相对荧光值。同时设空白对照组及对照组(反应体系内只加入 50 ng PolyP66 及不含 PPK 的蛋白保存液)。每组设 3 次重复。

2 结果

2.1 pQE-80L-PPK 原核表达载体的构建及蛋白表达

经 PCR 获得 2Kb 的 PPK 目的基因。连接入载体 pQE-80L 后,重组质粒 pQE-80L-PPK 的插入序列经测序,证实与 GenBank 的相应序列完全符合,且读框正确。重组质粒转化表达菌株 *E.coli* DH-5 α 后,含重组质粒 pQE-80L-PPK 的表达菌总蛋白经 12%SDS-PAGE 结果显示:IPTG 诱导 16h 后,菌体总蛋白电泳条带在融合蛋白相应位置(约 77 kDa)出现浓染带,而未诱

导菌蛋白条带在相应位置无明显浓染(图 1)。

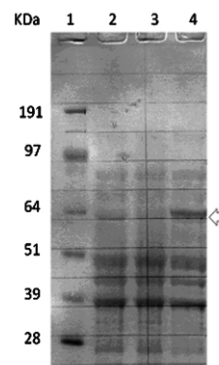


图 1 His 融合 PPK 蛋白的表达 1: 蛋白分子质量标准 2: 含 pQE-80L 空载体的 *E.coli* DH-5 α 经 0.5 mmol.L⁻¹ IPTG 诱导 3: 含 pQE-80L-PPK 的 *E.coli* DH-5 α 未经诱导 4: 含 pQE-80L-PPK 的 *E.coli* DH-5 α 经 0.5 mmol.L⁻¹ IPTG 诱导。

Fig.1 The expression of His fused PPK

1: Protein molecular weight marker ; 2: *E.coli* DH-5 α containing pQE-80L with 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG induction ; 3: *E.coli* DH-5 α containing pQE-80L-PPK without induction ; 4: *E.coli* DH-5 α containing pQE-80L-PPK with 0.5 mmol.L⁻¹ IPTG induction.

2.2 蛋白质纯化

细菌经裂解后,经 SDS-PAGE 证实 PPK 蛋白位于上清液,为可溶性蛋白。该 His 融合蛋白可与 BD Talon resin 很好的结合。经纯化洗脱后,洗脱液内含大量纯度较高的幽门螺杆菌 His-PPK 蛋白(图 2)。

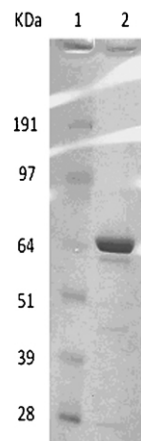


图 2 His 融合 PPK 蛋白的纯化 :1: 蛋白分子质量标准 ;2: 纯化后的 His 融合的幽门螺杆菌 PPK 蛋白

Fig.2 The purification of His fused PPK

1: Protein molecular weight marker ; 2: Purified His fused PPK of helicobacter pylori.

2.3 幽门螺杆菌 PPK 蛋白合成 Polyphosphate 的活性

在合成 Polyphosphate 的反应体系内,加入我们纯化的幽门螺杆菌 PPK 蛋白:产生的反应产物纯化后,以 6% UREA-PAGE 鉴定,toluidine blue 染色后,可见合成了具有不同链长 Polyphosphate,其分子量范围类似于直接从幽门螺杆菌活菌内提取的 Polyphosphate。而加入 *E.coli* PPK 的对照组,合成的 Polyphosphate 链长范围却仅在 750 左右。未加入 PPK 的对照组,未见 Polyphosphate 的合成(图 3)。



图3 幽门螺杆菌 PPK 合成 Polyphosphate 的活性 1: 纯化的幽门螺杆菌 PPK 合成的 Polyphosphate 2 将标本 1 稀释 5 倍 3: *E.coli* PPK 合成的 Polyphosphate; 4: 直接从幽门螺杆菌内提取的 Polyphosphate; 5 未加入 PPK 的对照组

Fig.3 The activity of *H.pylori* PPK in synthesizing Polyphosphate.

1: Polyphosphate synthesized by purified PPK of *Helicobacter pylori*; 2: Sample 1 with 5 fold dilution; 3: Polyphosphate synthesized by PPK of *E.coli*; 4: Polyphosphate extracted from *Helicobacter pylori*; 5: Control: Reaction without PPK

2.4 PPK 转化 Polyphosphate 至 ATP 的活性

在转化 ATP 的反应体系内, 加入我们纯化的幽门螺杆菌 PPK 蛋白: 产生的反应产物与 ATP Luminescent Assay 试剂混合后, 在荧光测定仪读取高荧光值, 证明大量 Polyphosphate 被转化为 ATP。而未加 PPK 蛋白的对照组的荧光值则与空白对照接近, 显示并无 Polyphosphate 被转化为 ATP (图 4)。

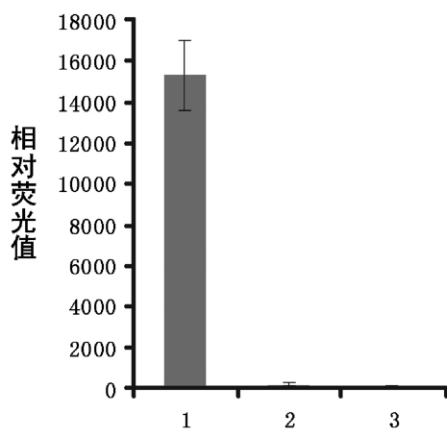


图4 幽门螺杆菌 PPK 转化 Polyphosphate 至 ATP 的活性 1: 反应体系中加入幽门螺杆菌 PPK 测定的相对荧光值 2 反应体系中只加入蛋白保存液 测定的相对荧光值 3 空白对照。所有数值为三次平均值。

Fig.4 The activity of *H.pylori* PPK in transferring Polyphosphate to ATP 1: Relative luminescence unit of the reaction system with *Helicobacter pylori* PPK 2: Relative luminescence unit of the reaction system with protein buffer only; 3: Blank. Number was the average of three repeat experiments.

3 讨论

幽门螺杆菌是引起胃溃疡乃至胃癌的重要病原体。1994 年, 世界卫生组织将幽门螺杆菌定义为一类致癌病原体^[8], 这也

是目前发现的第一个可以致癌的细菌。此外, 幽门螺杆菌与特发性血小板减少性紫癜^[9]、肝性脑病^[10]等胃外疾病的也有密切联系。在我国, 幽门螺杆菌感染非常常见。因此, 正确的治疗与预防幽门螺杆菌, 是公共医疗卫生的迫切需要。

但目前对幽门螺杆菌的治疗尚存在争议, 主要是因为幽门螺杆菌的感染虽然普遍, 但是却仅有小部分感染者会发生胃溃疡等疾病, 因此一些学者反对不加选择的清除体内的幽门螺杆菌。事实上, 近年来, 随着发达国家中幽门螺杆菌感染的下降, 胃酸反流性疾病及食管癌的发生率却随之上升^[11-13], 其他如哮喘等过敏性疾病^[14]、肥胖和其他细菌感染导致的腹泻的发生率也有所提高。因此, 有学者争议幽门螺杆菌在某些情况下可能是人体的有益菌^[15]。综合来看, 幽门螺杆菌的致病是一个复杂的过程, 其可能受多种因素的影响, 而对人体产生有害或有益的作用^[16]。我们要正确的治疗与预防幽门螺杆菌的相关疾病, 就要进一步理解幽门螺杆菌致病机制, 具体说就应该研究菌体在何种的条件下, 启动何种转录机制, 造成致病基因的持续高表达, 从而引发胃溃疡或胃癌。

之前的研究发现, 幽门螺杆菌在特定条件下可出现 Polyphosphate 的积聚。而积聚的 Polyphosphate 可以修饰幽门螺杆菌主要转录因子 Sigma80, 进而影响转录^[7], 这一机制可能与幽门螺杆菌的致病性有关。PPK 则是合成 Polyphosphate 的关键酶, 而且已有研究证实它与幽门螺杆菌的致病侵袭性密切相关^[4,5]。因此 PPK 可能是引起幽门螺杆菌致胃溃疡、胃癌的重要酶。但目前并无对该蛋白进行表达纯化的报道, 从而缺乏直接研究该酶功能的基础。因此纯化该蛋白并对其体外功能测定, 可以为进一步研究 PPK 及 Polyphosphate 与胃癌的关系奠定基础。

本实验采用原核表达载体 pQE-80L 来表达目的蛋白, 产生的蛋白在其 N 端融合了 6 个 His Tag。由于只有 6 个氨基酸, 理论上对幽门螺杆菌 PPK 蛋白的空间结构影响小, 使获得的蛋白构象接近天然的蛋白, 从而在分子学基础上保证其生物学活性。而目前对 His 标签蛋白的纯化技术比较成熟, 这样为进一步纯化创造了条件。

结果显示, 本研究成功的表达纯化了幽门螺杆菌 PPK。通过体外实验, 直接证明该酶具有合成 Polyphosphate 及转化 Polyphosphate 至 ATP 的双向功能。而这两个不同功能的发挥, 取决于反应体系内 ATP 及 ADP 的浓度, 即当 ATP 浓度高时, 则表现合成 Polyphosphate 的活性, 当反应体系内 ADP 浓度高时, 则表现转化 Polyphosphate 至 ATP 的活性。而将该酶合成的 Polyphosphate 进行 Urea-PAGE 分析后发现, 它是由具有不同链长的 Polyphosphate 组成的混合物。这使之区别于 *E.Coli* 的 PPK, 后者在体外只能合成约 750 链长的 Polyphosphate^[17]。由于在特定条件下, Polyphosphate 可在幽门螺杆菌内积聚, 我们将这些积聚的 Polyphosphate 直接从幽门螺杆菌中提取出来, 通过 Urea-PAGE 分析对比, 发现其链长范围与我们体外合成 Polyphosphate 非常接近。

总之, 我们纯化了具有良好生物活性的幽门螺杆菌 PPK, 可成为进一步研究 PPK 及 Polyphosphate 与胃溃疡、胃癌的关系的基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Dorer MS, Talarico S, Salama NR. Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease [J]. PLoS Pathog, 2009, 5 (: e100054410) :1-6
 - [2] Zhou YN, Coleman WG Jr, Yang ZX. Regulation of cell growth during serum starvation and bacterial survival in macrophages by the bi-functional enzyme SpoT in Helicobacter pylori [J]. J Bacteriol, 2008, 190(24): 8025-8032
 - [3] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer [J]. New Engl. J. Med, 2001, 345: 784-789
 - [4] Ayraud S, Janvier B, Salaun L, et al. Polyphosphate kinase: a new colonization factor of helicobacter pylori [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1): 45-50
 - [5] Ayraud S, Janvier B, Salaun L, et al. Modification in the ppk gene of helicobacter pylori during single and multiple experimental murine infections [J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 1733-9.1: 77-85
 - [6] Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. Helicobacter pylori attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3): 1259-1264
 - [7] Yang ZX, Zhou YN, Yang Y, et al. Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in Helicobacter pylori [J]. Mol Microbiol, 2010, 77(3): 618-627
 - [8] Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastric Cancer, 2009, 12(2): 79-87
 - [9] Stasi R, Provan D. Helicobacter pylori and Chronic ITP. Hematology [J] Am Soc Hematol Educ Program, 2008, 206-211
 - [10] Chen SJ, Wang LJ, Zhu Q, et al. Effect of H pylori infection and its eradication on hyperammonemia and hepatic encephalopathy in cirrhotic patients [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(12): 1914-1918
 - [11] Blaser MJ. An endangered species in the stomach. Sci American [J]. 2005, 292(2): 38-45
 - [12] Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori in health and disease [J]. Gastroenterology, 2009, 136 (6): 1863-1873
 - [13] Ghoshal UC, Chourasia D. Gastroesophageal Reflux Disease and Helicobacter pylori: What May Be the Relationship [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2010, 16(3): 243-250
 - [14] Amedei A, Codolo G, Del Prete G, et al. The effect of Helicobacter pylori on asthma and allergy [J]. J Asthma Allergy, 2010, 29; 3: 139-147
 - [15] Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (9): 2475-2487
 - [16] Proenca-Modena JL, Acrani GO, Brocchi M. Helicobacter pylori: phenotypes, genotypes and virulence genes [J]. Future Microbiol, 2009, 4(2): 223-240
 - [17] Ault-Riche D, Fraley CD, Tzeng CM, et al. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1998, 180 (7): 1841-1847
-
- (上接第 1008 页)
- [10] Tsuda M, Shigemoto MY, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury [J]. Nature, 2003, 424, 778-783
 - [11] Qin M, Rao ZR, Wang JJ, et al. Effects of response of medullary astrocytes and neurons to visceral pain stimulation rats by carbenoxolone [J]. Progress in modern biomedicine, 2010, 10(18): 3410-3413
 - [12] Deck JH, Eng LF, Bigbee J, et al. The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors [J]. Acta Neuropathol, 1978, 42: 183-190
 - [13] Sun YN, Lou JY, Rao ZR, et al. GFAP and Fos immunoreactivity in lumbo-sacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11 (31): 4827-4832
 - [14] Qin M, Wang JJ, Cao R, et al. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat [J]. Neuroscience Research, 2006, 55(44) :442-450
 - [15] Duan L, Yuan H, Su CJ, et al. Ultrastructure of junction areas between neurons and astrocytes in rat suprapontic nuclei [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(1): 117-121