

# 减毒鼠伤寒沙门氏菌全长 *hpaA* 基因工程菌的构建\*

朱森林 陈旻湖 陈 洁 胡品津 李国庆

(中山医科大学附属第一医院 广州 510080)

**摘 要:**为构建表达 HpaA 蛋白的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌,并探讨以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体构建 *H. pylori* 疫苗株的意义,应用 PCR 法从 *H. pylori* 基因组 DNA 中扩增 783bp 的 *hpaA* 基因,经酶切-连接反应将其克隆入原核表达质粒 pTrc99A 的 *Nco* I -*Sal* I 位点,并进行了核苷酸序列测定。重组质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261,提取重组菌质粒,PCR 和酶切鉴定,筛选阳性克隆。用 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 进行 HpaA 表达分析和鉴定,用薄层扫描分析 HpaA 含量。重组菌 C57BL/6 小鼠喂灌,分批 2 d 和 10 d 后处死小鼠,取脾和末段回肠进行细菌培养,挑菌落提质粒鉴定。结果表明,经 PCR 和酶切证实,构建了含 783bp *hpaA* 基因的重组原核表达质粒,并将后者成功转化了减毒鼠伤寒沙门氏菌。重组菌能表达约 30kD HpaA 蛋白,重组 HpaA 量约占全菌体蛋白量的 38.9%,Western blot 证实其有免疫反应性。小鼠重组菌喂灌 2 d 或 10 d 后,脾和末段回肠均发现携目的基因的菌落。这些结果提示,构建了表达 *H. pylori* HpaA 的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌,为制备以减毒鼠伤寒沙门氏菌为抗原释放系统的 *H. pylori* 口服活疫苗进行了有益探索。

**关键词:** 幽门螺杆菌, *hpaA* 基因, 鼠伤寒沙门氏菌, 疫苗, 重组

中图分类号: R378.2 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0027-06

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 现已被公认为慢性胃炎和消化性溃疡的重要致病菌,并与胃癌和胃淋巴瘤形成关系密切。虽然联合化学药物治疗可取得较高的根除率,但也存在不少问题,如菌株的耐药率升高,药物副作用较明显及药价偏贵,故难以推广。因此,人群 (*H. pylori*) 感染的防治应建立在有效疫苗应用的基础上。*hpaA* 为 *H. pylori* 所特有,它编码 *H. pylori* 鞭毛粘附素与受体结合的亚单位蛋白,后者有免疫原性<sup>[1,2]</sup>。活减毒鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 能表达和释放外源抗原,在哺乳动物中经口、鼻、直肠和阴道粘膜途径免疫能诱导强大而特异的免疫反应<sup>[3]</sup>。我们将全长 *hpaA* 基因克隆入表达质粒 pTrc99A,并进行了核苷酸测序,再将重组质粒导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261,构建成表达幽门螺杆菌 HpaA 蛋白减毒鼠伤寒沙门氏菌株,为探索以制备减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体的 *H. pylori* 口服组份活疫苗打基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

减毒鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) LB5000 (LT2 Trp MetE rpsI flaA etc, R<sup>-</sup>

\*卫生部临床学科重点项目 (97040226)、CMB Scholar Program (98-677)、广东省科技计划重点攻关项目 (99M04802G)、广东省自然科学基金课题 (990077) 和广东省高教厅“千百十工程”优秀人才基金 (2000-08)

作者简介:朱森林 (1968-),男,江西修水人,主治医师,医学博士,从事幽门螺杆菌感染免疫防治及其机理研究。

收稿日期:2001-02-05,修回日期:2001-04-16

M<sup>+</sup> for all three systems)和 SL3261(WARY hisG 46 aroA del 407 Fusaricres etc, R<sup>+</sup> M<sup>+</sup>)为本室保存菌株,用 Amp(-)LB 培养基 37℃ 培养。*H. pylori* Sydney strain 1(SS1)为澳大利亚新南威尔士大学 Lee 教授惠赠,用改良 Skirrow 培养基,37℃ 微需氧培养。原核表达载体 pTrc99A 质粒(有 amp<sup>r</sup> 筛选标记)和 JM105 菌株购自 Amersham Pharmacia 公司。

## 1.2 试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、Sal I、T4 DNA 连接酶、山羊抗小鼠 IgG-HRP 购于华美生物工程公司,高保真 Taq DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术有限公司,NcoI 购于宝生物工程大连有限公司,丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺 Promega 公司产品,一抗为小鼠经 4 次 *H. pylori* 超破全菌体蛋白免疫所得免疫血清(本室制备),QIAprep Spin Miniprep Kit、QIAquick Gel Extraction Kit 为基因有限公司产品,GeneAmp PCR 系统 2400、ABI PRISM™ 377XL DNA 测序仪为 Perkin Elmer 公司生产,Sonics-VCX600 超声细胞粉碎仪、蛋白电泳仪和电转移仪为 Bio-Rad 公司生产,CS930 型双波长薄层扫描仪为岛津公司生产。

## 1.3 pTrc99A-hpaA 原核表达载体的构建<sup>[4]</sup>

引物据基因文库中提供的 *hpaA* 序列设计、由上海生工生物工程技术有限公司合成如下:P1 5'-CGCCATGGCTAAAGCAAATAAT-3',P2 5'-GCGTCGACTTATCGGTTTCT-3'。据载体的多克隆位点已在 P1 的 5'端加 NcoI 酶切位点,P2 的 5'端加 SalI 酶切位点,并确保读框正确。提取 *H. pylori* 基因组 DNA 为模板,以 P1,P2 为引物用 PCR 扩增 *hpaA*。QIAquick Gel Extracton Kit 回收目的片段。后者与 pTrc99A 质粒同时用 NcoI 和 SalI 双酶切,去除小片段,然后用 T4 DNA 连接酶将酶切后 *hpaA* 接入 pTrc99A NcoI-SalI 位点。连接产物转化 JM105,挑选 Amp 抗性克隆,用 QIAprep Spin Miniprep Kit 提取质粒,用 PCR 和双酶切鉴定,筛选阳性克隆。

## 1.4 重组质粒 *hpaA* 核苷酸测序

挑选阳性克隆,提取质粒,以 P1,P2 为引物对 *hpaA* 基因进行序列测定。

## 1.5 pTrc99A-hpaA 重组质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏菌<sup>[4]</sup>

重组质粒 pTrc99A-*hpaA* 和空质粒 pTrc99A 用氯化钙法转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000,筛选阳性克隆,提取修饰后质粒进一步转化终疫苗宿主菌 SL3261,挑选 Amp 抗性克隆,用 PCR(方法同 1.3)和双酶切鉴定。

## 1.6 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的稳定性

将 8 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠随机平均分成 A,B 两组,A 组每只喂灌接种 10<sup>9</sup> 转导空质粒的减毒鼠伤寒沙门氏菌,B 组每只接种相同量重组质粒转化的减毒鼠伤寒沙门氏菌。两组均于 2d 和 10d 后分别处死两只,取脾脏和末段回肠 2cm 匀浆,在 Amp(+)LB 培养基上培养,挑菌落提取质粒,双酶切鉴定。

## 1.7 重组蛋白 SDS-PAGE 和薄层扫描分析

挑取重组菌落和对照菌落(转化 pTrc99A 空载体的 SL3261),在 LB 培养液中 37℃ 振荡过夜,取 20μL 加入 2mL LB 培养液中 37℃ 振荡培养 5h,各取 1mL 培养物制备成上样样品。取重组菌和对照菌各 10μL 蛋白样品于 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶于考马斯亮蓝 R250 液中染色,然后固定脱色,进行薄层扫描。

## 1.8 Western Blot 分析

按上述方法进行蛋白表达和 SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素膜,2%牛血清白蛋白(BSA)37℃封闭 30min,加入一抗 4℃过夜,山羊抗小鼠 IgG-HRP 37℃ 1h,经 TBS 振洗后,4-氯-1-萘酚显色。

## 2 结果

### 2.1 pTrc99A-*hpaA* 重组质粒的构建

按材料和方法构建 pTrc99A-*hpaA* 重组质粒,以此为模板 PCR 能扩出 783bp 目的片段,双酶切后可见线性化载体片段和目的基因,表明重组载体构建成功(见图 1)。

### 2.2 *hpaA* 的核苷酸序列测定

重组质粒测序及推测的氨基酸顺序见图 2,显示 *hpaA* 基因已成功克隆入载体,测出序列与基因文库 *hpaA* 序列(Accession Number 为 AE000591)比,有 23 个碱基置换,一致性为 97.06%(760/783),但不能排除其中有 PCR 引起的突变,多数(19/23)置换没改变所编码氨基酸残基,且存在粘附素受体结合基元 K-R-T-I-Q-K 编码序列,与所报道情况相似<sup>[2,5]</sup>。

### 2.3 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的鉴定结果

从重组减毒鼠伤寒沙门氏菌提取质粒,以 P1,P2 为引物 PCR 能扩出 783bp 目的片段,*Nco*I 和 *Sal*I 双酶切后亦可见线性化载体片段和目的基因(见图 1)。

### 2.4 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的稳定性

A,B 两组小鼠的脾和末段回肠均能培养出 Amp 抗性菌落,B 组菌落所提质粒用 *Nco*I 和 *Sal*I 双酶切能切出 783bp 目的片段,而对照 A 组不能。

### 2.5 *hpaA* 在重组菌中的表达分析

重组菌的 SDS-PAGE 分析显示,在 30kD 左右出现一条新生蛋白带,与 HpaA 分子量相符,经 Western blot 能免疫着色,而对照菌体蛋白中无该条蛋白带,薄层扫描分析展示,HpaA 量约占总菌体蛋白的 38.9%(见图 3,4)。

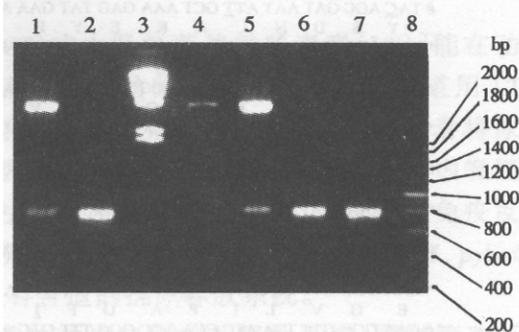


图 1 携带 *hpaA* 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的鉴定  
Fig.1 Identification of a recombinant attenuated *S. typhimurium* vaccine strain carrying *hpaA* by agarose gel electrophoresis, showing 783bp *hpaA* gene

1. Plasmid from the tenth generation of recombinant vaccine strain digested by both *Nco*I and *Sal*I; 2. *hpaA* gene amplified from plasmid in recombinant strain by PCR; 3.  $\lambda$  DNA/*Hind* III Markers; 4. pTrc99A digested by both *Nco*I and *Sal*I as negative control; 5. Recombinant pTrc99A-*hpaA* expression plasmid digested by both *Nco*I and *Sal*I; 6. *hpaA* gene amplified from recombinant pTrc99A-*hpaA* expression plasmid by PCR; 7. *hpaA* gene amplified from *H. pylori* genome DNA by PCR; 8. Molecular standard, 200bp ladders.

```
*ATG AAA GCA AAT AAT CAT TTT AAA GAT TTT GCA TGG AAA AAA TGC CTT TTA GGC GCG AGC GTG GTG
M K A N N H F K D F A W K K C L L G T S V V
#ATG AAA GCA AAT AAT CAT TTT AAA GAT TTT GCA TGG AAA AAA TGC CTT TTA GGC GCG AGC GTG GTG
M K A N N H F K D F A W K K C L L G T S V V
*GCT TTA TTA GTG GGA TGC AGC CCG CAT ATT ATT GAA ACC AAT GAA GTC GCT TTG AAA TTG AAT TAC
A L L V G C S P H I I E T N E V A L K L N Y
#GCT TTG TTA GTG GGA TGC AGC CCG CAT ATT ATT GAA ACC AAT GAA GTC GCT TTG AAA TTG AAT TAC
A L L V G C S P H I I E T N E V A L K L N Y
*CAT CCA GCT AGC GAG AAA GTT CAA GCG TTA GAT GAA AAG ATT TTG CTT TTA AGG CCA GCT TTG CAA
H P A S E K V Q A L D E K I L L L R P A F Q
#CAT CCA GCT AGC GAG AAA GTT CAA GCG TTA GAT GAA AAG ATT TTG CTT TTA AGG CCA GCT TTG CAA
H P A S E K V Q A L D E K I L L L R P A F Q
```

```

* TAT AGC GAT AAT ATC GCT AAA GAG TAT GAA AAC AAA TTC AAG AAT CAA ACC GCG CTC AAG GTT GAA
Y S D N I A K E Y E N K F K N Q T A L K V E
# TAC AGC GAT AAT ATT GCT AAA GAG TAT GAA AAC AAA TTC AAG AAT CAA ACC GCG CTC AAG GTT GAA
Y S D N I A K E Y E N K F K N Q T A L K V E
* CAG ATT TTG CAA AAT CAA GGC TAT AAG GTT ATT AGA GTA GAT AGC AGC GAT AAA GAC GAT TTT TCT
Q I L Q N Q G Y K V I R V D S S D K D D E S
# CAG ATT TTG CAA AAT CAG GGC TAT AAG GTT ATT AGG GTA GAT AGC AGC GAT AAA GAC GAT CTT TCT
Q I L Q N Q G Y K V I R V D S S D K D D L S
* TTT GCA CAA AAA AAA GAA GGG TAT TTG GCG GTT GCT ATG AAT GGC GAA ATT GTT TTA CGC CCC GAT
F A Q K K E G Y L A V A M N G E I V L R P D
# TTT TCG CAA AAA AAA GAA GGG TAT TTG GCT GTT GCT ATG AAT GGC GAA ATT GTT TTA CGC CCC GAT
F S Q K K E G Y L A V A M N G E I V L R P D
* CCT AAA AGG ACC ATA CAG AAA AAA TCA GAA CCC GGG TTA TTC TCC ACC GGT TTG GAT AAA ATG
P K R T I Q K K S E P G L L F S T G L D K M
# CCT AAA AGG ACC ATA CAG AAA AAA TCA GAA CCC GGG TTA TTC TCC ACT GGT TTG GAT AAA ATG
P K R T I Q K K S E P G L L F S T G L D K M
* GAA GGG GTT TTA ATC CCG GCT GGG TTT ATT AAG GTT ACC ATA CTA GAG CCT ATG AGT GGG GAA TCT
E G V L I P A G F I K V T I L E P M S G E S
# GAA GGG GTT TTA ATC CCA GCC GGG TTT GTC AAG GTT ACC ATA CTA GAG CCT ATG AGT GGG GAA TCT
E G V L I P A G F V K V T I L E P M S G E S
* TTG GAT TCC TTT ACG ATG GAT TTG AGC GAG TTA GAC ATT CAA GAA AAA TTC TTA AAA ACC ACC CAT
L D S F T M D L S E L D I Q E K F L K T T H
# TTG GAT TCT TTT ACG ATG GAT TTG AGC GAG TTA GAC ATT CAA GAA AAA TTC TTA AAA ACC ACC CAT
L D S F T M D L S E L D I Q E K F L K T T H
* TCA AGC CAT AGC GGG GGG TTA GTT AGC ACT ATG GTT AAG GGA ACG GAT AAT TCT AAT GAT GCG ATC
S S H S G G L V S T M V K G T D N S N D A I
# TCA AGC CAT AGC GGG GGG TTA GTT AGC ACT ATG GTT AAG GGA ACG GAT AAT TCT AAT GAT GCG ATC
S S H S G G L V S T M V K G T D N S N D A I
* AAG AGC GCT TTG AAT AAG ATT TTT GCA AAT ATC ATG CAA GAA ATA GAC AAA AAA CTC ACT CAA AAG
K S A L N K I F A N I M Q E I D K K L T Q K
# AAG AGC GCT TTG AAT AAG ATT TTT GCA AAT ATC ATG CAA GAA ATA GAC AAA AAA CTC ACT CAA AAG
K S A L N K I F A N I M Q E I D K K L T Q K
* AAT TTA GAA TCT TAT CAA AAA GAC GCC AAG GAA TTA AAA AAC AAA AGA AAC CGA TAA
N L E S Y Q K D A K E L K N K R N R *
# AAT TTA GAA TCT TAT CAA AAA GAC GCC AAG GAA TTA AAA GGC AAA AGA AAC CGA TAA
N L E S Y Q K D A K E L K G K R N R *

```

图2 *H. pylori* SS1 中 *hpaA* 核苷酸测序结果 (\*) 及其推测氨基酸顺序[与基因文库中 *hpaA* 相比较 (#)]

Fig.2 Nucleotide sequence of *H. pylori* Sydney Strain 1(SS1) *hpaA* gene (\*) and the deduced amino acid sequence[Compared with that in GenBank (#)]

Showing coding sequence of *H. pylori* adhesin receptor-binding motif K-R-T-I-Q-K.

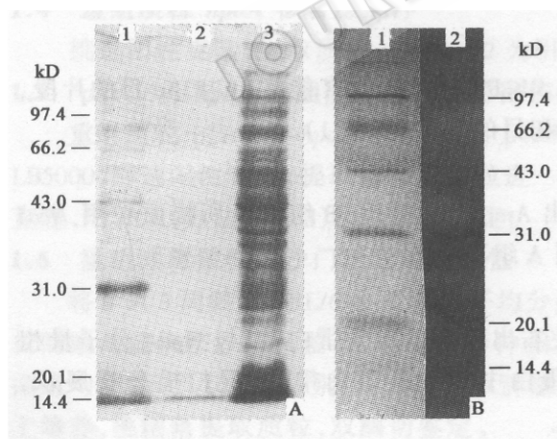


图3 *HpaA* 在重组菌中表达和 Western blot 分析

Fig.3 Expressed *HpaA* in recombinant strain was analyzed by SDS-PAGE(A) and Western blot(B)

A: 1. The recombinant vaccine strain, indicating about 30kD *HpaA*; 2. Middle molecular weight protein markers; 3. The control strain, SL3261 transformed pTrec99A. B: 1. Middle molecular weight protein markers; 2. Recombinant *HpaA*.

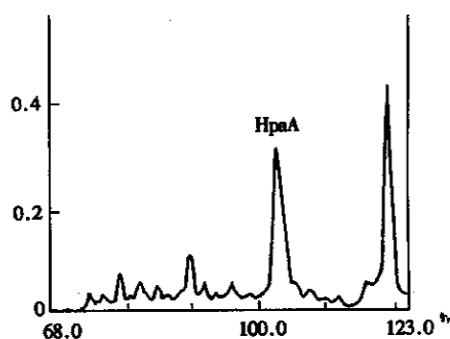


图4 重组菌中 *HpaA* 表达的薄层扫描分析

Fig.4 Expressed *HpaA* in recombinant strain was analyzed by layer scanning determination

### 3 讨论

已知 *H. pylori* 抗原加粘膜佐剂[霍乱毒素(CT)或大肠杆菌热敏肠毒素(LT)]能在动物模型中诱导保护性免疫<sup>[6-9]</sup>。但细菌毒素的毒性作用妨碍其临床应用。有报道用 LT 的无毒突变物 LTK63 或皂甙衍生物作佐剂,取得了较好的免疫效果<sup>[8,10]</sup>。还有学者将尿素酶 B 亚单位基因代替脊髓灰质炎病毒壳体基因,构建成携有尿素酶 B 亚单位基因脊髓灰质炎病毒复制子,经肌注免疫小鼠,再单次肌注重组尿素酶 B 亚单位,也诱导出免疫反应<sup>[11]</sup>。但重组尿素酶的免疫保护作用也有人质疑<sup>[12]</sup>。目前认为,有应用价值的 *H. pylori* 疫苗应该是多个重组 *H. pylori* 蛋白的组合,并应有合适的抗原释放系统。

我们的研究旨在用减毒活鼠伤寒沙门氏菌载体改进口服疫苗释放系统,同时筛选新的疫苗候选组份。活减毒伤寒沙门氏菌属作为表达和释放异种抗原载体,可克服佐剂的缺点,与传统疫苗比有如下优点:不必纯化抗原,不需佐剂,避免了抗原在胃内降解和变性,对所表达的外源抗原的免疫应答不随粘膜免疫途径的变化而变化,并且能诱导细胞介导的、体液的和分泌型 IgA 抗体反应<sup>[3,13,14]</sup>。*H. pylori* 的鞭毛 N-乙酰神经胺乳糖(NL)结合血凝素(NLBH)是 *H. pylori* 的定植因子,是 *H. pylori* 有致病性的原因之一。*hpaA* 基因为 *H. pylori* 所特有,编码保守的 *H. pylori* 鞭毛粘附素与受体结合的亚单位,后者是 NLBH 具有粘膜结合特性的原因,其免疫原性已被证实<sup>[1,2]</sup>。本实验将完整的 *hpaA* 基因克隆入原核表达载体 pTrc99A 质粒,构建成 pTrc99A-*hpaA* 重组质粒,并对所克隆基因进行了核苷酸测序。酶切分析、PCR 和测序均证实重组表达质粒的构建成功。测序结果表明,目的基因内存在粘附素受体结合基元 K-I-T-I-Q-K 编码序列,核苷酸系列与基因文库中相关系列的一致性达 97.06% (760/83),只有四个氨基酸残基发生了改变,进一步证明了该基因的保守性,是它入选疫苗靶基因的必要条件之一。

重组质粒经转化 LB5000 培养后,在 LB5000 中获得甲基化修饰,不会因为外源 DNA 而被减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 中的限制性内切酶降解,故能成功转化疫苗载体菌 SL3261。*HpaA* 表达量约为全菌体蛋白总量的 38.9%。Western blot 结果再次证实其免疫反应性。重组菌能在 C57BL/6 小鼠脾脏和末段回肠(富含 Peyer's patch)较长时间存在,重组质粒不会因重组菌在体内无选择压力而丢失,可见重组菌在体内的稳定性,且对宿主未见明显毒副作用,便于在这些淋巴组织中释放抗原刺激机体产生保护性免疫应答。

构建了表达 *H. pylori hpaA* 基因重组减毒鼠伤寒沙门氏菌株,并证实了其稳定性和所表达的 *HpaA* 的免疫反应性,是为进一步发展有效的以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体的抗 *H. pylori* 感染的活疫苗进行的初步尝试。该法不需佐剂,适应于构建多个表达和释放不同 *H. pylori* 抗原的疫苗株,以探索多效价活疫苗的研究方法。

### 参 考 文 献

- [1] Evans D G, Karjalainen T K, Evans D J Jr, et al. *J Bacteriol*, 1993, 175(3):674 ~ 683.
- [2] Evans D G, Evans D J Jr, Lampert H C, et al. *Am J Gastroenterol*, 1995, 90(8):1282 ~ 1288.
- [3] Hopkins S, Kraehenbuhl J, Schodel F, et al. *Infect Immun*, 1995, 63:3270 ~ 3282.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F & Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Press, 1989.

- [ 5 ] Jones A C, Logan R P, Foynes S, *et al.* *J Bacterol*, 1997, **179**(17):5643 ~ 5647.
- [ 6 ] Chen M, Lee A, Hazell S L. *Lancet*, 1992, **339**:1120 ~ 1121.
- [ 7 ] Lee A, Chen M. *Infect Immun*, 1994, **62**(8):3594 ~ 3597.
- [ 8 ] Guy B, Hesler C, Fourage S, *et al.* *Vaccine*, 1998, **16**(8):850 ~ 856.
- [ 9 ] Lee C K, Soike K, Hill J, *et al.* *Vaccine*, 1999, **17**(11 - 12):1493 ~ 1505.
- [ 10 ] Marcetti M, Rossi M, Giannelli V, *et al.* *Vaccine*, 1998, **16**(1):33 ~ 37.
- [ 11 ] Novak M J, Smythies I E, McPherson S A, *et al.* *Vaccine*, 1999, **17**(19):2384 ~ 2391.
- [ 12 ] Solick J V, Canfield D R, Hansen L M, *et al.* *Infect Immun*, 2000, **68**(5):2560 ~ 2565.
- [ 13 ] Vancott J L, Staats H F, Pascual D W, *et al.* *J Immunol*, 1996, **156**:1504 ~ 1514.
- [ 14 ] Cortesy-Theulaz I E, Hopkins S, Bachmann D, *et al.* *Infect Immun*, 1998, **66**(2):581 ~ 586.

## Construction of *hpaA* Gene-Engineered Attenuated *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain\*

Zhu Senlin Chen Minhu Chen Jie Hu Pinjin Li Guoqing

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University of  
Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** To express *Helicobacter pylori hpaA* gene in attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine vehicle, and elucidate the potential value of attenuated *Salmonella typhimurium* as a vector expressing *Helicobacter pylori* antigens, by means of molecular biology, 783bp *hpaA* gene was cloned into *NcoI-Sall* site of a procaryotic expression plasmid pTrc99A, and the recombinant plasmid was then used to transform an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain SL3261, and the positive clones were screened by PCR and restriction enzyme digestion. HpaA expression was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Two and 10 days after recombinant strain intragastric immunization, the C57BL/6 mice was sacrificed, and the spleen and terminal ileum was cultured for recombinant strain. The results showed that a recombinant procaryotic expression plasmid pTrc99A-*hpaA* was constructed, and the recombinant plasmid was then introduced into an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain SL3261 successfully. HpaA was expressed in the recombinant strains as a 30kD protein, and also its immunogenicity was confirmed by Western blot. Recombinant strain was found in both spleen and terminal ileum of each mouse two and ten days after intragastric immunization. We concluded that a recombinant live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *Helicobacter pylori hpaA* gene was constructed and identified, and this work will help to develop oral recombinant live vaccine strains against *Helicobacter pylori* infection.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, *hpaA* gene, *Salmonella typhimurium*, Vaccine, Recombinant

\* Supported by Key Clinical Project of Ministry of Health (97040226), CMB Scholar Program(98-677), Natural Science Foundation of Guangdong Province(990077) and Key Project Fund of Scientific Committee of Guangdong Province(99M04802G).