

表达幽门螺杆菌黏附素保守区的减毒鼠伤寒沙门氏菌株的构建

白 杨¹ 王继德¹ 张兆山² 张亚历^{1*}

¹(第一军医大学南方医院全军消化病研究所, 广州 510515)

²(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘 要 为构建表达幽门螺杆菌(Hp)黏附素保守区(AB)的无抗性减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗,采用缺失腺苷酸环化酶基因(Δcya)、环腺苷酸受体蛋白基因(Δcrp)以及天冬氨酸 β -半醛脱氢酶基因(Δasd)的鼠伤寒沙门菌(X4072)作为宿主,将编码 AB 的基因插入 Asd^+ 的组成型表达载体 pYA248,通过两次转化引入宿主菌,构建了表达 AB 基因平衡致死的减毒鼠伤寒沙门重组菌 X407 χ pYA248-AB,采用桥联法 ELISA 测定 X407 χ pYA248-AB 培养上清液和裂解上清液中 AB 的抗原性,参照 Meacock 叙述的方法及重组菌生长曲线的测定来确定重组菌株的稳定性,通过 C57BL/6 小鼠口服测定半致死量来确定重组菌的安全性。成功构建了表达 AB 的减毒鼠伤寒沙门菌重组菌株 S. typhimurium X407 χ pYA248-AB)桥联法 ELISA 测定表明重组菌 X407 χ pYA248-AB 培养上清中 AB 的含量高于菌体裂解液,重组菌 pYA248-AB 在没有选择压力的情况下培养 100 代,随机挑选的重组菌全部都能生长,且在 ELISA 测定 AB 抗原时均显阳性。重组菌的生长曲线测定表明 X407 χ pYA248 和 X407 χ pYA248-AB 的生长状态基本一致;口服重组菌株 X407 χ pYA248-AB) 1.0×10^{10} cfu.30d 后,C57BL/6 存活率仍为 100%。成功构建了表达 AB 的无抗性的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗 X407 χ pYA248-AB),体外实验表明重组质粒是稳定的,动物实验证明重组菌株是安全的,为防治幽门螺杆菌感染提供了口服活菌疫苗候选株。

关键词 幽门螺杆菌,黏附素保守区,鼠伤寒沙门氏菌,重组

中图分类号 Q78.R739 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0433-06

幽门螺杆菌(简称 Hp)的发现,使慢性胃炎、消化性溃疡等有关疾病的发病学和防治学研究发生了一场革命^[1,2]。现已确认 Hp 是慢性胃炎、消化性溃疡的最主要病因,胃癌和胃淋巴瘤发生的重要因素^[3,4]。1994 年世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)已将该菌列为 I 类致癌原^[5,6]。流行病学资料显示,全球有 50% 的人口感染 Hp,我国是一个 Hp 高感染率国家^[7]。基于此,根除 Hp 是预防和治疗上述疾病的主要手段之一。目前广泛用于临床根除 Hp 的手段是抗菌治疗,尽管有较高的根除率,但存在诸如费用较高、耐药菌株的不断加致根除率逐年降低、药物的副作用以及病人的依从性差等问题^[8-10]。免疫防治 Hp 成为治疗 Hp 最有希望的方法之一。鉴于 Hp 已证实的 4 种黏附素保守区(AB)是外膜蛋白(OMP)和膜孔素(Porin)样成分,而外膜蛋白和膜孔素样成分是优秀的疫苗候选抗原^[11-13]。

此外,表达外源性抗原的减毒伤寒沙门菌属菌苗是很有希望的新一代菌苗,人体试验表明减毒伤寒杆菌株有很好的耐受性和免疫原性,可用于传递外源抗原,这样既解决了佐剂问题,又解决了口服亚单位蛋白疫苗成本昂贵的问题。目前,国内已经有减毒沙门菌属菌苗用于 Hp 疫苗的研制,但还未见包含有平衡致死系统无抗性的减毒伤寒沙门菌属菌苗在 Hp 疫苗研制中的应用。本研究拟构建表达 AB 的无抗性的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗,并研究其生物特性,为下一步的生物治疗研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 实验过程中所使用菌株和质粒见表 1。

收稿日期 2002-11-29, 修回日期 2003-03-18。

基金项目: 863 计划专题(No. 102-07-03-06) 国家自然科学基金(No. 30270078) 军队“十五”医药卫生科研课题(OIMA-132)资助项目。

* 通讯作者。Tel: 86-20-61648531; E-mail: baiyang1030@hotmail.com

表 1 实验涉及的菌株(质粒)及主要特性

Table 1 Strain(plasmid)and genotype

Strain(plasmid)		Genotype	Source
<i>E. coli</i> X6097		Asd ⁻	Dr. Roy Curtiss
<i>Salmonella typhimurium</i>	X3181	Wild strain	Institute for the control of biological product, Ministry of health
	X3730	GalE ⁻ hsd ⁻ asd ⁻	Dr. Roy Curtiss
	X4072	Cya ⁻ Crp ⁻ Asd ⁻	Dr. Roy Curtiss
pET-22b(+)-AB		Amp ^r AB	Construction in the previous research ^[14,15]
pYA248		Asd ⁺	Dr. Roy Curtiss
pYA248-AB		AB	Construction in the research

1.1.2 实验动物:无特定病原体(Specific-pathogen free, SPF)C57BL/6 小鼠 15 只, 4 周龄, 雄性, 购自本所动物中心。

1.1.3 工具酶:*Eco*R I、*Sal* I 等限制酶及 T4 DNA ligase、Vent DNA polymerase 等工具酶分别购自 New England Biolabs 公司、Promega 公司及华美生物工程公司。

1.1.4 试剂:HRP 标记羊抗兔 IgG 购自华美生物工程公司, 抗 AB 抗体本所制备, 二氨基庚二酸(DAP, 50mg/L) 购自 Sigma 公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取及纯化:质粒的快速抽提及大量制备均采用碱变性法, 详见参考文献 [16]。

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增:根据保守区基因序列设计引物, 在其 5' 端加上合适的限制性酶切位点, 由上海博亚公司合成。模板为 pET-22b(+)-AB。序列如下:

保守区 1 5'-CCG GAA TTC AAC GCG CTC AAC AAT CAG-3'

*Eco*R I

保守区 2 5'-CAC GTC GAC CTA GAA TGA ATA CCC ATA AG-3'

Sal I

1.2.3 DNA 片段的酶切、连接、转化和阳性克隆的筛选:详见参考文献 [17]。质粒和目的基因 DNA 经 *Eco*R I、*Sal* I 双酶切, 玻璃奶回收酶切片段, T4 连接酶作用下 16℃ 连接 12h, 依次转化宿主菌 *E. coli* X6097、*Salmonella typhimurium* X3730 和 X4072, 双酶切鉴定筛选阳性克隆。

1.2.4 重组菌表达的 AB 蛋白的测定:重组菌株 *S. typhimurium* X4072(pYA248-AB) 接种于液体 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 15~16h, 离心分别收集菌体和上清液。菌体用生理盐水洗 1 次后, 离心后用去离子水悬浮, 悬液菌液超声破碎 3min, 离心取上清。桥联法 ELISA 测定 X4072(pYA248-AB) 培养上清液和裂解上清液中 AB 的抗原性。

1.2.5 重组菌株的稳定性实验:重组菌株的稳定性实验参照 Meacock 叙述的方法进行。将 37℃ 振荡培养过夜的菌体按 10% 接种于含 DAP 的 LB 培养基中, 继续培养 12h, 将上述培养物再按 10% 量接种于含 DAP 的 LB 液体中培养 12h, 如此培养至 50h, 则菌体传代 100 代后, 将培养物稀释 10⁶ 倍, 取 100μL 稀释液涂含 DAP 的 LB 琼脂平板, 过夜培养后, 随机挑选 100 个单菌落, 转种在 DAP⁻ 的 LB 琼脂平板上, 如果质粒丢失, 细菌不会在 DAP⁻ 液体中生长, 以此测定重组质粒的稳定性。同时用 ELISA 法检测这 100 个菌落培养上清 AB 抗原的表达, 以确定外源基因在鼠伤寒沙门氏菌宿主表达的稳定性。

1.2.6 重组菌的生长曲线的测定:挑取单克隆 *S. typhimurium* X4072(pYA248) 和 *S. typhimurium* X4072(pYA248-AB) 分别接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 10h 后, 取 50μL 接种于 5mL LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养, 每隔 1h 测定 OD₆₀₀ 值 1 次, 绘制测定菌的生长曲线。

1.2.7 重组菌的安全性实验:重组菌的安全性, 通过 C57BL/6 小鼠口服测定半致死量来确定。

2 结 果

2.1 含 asd 基因并编码 AB 基因的重组质粒的构建

质粒 pYA248 大小为 3.0kb, 启动子为 P_{trc}, 多克隆位点包括 *Eco*R I、*Hind* III、*Sal* I 等。用 *Eco*R I 和 *Sal* I 对 pYA248 进行酶切, 回收大的 E-S 片段作为载体。用同样的酶完全酶切 AB PCR 产物, 回收后与载体混合进行连接, 然后以 CaCl₂ 法转化 *E. coli* X6097 宿主菌, 转化子在 DAP⁻ 的 LB 琼脂平板上生长, 进一步提取质粒进行鉴定。重组质粒 pYA248-AB 经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切鉴定结果见图 1。

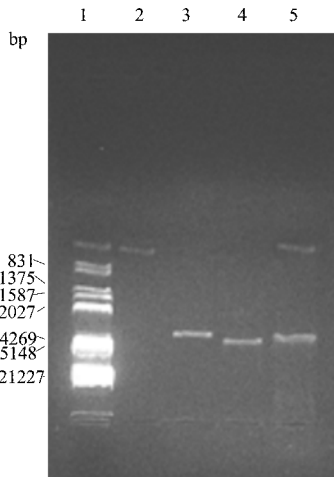


图1 重组质粒 PYA248-AB 的双酶切鉴定图谱

Fig.1 Double restriction enzyme digestion map of recombinant plasmid PYA248-AB

1. DNA marker ; 2. PCR product ; 3. PYA248/*Eco*R I ; 4. PYA248-AB/*Eco*R I ; 5. PYA248-AB/*Eco*R I + *Sal* I

2.2 重组菌株的构建

从 *E. coli* X6097(pYA248-AB)中分离重组质粒 , 电转法依次转入宿主菌 *S. typhimurium* X3730、X4072。由于宿主菌的不同 , 摸索了相应的最佳转化条件。采用条件 (1) :Cuvette Gap 0.2cm ,Voltage 2.5kV ,Field Strength 12.5kV/cm ,Capacitor 25 μ F ,Resistor 200 Ω ,Time Constant 4.5 ~ 5.0ms 将重组质粒转化入宿主菌 *S. typhimurium* X3730 中 ,再从 *S. typhimurium* X3730(pYA248-AB)重组菌中分离重组质粒 ; 采用条件 (2) :Cuvette Gap 0.2cm ,Voltage 2.4kV ,Field Strength 12.0kV/cm ,Capacitor 25 μ F ,Resistor 400 Ω ,Time Constant 9 ~ 13ms ,将重组质粒转化入宿主菌 *S. typhimurium* X4072 中 ,得到重组菌株 *S. typhimurium* X4072(pYA248-AB)。

2.3 重组菌表达 AB 蛋白的测定

桥联法 ELISA 测定 X4072(pYA248-AB)培养上清液和裂解上清液中 AB 的抗原性的结果如表 2 所示。重组菌 X4072(pYA248-AB)培养上清中 AB 的含量高于菌体裂解液 ,说明 AB 主要存在于培养上清液中 ,即以分泌的方式表达。

表 3 小鼠口服重组鼠伤寒沙门氏菌和野生株后的存活率

Table 3 Survival of mice after oral inoculation with virulent and recombinant *S. typhimurium* strains

Strain	Relevant phenotype	Inoculating dose(cfu)	Observation Intervals/d	Survial (live/total)
X3181	Wild type	1.0×10^7	5	0/5
		2.6×10^5	30	2/5
X4072(pYA248-AB)	<i>Cya</i> ⁻ <i>Crp</i> ⁻ AB ⁺	1.0×10^{10}	30	5/5

表 2 桥联法 ELISA 测定 X4072(pYA248-AB)中 AB 抗原性
Table 2 AB expressed in X4072(pYA248-AB) assayed by bridged ELISA

Sample	A_{492nm}	P/N
Negative control of X4072(pYA248) culture supernatant	0.04	
Negative control of X4072(pYA248) sonicate supernatant	0.04	
Positive control of BL21(pET-AB) periplasm	1.08	27.0
X4072(pYA248-AB) culture supernatant	0.96	24.0
X4072(pYA248-AB) sonicate supernatant	0.78	19.5

2.4 表达 AB 抗原的稳定性

重组菌 pYA248-AB 在没有选择压力的情况下培养 100 代 ,随机挑选 100 个菌落转移至 DAP⁻ 平板 ,100 个菌全部都能生长 ,且在 ELISA 测定 AB 抗原时均显阳性 ,其 A_{492nm} 值的均数 \pm 标准差为 0.979 ± 0.052 ,阴性对照菌 X4072(pYA248) A_{492nm} 值为 0.040 ,表明重组菌生长 100 代后 ,重组质粒能稳定存在于减毒宿主内。

2.5 重组菌的生长曲线

挑取单克隆 X4072(pYA248)和 X4072(pYA248-AB) ,分别接种于 LB 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 过夜 ,取 50 μ L 接种于 5mL LB 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 ,每隔 1h 测定 OD_{600} 值 1 次 ,记录各 OD 值 ,得到测定菌生长曲线 (图 2) 。从图 1 可以看出各种菌的生长状态基本一致 ,即表示在减毒沙门氏菌中转入重组质粒 ,基本不影响该菌的新陈代谢。

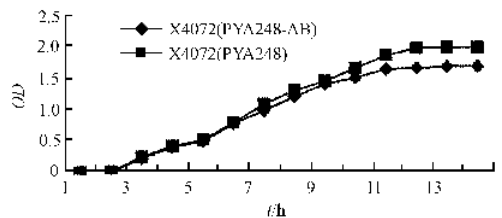


图 2 X4072(pYA248)和 X4072(pYA248-AB)的生长曲线

Fig.2 The growing curve of X4072(pYA248) and X4072(pYA248-AB)

2.6 重组菌的安全性

C57BL/6 小鼠口服重组菌株的安全性实验结果见表 3。小鼠口服野生株 X3181 1×10^7 cfu 后 ,在 5d

内全部死亡,而口服重组菌株 X4072(PYA248-AB) 1.0×10^{10} cfu 30d 后,存活率仍为 100%。从表上还可以看出 C57BL/6 小鼠口服重组菌株的活菌数已是野生株 X3181 致死剂量的 10^3 倍。

3 讨 论

伤寒沙门氏菌能通过黏附、侵袭、定居在肠道相关淋巴组织,被 Peyer 结中的巨噬细胞或 M 细胞吞噬,并经肠系膜淋巴结到达肝脏、脾脏,进一步有效地刺激机体其它部位(包括胃)产生粘膜、细胞和体液免疫应答。近几年,以减毒沙门菌菌苗为释放系统研制胃肠道疫苗,成为重组口服新型活疫苗研究的一个新的方向。其中,减毒鼠伤寒沙门菌是迄今为止作为携带外源疫苗抗原应用最广泛的菌属。这主要归因于鼠伤寒沙门氏菌感染鼠类的模型同人伤寒沙门氏菌感染人类的机制基本一致,且对鼠伤寒沙门氏菌的毒力因子已有深入的研究。现已用于伤寒沙门氏菌减毒突变的基因包括:控制芳香族化合物生物合成的 *aro* 基因^[18],影响脂多糖合成的 *galE* 基因^[19],调节环腺苷酸代谢水平的 *cya*、*crp* 基因^[20],控制嘌呤生物合成的 *pur* 基因^[21],调控基因转录的非特异性酸性磷酸酶 *phoP* 基因^[22],以及调节 porin 表达的 *ompR* 基因^[23]等。许多实验室已突变这些相关基因而成功地构建了无毒、并且具有免疫原性的伤寒沙门氏菌株,在小鼠、牛、猪等动物甚至志愿者体内实验证明安全有效^[24-29],但用这些减毒株表达外源保护性抗原时,通常将编码保护性抗原的基因克隆在含抗药基因的载体上,为使质粒稳定,必须用抗生素作为选择压力。按照美国 FDA 食品与药物管理机构(Food and Drug Administration)的规定,活疫苗中不能存在抗药质粒,且在人和动物体内,无法以抗生素来维持重组质粒的稳定性。

为了在没有抗生素存在条件下,外源保护性抗原能在减毒伤寒沙门氏菌中稳定表达,目前已发展起来一种新型的质粒载体系统,即载体-宿主平衡致死系统。载体-宿主平衡致死系统的宿主菌是一类染色体突变体,突变的基因是管家基因(Housing keeping gene) 因其编码的产物催化细菌的基因代谢反应,故该基因的缺陷必然导致细菌成为营养缺陷型,不能在正常培养基上生长。当引入带有其互补基因的重组质粒后,因与缺陷型宿主菌构成遗传互补,故可在正常培养基上生长。在这一条件下,质粒对细菌的生存成为必需。一旦转化子质粒丢失,细菌则由于不能合成必需物质,又不能在正常培养基

上生长,因此,凡是能在正常培养基上生长的细菌,必定包含重组质粒,从而构成了平衡致死系统。在该系统中,在没有抗菌素存在的情况下,外源保护性抗原能在受体菌中稳定表达。其中,以 *asd* 基因构建的平衡致死系统得到广泛使用,如 Redman 等将链球菌的表面蛋白抗原基因克隆至带 *asd*⁺ 的质粒,然后转化至 $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ 三缺陷鼠伤寒沙门氏菌株,小鼠口服免疫试验结果表明,重组菌能诱导小鼠产生持续性的抗体应答反应^[30]。还有学者将表达乙肝病毒 core pre S 蛋白的 $\Delta cya \Delta (crp cdt) \Delta asd$ 伤寒沙门氏菌,在成年妇女志愿者体内进行试验,结果表明,该菌株能激发机体全身性和粘膜性免疫应答,并且在泌尿生殖道和肠道产生特异的分泌型抗体 (sIgA)^[31]。

我们即利用上述系统完成了表达 AB 的减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗的构建工作。由于沙门氏菌细胞壁厚难以转化,我们采用敲除了 *asd* 基因的 *E. coli* X6097 作为挑选重组克隆的宿主。挑出的重组质粒电击转入中间宿主 *S. typhimurium* X3730。X3730 是减毒鼠伤寒沙门氏菌 LT-2 的 *galE* 突变型菌株,并已敲除了 *asd* 基因,它缺失了限制性作用而具有修饰作用,由于它的修饰作用,进入该宿主的质粒可获得鼠伤寒沙门氏菌的甲基化模式,从而能稳定地存在鼠伤寒沙门氏菌中。我们用从 X3730 中分离的经特异甲基化模式的重组质粒电转入终宿主菌 X4072 而不受限制,从而完成了构建工作。

动物实验证明重组菌株是安全的。ELISA 检测发现 AB 蛋白主要以分泌形式表达,但表达水平较低,然而对于以疫苗构建为目标的重组菌株,比高水平表达更重要的一个问题是外源基因表达的稳定性问题,因为工程菌必须能在体内较长时间地存活并稳定地释放抗原,才能有效地激活机体的免疫系统应答,过高水平的表达可能破坏菌株作为一个完整有机体的生化平衡,使宿主菌难以维持外源基因的稳定性表达。我们构建的重组菌株具有良好的稳定性,在没有选择压力的情况下,重组质粒能维持稳定存在,外源基因也能稳定地表达,且其生长曲线并未因外源基因的表达而出现明显的改变。这其中的主要原因可能就是外源基因表达水平相对于宿主的适中。另外,根据 Philip 等关于免疫防治 Hp 的“less is best”的原则^[32],即低的抗原剂量较高的抗原剂量免疫效果更佳,也许这种稳定的低水平表达 Hp 抗原的减毒鼠伤寒沙门氏菌活疫苗能够产生更好的免疫效果,有关动物实验验证我们正在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Janowitz H D , Abittan C S , Fiedler L M . A gastroenterological list for the millennium. *J Clin Gastroenterol* , 1999 , **29** : 336 - 338
- [2] Kirsner J B . The origin of 20th century discoveries transforming clinical gastroenterology. *Am J Gastroenterol* , 1998 , **93** : 862 - 871
- [3] Fireman Z , Trost L , Kopelman Y *et al* . Helicobacter pylori : seroprevalence and colorectal cancer. *Isr Med Assoc J* , 2000 , **2** (1) : 6 - 9
- [4] Blaser M J . Helicobacter pylori : its role in disease. *Clin Infect Dis* , 1992 , **15** : 386 - 393
- [5] Parsonnet I , Friedman G D , Vandersteen D P *et al* . Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* , 1991 , **325** : 1132 - 1136
- [6] Parsonnet J , Hansen S , Rodriguez L *et al* . Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* , 1994 , **330** : 1267 - 1271
- [7] BAI Y (白杨) , ZHANG Y I (张亚历) , WANG J IX (王继德) *et al* . Cloning and high expression of Helicobacter pylori adhesin *alpA* gene. *Journal of Fourth Military Medical University* (第四军医大学学报) , 2002 , **23** (16) : 1490 - 1492
- [8] Michetti P . Vaccine against Helicobacter pylori : fact or fiction? *Gut* , 1997 , **41** (6) : 728 - 730
- [9] Tytgat G N J . Aspects of anti-Helicobacter pylori eradication therapy. In : Hunt RH Tytgat GNJ (eds) Helicobacter pylori basic mechanisms to clinical cure. Amsterdam , Kluwer . 1996 , pp. 340 - 347
- [10] BAI Y (白杨) , ZHANG Y I (张亚历) , WANG J IX (王继德) *et al* . Cloning , expression and activity of catalase gene of *H. pylori*. *Chinese Journal of Digestion* (中华消化杂志) 2002 , **22** (4) : 203 - 205
- [11] Tomb J F , White O , Kerlavage A R *et al* . The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* , 1997 , **388** (6642) : 539 - 547
- [12] Doig P , Trust T J . Identification of surface-exposed outer membrane antigens of Helicobacter pylori. *Infect Immun* , 1994 , **62** : 4526 - 4533
- [13] Rijpkema S G . Prospects for therapeutic Helicobacter pylori vaccines. *J Med Microbiol* , 1999 , **48** (1) : 1 - 3
- [14] BAI Y (白杨) , ZHANG Y I (张亚历) , WANG J IX (王继德) *et al* . Conservative region of the genes encoding four adhesins of Helicobacter pylori : cloning , sequence analysis and biological information analysis. *Journal of First Military Medical University* (第一军医大学学报) , 2002 , **22** (10) : 869 - 871
- [15] BAI Y (白杨) , DAN H I (但汉雷) , WANG J IX (王继德) *et al* . Cloning , expression , purification and identification of conservative region of four Helicobacter pylori adhesin genes in *AlpA* gene. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展) 2002 , **29** (6) : 922 - 926
- [16] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular cloning : a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [17] BAI Y (白杨) , ZHANG Y I (张亚历) , WANG J IX (王继德) *et al* . Study on the cloning , expression and the immunogenicity of Helicobacter pylori heat shock protein 60 gene. *Journal of First Military Medical University* (第一军医大学学报) 2002 , **22** (1) : 3 - 5
- [18] Stocker B A . Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine. *Vaccine* , 1988 , **6** (2) : 141 - 145
- [19] Hone D , Morona R , Attridge S *et al* . Construction of defined galE mutants of Salmonella for use as vaccines. *J Infect Dis* , 1987 , **156** (1) : 167 - 174
- [20] Curtiss R 3rd , Kelly S M . Salmonella typhimurium deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* , 1987 , **55** (12) : 3035 - 3043
- [21] McFarland W C , Stocker B A . Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of Salmonella dublin and of two strains of Salmonella typhimurium. *Microb Pathog* , 1987 , **3** (2) : 129 - 141
- [22] Hohmann E L , Oletta C A , Miller S I . Evaluation of a phoP/phoQ-deleted , *aroA*-deleted live oral Salmonella typhi vaccine strain in human volunteers. *Vaccine* , 1996 , **14** (1) : 19 - 24
- [23] Dorman C J , Chatfield S , Higgins C F *et al* . Characterization of porin and ompR mutants of a virulent strain of Salmonella typhimurium : ompR mutants are attenuated in vivo. *Infect Immun* , 1989 , **57** (7) : 2136 - 2140
- [24] Curtiss R 3rd , Galan J E , Nakayama K *et al* . Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* , 1990 , **141** (7 - 8) : 797 - 805
- [25] Maskell D J , Sweeney K J , O 'Callaghan D *et al* . Salmonella typhimurium *aroA* mutants as carriers of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microb Pathog* , 1987 , **3** (3) : 211 - 221
- [26] Clements J D , El-Morshidy S . Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-Escherichia coli-related diarrheas. *Infect Immun* , 1984 , **46** (2) : 564 - 569
- [27] Giron J A , Xu J G , Gonzalez C R *et al* . Simultaneous expression of CFA/II and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic Escherichia coli by delta *aroC* , delta *aroD* Salmonella typhi vaccine strain CVD 908. *Vaccine* , 1995 , **13** (10) : 939 - 946
- [28] Formal S B , Baron L S , Kopecko D J *et al* . Construction of a potential bivalent vaccine strain : introduction of Shigella sonnei form I antigen genes into the galE Salmonella typhi Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect Immun* , 1981 , **34** (3) : 746 - 750
- [29] Hone D M , Harris A M , Chatfield S *et al* . Construction of genetically defined double *aro* mutants of Salmonella typhi. *Vaccine* , 1991 , **9** (11) : 810 - 816
- [30] Redman T K , Hamon C C , Michalek S M . Oral immunization with recombinant Salmonella typhimurium expressing surface protein antigen A (SpaA) of Streptococcus sobrinus : effects of the Salmonella virulence plasmid on the induction of protective and sustained humoral responses in rats. *Vaccine* , 1996 , **14** (9) : 868 - 878
- [31] Nardelli-Haeffliger D , Benyacoub J , Lemoine R *et al* . Nasal vaccination with attenuated Salmonella typhimurium strains expressing the Hepatitis B nucleocapsid : dose response analysis. *Vaccine* , 2001 , **19** (20 - 22) : 2854 - 2861
- [32] Sutton P , Wilson J , Lee A . Further development of the Helicobacter pylori mouse vaccination model. *Vaccine* 2000 , **18** (24) : 2677 - 2685

Construction of the Attenuated *Salmonella typhimurium* Strain Expressing *Helicobacter pylori* Conservative Region of Adhesin Antigen

BAI Yang¹ WANG Ji-De¹ ZHANG Zhao-Shan² ZHANG Ya-Li^{1*}

¹(PLA Institute for Digestive Medicine ,the First Military Medical University ,Guangzhou 510515 ,China)

²(Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100071 ,China)

Abstract Abstract To construct a non-resistance and attenuated *Salmonella typhimurium* strain which expresses conservative region of adhesin (AB) of *Helicobacter pylori* (Hp). The AB gene was amplified by PCR and inserted into the expression vector pYA248 containing *asd* gene and was introduced into the delta Cya ,delta Crp ,delta Asd attenuated *Salmonella typhimurium* strain by twice transformations , which is a balanced lethal recombinant. Bridged ELISA method was used to measure AB expressed in sonicate and culture supernatant. According to Meacock 's way and growth curve , stability of the recombinant is evaluated. Semi-lethal capacity test was used to evaluate the safety of recombinant. Results showed *S. typhimurium* X407 χ (pYA248- AB) was constructed successfully , recombinant X407 χ (pYA248- AB) content of supernatant serum was higher than that of thal-lytic liquor confirmed by bridged ELISA , and after recombinant pYA248- AB cultured 100 generation without selection pressure , all the recombinant germ selected randomly can grow , and the AB antigen was positive by ELISA detection. The growth curve of the recombinant germ showed that the growth state of X407 χ (pYA248) and X407 χ (pYA248- AB) were coincidence on the whole , and the survival rate of C57BL/6 was still 100% , 30 days after taking X407 χ (pYA248- AB) 1.0×10^{10} cfu. orally. Non-resistance *S. typhimurium* X407 χ (pYA248- AB) was constructed successfully. The recombinant plasmid was stable indicated by *in vitro* experiment. And the recombinant strain was safe confirmed by animal experiment. This live vaccine strain is worthy to be considered as a new live oral vaccine candidate against Hp infection.

Key words *Helicobacter pylori* , conservative region of adhesin , *Salmonella typhimurium* , recombination

Received : 11-29-2002

This work was supported by grants from The State 863 High Technology R & D Project of China (No. 102-07-03-06) , The National Natural Sciences Foundation of China (No. 30270078) and Military ' ten-five ' Commanding Project.

* Corresponding author. Tel 86-20-85141532 ; E-mail baiyang1030@hotmail.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>