

幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因缺失突变体的构建

韩秀萍, 展德文, 王 芑, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张 丽, 邱 炎, 李家奎, 刘纯杰

韩秀萍, 展德文, 王 芑, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张丽, 邱炎, 刘纯杰, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

韩秀萍, 李家奎, 华中农业大学动物医学院 湖北省武汉市 430070

十一·五863“疫苗与抗体工程”重大基金资助项目, No. 2006AA02A219

十一·五国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2008BAI66B03
十一·五重大传染病专项课题基金资助项目, No. 2008ZX10004-015

作者贡献分布: 韩秀萍与展德文对此文所作贡献均等; 此课题由韩秀萍与王芑设计, 研究过程由韩秀萍、展德文、李丛胜、陶好霞、袁盛凌、张丽及邱炎操作完成; 本论文写作由韩秀萍、刘纯杰、李家奎及展德文完成。

通讯作者: 刘纯杰, 副研究员, 100071, 北京市丰台区东大街20号, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所。

liucj@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-02-21 修回日期: 2010-05-02

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-08-28

Construction of an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori*

Xiu-Ping Han, De-Wen Zhan, Peng Wang, Cong-Sheng Li, Sheng-Ling Yuan, Hao-Xia Tao, Li Zhang, Yan Qiu, Jia-Kui Li, Chun-Jie Liu

Xiu-Ping Han, De-Wen Zhan, Peng Wang, Cong-Sheng Li, Sheng-Ling Yuan, Hao-Xia Tao, Li Zhang, Chun-Jie Liu, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Beijing 100071, China

Xiu-Ping Han, Jia-Kui Li, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Supported by: the Major Foundation of Vaccines and Antibody Program during the 11th Five-Year Plan Period (863 Program), No. 2006AA02A219; the National Key Technologies Research and Development Program of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008BAI66B03; and the National Specialized Research Fund for Control of Major Infectious Diseases during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008ZX10004-015

Correspondence to: Chun-Jie Liu, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Beijing 100071, China. liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: 2010-02-21 Revised: 2010-05-02

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To construct an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) to provide a basis for further study of the functions of the $hp0596$ gene.

METHODS: Two homologous arms upstream

and downstream of the $hp0596$ gene were amplified from *H.pylori* 26695 genomic DNA and cloned into a pBluescript SK II(-) vector carrying a chloramphenicol resistance cassette flanked by two FRT sites to construct a recombinant vector. The target fragment was then amplified from the recombinant vector and transformed into *H.pylori* 26695. Under antibiotic selective pressure, homologous recombination occurred between the target fragment and the genome of host strain. The recombinants were selected on chloramphenicol agar plates and identified by PCR.

RESULTS: Restriction endonuclease analyses showed that the recombinant vector (pBs-0596) was successfully constructed. An $hp0596$ gene deletion mutant of *H.pylori* 26695 was successfully obtained after identification by PCR, direct sequencing, resistance analysis, and detection of $hp0596$ expression at RNA and protein levels. After culturing for 7 generations, it was confirmed that the $hp0596$ gene deletion mutant of *H.pylori* 26695 was stable.

CONCLUSION: An $hp0596$ gene deletion mutant of *H.pylori* 26695 has been obtained successfully.

Key Words: *Helicobacter pylori*; $hp0596$ gene; Mutant

Han XP, Zhan DW, Wang P, Li CS, Yuan SL, Tao HX, Zhang L, Qiu Y, Li JK, Liu CJ. Construction of an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2579-2583

摘要

目的: 构建幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*) $hp0596$ 基因缺失突变体, 为进行 $hp0596$ 基因功能研究奠定基础。

方法: 利用PCR技术, 从*H.pylori* 26695基因组分别扩增得到 $hp0596$ 基因的上游同源臂和下游同源臂, 与两端带有FRT位点的氯霉素抗性基因片段共同构建同源重组载体; 以重组载体为模板扩增打靶片段, 将其转化入*H.pylori* 26695; 在抗生素选择压力下, 打靶片段和菌体基因组发生同源重组, 通过氯霉素抗性筛选

■背景资料

$hp0596$ 是*H.pylori*特有的基因, 与目前已知的*H.pylori*毒力基因 $cagA$ 、 $urease$ 、 $vacA$ 等没有序列相似性, 他只与J99株的jhp0543、SR7791株的HP-MP1同源以及一些临床分离菌株的相似基因有同源性, 在*H.pylori*以外的生物中还未发现与其相似的基因。

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

■相关报道

大量调查研究显示, *H. pylori* 阳性慢性胃炎患者胃黏膜组织 TNF- α 蛋白水平明显高于对照组, 而且 *H. pylori* 阳性慢性活动性胃炎患者经抗 *H. pylori* 治疗后, 胃窦黏膜组织分泌 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$).

得到带有抗性标记的重组菌.

结果: 构建的突变载体经限制性内切酶酶切分析显示, 产生的条带与预计结果完全一致. PCR方法扩增突变株 0596, cm^r 基因显示, 0596 基因已经被完全敲除, 经 DNA 测序, RNA 水平, 蛋白质水平证实筛选得到了 0596 基因缺失的 *H. pylori* 26695 Δ 0596 突变株. 连续培养 7 代后, *H. pylori* 26695 Δ 0596 突变株具有良好的稳定性.

结论: 获得了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变体.

关键词: 幽门螺杆菌; *hp0596* 基因; 突变体

韩秀萍, 展德文, 王凡, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张丽, 邱炎, 李家奎, 刘纯杰. 幽门螺杆菌 *hp0596* 基因缺失突变体的构建. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2579-2583

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2579.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种革兰氏阴性微需氧菌, 定居在胃黏膜上皮细胞间沟内及胃小凹内黏液深层中. 该菌感染呈全球性分布, 人类感染率在 50% 以上, 尤其在发展中国家, 感染率高达 80%^[1], 婴幼儿和儿童感染也很普遍. 研究表明, *H. pylori* 感染是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 并且也是诱发胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的因素之一. 机体感染 *H. pylori* 后常常导致促炎症因子的释放, 进而诱发机体发生炎症. 促炎症因子包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 和白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 等^[2]. 近期研究发现 *H. pylori* HP0596 蛋白被鉴定为一种新的毒力致病因子^[3], 他能激活 NF- κ B, 诱导机体产生 TNF- α , 增强基质细胞因子的表达, 上调 *bcl-2* 基因表达和下调 *p53* 基因表达, 而这两类因子在人类胃癌形成过程中扮演着重要的角色. 基因敲除技术是功能基因组学研究的有力工具, 即通过目的基因的缺失, 结合相应的手段分析突变体与野生株之间的差异, 以研究基因功能. 为进一步探讨 *H. pylori* 的致癌机制, 我们利用同源重组技术敲除了 *H. pylori* 26695 株的 *hp0596* 基因, 构建了幽门螺杆菌 *H. pylori* 26695 Δ 0596 缺失突变体, 为系统研究 *hp0596* 基因功能创造了条件, 也为进一步阐明 *H. pylori* 致病机制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* 国际标准菌株 *H. pylori* 26695、克隆载体 pBluescript SK II (-)、质粒 pKD3、*E. coli* DH5 α 为本实验室保存. DNA 聚合酶、限制性内切酶、dNTPs 和 DNA 连接酶购自 NEB 公司、小量质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司. 细菌基因组提取试剂盒、DNA Marker 购自天根生化试剂公司, 低分子量蛋白 Marker 为 GE 公司产品. *hp0596* 多抗由本实验室制备.

1.2 方法

1.2.1 打靶载体的构建: 根据国际标准株 *H. pylori* 26695 基因组序列, 设计两对引物 p1/p2 和 p7/p8, 并引入相应的酶切位点, 用于扩增目的基因 *hp0596* 的上游同源臂 (452 bp)、下游同源臂 (380 bp); 引物 p3/p4 扩增质粒 pKD3 上氯霉素抗性片段 (1 033 bp); 引物 p5/p6 和 p5/p8 用于鉴定目的基因两端是否丢失 (引物序列见表 1). 以 *H. pylori* 26695 基因组为模板, 用引物 p1/p2 和高保真 Pfu DNA 聚合酶扩增 *hp0596* 基因上游臂 452 bp 的片段, 即 *hp0596* 基因上游同源臂; 按照同样的方法扩增出氯霉素片段和下游同源臂; PCR 产物纯化后, 将上游臂用 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切, 氯霉素片段用 *Xho* I / *Sal* I 双酶切, 下游臂用 *Sal* I / *Bam* H I 双酶切, 他们分别与 T 载体连接, 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 具体方法参考文献 [4]. 通过蓝白斑筛选单克隆, 同时采用菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定, 初步鉴定正确的菌株送英骏公司测序. 将测序正确后的产物上游同源臂双酶切, 连接到经相同酶切的 pBluescript SK II (-) 载体上, 用化学方法转化到 *E. coli* DH5 α , 经菌落 PCR 和质粒双酶切进行鉴定后, 再将氯霉素抗性片段和下游同源臂分别双酶切, 切胶回收后连到 pBluescript SK II (-) 载体上转化 *E. coli* DH5 α , 构建出打靶载体 pBS0596, 并进行 PCR 和酶切鉴定^[5].

1.2.2 电转感受态的制备及电击转化: 参照 Yuan 等^[6] 的方法, *H. pylori* 26695 在空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上生长, 37 °C 微需氧环境 (50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂) 下培养 48 h, 用改良布氏肉汤收集菌体 1 mL, 离心 10 min 弃上清, 用 10% 甘油重复洗涤离心 3 次 (4 °C, 6 000 r/min, 10 min), 然后将沉淀重悬于 100 μ L 10% 甘油, 4 °C 静置 10 min, 然后取 5 μ L 打靶载体质粒 pBS0596 与 48 mL 感受态混合, 将混合物加入 0.1 cm 电击杯中, 迅速将 500 mL 预冷的布氏肉汤涂于无抗空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上, 24 h

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
P1	GGGGTACCGCATTAGAAGATGGTCGC
P2	CCGCTCGAGGATTTTCTAACACGC
P3	CCGCTCGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
P4	ACGCGTCGACATGGGAATTAGCCATGGTCC
P5	GATGGTAAGAAACTGAAGAG
P6	AAAGTCCCTATAGCCATG
P7	ACGCGTCGACCGTTCTCGCTATCGTCTGTTC
P8	CGGGATCCCTTTCAGTGCTGATGGATG

后转涂于氯霉素(20 mg/L)空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上, 37 °C微需氧环境(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂)下培养5 d后观察转化子。

1.2.3 全菌PCR鉴定含重组质粒的转化子: 随机挑取单克隆用布氏肉汤扩增, 用1 mL的布氏肉汤收菌, 提取基因组, 用引物p1/p8进行PCR扩增鉴定, PCR反应条件为: 95 °C预变性 5 min; 然后94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 扩增35个循环; 最后72 °C延伸 10 min^[7]。

1.2.4 *H.pylori* 26695 Δ 0596基因缺失突变株的RNA水平分析: 取敲除株*H.pylori* 26695 Δ 0596和野生株的*H.pylori* 26695单菌落, 接种到空肠弯曲菌血琼脂生长培养基中, 生长3 d后, 用1 mL的布氏肉汤收菌, 并且取1 mL培养物(约 1×10^9 CFU), 加生理盐水处理, 离心收集菌体, 500 μ L TE缓冲液重悬(终浓度为30 g/L), 然后用TRIzol提取菌体的总RNA, 具体操作按照说明书进行。得到的总RNA测定浓度后取约1 μ g作为模板, 利用随机引物反转录合成cDNA第一链, 然后再以此cDNA作为模板, 使用引物p5/p6, p5/p8进行RT-PCR分析。

1.2.5 *H.pylori* 26695 Δ 0596基因缺失突变株的全菌蛋白和免疫印迹分析: 通过PCR鉴定的菌确定在基因水平发生了重组, 取其500 μ L 3 d培养物, 4 °C, 17 000 g离心5 min, 弃上清, 再用等体积PBS洗涤3次, 最后用30 μ L PBS重悬菌体, 按照实验手册制备全菌蛋白样品, 进行SDS-PAGE电泳分析和免疫印迹分析。硝酸纤维素膜用5%脱脂奶粉室温封闭2 h; 再与HP0596兔多抗血清(1:10 000)37 °C共孵育2 h; 用PBST洗涤3次, 每次5 min, 然后与HRP标记的羊抗兔IgG抗体(1:5 000)共孵育1 h, 最后将硝酸纤维素膜用PBST洗干净后用HRP显色试剂盒进行显色。

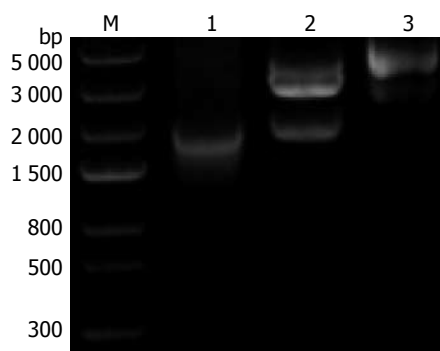


图 1 打靶突变载体的鉴定。M: DNA Marker; 1: 打靶突变载体的PCR扩增(引物p1/p8); 2: 打靶突变载体*Kpn* I /*Bam* H I双酶切鉴定; 3: 打靶突变载体质粒pBS0596。

2 结果

2.1 打靶载体 PCR扩增上下游同源臂和抗性片段, 经琼脂糖凝胶电泳分析表明, PCR扩增出的产物与目的片段预期大小一致, 其中上游同源臂为452 bp、下游同源臂为380 bp, 氯霉素抗性片段为1 033 bp片段。打靶载体构建上述3种片段纯化后, 连接pBluescript SK II(-)载体构建打靶载体pBS0596, 双酶切实验鉴定表明, 用*Kpn* I /*Xho* I双酶切鉴定可以得到约452 bp的上游同源臂片段, 用*Sal* I /*Bam* H I双酶切可以得到约380 bp的下游同源臂片段, 用*Xho* I /*Sal* I双酶切可以得到约1 033 bp的氯霉素抗性片段。同样用PCR方法鉴定表明, 将pBS0596用引物p1/p8扩增得到了约1 800 bp的片段, 打靶载体用上游同源臂起始处的*Kpn* I和下游同源臂终结处的*Bam* H I双酶切鉴定也得到约1 800 bp的片段(图1)。鉴定结果表明上下游同源臂均成功地连接到载体pBluescript SK II(-)上, 测序鉴定结果也说明序列完全正确。

2.2 基因的敲除及PCR鉴定 随机挑选在含氯霉素的空肠弯曲菌血琼脂平板上生长出的4个单菌落做全菌PCR鉴定(图2), 用基因上游同源臂起始处的p1引物和下游同源臂终结处的p8引物对重组转化子进行PCR鉴定。结果表明, 扩增得到两条片段。一条为约为1.5 kb的片段, 与以正常对照*H.pylori* 26695为模板扩增的片段理论长度一致。另一条约为1.8 kb, 与重组菌片段理论长度一致, 说明对应的菌株已经在基因位点发生了重组。将该1.8 kb片段克隆到T载体中, 进行克隆和测序, 结果显示该序列的上下游分别含有基因上下游同源臂的片段, 中间为氯霉素抗性基因元件, 说明在基因组水平重组成功。将新菌株命名为*H.pylori* 26695 Δ 0596。研究结果显示

■创新盘点

本文通过同源重组方法敲除*H.pylori*中*H.pylori* 26695 Δ 0596基因, 首次构建出源自幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因全部缺失的 $hp0596$ 阴性突变株, 为研究中国幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因的生物学功能及其在毒力相关蛋白表达中的作用, 从而在明确 $hp0596$ 基因与幽门螺杆菌致病性的关系等方面奠定实验基础。

■应用要点

为进一步探讨 *hp0596* 致病机制, 本研究利用同源重组技术敲除了 *H. pylori* 26695 株的 *hp0596* 基因, 构建了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 缺失突变体。为系统研究 *hp0596* 基因功能创造了条件, 为进一步阐明 *H. pylori* 致病机制奠定基础。

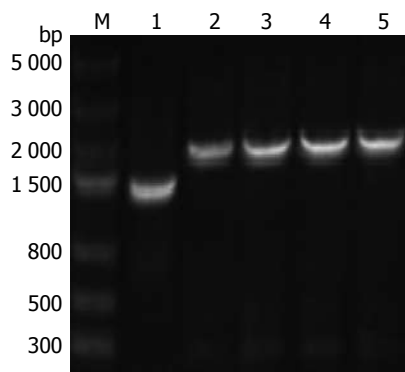


图2 重组菌的PCR鉴定。M: DNA Marker; 1: 引物p1/p8扩增 *H. pylori* 26695; 2-5: 引物p1/p8扩增 *H. pylori* 26695 Δ 0596。

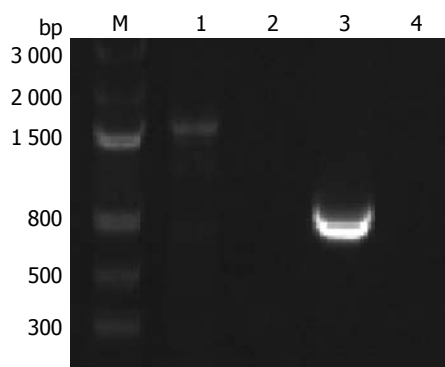


图3 重组菌的RT-PCR鉴定。M: DNA Marker; 1, 3: 以 *H. pylori* 26695 为模板; 2, 4: 以 *H. pylori* 26695 Δ 0596 为模板。1, 2: 引物p5/p8。3, 4: 引物p5/p6。

在2-5号重组克隆中克隆都得到了1.8 kb特异性扩增带, 可见此基因打靶的克隆阳性率非常高。

2.3 *hp0596* 基因缺失突变株的RT-PCR分析 对于DNA水平鉴定为阳性菌株, 应用TRIzol提取细菌总RNA。以 *hp0596* 基因特异性的引物p5/p8和p5/p6进行RT-PCR鉴定。对于 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因完全敲除菌株, 用引物p5/p8和p5/p6扩不出条带, 而对照菌株则分别扩出一条1 500 bp和576 bp的条带, 实验结果说明在RNA水平上, *hp0596* 基因已经被成功敲除(图3)。

2.4 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变株的全菌蛋白分析 将在DNA、RNA水平鉴定为阳性 *hp0596* 基因缺失的菌株(两株)进行SDS-PAGE电泳分析, HP0596蛋白相对分子质量大小为21.7 000 Da, 在电泳上样量大致相当的情况下, 对照菌株 *H. pylori* 26695 的HP0596蛋白表达水平很高。而相比之下, 缺失突变株在对应位置表达的蛋白却很少几乎没有表达, 这一结果也就从蛋白水平进一步证实成功敲除 *hp0596* 基因。另外, 以HP0596蛋白的兔多抗血清作为一抗对其

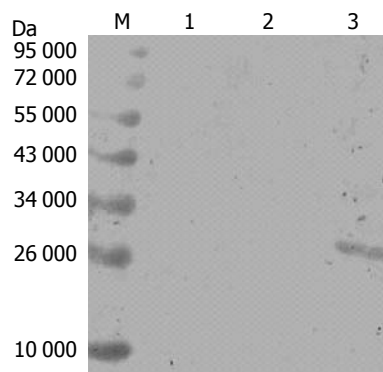


图4 Western blot检测重组突变株 *H. pylori* 26695 Δ 0596。M: 预染蛋白Marker; 1, 2: 缺失突变株 *H. pylori* 26695 Δ 0596; 3: 野生株 *H. pylori* 26695。

中两株重组菌进行免疫印迹分析也从另一个侧面证实了上述实验结果(图4)。

3 讨论

hp0596^[8] 是 *H. pylori* 特有的基因, 与目前其他已知的 *H. pylori* 其他毒力基因如 *cagA*、*urease*、*vacA* 等没有序列相似性, 他只与 *H. pylori* J99 株的 *jhp0543*、*H. pylori* SR7791 株的 HP-MP1^[9] 以及一些临床分离菌株的相似基因有同源性, 在 *H. pylori* 以外的生物中还未发现与其相似的基因。

H. pylori 定植于胃黏膜上皮表面黏液层中的中性微需氧环境中, 通过刺激上皮细胞产生细胞因子, 并促使黏膜固有层的免疫炎症细胞的聚集与活化, 造成慢性胃炎。已证实 *H. pylori* 相关的胃炎与IL-1、IL-6和TNF- α 等因子的升高有关^[10]。大量调查研究显示^[11], *H. pylori* 阳性慢性胃炎患者胃黏膜组织TNF- α 蛋白水平明显高于对照组, 而且 *H. pylori* 阳性慢性活动性胃炎患者经抗 *H. pylori* 治疗后, 胃窦黏膜组织分泌TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$)。提示 *H. pylori* 感染后, 胃窦黏膜组织TNF- α 表达升高, 并引起胃黏膜细胞损伤^[12]。这些都说明TNF- α 在慢性胃炎中起重要作用。TNF- α 过度表达诱发炎症反应, 导致出现临床胃炎症状。而 *H. pylori* 26695 菌株的基因产物HP0596蛋白已被鉴定为TNF- α 诱发的蛋白, 与巨噬细胞共孵育可以刺激其分泌TNF- α ^[13]。

为了更好地研究HP0596蛋白的功能, 本实验通过同源重组原理构建了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变株。利用PCR技术, 分别扩增得到目的基因的上游同源臂和下游同源臂, 与两端带有FRT位点的氯霉素抗性基因片段共同构建同源重组载体pBS0596; 以重组载体为模板扩增打靶片段, 我们采用电穿孔转化技术, 将打

靶载体pBS0596转化入*H.pylori* 26695. 在抗生素压力的帮助下, 打靶片段和菌体基因组发生同源重组, 通过氯霉素抗性筛选得到带有抗性标记的重组菌. 随后因突变载体不能在*H.pylori* 26695菌体内生长复制而丢失.

检测突变株*H.pylori* 26695 Δ 0596是否还存在 $hp0596$ 基因或蛋白, 是最后认证 $hp0596$ 基因缺失突变株构建成功与否的关键. 我们对野生株和突变株的基因组进行了PCR鉴定, 用 $hp0596$ 基因两侧的引物进行长片段扩增, 野生株可以扩出完整的 $hp0596$ 基因和非编码序列的长约1 500 bp片段, 而突变株可以扩出约1 800 bp的基因片段. 提示 $hp0596$ 基因完整编码区(576 bp)被氯霉素抗性片段(1 033 bp)所取代. 另外, 在RNA水平和蛋白水平上也得到了相同的验证, 使用引物p5/p6, p7/p8进行RT-PCR分析. 野生株可以扩出约1 500 bp/576 bp大小的片段, 而突变株中没有相同的条带. 这一结果也就从RNA水平进一步证实 $hp0596$ 基因敲除成功. 以HP0596蛋白的兔多抗血清作为一抗, 羊抗兔作为二抗重组菌进行免疫印迹分析的结果表明, 野生菌株特异蛋白表达约22 000 Da, 而突变株蛋白并未表达, 从而在蛋白水平上证实了上述实验结果. 本研究构建的 $hp0596$ 基因缺失突变株为进一步研究幽门螺杆菌中 $hp0596$ 基因的功能, 阐明其在*H.pylori*致病中的地位及作用奠定了实验基础. 目前, *H.pylori* 26695 Δ 0596与突变株相关功能的研究正在进行之中.

4 参考文献

- 1 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 2 陈晓露, 彭孝伟. 肿瘤坏死因子- β 、白细胞介素-4基因多态性与胃癌. *中华消化杂志* 2007; 27: 136-137
- 3 Jang JY, Yoon HJ, Yoon JY, Kim HS, Lee SJ, Kim KH, Kim do J, Jang S, Han BG, Lee BI, Suh SW. Crystal structure of the TNF-alpha-Inducing protein (Tipalpha) from Helicobacter pylori: Insights into Its DNA-binding activity. *J Mol Biol* 2009; 392: 191-197
- 4 J. 萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 50-51
- 5 黄志刚, 段广才. cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3190-3194
- 6 Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- 7 Zeng X, He LH, Yin Y, Zhang MJ, Zhang JZ. Deletion of cagA gene of Helicobacter pylori by PCR products. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3255-3259
- 8 Kuzuhara T, Suganuma M, Tsuge H, Fujiki H. Presence of a motif conserved between Helicobacter pylori TNF-alpha inducing protein (Tipalpha) and penicillin-binding proteins. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 2133-2137
- 9 Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori. *Cancer Res* 2001; 61: 6356-6359
- 10 Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, Ferrero RL. Helicobacter pylori heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 245-250
- 11 Nahar IK, Shojania K, Marra CA, Alamgir AH, Anis AH. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1256-1265
- 12 Tilly K, Elias AF, Bono JL, Stewart P, Rosa P. DNA exchange and insertional inactivation in spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 433-442
- 13 Godlewska R, Pawlowski M, Dzwonek A, Mikula M, Ostrowski J, Drela N, Jagusztyn-Krynicka EK. Tip-alpha (hp0596 gene product) is a highly immunogenic Helicobacter pylori protein involved in colonization of mouse gastric mucosa. *Curr Microbiol* 2008; 56: 279-286

■同行评价

本文结果可靠, 具有一定的研究意义及实用价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才