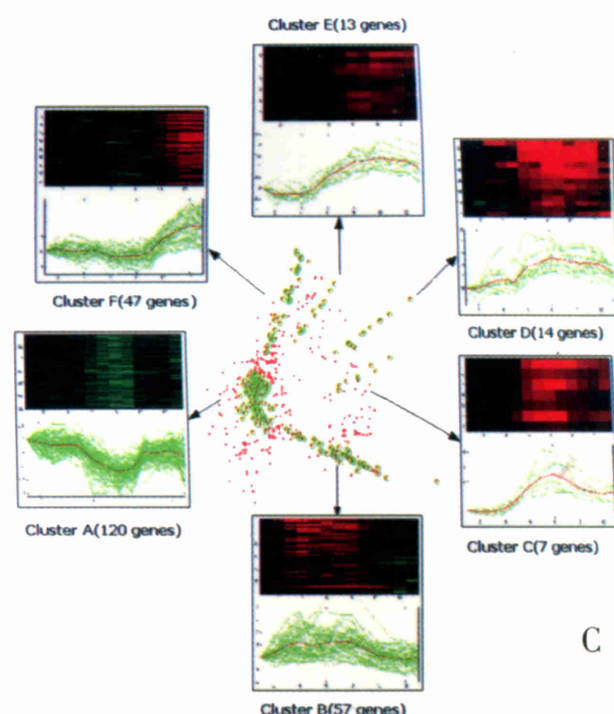
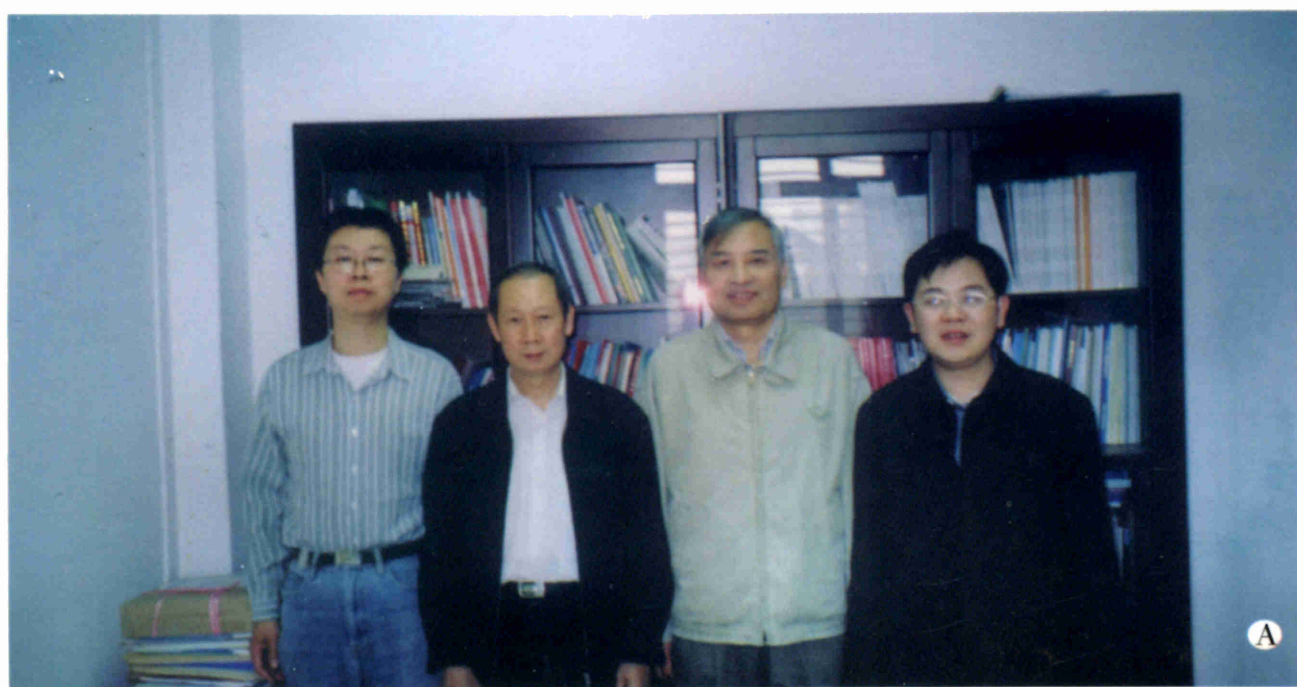


世界华人消化杂志®

**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- κ B 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

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

姜政, 蒲丹, 陶小红, 王丕龙, 重庆医科大学第一附属医院消化科
重庆市 400016
黄爱龙, 重庆医科大学肝炎研究所 重庆市 400010
姜政, 男, 1965-06-06, 四川武胜人, 汉族, 1989年重庆医科大学本科毕业, 1994年重庆医科大学硕士研究生毕业, 现攻读2000级博士研究生, 副教授, 主要从事胃肠疾病的研究。
项目负责人: 姜政, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学第一附属医院消化科。 Jianggooddoctor@mailchina.com
电话: 023-68891218
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-27

Cloning, expression and antigenic analysis of heat shock protein A gene of human *Helicobacter pylori*

Zheng Jiang, Dan Pu, Ai-Long Huang, Xiao-Hong Tao, Pi-Long Wang

Zheng Jiang, Dan Pu, Xiao-Hong Tao, Pi-Long Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Ai-Long Huang, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
Correspondence to: Dr. Zheng Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. jianggooddoctor@mailchina.com
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-27

Abstract

AIM: To construct a recombinant vector containing gene encoding heat shock protein A with a M_r of 13 000 from human *Helicobacter pylori* (*H pylori*) and express it in *E. coli* BL21, and to explore the antigenicity.

METHODS: The target gene was amplified from *H pylori* chromosome by PCR, and then inserted into the prokaryotic expression vector pET32a (+) digested by restrictive endonuclease enzymes of *kpn* I, *Bam*H I simultaneously. The recombinant vector was transformed and expressed in *E. coli* BL21. The antigenicity of recombinant fusion protein was analysed by Western blot.

RESULTS: Enzyme digestion and sequencing analysis showed that the target gene has been inserted into the recombinant vector, but as compared with the gene reported by GenBank, 1.6 % of gene mutation and 1.6 % of amino acid residues change in *H pylori* occurred, respectively. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant vector could be expressed in *E. coli* BL21, the relative molecular mass (M_r) of expressed product was 33×10^3 , while M_r of protein expressed by pET32a (+) was about 20×10^3 , and soluble fusion expression product accounted for 18.96 % of total bacterial protein. After purification with Ni^{2+} -NTA agarose resin, the purity of recombinant fusion protein was about

95 %. Western blot result showed that recombinant fusion protein could be recognized by anti-*H pylori* positive serum, suggesting that the protein had good antigenicity.

CONCLUSION: The gene encoding *H pylori* heat shock protein A has been cloned and expressed successfully. The results lay the foundation for development of *H pylori* protein vaccine and a quick diagnostic kit for detection of *H pylori* infection.

Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Cloning, expression and antigenic analysis of heat shock protein A gene of human *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1480-1484

摘要

目的: 构建含人幽门螺杆菌(*H pylori*)热休克蛋白A编码基因的重组载体、进行核苷酸序列分析,并在*E. coli* BL21中表达,研究其抗原性,为疫苗的开发奠定基础。

方法: 利用分子克隆技术从*H pylori* DNA染色体中,扩增热休克蛋白A编码基因片段;将目的基因与载体pET32a(+)同时经*kpn* I、*Bam*H I双酶切、纯化、连接后,转化含有目的基因的重组载体;以含目的基因片段的重组载体转化大肠杆菌BL21(DE30)并表达;表达产物经纯化后,用Western blot法检测其抗原性。

结果: 经酶切、测序分析表明,插入的基因片段为*H pylori*热休克蛋白A编码基因,与GenBank报道的相比较,有1.6 %的碱基(bp)发生变异,1.6 %的氨基酸残基改变。经SDS-PAGE分析发现,融合基因表达的蛋白 M_r 为 33×10^3 ,其中pET32a(+)表达的蛋白 M_r 约为 20×10^3 ,可溶性表达产物占全菌总蛋白的18.96 %。重组蛋白经 Ni^{2+} -NTA琼脂糖树脂纯化后,其纯度达95 %以上。用Western blot方法检测显示,该重组蛋白可被*H pylori*阳性患者的血清所识别,具有良好的抗原性。

结论: 成功地克隆并表达了*H pylori*热休克蛋白A基因,为*H pylori*蛋白质疫苗的研制和快速诊断试剂盒的研究奠定了良好的基础。

姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1480-1484
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1480.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是人类最常见

的致病菌,我国普通人群的感染率为 50-80%, 仍以每年 1-2% 的速度增加^[1], 每年新增感染人数近千万. *H. pylori* 感染不但与消化性溃疡、MALT 淋巴瘤、胃癌的发生有密切关系^[2-7], 而且与肠道外疾病的发生也有显著的作用^[8-15], 故已被世界卫生组织国际癌症研究机构列入第一类致癌原^[16]. 根除 *H. pylori* 的感染目前采取的方式很多: 比如药物的二联、三联以及四联疗法, 虽然可以达到治疗消化道疾病的目的, 同时也不同程度的根除 *H. pylori* 的感染, 但近年来, 由于广泛的、大剂量的抗生素应用, 导致了 *H. pylori* 耐药菌株的产生; 同时出现了一些药物副作用; 而且患者耐受性、依从性以及承受力都受到了挑战. 鉴于此, 欲求降低 *H. pylori* 感染率及其相应疾病的发生率, 不少研究工作者正致力于开发研究新的 *H. pylori* 治疗以及预防方案: *H. pylori* 疫苗的开发. 疫苗的研制已成为全球研究的热点, 美国已将其列为 21 世纪疫苗优先发展的 II 类项目, 有人预测在 2010 年, *H. pylori* 疫苗将有选择地应用于人群的预防和临床治疗. 新近研究表明: *H. pylori* 的尿素酶、热休克蛋白 A(HspA)、中性粒细胞激活蛋白、黏附素、空泡细胞毒素、细胞毒素相关 A 蛋白以及 Mr 为 18 000、26 000 OMP 均是有效的抗原成分^[17-34]. 而 HspA 为所有的 *H. pylori* 共同的抗原成分, 用作疫苗抗原可使 70-80% 试验小鼠获得保护, 由于 *H. pylori* 属微需氧菌, 培养条件高, 难以获得大量天然的 HspA, 因此, 我们采用基因克隆技术, 将 HspA 编码基因, 经 PCR 扩增后, 构建重组载体, 在 *E. coli* 中进行表达, 为 *H. pylori* 疫苗的研制及快速诊断试剂盒的制备奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* 由本校微生物学教研室提供; Top10、BL21(DE3)菌株和 pET32a(+)载体, 为本校病毒性肝炎研究所保存; T_4 DNA 连接酶和限制性内切酶(kpnI 和 BamH I)购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶为 Takara 产品; dNTP 为上海生工生物工程公司产品; IPTG 为 sigma 公司产品; PE-2400 型 PCR 为美国 PE 公司产品. 参考文献[33]提取 *H. pylori* 基因组 DNA, 取 *H. pylori* 培养物 1.5 mL, 以 12 000 r/min 离心 2 min; 取沉淀, 加入 TE 缓冲液 567 μ L 混悬, 再加入 100 g/L SDS 30 μ L 和 20 g/L 蛋白酶 K 3 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h; 而后依次加入 5 mol/L NaCl 100 μ L 和 100 g/L SDS 80 μ L, 于 65 $^{\circ}$ C 温育 10 min. 用酚及酚/氯仿各抽提 3 次, 收集上清液转入 EP 管中, 加入 0.6 倍于上清液的异丙醇, 并以 12 000 r/min 离心 15 s. 取沉淀, 加入 700 mL/L 乙醇 1 mL 洗涤, 再以 12 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 将沉淀溶于 100 μ L TE 中, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2 方法 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增, 根据 GenBank, 经微机分析设计扩增 HspA 编码基因的引物 P1 和 p2, P1 的序列为 5' -CCGGTACC-ATGAAGTTTCAACCATTAGG-3'; P2 为 5' -CCGGATCC-GTGT

TTTTGTGATCATGAC-3'. P1 引物中引入 kpnI 酶切位点, P2 引物中引入 BamH I 酶切位点. 在 50 μ L 反应体系中, 分别加入 dNTP 1 μ L, DNA(作为模板) 2 μ L 及浓度各为 18 μ mol/L 的 P1 和 P2 引物各 1 μ L, 以及 Taq DNA 聚合酶 1 μ L, 按照以下条件进行 PCR 扩增, 即 94 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 最后 1 个循环结束后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 共 35 个循环. 所获 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 同时进行 10 g/L 琼脂糖凝胶回收. 将纯化的 PCR 产物和载体 pET32a(+), 分别以 kpnI 和 BamH I 双酶切, 并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化; 将酶切纯化的目的基因和 pET32a(+)按 4:1 (摩尔数)比例, 并在 4 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜; 同时根据文献[33]制备 Top10 感受态菌: 取 Top10 菌的过夜培养物 50 μ L, 加于 LB 培养液 2 mL 中, 以 300 r/min 摇荡 3 h, 然后在室温下以 10 000 r/min 离心 2 min. 弃上清, 加入 100 mmol/L CaCl₂ 150 μ L 混悬, 置 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中 2 h, 而后加入连接产物 10 μ L 混悬, 依次于 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中 30 min、42 $^{\circ}$ C 水浴中 2 min 及冰水浴中 2 min; 加入 1 mL LB 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 取 200 μ L 培养物, 涂于 LB+ 氨苄青霉素 100 mg/L 平皿, 于 37 $^{\circ}$ C 过夜. 于次日挑选单个菌落, 接种于 2 mL LB+ 氨苄青霉素 100 mg/L 培养液中, 于 37 $^{\circ}$ C 以 250 r/min 培养 12 h. 重组载体的提取, 按照上海生物工程公司出版的 DNA 抽提纯化操作手册进行, 同时进行酶切鉴定和基因测序分析.

1.2.1 重组载体 pET32a(+)/HspA 在 *E. coli* 中的表达 以酶切鉴定的重组载体转化 *E. coli* BL21, 随后挑选含重组载体的单个菌落接种于盛有 LB 培养基的试管(含氨苄青霉素 100 mg/L)中. 于 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600}=0.4-0.6$ 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h, 以 10 000 r/min 离心 2 min. 收集菌体, 加入等体积蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE, 筛选高表达的含重组质粒的单个菌落, 以获得大量的重组蛋白.

1.2.2 表达产物的纯化及活性检测 由于融合蛋白的 C 端融合了 6 个组氨酸, 故表达产物采用 Ni²⁺-NTA 琼脂糖树脂进行纯化. 将 500 mL LB 培养基制备的细菌, 混悬于超声破碎液(50 mmol/L NaH₂PO₄ 和 300 mmol/L NaCl, pH 7.0)10 mL 中, 在 35% \times 600 v 的低温条件下, 超声破碎 40 min, 以 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液过 Ni²⁺-NTA 琼脂糖树脂柱, 先以洗涤液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、300 mmol/L NaCl 及 20 mmol/L 咪唑, pH 7.8)10 mL 洗涤 2 次, 然后以洗脱液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 7.8)10 mL 洗脱, 并分 3 段收集. 分别取 3 段收集液各 10 μ L, 以等量 2 \times 蛋白上样缓冲液混匀后, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE. 采集 *H. pylori* 阳性患者的血清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗人血清(IgG)为二抗, 以 western blot 方法, 检测目的蛋白的生物学活性.

2 结果

2.1 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增 以 *H. pylori* 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增. 所获 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析(图 1). 结果表明, PCR 扩增产物位于 250-500 bp 之间. 序列分析证实, PCR 扩增产物, 即为所需要的目的基因片段, 其大小约为 357 bp.

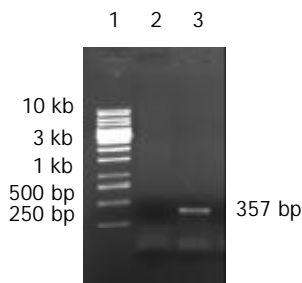


图1 HspA 编码基因 PCR 产物的 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析. 1: DNA Marker; 2: Negative control; 3: PCR products of HspA gene.

2.2 重组载体的酶切鉴定 分别以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板, 按照上述 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增, 反应体系 25 μ L, 共 35 个循环. 所获 PCR 产物进行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示: 以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板, 均能扩增出 1 条约

为 357 bp 的带(图 2), 与实验设计相一致. 说明重组载体构建成功.

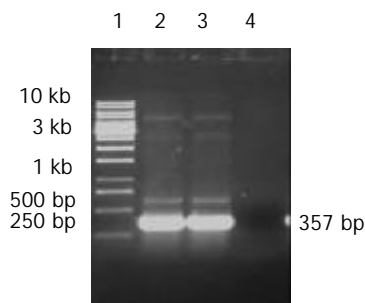


图2 重组载体的 PCR 鉴定. 1: DNA marker; 2: PCR product with the template of pET32a(+)/HspA; 3: PCR product with the template of Top10/pET32a(+)/HspA; 4: Negative control.

2.3 HspA 基因片段的序列分析 将重组载体以 T7 为引物进行序列分析(上海基康生物有限公司), 并采用电脑 DNA 分析辅助软件, 对所测定的 DNA 序列进行同源性分析. 结果发现, 插入的基因片段为 HspA 基因的片段, 其中有 6 个 bp 发生变异, 另有 2 处编码的氨基酸残基发生变化, 一处由 G \rightarrow D, 一处由 A \rightarrow S, 但 HspA 的特性无明显改变, 其同源性高达 98 %. 关于克隆的编码 HspA 基因及表达的目的蛋白的序列见其后.

```

357a 1          ATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA 38
cx 477 ATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA 544

357a 39 AAGACTTGAAGAAGAGAAACAAAACAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT 106
cx 545 AAGACTTGAAGAAGAGAAACAAAACAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT 612

357a 107 TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT 174
cx 613 TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT 680

357a 175 GTGATCGCTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA 242
cx 681 GTGATCGCTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA 748

357a 243 ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGCTGTCATACAGGTAATCATGATCATAAAC 310
cx 749 ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGCTGTCATACAGATAGTCATGACCATAAAC 816

357a 311 ATGCTAAAGAGCATGAAGCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACTAA 357
cx 817 ATGCTAAAGAGCATGAATCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACGGATCCTCGAGCTCCGTCGA 884
  
```

357 a 为 GenBank 中 HspA 的序列, CX 为本实验所得序列, 划线部分为酶切位点.

2.4 重组载体在 *E. coli* 中的表达 从重组载体 pET32a(+)/HspA 转化的 *E. coli* BL21 中, 筛选高效表达菌株. 将含有重组载体的单个菌落置于 LB 培养液(含氨苄青霉素 100 mg/L)中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600}=0.4-0.6$ 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h, 以 10 000 r/min, 离心 5 min. 收集菌体, 进行 150 g/L SDS-PAGE. 结果发现, 经 IPTG 诱导后, 可高效表达 Mr 为 33 000 的融合蛋白(图 3). 通过 Imagemaster totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析, 融合蛋白的表达量约占菌体总蛋

白的 18.96 %. 将 500 mL LB(含氨苄青霉素 100 mg/L)培养基制备的菌体, 溶于超声波缓冲液中, 破碎细菌、离心以及 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖树脂柱纯化, 通过 SDS-PAGE 以及 Imagemaster totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析, 获得纯度达 95 % 以上的终产物.

2.5 用 western blot 方法检测 HspA 表达产物的抗原性 将诱导培养的 BL21/pET32a(+), BL21/pET32a(+)/HspA 细菌各取 1 mL, 离心, 在沉淀中加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE 电泳, 而

后在以电压 14 V, 4 °C 的条件下, 进行电转 8-12 h, 再将 PVDF 膜进行封闭、洗涤, 加入 *H. pylori* 阳性患者的血清作为一抗, 同时以 HRP 标记的羊抗人 IgG 作为二抗(1:1 000)进行 western blot 检测. 结果显示, 在 BL21/pET32a(+)/HspA 的泳道上相应于其表达产物相对分子质量的地方出现了棕色的条带, 而 BL21/pET32a(+) 的泳道上未出现任何条带(图 4).

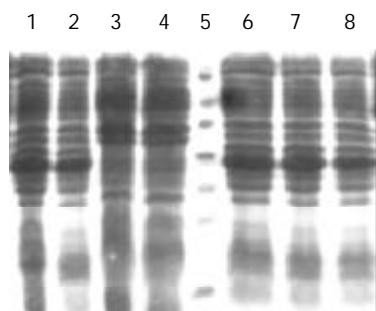


图 3 重组载体在 BL21 中表达的全菌蛋白的 150g/L SDS-PAGE 分析. 1, 2, 6-8: Expression of recombinant vector in BL21 after induction of 4h with IPTG; 3: Bacterial protein expressed in BL21 after induction of 4 h with IPTG; 4: Expression of pET32a(+) in BL21; 5: Standard protein marker(Mr 14.2; 20.1; 24; 29; 36; 45; 66X10³).



图 4 用 western blot 方法检测表达产物的抗原性. 1. BL21/pET32a(+); 2. BL21/pET32a(+)/HspA.

3 讨论

热休克蛋白, 其广泛存在于人、动物、微生物和植物细胞内, 主要在细胞内发挥功能, 占细胞内总蛋白的 5%, 属高度保守的应激蛋白质^[35-38]. 而 *H. pylori* 合成的热休克蛋白 - 热休克蛋白家族 HspA、B、Hsp60、Hsp70 等, 在细菌的致病机制中起着重要的角色, 同时能显著增强 *H. pylori* 尿素酶的活性. 编码热休克蛋白 A、B 的 DNA 疫苗, 分别接种 C57BL 小鼠: 接种 pcDNA3.1-HspA 小鼠产生了 IgG2a, 而接种 pcDNA3.1-HspB 则产生 IgG1/IgG2a, 他们都显著地减少 *H. pylori* 在胃内的定植, 同时减轻因 *H. pylori* 存在的炎症反应. 因而, 作者认为, 以热休克蛋白为基础的(核酸 DNA, 或蛋白质)疫苗不失为一种有效的 *H. pylori* 疫苗.

鉴于此, 我们将 *H. pylori* HspA 编码基因进行了克隆、构建了重组载体并进行了表达. 克隆 HspA 编码基因有 1.6% (6/357) 的碱基发生变异, 约 1.6% (2/119) 的氨基酸残基发生改变, 据文献^[33]报道, 可能的原因有: (1)所采用的 *H. pylori* 菌种不同; (2)*H. pylori* 具有转化能力, 能够通过已死亡的 *H. pylori* DNA 转化而致基因组发生重排导致基因变异. (3)由 *H. pylori* 菌株间的变异引起. 不同的患者感染的 *H. pylori* 具有其特殊的限制性片段长

度多态性(RFLP)谱型, 尤其是不同地区差别更加明显, 通常有好几个片段的差异, 但其高度的同源性又决定了不同菌株间编码蛋白的主要抗原决定簇的一致性, 从而保证了重组载体的表达. (4)PCR 扩增所致的错配现象. 由于 *H. pylori* HspA 编码基因编码 119 个氨基酸残基, 其多肽 *M_r* 约 13 000 道尔顿, 分子量较小, 故我们采用原核表达载体 pET32a(+), 其主要特点是, 除能够编码 6 个组氨酸残基外, 还带有大肠杆菌 TrxA 基因. TrxA 基因可编码 109 个氨基酸的硫氧还蛋白, 外源基因经多克隆位点插入后, 可与 TrxA 一起融合表达. 融合表达不仅提高了表达产物的稳定性, 而且由于相对分子质量增大, 用 SDS-PAGE 更容易分析鉴定. 此外, 外源蛋白与硫氧还蛋白之间具有肠激酶和凝血酶的识别位点, 从而也方便了外源蛋白与硫氧还蛋白的分离. 本研究中, 我们获得了高产量的融合蛋白产物, 由于载体 pET32a(+)表达的 6 个组氨酸残基可与 Ni²⁺-NTA 琼脂糖树脂中的 Ni²⁺ 结合, 从而可对表达产物进行纯化. 我们通过 Western blotting 检测了融合蛋白表达产物的抗原性, 在 BL21/pET32a(+)/HspA 的泳道上相应于其表达产物相对分子质量的地方出现了棕色的条带, 而 BL21/pET32a(+) 的泳道上未出现任何条带, 实验结果表明, 融合表达的蛋白具有良好的抗原性, 能够被 *H. pylori* 阳性患者的血清所识别. 为以后制备安全、高效的疫苗, 以及制备 ELISA 快速诊断试剂盒奠定了基础.

除了构建和表达 *H. pylori* HspA 编码基因外, 我们还致力于寻找活的载体. 因为抗原的呈递系统影响免疫反应的质和量. 黏膜免疫具有以下优点: (1)能够刺激局部免疫和体液免疫; (2)简单、经济, 适合群体免疫; (3)具有广泛的场所, 但到目前为止, 还未找到适合人类的副作用小的活载体; 而通过皮下免疫除了具有上述优点外, 还具有: (1)一次性接种, 终身带菌; (2)本身就是一种免疫佐剂, 可增强机体免疫功能; (3)如果细菌在体内过度表达, 可通过体外简单的方法加以解决, 这类载体以卡介苗为代表. 以 BCG(*mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin*)牛型结核分枝杆菌的减毒菌株作为载体, 则具有无比的优越性. BCG 以往主要用于预防结核菌的感染, 由于是活载体及其独特的安全性和免疫佐剂作用而受到科学家们的关注, 现已经研究表明, 重组的 BCG(rBCG)表达的 IL-12、IFN- γ 、GM-CSF、HCG- β 能被机体识别, 具有生物活性, 可广泛用于医疗卫生事业. 关于抗爱滋病、百白破、寄生虫疫苗正在研究之中, 我们正在构建以 BCG 为载体的重组能同时表达 *H. pylori* HspA 与 *M_r* 18 000 OMP 疫苗, 我们相信, 不久的将来, *H. pylori* 疫苗一定将广泛应用于临床, 彻底根除与 *H. pylori* 相关的一切疾病.

4 参考文献

- 1 Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of

- primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 2 Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M. Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;48:454-460
- 3 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 5 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88:1054-1058
- 6 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 7 Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- 8 Tsai CJ, Huang TY. Relation of *Helicobacter pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1227-1232
- 9 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, Duda A, Bielanski W, Konturek PC, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000;6:1085-1092
- 10 Tsang KW, Lam WK, Kwok E, Chan KN, Hu WH, Ooi GC, Zheng L, Wong BC, Lam SK. *Helicobacter pylori* and upper gastrointestinal symptoms in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999;14:1345-1350
- 11 Caselli M, Zaffoni E, Ruina M, Sartori S, Trevisani L, Ciaccia A, Alvisi V, Fabbri L, Papi A. *Helicobacter pylori* and chronic bronchitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:828-830
- 12 Dauden E, Jimenez Alonso I, Garcia-Diez A. *Helicobacter pylori* and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000;39:446-452
- 13 Ojetti V, Armuzzi A, De-Luca A, Nucera E, Franceschi F, Candelli M, Zannoni GF, Danese S, Di-Caro S, Vastola M, Schiavino D, Gasbarrini G, Patriarca G, Pola P, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection affects eosinophilic cationic protein in the gastric juice of patients with idiopathic chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:66-72
- 14 Vainio E, Huovinen S, Liutu M, Uksila J, Leino R. Peptic ulcer and *Helicobacter pylori* in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2000;80:427-429
- 15 Szlachcic A, Sliowski Z, Karczewska E, Bielanski W, Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:777-786
- 16 Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haïoun C. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuselarge B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2324-2328
- 17 Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso A, Vindigni C, Ciampolini F, Covacci A, Telford JL, De Magistris MT, Pizzi M, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect Immune* 1997;65:4996-5002
- 18 Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewaki J, Mifune K, Nasu M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immune* 1999;67:2531-2539
- 19 Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, Porta N, Blanco J, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Cortes-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with Urease and Escherichia coli Heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 1999;116:804-812
- 20 Li MF, Ling Z, Ma AY, Zhao JH, Sun JX, Yu SZ, Wu XP. Cloning, expression and immunogenicity of *Hp* UreB gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:596-600
- 21 Lee CK, Soike K, Hill J, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, Boden J, Kleanthous H, Giannasca P, Ermak T, Weltzin R, Blanchard J, Monath TP. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine* 1999;17:1493-1505
- 22 Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM, Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immune* 2000;68:2560-2565
- 23 Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
- 24 Todoroki I, Joh T, Watanabe K, Miyashita M, Seno K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Tochikubo K, Itoh M. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:159-163
- 25 Myers GA, Ermak TH, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, Kleanthous H, Lee CK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease confers long-lasting immunity against *Helicobacter felis* infection. *Vaccine* 1999;17:1394-1403
- 26 Kim BO, Shin SS, Yoo YH, Pyo S. Peroral immunization with *Helicobacter pylori* adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:291-298
- 27 Kotloff KL, Szein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immune* 2001;69:3581-3590
- 28 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, Fujioka T, Mifune K. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* 2000;44:29-39
- 29 Koesling J, Lucas B, Develiglou L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium* aroA against *H pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* 2001;20:413-420
- 30 Bumann D, Metzger WG, Mansouri E, Palme O, Wendland M, Hurwitz R, Haas G, Aebischer T, von Specht BU, Meyer TF. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* 2001;20:845-852
- 31 Liao W, Chen M, Zhu S. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *Helicobacter pylori* catalase and observation on its protective immunity. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:613-616
- 32 Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001;19:3927-3935
- 33 Jiang Z, Tao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- 34 Keenan J, Oliaro J, Domigan N. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies Lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immune* 2000;68:3337-3343
- 35 Ning XX, Wu KC, Shi YQ, Wang X, Zhao YQ, Fan DM. Construction and expression of gastric cancer MG7 mimic epitopic fused to heat shock protein 70. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:892-896
- 36 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:907-910
- 37 Chen ZF, Deng CS, Xia B, Zhu YQ, Zeng J, Gong LL. Expression of heat shock protein60, CD44 splice variant V6 in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:988-991
- 38 Wu SL, Pan CE, Yang W, Niu XJ, Geng ZM. Expression of Hsp70 and MHC-1 antigen in hepatocellular carcinoma and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:291-294



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

