

幽门螺杆菌融合蛋白HspA-UreB的表达和免疫学活性

代丽萍, 段广才, 范清堂, 郝园林, 张荣光

代丽萍, 段广才, 郝园林, 张荣光, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室 河南省郑州市 450052

段广才, 范清堂, 河南省分子医学重点学科开放实验室 河南省郑州市 450052
代丽萍, 女, 1970-05-07 生, 河南省内黄县人, 汉族, 1993 年河南医科大学本科毕业, 1997 年河南医科大学硕士研究生毕业, 2003 年郑州大学博士研究生毕业, 副教授, 主要从事分子流行病学与基因工程疫苗方面的研究。

河南省创新人才工程基金资助项目, No. 2000-84

河南省科技攻关项目, No. 0424410035

项目负责人: 段广才, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室. gcduan@public2.zz.ha.cn

电话: 0371-6911453 传真: 0371-6969270

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-18

Expression and immunocompetence of HspA-UreB fusion protein of *Helicobacter pylori*

Li-Ping Dai, Guang-Cai Duan, Qing-Tang Fan, Yuan-Lin Xi, Rong-Guang Zhang

Li-Ping Dai, Guang-Cai Duan, Yuan-Lin Xi, Rong-Guang Zhang, Department of Epidemiology, Zhengzhou University College of Public Health, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Guang-Cai Duan, Qing-Tang Fan, Key Laboratory of Molecular Medicine in Henan Province, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by the Henan Project Foundation for Innovation Talents, No.2000-84, and Henan Scientific Project for Tackling Key Problem, No. 0424410035

Correspondence to: Dr. Guang-Cai Duan, Department of Epidemiology, Zhengzhou University College of Public Health, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. gcduan@public2.zz.ha.cn
Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To construct recombinant expression vector expressing HspA-UreB fusion protein of *Helicobacter pylori* (*H pylori*), and to determine its immunoreactivity, in order to develop gene recombinant vaccine against *H pylori* infection.

METHODS: The *hspA* and *ureB* genes were amplified by PCR from *H pylori* MEL-HP27 isolated in Zhengzhou and cloned directionally into vector pNEB193. These two genes were restricted by using two corresponding restriction enzyme separately and cloned together into the fusion expression vector pET-30 (a), and the recombinant plasmid was then used to transform *E.coli* BL21 (DE3). The positive clones were identified by PCR and restriction enzyme digestion. The recombinant fusion protein HspA-UreB was induced to express from *E.coli* by IPTG and was analyzed by SDS-PAGE. The fusion protein was purified by use of Ni²⁺ affinity chromatography and then used to immunize mice. The immunogenicity and immunoreactivity of the fusion protein were analyzed by Western blot.

RESULTS: The *hspA-ureB* fusion gene was amplified from the recombinant fusion expression plasmid pET-HU27 (pET-HspA-UreB) by PCR, and also the *hspA-ureB* fusion gene fragment was produced from these plasmids after restriction

enzyme digestion. SDS-PAGE and optical density scanning indicated that the fusion protein was expressed in the recombinant vaccine strain BL21 (pET-HU27) as a protein with 82.1 KDa of molecular weight that accounted for 21% of the total bacterial protein. The purity of fusion protein was 91%. Western blot analysis of the purified fusion protein confirmed that it could specifically be recognized by mouse serum.

CONCLUSION: A recombinant vaccine candidate strain expression fusion protein HspA-UreB of *H pylori* is constructed and identified successfully, and purified fusion protein has strong immunoreactivity.

Dai LP, Duan GC, Fan QT, Xi YL, Zhang RG. Expression and immunocompetence of HspA-UreB fusion protein of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1818-1822

摘要

目的: 构建表达幽门螺杆菌(*H pylori*)融合蛋白HspA-UreB的重组表达质粒, 并研究其免疫学活性。

方法: 定向克隆方法将郑州分离Hp菌株MEL-HP27的*hspA*和*ureB*基因融合连接入原核表达载体pET30(a), 构建重组表达质粒pET-HU27。该质粒转化大肠杆菌BL21后经IPTG诱导, SDS-PAGE分析融合蛋白HspA-UreB表达情况。Ni²⁺柱亲和层析纯化融合蛋白, 与小鼠免疫血清进行Western blot分析, 检测融合蛋白的免疫反应性。

结果: 特异PCR法与质粒酶切鉴定证实重组表达质粒pET-HU27构建成功。SDS-PAGE分析显示在82.1 KDa处出现特异蛋白带, 占菌体总蛋白的21%, 亲和层析法获得纯度为91%的纯化融合蛋白, 经免疫小鼠制备的血清可以识别该融合蛋白。

结论: 成功构建表达*H pylori*HspA-UreB融合蛋白的重组表达质粒, 表达的融合蛋白具有良好的免疫反应性。

代丽萍, 段广才, 范清堂, 郝园林, 张荣光. 幽门螺杆菌融合蛋白HspA-UreB的表达和免疫学活性. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1818-1822

<http://www.wjnet.com/1009-3079/12/1818.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染是慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡以及胃癌的重要致病因素^[1-4], 世界卫生组织已将*H pylori*列为人类I类生物致癌因子^[5], 而且*H pylori*感染在世界范围内流行十分广泛, 尤其是在发展中国家。由于*H pylori*感染的治疗方法存在一

些弊端, 难以在人群中推广, 因此, 研制一种安全有效的疫苗成为防治 *H pylori* 感染的重要手段^[6]. 目前, 虽然已经找到几种具有免疫保护性的 *H pylori* 抗原, 但单独一种抗原免疫动物时效果并不十分理想, 而两种抗原联合作用时保护作用明显增加^[7]. 拟将 *H pylori* 两种已被证实具有良好免疫保护性的抗原热休克蛋白 A 亚单位(heat shock protein subunit A, HspA)和尿素酶 B 亚单位(urease subunit B, UreB)利用基因工程的方法融合表达, 并分析融合蛋白 HspA-UreB 的免疫学活性, 为 *H pylori* 联合抗原基因工程疫苗的研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* MEL-HP27 系本研究室保存, 分离自郑州慢性浅表性萎缩性胃炎患者. 原核表达载体 pET30a(+)系 Invitrogen 公司产品. 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)为本研究室保存. *EcoRI*、*SaI*、*XhoI*、Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司. DNA 标准分子质量 1 kb DNA Ladder 和卡那霉素购自上海生工公司. 辣根过氧化物酶标记的羊抗人、羊抗鼠 IgG 系北京邦定公司产品. DNA 凝胶回收试剂盒系 Vitagen 产品. 1 mL 亲和层析预装柱系 Amphamacia 公司产品. 其他常规试剂配制按参考文献(分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992).

1.2 方法

1.2.1 *H pylori hspA* 和 *ureB* 基因的克隆 *hspA* 的上游引物 5' 端加 *EcoRI* 酶切位点, 保留起始密码子 ATG; 在下游引物 5' 端加 *SaI* 酶切位点, 去除终止密码子 TAA. 引物序列: hpr1: 5' -CCC GAA TTC ATG AAG TTT CAA CCA TTA- 3'; hpr2: 5' -CGC GTC GAC GTG TTT TTT GTG ATC ATG AC- 3'. *ureB* 的上游引物 5' 端加 *SaI* 酶切位点, 去除起始密码 ATG, 下游引物 3' 加 *XhoI* 酶切位点, 保留终止密码 TAG, 引物序列: upr1: 5' -CC GTC GAC AAA AAG ATT AGC AGA AAA G- 3'; upr2: 5' -CGC CTC GAG CTA GAA AAT GCT AAA GAG- 3'. 引物由上海生工公司合成. PCR 反应条件见参考文献[8-9].

1.2.2 重组表达质粒 pET-hspA-ureB 的构建和表达 *hspA* 和 *ureB* PCR 产物分别经双酶切后利用胶回收试剂盒回收, 然后以 *hspA-ureB* 的顺序连接入原核表达载体 pET30a(+), 转化大肠杆菌 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选阳性菌落, 特异 PCR 和质粒酶切电泳鉴定重组质粒. 阳性重组质粒简称 pET-HU27. 取小提质粒 pET-HU27 1 μ L 转化 BL21(DE3), 小提质粒、酶切鉴定. 构建表达 HspA-UreB 融合蛋白的重组子 BL21(pET-HU27). 从过夜培养的 BL21(pET-HU27)菌液中取 50 μ L, 加入 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中, 250 r/min, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期. 加化学诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 继续 250 r/min, 35 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h, 制备样品进行 SDS-PAGE 电泳. 大量诱导的菌

液, 4 $^{\circ}$ C, 4 000 g 离心 20 min 收集细菌, 1 \times PBS 洗菌 1 次. 将细菌重悬于纯水 5 mL 中. 进行超声破碎, 12 000 g 离心 15 min, 上清液纯化. 0.1 mol/L NiCl₂ 0.5 mL 过柱, 挂镍. Start buffer (20 mmol/L Na₂HPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑)10 mL 平衡过柱. 5 mL 上清液过柱, 流速控制在 1 mL/min. Start buffer 10 mL 洗柱, Elution buffer (20 mmol/L Na₂HPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑)5 mL 洗脱, 收集洗出物, 电泳观察纯化效果.

1.2.3 融合蛋白 HspA-UreB 的免疫活性分析 取 1 ml 纯化的融合蛋白 HspA-UreB 与 0.5 ml 完全弗氏佐剂混匀, 进行超声乳化(200 W, 10 s, 间歇 1 min, 共 4 次). 选择 8 周龄的昆明小鼠 6 只, 每只背部皮下两点注射抗原 100 μ L, 1 次/wk, 共免疫 5 次. 最后 1 次免疫后 1 wk, 摘眼球取血, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用. 蛋白样品经 SDS-PAGE 后, 凝胶和 PVDF 膜在转移缓冲液(25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 20 ml/L 甲醇, 0.1 g/L SDS)中浸泡 15 min, 于半干式电转印仪 25V 转印 25 min. PVDF 膜用蒸馏水洗 3 次, PBS 洗 1 次, 转入封闭液(PBST+10 g/L 脱脂奶粉), 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜. 与血清反应 2 h, 洗膜后, 与辣根过氧化物酶标记的第 2 抗体(1:1 000)反应 1 h, 用 DAB(二氨基联苯胺)显色.

2 结果

2.1 重组表达质粒 pET-HU27 的构建及鉴定 *H pylori* 菌株 MEL-HP27 经提取染色体 DNA 进行 PCR 扩增, *hspA* 基因(354 bp)和 *ureB* 基因(1 707 bp)均扩增出相应大小的基因片段(图 1). MEL-HP27 *hspA* 和 *ureB* 的 PCR 产物经过连接、转化、筛选后, 小提质粒, 对重组质粒进行 *EcoRI*、*XhoI* 双酶切, 获得与预计融合基因大小一致的 DNA 片段(2 067 bp)(图 2). 以 *hspA* 的上游引物和 *ureB* 的下游引物为一对引物, 以重组质粒为模板进行扩增, 亦获得了 2 067 bp 左右的目的片段. 重组质粒 pET-HU27 构建成功, *hspA* 和 *ureB* 基因测序结果与参考文献[8-9]中的序列一致.

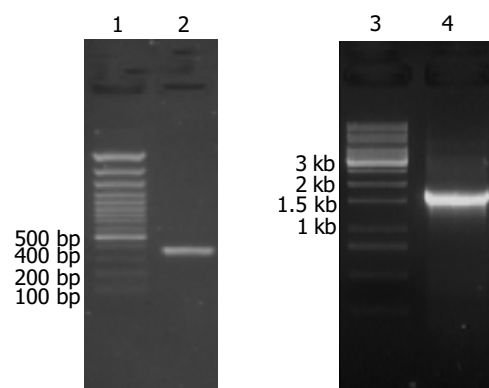


图 1 MEL-HP27 *hspA* 和 *ureB* 基因的 PCR 扩增. 1: 100 bp DNA ladder marker; 2: PCR product of *hspA* gene; 3: 1 kb DNA ladder marker; 4: PCR product of *ureB* gene.

2.2 *Hp* 融合蛋白 HspA-UreB 的表达及鉴定 分别带有重组质粒和空质粒的大肠杆菌[即 BL21(pET-HU27)和 BL21(pET30a)]经 IPTG 诱导后进行蛋白电泳, 结果在 BL21(pET-HU27)的全菌蛋白中检测到了预期分子质量的表达产物(图 3). HspA-UreB 的分子质量为 76.5 KDa, 而 pET30 质粒中从翻译起始密码 ATG 到 *EcoRI* 之间有 154 bp, 约 5.6 KDa, 因此融合蛋白实际分子量应为 82.1 KDa. 经 Genetools 软件分析, 融合蛋白在全菌中所占的比例分别为 21%(见图 4). 诱导 3 h 产物经 SDS-PAGE 电泳后, 转印到 PVDF 膜上, 与 1:50 *H pylori* (+) 患者血清进行 Westernblot 分析, 结果在 82.1 KDa 左右处出现一条特异反应带, 证实 BL21(pET-HU27)可以正确表达融合蛋白 HspA-UreB.

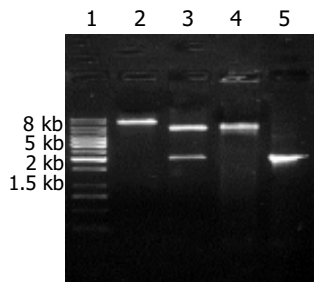


图 2 重组质粒 pET-HU27 酶切鉴定图谱. 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: pET-HU27 digested by *EcoRI*; 3: pET-HU27 digested by *XhoI*; 4: product of *hspA-ureB* fusion gene from pET-HU27.

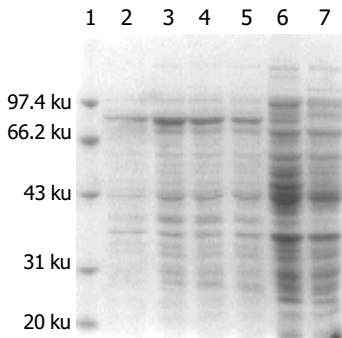


图 3 HspA-UreB 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析. 1: protein marker; 2-5: BL21 with recombinant plasmid pET-HU27 induced by IPTG for 4、3、2 and 1 h; 6: BL21 with recombinant plasmid pET-HU27 uninduced for 4 h; 7: BL21 with pET30a induced for 4 h.

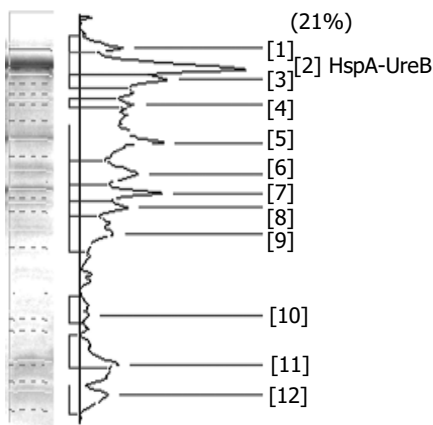


图 4 诱导 3 h 融合蛋白含量分析.

2.3 HspA-UreB 融合蛋白的纯化和生物学活性 镍离子柱准备好后, 先用 Start buffer 平衡柱, BL21(pET-HU27)诱导表达的上清 5 mL 过柱, Start buffer 洗柱后, 用 Elution buffer 洗脱, 收集洗脱蛋白, SDS-PAGE 电泳检查蛋白纯化结果. 共收集 5 管, 结果融合蛋白主要出现在第 1-3 管中(图 5). 含量高达 91%, 浓度约 30 mg/L. 亲和层析纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至 PVDF 膜, 先后与 1:30 稀释的 HspA-UreB 免疫小鼠血清和 1:1 000 羊抗鼠 IgG-HRP 反应后, DAB 显色. 结果在 82.1 KDa 处出现一条特异反应带, 证实纯化的融合蛋白可以刺激小鼠产生相应抗体, 并可以特异性与相应抗体发生反应, 证明其具有免疫原性, 并能与该融合蛋白发生免疫反应(图 6).

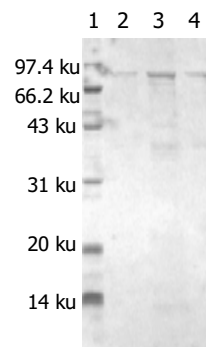


图 5 亲和层析纯化融合蛋白结果. 1: protein marker; 2-4: purified fusion protein.

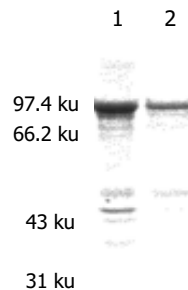


图 6 融合蛋白的 Western blot 分析. 1: unpurified fusion protein; 2: purified fusion protein.

3 讨论

已经证实具有免疫保护作用的 *Hp* 抗原: UreB^[10]、HspA^[11]、VacA^[12]、过氧化氢酶^[13-14]等, 近年来新发现的一些抗原如: Lpp20^[15-16]、NAP^[17-18]等, 也都有望成为 *Hp* 疫苗的保护性抗原候选. 但研究表明, 当多种抗原联合使用免疫动物时, 可产生比一种抗原强的免疫保护作用. 目前, 国内学者正致力于多价抗原 *Hp* 基因工程疫苗的研究^[19-21, 30]. 本研究则选用 *Hp* 两种保守性和免疫效果均较好的抗原: HspA 和 UreB, 构建表达融合蛋白 HspA-UreB 的原核表达系统, 探讨其免疫学活性, 为 *Hp* 多价疫苗的研究奠定基础.

尿素酶(urease, Ure)是目前研究最多也是最深入的

一种抗原. 口服尿素酶B亚单位及佐剂可刺激机体产生相应的体液免疫、细胞免疫及黏膜免疫应答^[22-24]. Cynthia及其同伴^[25]将2.4 kb UreB基因克隆入pET24+并转入 *E. coli* BL21(DE3)中, 纯化尿素酶, 用口服和灌胃两种方法辅以佐剂大肠杆菌毒素(LT)或CT免疫Webster小鼠, *H. heli*攻击小鼠, 尿素酶检测结果显示保护率60-100%. Monath *et al*^[26]用重组Ure加CT或LT免疫小鼠, 获得70-80%的保护率.

热休克蛋白(Heat shock protein, Hsp)是一种高度保守的蛋白质, 幽门螺杆菌的Hsp属于Hsp60族, Hsp60对尿素酶亚单位分子的穿膜输出和出膜后尿素酶复合体的装配有关系, 而且对处于胃酸局部pH变化和活性蛋白酶中的完整Hp表面的尿素酶有稳定作用^[27]. *H. pylori*的Hsp由A、B两个亚单位组成, HspA包括两个区域:N区与GroES家族同源物高度保守, 是免疫显性区; C区有27个氨基酸残基, 其中8个是组氨酸残基, 4个是半胱氨酸残基, 上述结构为金属镍离子结合区, 对镍离子的转运、呈递起着重要的作用. 他可以增强尿素酶的活性, 同时又是一种有效的抗原成分, 且位于细菌表面, 相对保守^[28]. 有望成为Hp亚单位疫苗的重要候选组分之一^[29]. Todoroki *et al*^[11]制备了编码热休克蛋白A的DNA疫苗(pcDNA3.1-HspA), 对C57BL小鼠进行皮下接种, 产生了TH1型免疫反应, 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. 因此, 以HspA为基础的疫苗不失为一种有效的*H. pylori*疫苗.

pET原核表达载体系列是目前应用最广泛的高效表达载体之一. pET30a(+)是其中的一种, 所带起始密码子ATG与6个组氨酸和外源基因表达为融合蛋白质, 但是被融合的一段DNA所表达的蛋白质免疫原性很低(仅5.6 KDa), 对重组蛋白质的结构和功能无干扰, 因而表达产物可以直接供免疫使用.

本研究利用PCR法从郑州分离*H. pylori* MEL-HP27中获得 *hspA* 和 *ureB* 基因, 然后以 *hspA-ureB* 的顺序融合插入 pET30a 中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经质粒酶切和特异 PCR 鉴定重组质粒 pET-HU27, 再转入宿主菌 BL21(DE3)中, 成功构建表达系统 BL21(pET-HU27). 重组菌经 IPTG 诱导, 结果在 82.1 KDa(5.6 KDa+76.5 KDa) 处出现一条特异蛋白带, 诱导 3 h, 融合蛋白表达量达到最高值, 约占全菌蛋白的 21%左右, 与人 *H. pylori* 阳性血清杂交时, 该蛋白可以被 *H. pylori* 阳性患者血清所识别. 纯化后的蛋白经与小鼠免疫血清进行 Western blot 分析, 可以被小鼠血清中相应抗体所识别, 证明纯化后的融合蛋白仍具有较好的免疫反应性. HspA 与 UreB 两种蛋白融合表达不但可以增加蛋白结构的复杂性, 从而增加抗原性, 而且在后期蛋白纯化过程中可以简化步骤, 为 *H. pylori* 疫苗的成功研究提供方便.

4 参考文献

- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-1275
- Mendall MA. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Semin Gastrointest Dis* 1997;8:113-123
- Blaser MJ. Gastric *campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1987;93:371-383
- Goodwin CS. Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori*, and a "leaking roof" concept. *Lancet* 1988;2:1467-1469
- Vainio H, Heseltine E, Wilbourn J. Priorities for future IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Environ Health Perspect* 1994;102:590-591
- Mastroeni P, Bowe F, Cahill R, Simmons C, Dougan G. Vaccines against gut pathogens. *Gut* 1999;45:633-635
- 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
- 代丽萍, 段广才, 郝园林, 范清堂. 幽门螺杆菌热休克蛋白 A 亚单位编码基因的克隆与序列分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2004(待发表)
- 代丽萍, 段广才, 郝园林, 范清堂. 幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位编码基因的克隆与序列分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2004(待发表)
- Gomez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* 1998;16:460-471
- 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
- Rossi G, Ruggiero P, Peppoloni S, Pancotto L, Fortuna D, Lauretti L, Volpini G, Mancianti S, Corazza M, Taccini E, Di Pisa F, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun* 2004;72:3252-3259
- Chen M, Chen J, Liao W, Zhu S, Yu J, Leung WK, Hu P, Sung JJ. Immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter* 2003;8:613-625
- Miyashita M, Joh T, Watanabe K, Todoroki I, Seno K, Ohara H, Nomura T, Miyata M, Kasugai K, Tochikubo K, Itoh M, Nitta M. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase. *Vaccine* 2002;20:2336-2342
- Keenan J, Neal S, Allardyce R, Roake J. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection. *Vaccine* 2002;20:2981-2988
- Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000;68:3337-3343
- 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
- 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
- 姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 人幽门螺杆菌 26000 外膜蛋白与热休克蛋白双价疫苗的构建和表达及抗原性研究. *中华医学杂志* 2003;83:862-867
- 朱森林, 陈旻湖, 陈洁, 焦志勇, 李国庆, 陈为, 彭晓忠, 胡品津. 优化构建 UreB/HpaA 双价幽门螺杆菌减毒活菌疫苗的免疫保护作用. *中华消化杂志* 2003;23:583-586
- 李勤, 刘纯杰, 李淑琴, 陶好霞, 刘秀丽, 张兆山. 幽门螺杆菌 ureB 及 ureB-hspA 融合基因在减毒鼠伤寒沙门菌中的表达及小鼠的免疫应答. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003;23:513-516
- 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
- 23 Liu X, Hu J, Zhang X, Fan D. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1513-1516
- 24 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
- 25 Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleantous 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
- 26 Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Matano K, Miura Y, Taniguchi T. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine* 1998;16:150-155
- 27 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染—基础与临床. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997:33-34
- 28 Kansau I, Guillain F, Thiberge JM, Labigne A. Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol* 1996;22:1013-1023
- 29 Michetti P, Corthesy-Theulaz I, Davin C, Haas R, Vaney AC, Heitz M, Bille J, Kraehenbuhl JP, Saraga E, Blum AL. Immunization of BALB/C mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology* 1994;107:1002-1011
- 30 李国庆, 陈旻湖, 朱森林, 陈洁, 焦志勇, 陈为, 胡品津. 重组减毒沙门菌尿素酶B亚单位和过氧化氢酶疫苗治疗幽门螺杆菌感染的实验研究. 中华消化杂志 2003;23:395-398

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑

经《World Journal of Gastroenterology, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点.

1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页 - 止页与首页是否一致, PMID 号是否与首页一致.

5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语化和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用 “et al”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.