

幽门螺杆菌 HspA 亚基的表达与纯化

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰, 北京生物工程研究所
北京市 100071

刘秀丽, 女, 1971-10-10 生, 河北省固安县人, 汉族, 2002 年北京生物工程研究所博士研究生毕业, 助理研究员, 主要从事幽门螺杆菌疫苗的研究。

国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划), No. 2004AA215213

项目负责人: 刘纯杰, 100071, 北京市丰台大路 20 号, 北京生物工程研究所, Liucj@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66948834 传真: 010-63833521

收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-26

Expression and purification of recombinant heat shock protein A subunit of *Helicobacter pylori*

Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Hao-Xia Tao, De-Wen Zhan, Chun-Jie Liu

Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Hao-Xia Tao, De-Wen Zhan, Chun-Jie Liu, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Supported by the Hi-tech Research and Development Program of China, No. 2004AA215213

Correspondence to: Chun-Jie Liu, Beijing Institute of Biotechnology, 20 Dongda Street, Beijing 100071, China. Liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: 2004-12-17 Accepted: 2005-01-26

Abstract

AIM: To express and purify recombinant heat shock protein A subunit (HspA) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

METHODS: Gene *hspA* was amplified by PCR, and inserted into the prokaryotic expression vector pET22b, pQE-60 and pGEX-4T-2 respectively. The plasmids were transformed into the *Escherichia coli* JM109 and BL21 (DE3). Expression of *hspA* gene was induced by IPTG and was analyzed by SDS-PAGE. The recombinant proteins were purified through nickel-affinity chromatography. Antigenicity of the recombinant proteins was analyzed by western blot.

RESULTS: The *hspA* gene was expressed in two forms (HspA and HspA-His₆) in pQE-60. The expressed protein accounted for above 40% of the total bacterial protein. The purity of HspA and HspA-His₆ were 88.63% and 86.32% respectively after purification. Western blot proved that the recombinant proteins could be recognized by the anti-*H. pylori* serum.

CONCLUSION: HspA of *H. pylori* has been expressed and purified with high efficiency, which can be used for vaccine development and immunological investigation.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Heat shock protein A; Recombinant expression; Purification

Liu XL, Zhang ZS, Tao HX, Zhan DW, Liu CJ. Expression and purification of recombinant heat shock protein A subunit of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):626-630

摘要

目的: 利用原核表达载体高效表达幽门螺杆菌热休克蛋白 A(HspA), 并进行纯化。

方法: PCR 扩增 *hspA* 基因, 将其克隆至原核表达载体 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2 中, 转化大肠杆菌, 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析表达。利用镍离子亲和层析对表达产物进行纯化。免疫印迹检测蛋白的抗原性。

结果: PCR 扩增得到 *hspA* 基因, 在载体 pQE-60 中以 HspA 和 HspA-His₆ 两种形式得到表达, 表达量高达菌体总蛋白的 40% 以上。经镍离子亲和层析后, 纯化率分别为 88.63% 和 86.32%, 但 HspA-His₆ 在纯化过程中发生降解。免疫印迹实验表明, HspA 和 HspA-His₆ 都有很好的抗原性。

结论: 实现了 HspA 蛋白的高效表达和纯化, 为幽门螺杆菌 HspA 亚单位疫苗的免疫实验奠定基础。

关键词: 幽门螺杆菌; 热休克蛋白 A; 重组表达; 纯化

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰. 幽门螺杆菌 HspA 亚基的表达与纯化. 世界华人消化杂志 2005;13(5):626-630

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/626.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是导致慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤(MALT)淋巴瘤等胃部疾病的主要致病细菌, 1994 年国际癌症研究所将 *H. pylori* 认定为第一类致癌因子^[1-5]。流行病学资料显示, *H. pylori* 感染呈全球分布, 在发展中国家人群中, *H. pylori* 感染率高达 70-80%, 即便在发达国家, *H. pylori* 的感染率也达 50% 左右。由于胃肠道黏膜组织很适合于 *H. pylori* 的定植, 一经感染 *H. pylori*, 便很难治愈^[6-10]。*H. pylori* 复合抗生素疗法, 成本昂贵; 而且通用的抗生素一般都没有专性于胃

肠环境, 因而对防治 *H. pylori* 感染的作用有限; 此外, *H. pylori* 对抗生素的抗性日益增加, 将进一步限制抗生素疗法的应用. 因此, 疫苗是预防和控制 *H. pylori* 最有效的途径之一. *H. pylori* 产生两种热休克蛋白, HspA 和 HspB, 其相对分子质量分别为 $M_{13\ 000}$ 和 $M_{58\ 200}$ ^[11-15]. 由于 HspA 参与尿素酶的组装, 并使其发挥酶活性, 分解尿素产生氨, 从而中和胃酸有利于 *H. pylori* 的定植^[16-20]. 由此可见 HspA 是 *H. pylori* 的重要致病因子, 同时研究已证明 HspA 是一种理想的保护性抗原成分, 并为有效的亚单位疫苗候选抗原. 我们将 HspA 基因克隆至原核表达载体, 实现 HspA 蛋白的初步纯化, 为研究其生物学特性和制备 *H. pylori* 亚单位疫苗奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* NCTC11637 为国际标准株, 大肠杆菌 JM109, BL21 (λ DE3), TOP010; 质粒 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2. 由本室保存. 限制性内切酶 *Nco* I, *Bam*HI 和 *Xho* I, Ex Taq DNA 聚合酶和 T₄ DNA 连接酶, 购自宝生物工程大连有限公司. 辣根过氧化物酶标记的第二抗体, 购自 Sigma 公司. 镍离子亲和层析柱 (5 mL), 购自安玛西亚公司.

1.2 方法

1.2.1 HspA 表达载体的构建 收集用平板厌氧培养的 *H. pylori* 菌体, 用 TE 缓冲液 (pH8.0) 洗涤和重悬后, 沸水浴 10 min, 离心取上清; 用等体积抽提液 (酚: 氯仿: 异丙醇的比例为 25:24:1) 抽提两次, 并用 2 倍乙醇沉淀和预冷 700 mL/L 乙醇洗涤; 沉淀抽干后溶于 TE 中, 制备 *H. pylori* NCTC11637 基因组模板. PCR 扩增引物为: P1: 5'-CTG CCA TGG AGT TTC AAC CAT TAG-3', P2: 5'-CGG GAT CCT TAG TGT TTT TTG TG-3', P3: 5'-CGG GAT CCG TGT TTT TTG TGA TC-3', P4: 5'-CGG GAT CCA TGA AGT TTC AAC C-3', P5: 5'-CCG CTC GAG TTA GTG TTT TTT GTG-3'. P1 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pET22b, pQE-60 上, 此引物为匹配载体上的起始密码子, 将 HspA 基因上的第 4 个碱基由 A 变为 G, 从而使 HspA 蛋白的第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu. P3 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pQE-60 上, 由此 HspA 蛋白不仅第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu, 而且 C 末端加入两个酶切位点的 4 个氨基酸和 (His)₆, 为融合表达基因. P3 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pGEX-4T-2 上, 与 GST 蛋白形成融合和表达. PCR 反应体系: 取 10×PCR buffer 5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 50 ng/ μ L 5' 和 3' 端引物 1 μ L, Ex Taq 0.5 μ L, dNTP 4 μ L, 加无菌水至 50 μ L. 94℃ 热变性 5 min 后, 进行 30 个“变性—复性—延伸”循环, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s. 然后 72℃

延伸 10 min. 利用凝胶回收试剂盒割胶回收 PCR 产物. 用 *Xho* I 和 *Eco* RI 双酶切 HspA 基因和质粒 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2, 酶切产物用凝胶回收试剂盒割胶回收, 并在 T₄ DNA 连接酶作用下于 16℃ 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 TOP010 后挑选阳性克隆, 经过抽提质粒、酶切分析鉴定. 将得到的重组质粒分别命名为 pETH、pQEH、pQEHS 和 pGEXH. 将重组质粒进行测序鉴定.

1.2.2 HspA 基因的表达及鉴定 将重组质粒 pQEH, pQEHS 转化 *E. coli* JM109 感受态, 将 pETH、pGEXH 转化 *E. coli* BL21 感受态, 筛选转化重组子. 将转化菌的单克隆菌落接种至 LB 培养基 37℃ 培养 3 h, A_{600} 为 0.4–0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h 后, 离心收集 1 mL 菌体, 然后加入水 70 μ L, 5× 上样缓冲液 20 μ L, 1 mol/L DTT 10 μ L. 煮沸 10 min, 离心 10 min, 取上清上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 鉴定转化菌的表达. 在 LB 液体培养基中大量培养 400 mL 转化菌, 诱导表达离心收集菌体, 加入 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液 (0.2 mol/L Na₂HPO₄, 80 mL; 0.2 mol/L NaH₂PO₄, 20 mL; H₂O, 900 mL;) 12 mL, 超声破碎 10 min, 15 000 g 离心 10 min, 收取上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳检测表达蛋白的分布情况.

1.2.3 HspA 基因的纯化 用 10 mL 一次性注射器吸满 10 mL 水与镍柱进口进行无气泡连接, 拧去柱子末尾的堵头, 冲洗柱中的 200 mL/L 乙醇, 冲洗 20 mL, 再使柱中充满 0.1 mol/L NiSO₄ 约 10 mL, 然后再用去离子水冲洗 15 mL. 用 Binding Buffer (0.016 mol/L Na₂HPO₄, 0.004 mol/L NaH₂PO₄, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 冲洗 10 个柱体积, 约 50 mL. 样品先用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 上样. 用 Eluting Buffer1 (10 mmol/L 咪唑, 0.016 mol/L Na₂HPO₄, 0.004 mol/L NaH₂PO₄, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 平衡 25 mL, 用 Eluting Buffer2 (0.25 mol/L 咪唑, 0.016 mol/L Na₂HPO₄, 0.004 mol/L NaH₂PO₄, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 洗脱, 收集 1 mL/管, SDS-PAGE 电泳检测.

1.2.4 Western 印迹 SDS-PAGE 结束后, 将胶用转移缓冲液 (39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris, 37 mg/L SDS, 200 mL/L 甲醇, 加水至 1 000 mL) 漂洗. 同时剪一与胶大小相同的硝酸纤维素膜及滤纸. 以半干核酸蛋白转移仪 0.8 mA/cm² 转移 2 h. 取出硝酸纤维素膜, 用封闭液 (0.05 mol/L PBS, 0.5 mol/L NaCl, 50 g/L BSA, 5 g/L Tween-20,) 4℃ 封闭过夜. 然后抗 *H. pylori* 血清稀释液, 室温下作用 2–3 h. 漂洗液 (0.05 mol/L PBS, 0.5 mol/L NaCl, 0.5% Tween-20,) 漂洗 4 次, 每次 10 min. 加入稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记的第二抗体 (1:5 000 稀释, 稀释液成分: 0.01 mol/L PBS, 0.25 mol/L NaCl, 0.5% Tween-20, 0.5% BSA), 室温作用 2 h. 漂洗后, 加入底物溶液 (Na₂HPO₄ 0.05 mol/L 柠檬酸 0.24 mol/L, 10 mL; 二胺

ATG	AAG	TTT	CAA	CCA	TTA	GGA	GAA	AGG	GTC	TTA	GTA	GAA	AGA	CTT	GAA	GAA
M	K	F	Q	P	L	G	E	R	V	L	V	E	R	L	E	E
GAG	AAC	AAA	ACC	AGT	TCA	GGC	ATT	ATC	ATC	CCT	GAT	AAC	GCT	AAA	GAA	AAG
E	N	K	T	S	S	G	I	I	I	P	D	N	A	K	E	K
CCT	TTG	ATG	GGC	GTA	GTC	AAA	GCG	GTT	AGC	CAT	AAA	ATC	AGT	GAG	GGT	TGC
P	L	M	G	V	V	K	A	V	S	H	K	I	S	E	G	C
AAA	TGC	GTC	AAA	GAA	GGC	GAT	GTG	ATC	GCT	TTT	GGC	AAA	TAT	AAA	GGT	GCA
K	C	V	K	E	G	D	V	I	A	F	G	K	Y	K	G	A
GAA	ATC	GTT	TTA	GAT	GGC	ACC	GAA	TAC	ATG	GTG	CTA	GAA	CTA	GAA	GAC	ATT
E	I	V	L	D	G	T	E	Y	M	V	L	E	L	E	D	I
CTG	GGC	ATT	GTG	GGT	TCA	GGC	TCT	TGT	TGT	CAT	ACA	GGT	AAT	CAT	GAT	CAT
L	G	I	V	G	S	G	S	C	C	H	T	G	I	H	D	H
AAG	CAT	GCT	AAA	GAG	CAT	GAA	GCT	TGC	TGT	CAT	GAT	CAC	AAA	AAA	CAC	TAA
K	H	A	K	E	H	E	A	C	C	H	D	H	K	K	H	*

图1 克隆至 pETH、pQEH 上的 Hsp A 抗原的基因序列和氨基酸序列.

基联苯氨4 mg, 300 mL/L30% H₂O₂ 15 μL)室温下显色. 待显色适度时, 用2 mol/L H₂SO₄终止反应, 水漂洗后阴干.

2 结果

2.1 hsp A 抗原基因的克隆及筛选 重组质粒pETH, pQEH, pQEHS 和 pGEXH 经酶切分析鉴定, 表明已成功将 hsp A 抗原基因克隆至原核表达载体(图1-2). 用引物从两侧进行序列测定, 即可通读. 序列分析表明, 该序列含 hsp A 基因 357 bp, 克隆至 pETH、pQEH 上的 HspA 基因的第四个碱基由 A 变为 G, 从而使 HspA 蛋白的第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu. 克隆至 pQEHS 末尾增加 GGA TCC AGA TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT 30 个核苷酸. 克隆至 pGEXH 上的 HspA 基因 GST 基因融合, 序列没有改变.

2.2 重组 Hsp A 蛋白的表达 重组的基因工程菌经 IPTG 诱导后, 经 SDS-PAGE 检测发现: 与对照 JM109 菌株相比 pQEH 和 pQEHS 均在 14 000 处表达处一条蛋白带. 初步判断应为重组 HspA 蛋白. HspA 蛋白占总蛋白的 42. 51%, HspA-His₆ 蛋白占总蛋白的 43. 07%. 与对照 BL21 相比 pGEXH 在 43 ku 左右表达处 3 条带, 而 pETH

没有表达带(图3).

2.3 重组 Hsp A 蛋白的纯化 质粒 pETH 未表达目的蛋白, 而重组 pGEXH 未明原因的表达三条带. 本实验以 pQEH 和 pQEHS 为纯化的研究对象. 取大量培养的超声离心上清和沉淀样品、纯化时的上样穿流峰样品、平衡峰样品和洗脱峰样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果发现 pQEH 表达的 HspA 蛋白均以可溶形式表达, 而 pQEHS 表达的 HspA-His₆ 蛋白部分以可溶形式表达, 部分以包涵体形式表达. HspA 蛋白与镍柱结合效果好, 在穿流峰中未检测到 HspA 蛋白. 而 HspA-His₆ 蛋白与镍柱结合效果差, 在穿流峰中检测到 HspA-His₆ 蛋白, 且在洗脱峰中 HspA-His₆ 蛋白出现降解带. 纯化 HspA 蛋白的纯度为 88. 63%, 而 HspA-His₆ 蛋白的纯度为 86. 32%(包括降解带). 从 400 mL 的培养菌中可得到 HspA 约 12 mg, 相同的菌量 HspA-His₆ 只能得到 3 mg 左右(图4).

2.4 HspA 和 HspA-His₆ 蛋白的免疫印迹分析 以 150 g/L 的 SDS-PAGE 将 HspA 和 HspA-His₆ 蛋白进行分离, 然后用抗 *H. pylori* 血清进行免疫印迹, 结果发现 HspA 纯化产物在 14 KD 左右有一阳性印迹, 而 HspA-His₆ 纯化

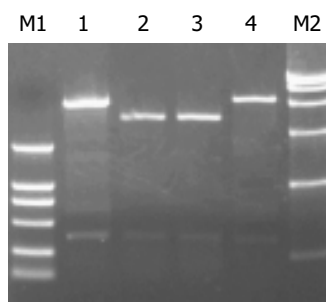


图2 重组质粒的酶切图. M1: DL2000; 1: pGEXH / *XhoI*+*Bam*H I; 2: pQEHS/*Nco* I+*Bam*H I; 3: pQEH/*Nco* I+*Bam*H I; 4: pETH/*Nco* I+*Bam*H I; M2: DL15 000.

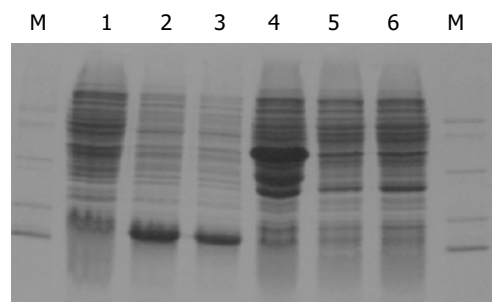


图3 HspA 重组蛋白的电泳分析图. M: Marker,(66 200,43 000,31 000, 20 100,14 400); 1: JM109,2: HspA-His₆(pQEHS),3: HspA(pQEH),4: HspA (pGEXH),5: HspA(pETH),6: BL21.

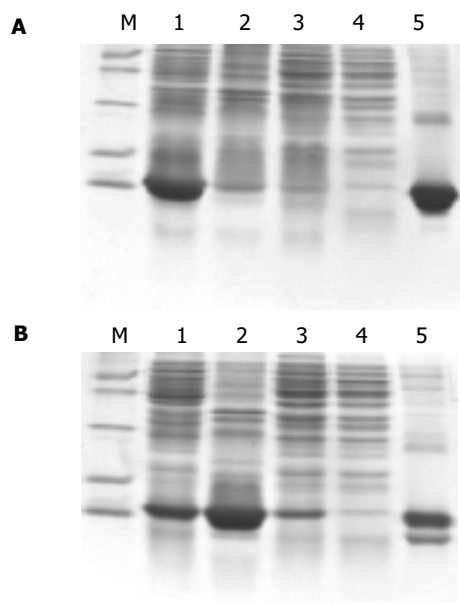


图4 HspA 纯化蛋白的电泳分析结果. A: Expression and purification of HspA; B: Expression and purification of HspA-His₆. M: Marker(66 200, 43 000, 31 000, 20 100, 14 400); 1: Centrifuged Supernatant; 2: Centrifuged precipitate; 3: loading peak fraction; 4: Equilibrating peak fraction; 5: Eluting peak fraction.

产物在 14 ku 左右有 2 条阳性印迹带, 由此可见 HspA-His₆ 在纯化过程中有降解现象 (图 5).

3 讨论

H pylori 中含有一个编码 13 ku 的热休克蛋白 A (HspA), 他与大肠杆菌 GroES 高度同源动物实验研究表明用 HspA (佐剂为霍乱毒素 CT) 免疫小鼠, 可使小鼠对猫胃螺杆菌攻击的保护率为 80%, 说明 HspA 是有效的保护性抗原^[21]. 另外由于 HspA 蛋白序列在不同 *H pylori* 菌株间高度保守, 因此将其单独使用或与其他抗原联用, 均可激发机体产生保护免疫, 是 *H pylori* 疫苗的理想组分^[22]. 我们将 hspA 基因克隆至不同的表达载体中, 目的是实现该基因的高度表达并利于纯化, 在 pET22b 中, 克隆的基因经测序后序列正确, 但未能实现表达. 将该基因克隆至 pGEX-4T-2 中, 使其与 GST 融合, 然后利用 GST 亲和层析对其纯化. 虽然克隆的基因序列完整无误, 但融合蛋白在表达或在检测处理过程中出现降解, 使得纯化出现困难. 可喜的是 HspA 在 pQE-60 中以 HspA 和 HspA-His₆ 的形式得到高效表达, 因此在纯化过程中我们以纯化 HspA 和 HspA-His₆ 为主.

Hsp A 位于 *H pylori* 的表面, 其 C 端含有 4 个组氨酸和 4 个半胱氨酸, 能够特异性结合镍离子, 起到镍离子库的作用^[23-29]. 尿素酶是 *H pylori* 中重要的定植因子, 他通过分解尿素形成氨以中和胃酸, 为 *H pylori* 的定植和生存创造条件. 尿素酶的活性与镍离子的存在有密切关系. 因此 Ure 和 Hsp A 之间通过镍离子建立

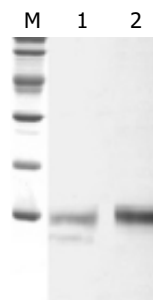


图5 重组蛋白 HspA-His₆ and HspA 的免疫印记分析. M: Marker(97 400, 66 200, 43 000, 31 000, 20 100, 14 400); 1: HspA-His₆; 2: HspA.

起一定的联系, 在决定 *H pylori* 定植效率方面起协同作用^[30]. 我们将 hspA 基因克隆至 pQE-60 中, 因 pQE-60 中含有 6 个组氨酸, 以利于用镍亲和柱纯化, 因此我们将 hspA 基因以带有和不带有 his₆ 尾巴两种形式表达. 通过纯化实验发现, HspA 无论在表达形式 (可溶表达或包涵体) 还是在与亲和柱结合上比 HspA-His₆ 的效果都要好. 这可能是 his₆ 尾巴的加入不但没有增强与镍亲和柱的结合, 反而干扰了 HspA 可溶性表达和 HspA 原有的结合镍离子的作用区域, 实属画蛇添足. 实验研究表明 HspA 对镍离子有很强的网络能力, 这为 *H pylori* 含有 HspA 的融合疫苗通过镍离子亲和层析纯化打下基础. 实验中所获得的高纯度的 HspA 蛋白为进一步进行动物免疫实验提供了大量抗原.

4 参考文献

- 1 Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, Yamamoto K, Miyazaki Y, Yasunaga Y, Shinomura Y, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K, Matsuzawa Y. *Helicobacter pylori*-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1384-1391
- 2 Suleymanov Z. Expression of class I and II MHC receptors in *Helicobacter pylori*-positive patients with active gastritis and duodenal ulcer. *Turk J Gastroenterol* 2003;14:168-172
- 3 Loughlin MF. Novel therapeutic targets in *Helicobacter pylori*. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:725-735
- 4 Perri F, Qasim A, Marras L, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):53-60
- 5 Lamarque D, M Peek R Jr. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):21-30
- 6 Nardone G, Morgner A. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):44-52
- 7 Leung WK, Graham DY. Ulcer and gastritis. *Endoscopy* 2001;33:8-15
- 8 Jimenez FP, Estevez MP. Role of cytokines in chronic gastritis by *Helicobacter pylori*. *Acta. Gastroenterol Latinoam* 2001;31:137-141
- 9 Tytgat G. *Helicobacter pylori*: past, present and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):G30-33
- 10 Kagawa J, Honda S, Kodama M, Sato R, Murakami K, Fujioka T. Enterocromaffin-like cell tumor induced by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002;7:390-397
- 11 Eamranond PP, Torres J, Munoz O, Perez-Perez GI. Age-specific immune response to HspA in *Helicobacter pylori*-positive persons in Mexico. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:983-985

- 12 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M_{18 000} OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 13 Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction, expression and antigenic study of bivalent vaccine candidate with 26 000 OMP and heat short protein A of human *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:862-867
- 14 Yi P, Li G, Liu S, Luo S, Tao X. Effect of xiaokuiling prescription on the expression of HSP72, HSP B in gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. *J Tongji Med Univ* 2001;21:310-313
- 15 Lock RA, Coombs GW, McWilliams TM, Pearman JW, Grubb WB, Melrose GJ, Forbes GM. Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2002;7:175-182
- 16 Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ItB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. *World J Gastroenterol* 2004;10:2675-2679
- 17 Fujii R, Morihara F, Fukushima K, Oku T, Hifumi E, Uda T. Recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against *H pylori*-associated disease. *Biotechnol Bioeng* 2004;86:737-746
- 18 Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- 19 Mehta N, Benoit S, Maier RJ. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* 2003;35:229-234
- 20 Lu DS, Mao XH, Zou QM, Wu C, Yang J, Zhang WJ, Wang FK, Xie QH, Luo P. Recombinant *Helicobacter pylori* urease B subunit and its biological properties. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2003;23:549-552
- 21 Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6499-6503
- 22 Suerbaum S, Thiberge JM, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol* 1994;14:959-974
- 23 Ren H, Yi C. Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric adenocarcinoma. *J Tongji Med Univ* 1999;19:127-130
- 24 Presecki V, Katicic M, Kalenic S, Strnad M, Plecko V, Babus V, Dominis M. A vaccine against *Helicobacter pylori* infection. *Lijec Vjesn* 2002;124(Suppl 1):79-82
- 25 Li MF, Ling Z, Zhang YC, Ma AY, Sun JX, Shi HJ, Wu XF. *Helicobacter pylori* HspA Heat-shock protein gene cloning, Expression and immunogenicity. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 1999;31:264-268
- 26 Liu CJ, Zhang ZS, Li SQ, Huang CF. Cloning and secretion expression of heat-shock protein 70 gene of *Helicobacter pylori*. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2000;32:524-528
- 27 Li MF, He ZY, Ling Z, Wang JY, Sheng XD, Yang GZ, Wu XF. A Candidate oral vaccine to *Helicobacter pylori* fusion protein of HspA and CtxB. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2001;33:360-364
- 28 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D12-19
- 29 Asante MA, Mendall MA, Ballam L, Morris J, Northfield TC. Relationship between *Helicobacter pylori*, gastric parietal cell antibodies and heat shock proteins. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1365-1370
- 30 Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleanthous H, Ermak TH, Soman G, Hill JE, Ackerman SK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 1995;172:161-172

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 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣。

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行。中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会。新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话。国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届。

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始。所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于2004-12-21产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种。

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果。(世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)