

可以携带同种耐药基因盒,如 1T 和 3T 质粒均携带了 *dfmA17-ORF5-aadA5* 基因盒,这种现象反映了耐药基因盒的频繁流动性。此外,在产 AmpC 酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中发现同样类型的整合子,表明携带多重耐药基因的整合子不仅可以在种内传播,不同种属间也可以发生转移,说明整合子转移的广泛性,这些都给多重耐药产 AmpC 酶细菌的抗感染治疗带来巨大的威胁。整合子存在方式和传播的灵活性,加速了多重耐药性的扩散,应引起足够的重视。临床实践中应加强抗生素的合理使用,减少整合子发生,以利于延缓多重耐药菌株的产生。

参 考 文 献

1 Philippon A, Arlt G, Jacoby GA, et al. Plasmid-determined AmpC type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 1-11.

2 Bennett PM. Integron and gene cassette: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 43: 1-4.
3 陆坚,唐英春,吴本权,等.产超广谱 β 内酰胺酶临床分离株可转移多重耐药分子机制的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 4: 199-202.
4 Zhang H, Shi L, Li L, et al. Identification and characterization class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol Immunol*, 2004, 48: 639-645.
5 Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, et al. Incidence of class 1 and class 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals and exotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 723-726.
6 Colils CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 155-162.
7 Chang CY, Chang LL, Chang YH, et al. Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class I integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC *J Med Microbiol*, 2000, 49: 1097-1102.

(收稿日期:2005-07-13)

·细菌学·

幽门螺杆菌 NCTC11639 标准株 *lpp20* 基因的克隆、表达及其抗原性的鉴定

李妍 宁云山 龙敏 董文其 李明

Lpp20 是 *Hp* 一种高度保守的膜蛋白,有研究表明其具有较强的免疫活性和免疫保护性,是一种理想的疫苗候选抗原。本研究利用基因工程技术构建了含 *lpp20* 基因的重组质粒,并进行了表达,为 *Lpp20* 疫苗的研究奠定了基础。

本研究参考 GenBank 收录的 *Hp* 国际标准株 26695 的基因序列,应用 Primer5.0 设计 *Hp lpp20* 基因的 PCR 引物:P1 5'-GAATTCATGAAAAATCAAGTAAAAA-3',P2 5'-GTCGACCTACTTTTAAACCATGC-3',在上、下游引物中分别加入 EcoR I 和 Sal I 酶切位点,以提取的 *Hp* 标准株 NCTC11639 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 60 s,退火 58℃ 50 s,延伸 72℃ 50 s,

共进行 35 个循环,最后一个循环结束后 72℃再延伸 6 min。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析,PCR 扩增目的条带大小约为 500 bp。首先将目的基因进行 T-A 克隆,即 *Lpp20/pMD-18* 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态中,挑取单个菌落,于 37℃,以 220 r/min 摇过夜菌,提取质粒,进行 EcoR I 和 Sal I 双酶切鉴定。将鉴定正确的重组质粒 *Lpp20-pMD18-T* 送上海博亚公司进行测序,*lpp20* 全长 528 bp,登录到 GenBank 上(登录号为 DQ106902),与 GenBank 上公布的其他菌株(26695, MEL-HP27, J99, CH-CTX1, 17874, 60190, chongqing)的 *lpp20* 核酸序列相比同源性为 96%~97%。将重组质粒 *Lpp20/pMD18-T* 和表达载体质粒 *pGEX-4T-1* 都用 EcoR I 和 Sal I 双酶切,胶纯化后按 4:1 用 T4 连接酶 16℃连接过夜,产物转化到 *E. coli* TOP10 感受态中,涂于含氨苄青霉素(100 μ g/ml)LB 固体培养基平皿过夜培养。挑取单菌落,37℃ 220 r/min,摇过夜菌,提取质粒,用 EcoR I 和 Sal I 进行双酶切鉴定,切出

大约 5000 bp 表达载体和 528 bp 目的基因片段。将含 *Lpp20/pGEX-4T-1* 的工程菌用 IPTG(1 mmol/L)诱导 4 h,温度为 30℃,经 SDS-PAGE 分析表达出相对分子质量(M_r)约为 48×10^3 的融合蛋白。表达菌体超声破菌后,在上清和沉淀中都存在目的蛋白,取上清进行 GST 亲和层析纯化。将纯化后的 *Lpp20* 行 Western blot, *Lpp20* 先进行 12% SDS-PAGE,转移至 NC 膜上,分别与全菌 *Hp* 免疫的小鼠血清(1:200)、正常人血清(1:100)、*Hp* 患者血清(1:100)反应,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠或羊抗人 IgG,结果为 *Lpp20* 与全菌免疫的小鼠血清和 *Hp* 患者血清都有反应,而与正常人血清没有反应。间接 ELISA 鉴定 29 株抗 *Hp* 的鼠单克隆抗体(*Hp* 全菌免疫 BALB/c 小鼠),*Lpp20* 蛋白(5 μ g/ml)包被酶标板,依次加入 29 株 McAbs,二抗为 HRP-标记的羊抗鼠 IgG,测定波长 450 nm 时的吸光度(A)值,共有 4 株针对 *Lpp20* 蛋白,说明了重组 *Lpp20* 具有很好的抗原性。

(收稿日期:2005-11-24)

基金项目:国家重大攻关项目资助(No. 2001CB510208)

作者单位:510515 广州,南方医科大学生物技术学院

通讯作者:李明,Email: mingli @ fimmu.com,电话:020-61648550