

幽门螺杆菌培养及抗原蛋白的分离纯化

赵圣国, 王加启, 刘光磊, 程金波, 张春刚

背景资料
利用幽门螺杆菌(*H. pylori*)的抗原蛋白制作疫苗, 免疫乳牛后, 能够生产抗*H. pylori*的免疫乳, 人饮用后, 可预防和治疗*H. pylori*感染, 为预防*H. pylori*感染提供新的思路, 避免药物副作用等。

赵圣国, 王加启, 刘光磊, 程金波, 张春刚, 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室 北京市100094
国家“十一五”科技攻关奶业重大专项资助项目, No. 2006BAD04A03
作者贡献分布: 赵圣国对此文做主要贡献; 此课题由王加启提出设计; 刘光磊, 程金波和张春刚对本文修改和审阅; 文章思路及写作由赵圣国完成。
通讯作者: 王加启, 100094, 北京市圆明园西路2号, 中国农科院北京畜牧兽医研究所. wang-jia-qi@263.net
电话: 010-62810458
收稿日期: 2007-09-13 修回日期: 2008-02-27

Culture of *Helicobacter pylori* and purification of antigen protein

Sheng-Guo Zhao, Jia-Qi Wang, Guang-Lei Liu, Jin-Bo Cheng, Chun-Gang Zhang

Sheng-Guo Zhao, Jia-Qi Wang, Guang-Lei Liu, Jin-Bo Cheng, Chun-Gang Zhang, State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100094, China
Supported by: the Dairy Momentous Project of National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2006BAD04A03
Correspondence to: Jia-Qi Wang, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, 2 Yuanmingyuan Western Road, Beijing 100094, China. wang-jia-qi@263.net
Received: 2007-09-13 Revised: 2008-02-27

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) live in the stomach of human. It is a kind of curve bacteria which can lead to chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Usually, antibiotics are used to treat the patients, but they have a lot of side effects. Milk of milch cow immunized with *H. pylori* vaccine can prevent and treat the infection of *H. pylori* without side effects. During the production of immune milk, the basic work is to prepare vaccine. During the preparation of sub-unit vaccine, key is to isolate and purify the antigen protein. In this article, we discuss the culture of *H. pylori* (solid and liquid culture), the recombinant expression and purification of its antigen protein (urease, VacA, CagA and lipopolysaccharide).

Key Words: *Helicobacter pylori*; Culture; Urease;

Vacuolization cytotoxin A; Cytotoxin associated antigen A; Lipopolysaccharides

Zhao SG, Wang JQ, Liu GL, Cheng JB, Zhang CG. Culture of *Helicobacter pylori* and purification of antigen protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(10): 1098-1104

摘要

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是一种生存于人胃中的弯曲状菌, 能导致人的慢性胃炎, 消化性溃疡和胃癌, 其治疗多用抗生素治疗, 但其副作用较大。给奶牛免疫*H. pylori*疫苗后, 其分泌的牛奶中含抗*H. pylori*的免疫球蛋白, 能够预防和治疗人类*H. pylori*感染, 且没副作用。在生产免疫乳时, *H. pylori*疫苗制备是基础性工作, 并且在亚单位疫苗中, 抗原蛋白的制备和分离纯化又最为关键。本文就*H. pylori*的培养(固体和液体培养)和抗原蛋白(尿素酶、空泡毒素、毒素相关蛋白和脂多糖)的理化性质、重组表达以及分离纯化方法进行比较研究。

关键词: 幽门螺杆菌; 培养; 尿素酶; 空泡毒素; 毒素相关蛋白; 脂多糖

赵圣国, 王加启, 刘光磊, 程金波, 张春刚. 幽门螺杆菌培养及抗原蛋白的分离纯化. 世界华人消化杂志 2008; 16(10): 1098-1104
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1098.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是1983年从澳大利亚患者炎性胃角上皮细胞分离出来, 现已证实在全世界人群中的感染率达50%以上, 而在我国人群中感染率则高达58.07%^[1-2]。感染*H. pylori*后, 能引起慢性胃炎和消化性溃疡, 还易转变成胃癌和胃MALT淋巴瘤^[3-5]。目前主要使用抗生素进行治疗, 但抗生素治疗存在一定的不良反应, 且产生耐药性。给奶牛免疫*H. pylori*疫苗后, 其分泌的牛奶中含抗*H. pylori*的免疫球蛋白, 能够预防和治疗*H. pylori*感染^[6-9]。在此项技术中, *H. pylori*疫苗的制备是首当其冲的工作。*H. pylori*全菌疫苗抗原成分复杂, 制备疫苗存在很多困难^[10-11]。而亚

同行评议者
白文元, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

表 1 幽门螺杆菌培养基的选择

| 菌种 | 基础培养基 | 抗生素 | 添加物 | 培养结果 | 参考文献 |
|-------------|--------------|---|---|----------------------------|--|
| ATCC 43504 | 脑心浸液 (BHI) | 萘啶酸(10 g/L, 万古霉素(6 g/L), 两性霉素B(2 g/L), 多黏菌素B(16 g/L) | 50 g/L改良的巧克力琼脂(新鲜羊血 热羊血 = 2 1), 10 g/L Isovitalex | 分离率: 92.6% | Ding <i>et al</i> ^[14] , 2001 |
| 12476 (恒河猴) | 布氏肉汤 琼脂(固) | 万古霉素(3 mg/L), 甲氧苄二氢嘧啶(5 mg/L), 两性霉素B(2 mg/L) | 脱纤维蛋白马血(50 mL/L), IsoVitalX(10 mL/L), 氯血红细胞素(1 g/L) | 7×10^{13} CFU/L | Kitsos <i>et al</i> ^[15] , 1998 |
| 12476 (恒河猴) | 布氏肉汤 琼脂(液) | 万古霉素(3 mg/L), 甲氧苄二氢嘧啶(5 mg/L), 两性霉素B(2 mg/L) | 脱纤维蛋白马血(50 mL/L), IsoVitalX(10 mL/L), 氯血红细胞素(1 g/L) | 6.8×10^{13} CFU/L | Kitsos <i>et al</i> ^[15] , 1998 |
| CCUG 17874 | 布氏肉汤 (液) | 头孢噻啶(6 mg/L), 万古霉素(5 mg/L), 甲氧苄二氢嘧啶(10 mg/L), 两性霉素B(8 mg/L) | (2, 6-di- <i>O</i> -methyl)- β CD(2 g/L) | $1.85 A_{580nm}$ | Marchini <i>et al</i> ^[16] , 1995 |
| ATCC 49503 | 脑心浸液 琼脂(BHI) | 100 mL含TMP 50 mg, 古霉素 60 mg, 多黏菌素B 2500 IU, 两性霉素20 mg | 2, 6-di- <i>O</i> -methyl- β -cyclodextrin | 无 | Ohno <i>et al</i> ^[17] , 2007 |
| NCTC 11637 | 哥伦比亚 琼脂(CAB) | 40 mL中含万古霉素(16 mg), 两性霉素B(16 mg), 多黏菌素B(0.6 mg), 三甲氧苄二氢嘧啶(8 mg) | 脱纤维绵羊血 | 4.0×10^{11} CFU/L | 谢献胜 <i>et al</i> ^[18] , 2006 |

研发前沿
利用乳牛生产抗
*H. pylori*免疫乳,
抵抗人类*H. pylori*
感染是一很好的
思路, 在此过程中
*H. pylori*疫苗制作
最为重要, 有必要
对*H. pylori*的培养
和抗原蛋白的制
备及分离纯化进
行思考和研究。

单位疫苗逐渐引起人们的重视, 单一*H. pylori*抗原的免疫保护率几乎低于80%, 2种以上抗原组合可获得理想的保护效果, 显示了多价疫苗将成为今后*H. pylori*疫苗研究的主要方向^[12-13]。因此, 菌体抗原蛋白的制备和分离纯化显得尤为重要。现就*H. pylori*培养和尿素酶(Urease)、空泡毒素A(vacuolization cytotoxin A, VacA)、毒素相关蛋白A(cytotoxin associated antigen A, CagA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的重组表达和分离纯化研究进展进行阐述, 为下一步免疫乳牛和生产免疫乳奠定基础。

1 *H. pylori*的分离培养

*H. pylori*是一种S型、弧形或弯曲形的革兰氏阴性细菌, 生化反应中尿素酶阳性, 过氧化氢酶阳性, 氧化酶阳性、马尿酸钠阴性。*H. pylori*对营养要求较高, 在微需氧、适度温度、37℃环境下缓慢生长, 一般需要3-7 d的时间才能形成针尖半透明的小菌落^[14-18](表1)。

在制备抗原疫苗时, 需要对细菌进行大量规模化培养, 常规的固体平板培养无法满足菌量需求。所以, 用液体培养基培养细菌已越来越多的用于疫苗生产中。但是含血清的菌液, 抗原的纯化特别困难, 多次洗涤细菌, 可能导致细菌表面蛋白的大量损失, 并且成本高^[15,19-20]。实验表明, 在用添加有环糊素的液体培养基发酵细

菌时, 也能得到与添加血清一样的效果。因此, 在用液体培养基培养*H. pylori*时, 常选用国际标准菌株, 在基础培养基中添加复合抗生素, 以抑制其他细菌生长, 并向基础培养基中添加营养性添加剂, 如环糊精, 经过37℃, 振荡箱中培养几天后, 便可以得到理想的菌体产量。

2 *H. pylori*的主要抗原蛋白

2.1 Urease $M_r = 380\,000 \pm 30\,000$, 等电点5.99 ± 0.03 , 最适pH8.2, K_m 值 0.3 ± 0.1 mmol/L。*H. pylori* Urease单体由A、B两个亚单位组成, 呈六聚体, M_r 分别为 $62\,000 \pm 2000$ 和 $30\,000 \pm 1000$ ^[21-22]。Urease被认为是最有代表性的毒素, 占细菌可溶性蛋白的6%, 其水解产生的氨能够中和胃酸, 保护细菌本身免受伤害。同时尿素的水解产物氢氧化铵可以明显的造成组织损害, 细菌过度生长促使硝酸盐降解为亚硝酸盐及亚硝酸而产生致癌作用。

2.2 VacA 在中性环境中是无活性的, 必须在酸性环境下解离成 M_r 为90 000的单体, 才具活性。*H. pylori*首先编码产生 M_r 约140 000的VacA前体蛋白, 经降解信号序列(s)及跨膜输出段后产生 M_r 为95 000的分泌性活性毒素VacA, 他是一种AB型毒素, 进一步降解产生 M_r 为37 000的A亚单位与58 000的B亚单位^[26-27]。VacA型*H. pylori*菌株能导致正常细胞空

创新盘点

本文系统性总结前人培养*H pylori*的方法,并提出液体培养法更能提高菌体产量,并总结4种*H pylori*抗原蛋白的制备和分离纯化的方法,提出通过基因重组表达再利用各种层析方法获得高纯度蛋白。

表 2 *H pylori*抗原蛋白的重组表达

| 抗原蛋白 | 基因提取 | 重组载体 | 转化细菌 | 诱导表达 | 结果 | 参考文献 |
|--------|----------|--------------------|---------------------------|--------------------|---|---|
| Urease | 酚/氯仿抽提 | pHP802 | <i>E.coli</i> HB101, DH5a | IPTG诱导表达, LA液体培养基 | Western blot证实获得UreB重组蛋白 | Hu <i>et al</i> ^[45] , 1992 |
| Urease | CTAB法抽提 | pIRES | 减毒沙门氏菌LB5000 | IPTG诱导表达, LB培养液 | 扩增出的ure基因和基因库中的相同, Western blot检测到特异性蛋白条带 | 徐灿, <i>et al</i> ^[46] , 2005 |
| Urease | 基因组抽提试剂盒 | pET28 | <i>E.coli</i> BL21 | IPTG诱导表达, LB培养液 | PCR扩增出414 bp的目的片段, 免疫印迹表明、重组蛋白能够被特异性血清识别 | 袁小澎 <i>et al</i> ^[47] , 2007 |
| VacA | 酚/氯仿抽提 | pMM592 | <i>E.coli</i> ER2566 | IPTG诱导表达, TBKAN培养液 | 免疫印迹分析, 能与 <i>H pylori</i> (+)患者血清发生结合, ELASA检验重组蛋白有良好的抗原性 | McClain <i>et al</i> ^[48] , 2003 |
| VacA | 酚/氯仿抽提 | pQE31 | <i>E.coli</i> M15 | IPTG诱导表达, LA培养液 | SDS-PAGE显示表达产物 M_r 为37 000和58 000 | 杨贵珍 <i>et al</i> ^[49] , 2006 |
| VacA | 碱裂解法 | pET32a | <i>E.coli</i> BL21 | IPTG诱导表达, LB培养液 | ELASA检验重组蛋白有良好的抗原性 | 段秀杰 <i>et al</i> ^[50] , 2006 |
| CagA | 基因组提取试剂盒 | pMD18-T, pGEX-4T-1 | <i>E.coli</i> TOP10 | IPTG诱导表达, LB培养液 | SDS-PAGE显示表达产物 M_r 为37 000和60 000, 免疫印迹分析, 能与 <i>H pylori</i> (+)患者血清发生结合 | 宁云山 <i>et al</i> ^[51] , 2006 |
| CagA | 基因组提取试剂盒 | pMG36e | <i>L. lactis</i> | IPTG诱导表达 | DNA序列分析表明重组基因与原基因有97.4%的一致性, Western bolt证实了重组蛋白的存在及强的免疫原性 | Kim <i>et al</i> ^[52] , 2006 |
| CagA | 基因组提取试剂盒 | pET42a | <i>E.coli</i> BL21 | IPTG诱导表达, LB培养液 | 该抗原检测抗体的敏感性为92.9% | 张静 <i>et al</i> ^[53] , 2005 |

泡样变、细胞凋亡、细胞骨架重排等形态学改变,与消化性溃疡、胃癌等密切相关^[28-30]。

2.3 CagA 是一种具有强免疫原性的亲水性外膜蛋白,不同菌株CagA的 M_r 范围是128 000-140 000。CagA蛋白的等电点为9.72,是疏水性蛋白,无前导肽及跨膜区^[31-32]。CagA与VacA在临床上密切相关, CagA对于VacA的转录后折叠、胞外运输、甚至毒素正常功能都必不可少。CagA的存在更适于*H pylori*定居在胃黏膜上, CagA能提高黏膜炎症反应程度。CagA阳性的*H pylori*能够引起更严重而长期的胃黏膜炎症反应,而长期的慢性炎症易导致胃黏膜萎缩,并发展成为慢性萎缩性胃炎,甚至胃癌^[33-34]。

2.4 LPS 是革兰氏阴性菌胞膜的主要组成成分,

H pylori LPS由内核和脂质A组成,多糖成分主要含有半乳糖、氨基葡萄糖、葡萄糖等^[36-37]。*H pylori*与沙门氏菌和大肠杆菌相比,其LPS免疫活性更低,因为小鼠的半数致死量,*H pylori* LPS要高出大肠与沙门菌LPS的500-10 000倍。*H pylori* LPS能加速组织胺的释放和DNA合成,还能增加胃黏膜细胞的超氧阴离子,引起胃黏膜细胞凋亡^[38-39]。

3 抗原蛋白的制备及分离纯化

3.1 抗原蛋白的制备 *H pylori*中的抗原蛋白的制备,一种方法是,通过固体或液体培养基大量培养*H pylori*后,直接从菌液中进行提取,这种方法操作比较简单,耗时少,容易掌握。但是*H pylori*

表 3 *H pylori*抗原蛋白的纯化

| 抗原蛋白 | 初步分离 | 纯化 | 结果 | 参考文献 |
|--------|------------------------|--|---|--|
| Urease | 离心 重悬 超速离心 | 凝胶过滤层析(Superose 12 HR 10/30柱, 缓冲液20 mmol/L磷酸盐和0.15 mmol/L NaCl, pH7.4) 过夜透析 阴离子交换层析(DEAE - 5PW SpHerogel TSK - IEX柱, pH7.0, 20 mmol/L磷酸盐缓冲液) 500 mmol/L NaCl线性梯度洗脱 | 尿素酶回收率为80%, 当把细菌暴露在200 - 1000 mL/L的乙醇中时, 总酶活力达70%, 尿素能被浓缩112倍, 总回收率达13% | Dunn <i>et al</i> ^[54] , 1990 |
| Urease | 离心 | DEAE - SepHarose层析 pHenyl - SepHarose层析 Mono Q层析 Superose 6层析 | 尿素酶能浓缩1070倍, 产量达25% | Todd <i>et al</i> ^[55] , 1987 |
| Urease | 重悬 细菌破碎 离心除膜 | DEAE - 琼脂糖凝胶层析(1.5 - 7.5 cm) 23 , 分阶段性用PHenyl - 琼脂糖凝胶(1.5 - 12 cm), Mono - Q(HR5/5), Superose 6(1.0 - 29.5 cm) | 尿素酶浓缩17倍, SDS - PAGE检验只有一条条带 | Hu <i>et al</i> ^[56] , 1990 |
| Urease | 离心 重悬 细菌破碎 离心除膜 | DEAE - SepHarose柱层析 pHenyl - SepHarose柱层析 Mono - Q柱层析 Superose 6柱层析 | 尿素酶吸光度2.0A | Hu <i>et al</i> ^[56] , 1990 |
| Urease | 离心 重悬 细菌破碎 超滤 | 离子交换层析(Source Q15离子交换柱), NaCl梯度洗脱 | <i>H pylori</i> 阳性检出率100% (12/12), 阴性符合率100% (18/18). 特异性良好 | 白慕群 <i>et al</i> ^[57] , 2000 |
| VacA | 离心 盐析 离心 重悬 | 疏水作用层析(pHenyl - Superose HR 5/5柱) 凝胶过滤层析(Superose 12 HR 16/50柱) 阴离子交换层析(Mono - Q HR 515柱, NaCl梯度洗脱) | 经过三步层析后, 空泡毒素效价在24 000 ± 5600, 浓缩倍数能够达到5333倍 | Cover <i>et al</i> ^[58] , 1992 |
| VacA | 离心 盐析 离心 重悬 微滤 | 凝胶过滤层析(Superose 12 HR 16/50或 Superose 6 HR 16/50柱, 60 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, pH7.5) | | Cover <i>et al</i> ^[58] , 1992 |
| VacA | 离心 盐析 密度梯度离心 | 自动Densi - Flow IIC装置 | | Cover <i>et al</i> ^[59] , 1997 |
| VacA | 溶菌酶处理 超声波 离心 | NiTEM™树脂柱平衡后, 用混合液(50 mmol/L Tris, pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Imidazole)洗脱 离心 | | 段秀杰 <i>et al</i> ^[50] , 2006 |
| VacA | 盐析 离心 透析 离心 | 吸附层析 盐析 重悬 透析 疏水作用层析(PHenyl - SepHarosc CL - 4B柱) 阴离子交换层析(DEAE - E SepHamsc FF柱, NaCl连续梯度洗脱 凝胶过滤层析 透析 离心 快速蛋白液相层析系统(FPLC) AKTA explorer - 900 | VacA蛋白浓度为0.125 mg/mL, 比活力达20 480, 与上清原液相比纯化倍数达4551, 产率为5 ug/L | 杜奕奇 <i>et al</i> ^[60] , 2002 |
| CagA | 离心 | SepHadexG25凝胶过滤层析 阴离子交换介质(High Q), 梯度洗脱 | 经生物电泳图象分析系统的密度扫描鉴定, 所得产物的纯度为90% | 龚岷 <i>et al</i> ^[61] , 2001 |
| CagA | 离心 | 金属螯合层析 | 经密度扫描鉴定, 这种方法所得产物的纯度为94.5% | 龚岷 <i>et al</i> ^[61] , 2001 |
| CagA | 用6 mol/L胍 透析菌液 | 凝胶过滤层析 | | Ye <i>et al</i> ^[62] , 2003 |
| LPS | 酶处理 | 辛基琼脂糖层析(用0.1 mmol/L醋酸钠, 0.5 mmol/L NaCl, pH4.7的缓冲液洗脱. 30% - 60%的线性梯度洗脱) PD - 10 脱盐柱, 2 g/L三乙胺平衡柱子 | | Yokota <i>et al</i> ^[63] , 2007 |
| LPS | 苯酚 - 氯仿 - 石 油醚处理 离心 | 上清液中脂多糖沉淀 离心 | | Slomiany <i>et al</i> ^[64] , 2003 |
| LPS | 超声波 离心 | 抽提离心 透析 DNA和RNA酶作用 水浴 离心 上清加无水乙醇 离心 沉淀用蒸馏水悬浮 透析 | | 严杰 <i>et al</i> ^[65] , 1994 |

应用要点
本文为*H pylori*疫苗的制作奠定了基础, 同时为抗*H pylori*免疫乳的生产开拓了道路。

名词解释

免疫乳: 给哺乳动物(主要指牛)选择性地接种一些能够引起人疾病的细菌、病毒或其他一些外来抗原刺激机体产生免疫应答, 以分泌特异性的抗体-免疫球蛋白, 并使其进入乳中, 这种乳称为免疫乳。

培养比较困难, 尤其是液体培养, 且抗原蛋白中含有很多的杂蛋白, 在蛋白提纯时比较费时费力, 同时需应用佐剂才能诱导有效的免疫反应, 而佐剂大多数对机体有不同程度的毒性作用, 因此用基因工程方法, 对抗原蛋白基因进行重组表达制备疫苗, 成为一种切实有益的途径^[21-30,40]。抗原蛋白的重组表达程序: 先从*H pylori*菌体中提取基因, 再利用设计好的相应抗原蛋白的基因引物, 进行PCR扩增, 得到大量的抗原蛋白基因片段, 再将这些片段通过双酶切和连接酶作用结合到质粒载体上, 得到重组载体。通过转化作用将其转移到细菌内, 根据重组载体的标志作筛选, 挑取单斑, 抽提质粒后双酶切鉴定。以阳性质粒转化表达宿主菌的感受态细胞, 接种LA(B)培养基, 用IPTG进行诱导表达, 便可得到大量高纯度抗原蛋白^[13,41-42]。*H pylori*重组表达时, 同样的载体、同样的系统, 很可能表达这个蛋白表达量奇高, 但是另外一个就是做不出来, 所以没有万能的载体, 只有永恒的分析。我们用大肠杆菌做受体菌, 是由于其易于生长和控制; 培养成本低; 可供选择质粒丰富, 但是也会形成包涵体而影响表达蛋白的生物学活性。常用的抗原蛋白重组表达方式见表2。

3.2 抗原蛋白的分离纯化 *H pylori*抗原蛋白的分离纯化, 是利用不同蛋白间内在的相似性与差异性, 利用各种蛋白间的相似性来除去非蛋白物质的污染, 而利用各蛋白质的差异将目的蛋白从其他蛋白中纯化出来。蛋白的纯化大致分为粗分离阶段和精细纯化阶段。粗分离阶段主要将*H pylori*抗原蛋白和*H pylori*细胞成分如DNA、RNA等分开。一般是将*H pylori*菌液离心, 用缓冲液或水重悬, 硫酸铵盐析, 再用透析袋透析。此方法操作简单, 但同时分离得到的抗原蛋白纯度特别低, 里面含有大量的杂蛋白, 在对机体进行免疫时, 会产生交叉反应^[43-45]。*H pylori*抗原蛋白精细纯化阶段则需要更高的分辨率, 此阶段是把*H pylori*目的蛋白与那些大小及理化性质接近的蛋白区分开来。目前, 人们多用层析技术对*H pylori*抗原蛋白进行精细纯化, 其包括凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水作用层析、亲和层析等^[21-26]。凝胶过滤层析纯化的蛋白范围太宽, 而且只对球形的蛋白比较适合, 常用于第一步纯化; 离子交换层析过程中有更多的参数可以调整以获得最优的纯化效果, 但仅此一步还是得不到纯的蛋白; 疏水作用层析由于在高盐浓度下上样, 所以更适合于离子交换层析的

下一步; 亲和层析成本比较高, 单抗结合力太强也易被酶破坏, 但是纯化的浓缩率特别高, 适于纯化过程后期使用^[27-32]。所以, 在对*H pylori*抗原蛋白样品进行层析时, 要首先明白各抗原蛋白的等电点, M_r 大小, 组合形式等。根据蛋白的性质选择合适的层析柱, 并合理的调节缓冲液的pH值, 离子强度以及洗脱液的pH值, 离子强度。并综合利用多种层析方法(表3), 以达到最终抗原蛋白纯度要求^[33-39]。

鉴于以上研究结果, 在对*H pylori*大规模培养时, 多选用液体培养法, 可以用环糊精代替血清而提供营养。*H pylori*重组表达后也可以获得大量高纯度的抗原蛋白(Urease、VacA、CagA和LPS), 此方法多选用质粒做载体, 大肠杆菌做受体菌, IPTG做诱导。制备好抗原蛋白后, 我们可以采用离心、盐析、透析后层析(凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水作用层析和亲和层析)的方法纯化蛋白。利用纯化的*H pylori*抗原蛋白, 加合适的佐剂后多次免疫乳牛, 使其生产含抗*H pylori*的特异性免疫球蛋白牛奶, 加工成乳制品。人们通过饮用这种乳制品, 消除胃中的*H pylori*, 来预防和治疗*H pylori*感染。

4 参考文献

- 1 Haruma K, Manabe N, Kamada T, Shiotani A, Kusaka K. Helicobacter pylori infection and GERD. *Nippon Rinsho* 2007; 65: 841-845
- 2 Raymond J, Bergeret M, Kalach N. Helicobacter pylori infection in children. *Presse Med* 2008; 37: 513-518
- 3 Wang C, Yuan Y, Hunt RH. The association between Helicobacter pylori infection and early gastric cancer: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1789-1798
- 4 Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007; 133: 659-672
- 5 Daniele B. Insights in Gastric Carcinogenesis From Helicobacter pylori Infection. *J Clin Gastroenterol* 2008
- 6 Thapa BR. Therapeutic potentials of bovine colostrums. *Indian J Pediatr* 2005; 72: 849-852
- 7 Courillon-Mallet A. Treatment of Helicobacter pylori infection. *Presse Med* 2008; 37: 535-538
- 8 Korhonen H, Syväoja EL, Ahola-Luttila H, Sivelä S, Kopola S, Husu J, Kosunen TU. Bactericidal effect of bovine normal and immune serum, colostrum and milk against Helicobacter pylori. *J Appl Bacteriol* 1995; 78: 655-662
- 9 Aboderin OA, Abdu AR, Odetoyin B, Okeke IN, Lawal OO, Ndububa DA, Agbakwuru AE, Lamikanra A. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. *Afr Health Sci* 2007; 7: 143-147
- 10 Kabir S. The current status of Helicobacter pylori vaccines: a review. *Helicobacter* 2007; 12: 89-102
- 11 Svennerholm AM, Lundgren A. Progress in vaccine

- development against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 146-156
- 12 Arora S, Czinn SJ. Vaccination as a method of preventing *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1890-1891
 - 13 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
 - 14 Ding HJ, Liu YC, Peng CF, Wang WM, Chen YW, Huang YF, Lin CC, Chen CY. An efficient method for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies with two-section petri dishes. *J Gastroenterol* 2001; 36: 237-241
 - 15 Kitsos CM, Stadtländer CT. *Helicobacter pylori* in liquid culture: evaluation of growth rates and ultrastructure. *Curr Microbiol* 1998; 37: 88-93
 - 16 Marchini A, d'Apolito M, Massari P, Atzeni M, Copass M, Olivieri R. Cyclodextrins for growth of *Helicobacter pylori* and production of vacuolating cytotoxin. *Arch Microbiol* 1995; 164: 290-293
 - 17 Ohno H, Murano A. Serum-free culture of *H. pylori* intensifies cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 532-537
 - 18 谢献胜, 王锋, 陆桂平, 卢伟, 崔山, 周冬仁. 幽门螺杆菌的培养与保存. 泰州职业技术学院学报 2006; 6: 51-53
 - 19 Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF, Abate L, Esposito E, de Gregorio L, Aziz J. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 160-162
 - 20 Dore MP, Osato MS, Malaty HM, Graham DY. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. *Helicobacter* 2000; 5: 165-168
 - 21 Yuan XP, Zhou QM, Bai Y, Yang J, Guo Y, Zhang WJ, Liu ZX. Purification and functional analysis of *Helicobacter pylori* UreB protein fragment. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2007; 27: 959-962
 - 22 Rokita E, Makristathis A, Hirschl AM, Rotter ML. Purification of surface-associated urease from *Helicobacter pylori*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 737: 203-212
 - 23 Bourke B, Jones NL. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 24-29
 - 24 Mobley HL, Hu LT, Foxall PA. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1991; 187: 39-46
 - 25 盛涛, 张建中. 幽门螺杆菌尿素酶研究现状. 世界华人消化杂志 1999; 7: 881-884
 - 26 Roche N, Ilver D, Angstrom J, Barone S, Telford JL, Teneberg S. Human gastric glycosphingolipids recognized by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA. *Microbes Infect* 2007; 9: 605-614
 - 27 Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 320-332
 - 28 Shirasaka D. *Helicobacter pylori* VacA and gastric ulcer. *Int J Hematol* 2006; 84: 316-318
 - 29 Sokić-Milutinović A, Todorović V, Milosavljević T. Clinical significance of infection with cag A and vac A positive *Helicobacter pylori* strains. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132: 458-462
 - 30 Hirayama T. Virulence mechanism of *Helicobacter pylori* VacA. *Nippon Saikingaku Zasshi* 2007; 62: 387-396
 - 31 Tsutumi R, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and SHP-2 tyrosine phosphatase. *Seikagaku* 2005; 77: 1269-1273
 - 32 Baek HY, Lim JW, Kim H. Interaction between the *Helicobacter pylori* CagA and alpha-Pix in gastric epithelial AGS cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1096: 18-23
 - 33 Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol* 2008; 57: 145-150
 - 34 Gatti LL, Lábio R, Silva LC, Smith Mde A, Payão SL. cagA positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 254-258
 - 35 Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA - a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 2006; 119: 1217-1223
 - 36 Grebowska A, Rechciński T, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Moran A, Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Owczarek A, Dziuba M, Krzemińska-Pakuła M, Planeta-Malecka I, Rudnicka W, Chmiela M. Potential role of LPS in the outcome of *Helicobacter pylori* related diseases. *Pol J Microbiol* 2006; 55: 25-30
 - 37 Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ. *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30 Suppl 3: S259-S260
 - 38 Kawahara T, Teshima S, Kuwano Y, Oka A, Kishi K, Rokutan K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G726-G734
 - 39 Moran AP. Lipopolysaccharide in bacterial chronic infection: insights from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and lipid A. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 307-319
 - 40 宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2605-2609
 - 41 Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM, Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun* 2000; 68: 2560-2565
 - 42 Hocking D, Webb E, Radcliff F, Rothel L, Taylor S, Pinczower G, Kapouleas C, Braley H, Lee A, Doidge C. Isolation of recombinant protective *Helicobacter pylori* antigens. *Infect Immun* 1999; 67: 4713-4719
 - 43 Kaihovaara P, Salmela KS, Roine RP, Kosunen TU, Salaspuro M. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 1220-1225
 - 44 Lee SG, Calhoun DH. Urease from a potentially pathogenic coccoid isolate: purification, characterization, and comparison to other microbial ureases. *Infect Immun* 1997; 65: 3991-3996
 - 45 Hu LT, Foxall PA, Russell R, Mobley HL. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. *Infect Immun* 1992; 60: 2657-2666
 - 46 徐灿, 李兆申, 屠振兴, 杜奕奇, 龚燕芳, 金晶, 满晓华, 孙波, 杨晔, 许国铭. 携带幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的重组减毒鼠伤寒沙门菌核酸疫苗的构建. 上海医学

同行评价
本文思路清晰, 参考文献较新, 具有较好的学术价值。

- 2005; 28: 308-310
- 47 袁小澎, 邹全明, 吴超, 张卫军, 郭鹰. 幽门螺杆菌尿素酶B亚单位功能片段构建及免疫原性研究. 广东医学 2007; 28: 521-523
- 48 McClain MS, Cover TL. Expression of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2003; 71: 2266-2271
- 49 杨贵珍, 刘钟滨, 袁建平, 胡宝瑜, 时晓东, 郭晓奎. 幽门螺杆菌空泡形成细胞毒素A亚单位的克隆表达和P37抗体的制备. 胃肠病学 2006; 11: 542-547
- 50 段秀杰, 邵世和, 闻平, 王文凯. 幽门螺杆菌VacA重组蛋白表达、纯化及鉴定. 中国微生态学杂志 2006; 18: 27-29
- 51 宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌标准株NCTC11639 CagA基因的克隆表达及其抗原性的鉴定. 中华检验医学杂志 2006; 29: 741-742
- 52 Kim SJ, Jun DY, Yang CH, Kim YH. Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72: 462-470
- 53 张静, 陈月秀, 余菲菲. 幽门螺杆菌CagA M1基因表达抗原的纯化及应用. 中国人兽共患病杂志 2005; 21: 495-498
- 54 Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1990; 265: 9464-9469
- 55 Todd MJ, Hausinger RP. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. *J Biol Chem* 1987; 262: 5963-5967
- 56 Hu LT, Mobley HL. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1990; 58: 992-998
- 57 白慕群, 卢戌, 文洁. 幽门螺杆菌尿素酶抗原的分离及纯化. 微生物学免疫学进展 2000; 28: 19-21
- 58 Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-10575
- 59 Cover TL, Hanson PI, Heuser JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 1997; 138: 759-769
- 60 杜奕奇, 李兆申, 屠振兴, 蒋应用, 许圉铭, 龚燕芳. 幽门螺杆菌VacA蛋白的纯化. 现代消化及介入诊疗杂志 2002; 7: 15-17
- 61 龚岷, 梁布锋, 张元兴. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A的分离纯化. 中华微生物学和免疫学杂志 2001; 21: 388
- 62 Ye SJ, Fang PC, Mao GG, Li CL, Qiu X, Chen HX. Purification and relationship with gastric disease of a 130 kDa (CagA) protein of *Helicobacter pylori*. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 232-235
- 63 Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, Fujii N, Amano K. Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 140-148
- 64 Slomiany BL, Slomiany A. Platelet-activating factor modulates gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 261-266
- 65 严杰, 方平楚. 幽门螺杆菌脂多糖生物学活性的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 1994; 14: 196-198

编辑 潘伯荣 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、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、解放军医学图书馆CMCC系统、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)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-08)