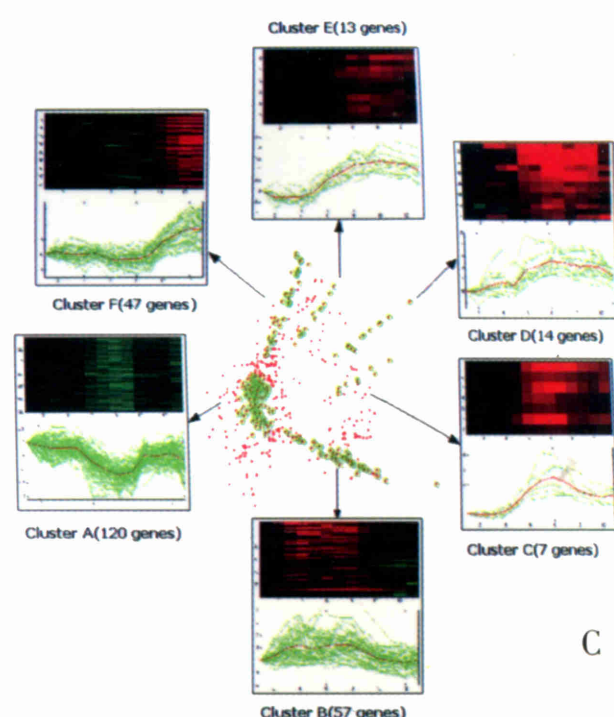


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (Volume 11 Number 10)



10/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

| ● 目 次 ● | | 2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (总第 114 期) |
|---------|--|---|
| 述 评 | 1465 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法 李梢, 张学工, 季梁, 李衍达 | |
| 幽门螺杆菌 | 1470 幽门螺杆菌黏附素基因 babA ₂ 的克隆、序列测定及其生物信息学分析 白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历 1475 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达 郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超 1480 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆、表达及抗原性研究 姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1485 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础 郝庆, 李岩, 高红, 张显忠 | |
| 基础研究 | 1488 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平 1492 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较 王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国 1497 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用 张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱 1500 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰 1505 急性胰腺炎大鼠肝脏 NF-κB 对 ICAM-1 表达的调控及其意义 石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨 1508 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响 李曦, 罗和生, 李凡 1511 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点 谢正勇, 卿三华 1515 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1520 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1524 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1/Th2 类细胞因子 m-RNA 的表达 崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升 | |
| 临床研究 | 1528 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难 26 例 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平 1531 胃癌组织 CD ₄₄ v9 和 MMP-2 基因的表达 张翠萍, 田宇彬, 赵清喜, 武军, 梁永信 1535 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙 1540 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用 唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平 1544 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化 邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林 1547 ERCP 对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值 李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴 1550 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性 王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平 1554 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达 杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国 1558 国人胆囊结石的形态结构特征 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚 1563 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性 赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁 | |
| 科研方法 | 1566 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案 岳茂兴 | |
| 文献综述 | 1569 门脉高压性肠病 尹朝晖, 刘浔阳 1572 肝纤维化治疗研究进展 叶方鹏, 肖冰, 张万岱 1576 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展 方驰华, 朱新勇 1581 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制 冒海蕾, 黄介飞 1588 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用 方驰华, 马俊勋, 钟世镇 1593 p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展 张艳, 何凤田 1597 血管抑素的研究进展 陈建发, 黄宗海 1601 TGF β-Smad 信号转导通路与肝纤维化 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙 1606 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展 李均, 汪维伟 1609 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用 蒋业贵, 李兆申 | |

| | |
|------|---|
| 文献综述 | 1614 Wilson病的诊断和治疗 林连捷, 郑长青 1618 E- 钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系 吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟 1621 胰腺癌的光动力学治疗 丁新民, 顾瑛, 刘凡光 1624 Ets 转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展 张健, 高福禄, 刘芝华 1628 核因子-κB 与细胞凋亡关系的研究进展 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚 |
| 研究快报 | 1632 paxillin 在胃腺癌中的表达及临床意义 田素芳, 熊永炎, 余少平, 汪必成 1634 丹参对 TGF-β1 刺激的 NIH/3T3 细胞 <i>c-fos</i> mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响 胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平 1636 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 郝悦, 周新民 1638 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义 鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖 1640 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达 尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平 1642 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca ²⁺ 的抑制作用 台卫平, 罗和生 1645 DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇 1646 Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用 尚海, 张颐, 单吉贤 1649 CO ₂ 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1652 CO ₂ 气腹对大鼠胃肠肌电作用的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1654 CO ₂ 气腹对胃黏膜血管活性肠肽及 P 物质含量的影响 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 |
| 临床经验 | 1656 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策 岳茂兴 1657 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎性反应综合征的临床研究 姜玉峰, 岳茂兴 1659 TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析 诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢 |
| 消 息 | 1504 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 1568 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1571 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1580 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1613 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1655 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 |
| 封面故事 | 1553 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室 |

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-10-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

| | | | | |
|----------------|--------|--------|------------------------|---------------|
| ISSN 1009-3079 | 邮发代号 | 国外代号 | 国内定价 | 广告经营许可证 |
| CN 14-1260/R | 82-262 | M 4481 | 每期 24.00 元 全年 288.00 元 | 1401004000050 |

www.wjgnet.com

幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTb 基因融合及表达

郭 红, 邹全明, 赵晓晏, 吴 超

郭红, 赵晓晏, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科
重庆市 400037
邹全明, 吴超, 中国人民解放军第三军医大学检验系临床微生物教研室
重庆市 400037
郭红, 女, 1971-11-22 生, 湖南省湘潭市人, 汉族. 1995 年重庆医科大学临
床医学本科毕业, 学士, 2001 年第三军医大学消化内科专业硕士毕业, 主治
医师, 讲师, 目前主要从事幽门螺杆菌研究.
国家“九五”重点科技攻关课题, No.96-901-01-54
全军“九五”医药卫生科研基金资助项目
项目负责人: 邹全明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学检验
系临床微生物教研室. zouquanming@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-68752316 传真: 023-68755604
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2003-06-10

Construction and expression of the fusion gene of *H pylori* HspA subunit and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit

Hong Guo, Quan-Ming Zou, Xiao-Yan Zhao, Chao Wu

Hong Guo, Xiao-Yan Zhao, Department of Gastroenterology, Xinqiao
Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China
Quan-Ming Zou, Chao Wu, Department of Clinical Microbiology, Third
Military Medical University, Chongqing 400037, China
Supported by the State Key Science and Technology Brainstorm Project
of 9th Five-year Plan, No. 96-901-01-54
Correspondence to: Quan-Ming Zou, Department of Clinical Microbiology,
Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. zouquan
ming@mail.tmmu.com.cn
Received: 2003-05-18 Accepted: 2003-06-06

Abstract

AIM: To construct and express the fusion gene of *H pylori* heat shock protein A subunit (HspA) and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTb), and analyse the biologic and immunologic characteristics of the fusion protein.

METHODS: HspA gene was amplified from *H pylori* chromosome by PCR. The gene was cloned into plasmid pPLtB and the fusion gene of *H pylori* urease B subunit (HspA) and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTb) was constructed, and then LTb-HspA recombinant protein was expressed in *E.coli* JM109.

RESULTS: LtB-HspA fusion gene was found to be 684 base pairs and encode the recombinant fusion protein, which was composed of 228 amino acid residues. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the recombinant fusion protein had a molecular weight of 25kD and a positive reaction with the serum from *H pylori*-infected patients. ELISA analysis showed that LTb protein existed in the fusion protein. At the same time, fusion protein kept the character of binding with LTb receptor-ganglioside GM₁.

CONCLUSION: LTb-HspA recombinant protein may be used

for research of genetically engineered *H pylori* vaccine.

Guo H, Zou QM, Zhao XY, Wu C. Construction and expression of the fusion gene of *H pylori* HspA subunit and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1475-1479

摘要

目的: 构建和表达人幽门螺杆菌(*H pylori*)热休克蛋白 A 亚单位(HspA)与 *E. coli* 不耐热肠毒素 B 亚单位(LTb)的重组融合蛋白, 并对其基本的生物学及免疫学特性进行研究.

方法: 采用 PCR 技术从人 *H pylori* 染色体 DNA 中扩增出 354 bp 的 HspA 基因, 并克隆至 pPLtB 载体中与 LtB 基因融合, 形成含有 LtB - HspA 融合基因的原核表达载体 pPLH, 并在工程菌 *E.coli* JM109 中诱导表达.

结果: 经序列分析, LtB - HspA 融合基因由 684 个碱基组成, 为编码 228 个氨基酸残基的多肽. SDS-PAGE 和 Western blotting 检测发现, 融合蛋白的 M_r 25×10^3 , 并与 *H pylori* 感染的阳性血清发生抗原抗体反应, ELISA 检测显示融合蛋白中存在 LTb 组分, 并保持与 LT 受体 - 神经节苷脂 GM₁ 结合的活性.

结论: LTb - HspA 融合蛋白有可能用于 *H pylori* 基因工程疫苗的研究.

郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超. 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTb 基因融合及表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1475-1479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1475.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H.pylori*)与 B 型胃炎, 消化性溃疡, 胃黏膜相关淋巴组织 (MALT)淋巴瘤以及胃癌发生密切相关, WHO 已将其列为一类致癌物质^[1-37]. *H pylori* 的致病性包括他的动力、黏附力、尿素酶、磷脂酶 A、热休克蛋白 (Hsp)和毒素, 毒素包括空泡细胞毒素(vacuolating cytotoxin A, VacA)和细胞毒素相关 A 蛋白(cytotoxin associated gene A protein, CagA)^[38-48]. *H pylori* 的尿素酶 B 亚单位(UreB)、热休克蛋白 A 亚单位(HspA)和 VacA 均是有效的抗原成分, 作为疫苗免疫动物均已取得良好的免疫预防和治疗效果. 大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)与 *H pylori* 的保护性抗原共同口服免疫后可起到预防和治疗 *H pylori* 感染的作用, 其中 B 亚单位以其无毒性和较好佐剂活性已得到高度重视^[49-58]. 我们采用 PCR 技术克隆 *H pylori* HspA 并与 LtB 基因融合, 进行表达, 为研究其产物的免疫

学功能及LTB的分子内佐剂活性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pFs2.2由F.schodel博士惠赠;原核表达载体PinPoint™Xa-III购自Promega公司;E.coli DH5α及E.coli JM109由本室保存,H pylori标准菌株NCTC11637购自中国预防科学研究所;各种工具酶购自宝灵曼公司;兔抗LT多抗血清购自上海市卫生防疫站,兔抗H pylori多抗血清本室制备;羊抗兔HRP酶标二抗,核酸相对分子质量标准、蛋白相对分子质量标准、IPTG购自华美公司;HRP标记的羊抗兔IgG抗体购自博士德公司;LT, GM₁购自Sigma公司。根据Genebank公布的hLT基因序列,设计了两条引物分别为:上游引物5' ATCTG CAGGGAGTTACTCACATGGCTCCCCAGTCTATTAC 3',下游引物5' CGCGGATCCATCCTGAGGGTAGTTTT' 3。上游引物位于LTB DNA序列ATG下游64 bp位置,下游引物位于LTB 3'端终止子前面部分序列,同时引入Pst I和Bam HI酶切位点,并在LTB最后一氨基酸(Asn)残基密码子AAC与Bam HI酶切位点之间设计增加了编码YPQD的12个核苷酸。以含有ltB基因的质粒pFs2.2为模板进行PCR扩增。根据GenBank公布的H pylori HspA序列及实验目的设计扩增引物,分别在上游引物和下游引物5'端加入Bam HI和EcoR V酶切位点,由于靠近hspA基因终止密码子TAA处存在大量不利于引物设计的连续相同的碱基,故将下游引物设计到与终止密码子TAA后约130*bp处的碱基相匹配。采用Net Primer引物分析软件评价设计引物,由上海生工公司合成,PAGE方式纯化。上游引物:5'-GTC GAT CCA AGT TTC AAC CAT TAG G-3'下游引物:5'-GCG ATA TCA CAG CGT CAT GGA GTT-3'。

1.2 方法 LtB基因和H pylori HspA基因的PCR扩增:分别以含有ltBDNA的质粒pFs2.2和Hp NCTC1 1637基因组DNA为模板,按常规PCR条件进行扩增。反应条件:94℃预变性5 min,加入Taq DNA聚合酶,然后按如下参数循环:94℃,1 min,55℃,1 min,72℃,1 min,最后一个循环结束后72℃反应5 min。反应完毕后取产物3 μl,在10 g/L⁻¹琼脂糖凝胶中进行电泳分析。融合基因表达载体的构建及DNA序列分析:LTB PCR产物经Pst I+Bam HI双酶切并纯化后与同样Pst I+Bam HI双酶切的PinPoint™Xa-III载体相连接,构建LTB融合表达质粒pPLtB,外源基因可通过pPLtB上多克隆位点插入,与ltB基因构成融合基因。质粒pPLtB和HspA PCR产物均用Bam HI和EcoR V酶切,用上海生工公司Silver Beads胶回收kits纯化回收DNA片段,将pPLtB/BamH I+EcoR V和PCR产物/BamHI+EcoR V在14-16℃连接16 h。连接产物转化E.coli DH5a,经氨苄青霉素抗性,质粒少量抽提电泳筛选,酶切鉴定,得到阳性重组子,命名为pPLH。用全自动测序仪进行序列分析。将重组表达质粒pPLH转化至E.coli JM109中,经IPTG诱

导后重组融合蛋白表达,SDS-PAGE电泳分析。重组融合蛋白的免疫学鉴定:Western-blotting检测按《精编分子生物学实验指南ISBN 7-03-006408-9/Q.768》进行。所用一抗为兔抗H pylori抗血清(1:2 000倍稀释),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:3 000倍稀释),邻苯二胺显色。ELISA检测用重组菌诱导表达超声破碎物包被酶标板,10 g/L⁻¹牛血清白蛋白封闭各孔,先后加入兔抗LT多抗(1:1 000)和HRP标记的羊抗兔IgG抗血清(1:10 000),邻苯二胺显色。重组融合蛋白的GM₁-ELISA检测,按文献进行。

2 结果

采用PCR技术分别从质粒pFs2.2和H pylori基因组中扩增出ltB基因和HspA基因,大小与预计大小相符(图1)。

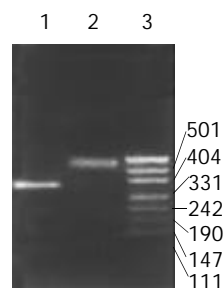


图1 琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。1 ltB PCR product; 2 hspA PCR product; 3 PCR marker。

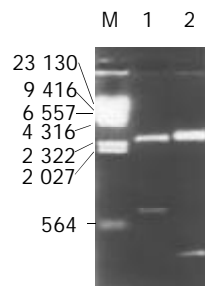


图2 重组质粒pPLH的双酶切鉴定图谱。Marker; 1. Positive recombinant plasmid pPLH PstI+EcoRV; 2. Positive recombinant plasmid pPLH PstI+BamHI。

2.1 融合基因的构建与鉴定 LtB PCR产物经PstI+BamHI双酶切并纯化后与同样PstI+BamHI双酶切的PinPoint™Xa-III载体相连接,构建LTB融合表达质粒pPLtB。经Amp抗性筛选,碱裂解少量抽提和PstI+BamHI酶切鉴定,出现330 bp DNA片段的为阳性重组子(图2)。再通过多克隆位点中BamHI和EcoRV切点将HspA PCR产物定向克隆于pPLtB载体并与ltB基因形成ltB-HspA融合基因,得到重组质粒pPLH(图3),PstI+EcoRV酶切鉴定,出现约800 bp DNA片段的为阳性重组子(图2)。将克隆载体pPLH进行双向序列分析(图4),与GenBank中公布的相应基因序列相比较,结果表明融合基因中ltB基因序列的同源性为99.1% (327/330),推定氨基酸同源性为

99.1 %, 而 HspA 基因序列同源性为 96.3 % (341/354), 氨基酸同源性为 98.3 % (2/118). 整个融合基因仅有 2.33 % 的碱基差异和 1.3 % 的氨基酸不同.

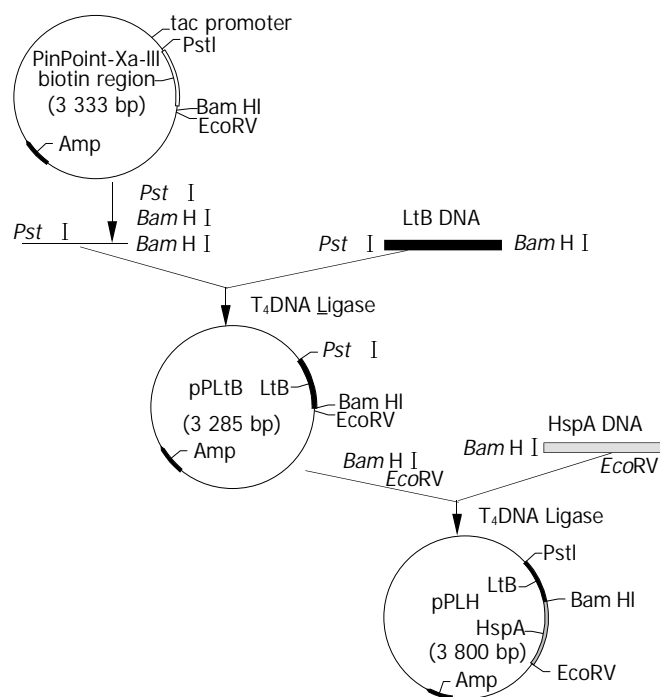


图3 重组质粒 pPLH 的构建示意图.

gct ccc cag tct att aca gaa cta tgt tcg gaa tat cgc aac aca caa ata tat acg ata
A P Q S I T E L C S E Y R N T Q I Y T I
aat gac aag ata cta tca tat aca gaa tcg atg gca ggc aaa aga gaa atg gtt atc att
N D K I L S Y T E S M A G K R E M V I I
aca ttt aag agc ggc gca aca ttt cag gtc gaa gtc ccg ggc agt caa cat ata gac tcc
T F K S G A T F Q V E V P G S Q H I D S
caa aaa aaa gcc att gaa agg atg aag gac aca tta aga atc aca tat ctg acc gag acc
Q K K A I E R M K D T L R I T Y L T E T
aaa att gat aaa tta tgt gta tgg aat aat aaa acc ccc aat tca att gcg gca atc agt
K I D K L C V W N N K T P N S I A A I S
atg gaa aac tac cct cag gat gga tcc aag ttt caa cca tta gga gaa agg gtc tta gta
M E N Y P Q D G S K F Q P L G E R V L V
gaa aga ctt gaa gaa gag aac aaa acc agt tca ggc att atc atc cct gat aac gct aaa
E R L E E E N K T S S G I I I P D N A K
gaa aag cct ttg atg ggc gta gtc aaa gcg gtt agc cat aaa atc agt gag ggt tgc aaa
E K P L M G V V K A V S H K I S E G C K
tgc gct aaa gaa ggc gat gtg atc gct ttt ggc aaa tat aaa ggt gca gaa atc gtt tta
C A K E G D V I A F G K Y K G A E I V L
gat ggc acc gaa tac atg gtg cta gaa cta gaa gac att ctg ggc att gtg ggt tca ggc
D G T E Y M V L E L E D I L G I V G S G
tct tgt tgt cat aca ggt aat cat gat cat aag cat gct aaa gag cat gaa gct tgc tgt
S C C H T G N H D H D H A K E H E A C C
cat gat cac aaa aaa cac taa
H D H K K H *

图4 LtB - HspA 融合基因的核苷酸序列及推定的氨基酸序列.

2.2 LtB - HspA 融合基因的表达 重组质粒 pPLH 在 E.coli JM109 中诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳, 可见新的蛋白条带出现, 与推定的融合蛋白 M_r 25 000 基本相符 (图 5). 重组 LtB - HspA 融合蛋白经 Western blotting 检测显示, 重组表达质粒在未经 IPTG 诱导和诱导后均在 M_r 25 000 处出现单一的阳性反应条带, 而其他对照均无阳性反应条带 (图 6). 证明融合蛋白中含有 HspA 组分. ELISA 检测显示融合蛋白包被孔呈明显的棕黄色, 而其他对照孔呈无色或淡黄色, 说明 LtB - HspA 融合蛋白中存在 LtB 组分. GM₁-ELISA 检测结果显示, 融合蛋白组呈现阳性, 而其他组为阴性, 证明该蛋白保留与神经节苷脂 GM₁ 受体相结合的活性.

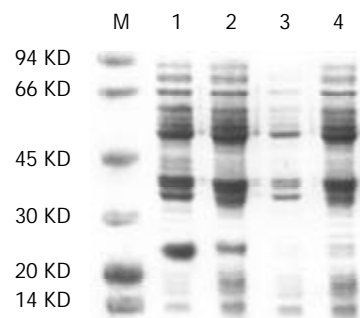


图5 重组质粒 pPLH 表达产物 SDS-PAGE 分析. M: Molecular weight marker; 1: E.coli JM109/pPLH after induction with IPTG; 2: E.coli JM109/pPLH before induction; 3: E.coli JM109/PinPoint™Xa-III after induction with IPTG; 4: E.coli JM109/PinPoint™Xa-III before induction.

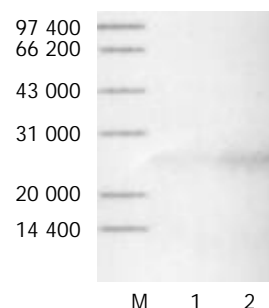


图6 重组 LtB - HspA 融合蛋白的免疫印迹分析. M: marker; 1: 诱导前重组菌; 2: 诱导 5 h 后重组菌.

3 讨论

幽门螺杆菌的热休克蛋白(Hsp)由于其特殊的结构和结合镍离子的特性, 已被认为是激发机体产生预防 H pylori 感染的最有效的抗原成分之一^[59], 可以作为基因工程疫苗的候选分子. 我们克隆出 H pylori 354 bp HspA 基因并与大肠杆菌 LtB 基因进行融合, 得到 LtB - HspA 融合基因. 经序列分析, 该融合基因由 684 个碱基组成, 包括 LtB 基因和 HspA 基因的序列, 其 LtB 基因序列与文献报道的序列相比较, 有 0.90 % (3/330) 的编码碱基发生变异, 但其推定的氨基酸序列完全相同, 同源性高达 99.1 %; 而 HspA 基因序列与 GenBank 公布的序列相比, 有 3.67 % (13/354) 的编码碱基发生变异, 其氨基酸序列中仅有 2 个氨基酸不同, 分别为 Val-51 变为 Ala-51 和 Val-73 变为

Thr-73, 同源性高达 98.3 %。整个融合基因约有 2.33 % (16/684) 的碱基差异和 1.3 % (3/228) 的氨基酸序列不同, 同源性极高, 为该融合基因的准确表达奠定了基础, 并且两个结构基因间仅存在 18 个非编码的碱基, 可以推测其编码的氨基酸将不会影响整个融合蛋白的免疫原性。为了使所构建的 Ltb-HspA 融合基因以天然蛋白形式表达, 特意将该融合蛋白表达载体中编码担体蛋白(tag)的一段 DNA 序列切去, 构建得到重组表达质粒 pPLH, 在工程菌 E.coli JM109 中经 IPTG 诱导表达后, 可见 M_r 25 000 的蛋白条带出现。Western blotting 检测目的条带处出现阳性反应, ELISA 试验呈现阳性。表明所表达蛋白为 LTB-HspA 融合蛋白, 且具有免疫反应性。大肠杆菌的不耐热肠毒素为一种外毒素物质, 可引起人和猪等家畜的严重腹泻, 其主要的毒性部位为 A 亚单位, 可通过 B 亚单位与肠黏膜上皮细胞膜上的神经节苷脂 GM_1 受体相结合进而发挥肠毒素活性。我们根据 LTB 可与神经节苷脂 GM_1 特异结合的特点, 建立 GM_1 -ELISA 方法, 检测证明了 LTB-HspA 融合蛋白中 LTB 的存在且具有与神经节苷脂 GM_1 进行特异性结合的生物学活性。同时以融合蛋白作为抗原包被酶标板后, 与 H pylori 感染患者的阳性血清发生抗原-抗体反应, 表明该融合蛋白保持了 HspA 原有的免疫反应性, 据此可将其用于 H pylori 感染患者的血清学检测与诊断。

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)除了具有毒素活性外, 更重要的是他还具有黏膜免疫原性和黏膜免疫佐剂性^[60, 61]。LTB 亚单位既缺乏 LT 全毒素分子的毒性, 又保留了黏膜免疫佐剂的作用, 他与多种非相关的蛋白或非蛋白抗原经不同途径免疫均能明显增强机体的黏膜免疫反应, 故研究者们选用他作为口服疫苗的黏膜免疫佐剂。Weltzin 将重组 LTB 作为佐剂与尿素酶共同免疫小鼠, 发现可产生特异性的血清抗尿素酶 IgG1 和 IgG2a 以及唾液中的抗尿素酶 IgA, 以及对 H pylori 的保护性免疫^[11]。大量实验研究证明, UreA, HspA 加 LT 通过黏膜途径免疫可获得有效的免疫保护性。将 LTB 与 HspA 构建成融合蛋白形式表达, 为进一步研究 LTB 的分子内佐剂性和整个蛋白的免疫原性奠定了基础。

4 参考文献

- 1 卢世云, 施作霖, 潘秀珍, 彭孝伟. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮细胞增生和凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:975-977
- 2 卢世云, 潘秀珍, 彭孝伟, 施作霖. 幽门螺杆菌感染对胃病细胞动力学的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:760-762
- 3 梁后杰, 高晋华, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. 幽门螺杆菌培养滤液长期作用下大鼠胃黏膜组织学的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:861-863
- 4 胡品津. 幽门螺杆菌与胃癌: 研究面临的挑战. 世界华人消化杂志 1999;7:1-2
- 5 黄品川, 陈彩凤, 程荣墀, 叶蕤, 卢惟纯. 消化性溃疡及胃癌患者血清 CagA VacA 抗体研究. 世界华人消化杂志 1999;7:917-918
- 6 华杰松. 幽门螺杆菌: 细胞增生和细胞凋亡在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:647-648
- 7 司君利, 刘吉勇, 元玉琴. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜端粒酶活性关系的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:429-430
- 8 Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16

(Suppl 1): 3-15

- 9 高华, 袁媛, 吴烨秋, 王兰, 董明, 张忠. 根除 Hp 对增生细胞核抗原 P53 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:995-996
- 10 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- 11 庄则豪, 陈玉丽, 王承党, 陈奕贵. 胃黏膜组织幽门螺杆菌感染与 TGF- β 1 表达的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:1090-1091
- 12 高利利, 梁浩, 纪小龙. 幽门螺杆菌相关性胃 MALT 淋巴瘤的发病机制及治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:789-790
- 13 夏华向, 张贵水. 细胞凋亡与增生在幽门螺杆菌感染致胃癌中的重要作用. 世界华人消化杂志 1999;7:740-742
- 14 聂昭华, 祝扬, 张敏, 赵源, 耿玉兰, 曹颖, 陈秀珍. Hp(+)DU 患者外周血 T 淋巴细胞亚群与胃黏膜组织急性炎症的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:590-592
- 15 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 胡品津, 徐智民. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 世界华人消化杂志 2000;8:219-220
- 16 何兴祥, 王家马龙, 吴捷莉, 袁顺玉, 艾莉. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与端粒酶活性的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:505-508
- 17 汪荣泉, 房殿春, 刘为纹, 罗云辉. 幽门螺杆菌感染胃癌和癌旁组织中 MRC1 和 MUC6 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:584-585
- 18 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 19 庄小强, 林三仁. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究. 世界华人消化杂志 2000;8:710-711
- 20 姚金锋, 姚希贤. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1042-1045
- 21 王承党, 黄海辉, 陈玉丽. 幽门螺杆菌感染对消化性溃疡患者胃 G, D 细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:847-850
- 22 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 杨仕明, 赵丽. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡与 Bax 蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:860-862
- 23 黄梅芳, 朱尤庆, 张春香, 刘珊, 黄星, 邓长生. Hp 感染对胃黏膜增生, DNA 含量及癌基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1057-1059
- 24 Sokucu S, Suoglu OD, Turkkan E, Elkabes B, Ozden T, Saner G. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. *Turk J Pediatr* 2002;44:102-108
- 25 聂昭华, 祝扬, 张敏, 陈秀珍. Hp(+)DU 胃黏膜组织中的 T 淋巴细胞亚群. 世界华人消化杂志 2000;8:1303-1305
- 26 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000;8:1084-1088
- 27 顾金柱, 侯天文, 王晓熙. 幽门螺杆菌致胃黏膜癌前期病变的横断研究. 世界华人消化杂志 2001;9:111
- 28 陆和平, 郑银宝. 肠化生, 胃癌组织中幽门螺杆菌感染与 ras 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:218-219
- 29 吕其军, 吴玉娥, 李玉生, 李淑霞. 十二指肠球部幽门螺杆菌定植与细胞增生及溃疡形成的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:472-473
- 30 钟慧闽, 宋健, 姚萍, 尹成才. 幽门螺杆菌阳性胃癌 P53 和 Fas 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:456-457
- 31 张焜和, 王崇文. 幽门螺杆菌相关性胃炎的胃肠动力改变. 世界华人消化杂志 2001;9:422-426
- 32 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 33 宋春芳, 袁媛. 细胞凋亡与胃癌及幽门螺杆菌相关胃疾病. 世界华人消化杂志 2002;10:427-429
- 34 王东旭, 房殿春, 李为, 杜群先, 刘为纹. 胃幽门螺杆菌感染与抑癌基因失活的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:984-987
- 35 顾掌生, 吴巍. 幽门螺杆菌在胃外疾病中作用. 世界华人消化杂志 2002;10:459-464
- 36 林敏娟, 阳惠湘. 幽门螺杆菌感染患者白介素 -8 及白介素 -1 β 的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:478-480
- 37 孙善明, 李国庆, 丰义宽, 张玉英, 田强, 刘丽娜. Hp+ 胃炎黏膜 iNOS, NO 的表达及意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1459-1461
- 38 韩锋产, 阎小君, 侯瑜, 肖乐义, 郭晏海, 苏成芝. 胶体金免疫层析法检测抗幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 抗体. 世界华人消化杂志

- 志 1999;7:743-745
- 39 张玲霞, 张沥, 张宁霞, 刘永国, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 西安市儿童 CagA 阳性幽门螺杆菌感染血清流行病学调查. 世界华人消化杂志 1999;7:702-703
- 40 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型. 世界华人消化杂志 2000;8:551-553
- 41 郭浩岩, 张建中. 幽门螺杆菌黏附素研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:690-692
- 42 张玲霞, 张沥, 刘永国, 张宁霞, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 与胃十二指肠溃疡关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8:733-736
- 43 江红, 阎小君, 苏成芝, 韩锋产, 冯永强, 侯瑜. 幽门螺杆菌 vacA 基因毒性相关片段的克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2000;8:728-732
- 44 胡维杰, 李宁生, 王淑丽, 刘炯, 屠振兴, 许国铭. 中国人感染幽门螺杆菌中检出 cag I 的结构差异. 世界华人消化杂志 2001;9:405-409
- 45 Gotteland M, Corvalan A, Sarmiento F, Chavez E, Backouse C, Palma M, Kakarieka E, Vial MT, Figueroa G. Gastric permeability is not increased in children colonized by CagA-positive strains of *Helicobacter pylori*. *Dig Liver Dis* 2001;33:750-754
- 46 尹焱, 张建中, 孙兆军. 幽门螺杆菌 HSPB 基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2001;9:348-350
- 47 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:455-458
- 48 李炯君, 阎小君, 刘智广, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关抗原 A 的表达纯化及其临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:271-274
- 49 吴超, 邹全明, 郭红, 张卫军, 袁小澎, 毛旭虎. 幽门螺杆菌 UreB 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2002;22:175-179
- 50 郭学青, 邹全明. 霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素生物学特性的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:325-326
- 51 毛旭虎, 邹全明, 许霖水. 大肠杆菌不耐热肠毒素的分子生物学特性. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 2000;21:228-229
- 52 王缚鲲, 于长青, 邹全明. 聚合物微粒包裹幽门螺杆菌疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:452-453
- 53 吴超, 邹全明. 幽门螺杆菌黏膜疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:203-205
- 54 Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P, Del GG, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2002;291:545-550
- 55 Londono-Arcila P, Freeman D, Kleanthous H, O' Dowd AM, Lewis S, Turner AK, Rees EL, Tibbitts TJ, Greenwood J, Monath TP, Darsley MJ. Attenuated salmonella enterica serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming parenteral boosting vaccination regimen. *Infect Immun* 2002;70:5096-5106
- 56 Raghavan S, Svennerholm AM, Holmgren J. Effects of oral vaccination and immunomodulation by cholera toxin on experimental *Helicobacter pylori* infection, reinfection, and gastritis. *Infect Immun* 2002;70:4621-4627
- 57 Keller WC, Michetti P. Vaccination against *Helicobacter pylori*—an old companion of man. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:795-802
- 58 Nilsson CL. Bacterial proteomics and vaccine development. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:59-65
- 59 Figura N, Piomboni P, Ponzetto A, Gambera L, Lenzi C, Vaira D, Peris C, Lotano MR, Gennari L, Bianciardi L, Renieri T, Valensin PE, Capitani S, Moretti E, Colapinto R, Baccetti B, Gennari C. *Helicobacter pylori* infection and infertility. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:663-669
- 60 De Haan L, Verweij WR, Feil IK, Holtrop M, Hol WG, Agsteribbe E, Wilschut J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 1998;94:424-430
- 61 Weltzin R, Guy B, Thomas WD Jr, Giannasca PJ, Monath TP. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000;68: 2775-2782



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

