

研究报告

P277 多肽融合热休克蛋白 65 提高抗 1 型糖尿病的作用

朱爱华^{1,2}, 鲁勇¹, 金亮¹, 吴洁¹, 李泰明¹, 刘景晶¹

1 中国药科大学生命科学与技术学院微基因药物实验室, 南京 210009

2 徐州师范大学生命科学学院, 徐州 221116

摘要: 为了提高 P277 肽抗 1 型糖尿病的作用, 把 P277 肽融合在卡介苗热休克蛋白 65 的 C 端, 构建了 pET28a-HSP65-P277 高效表达载体, 在大肠杆菌中高效可溶性表达。利用硫酸铵分级沉淀、阴离子交换柱层析分离纯化了融合蛋白 HSP65-P277。使用 HSP65-P277 在没有任何佐剂存在的情况下免疫非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠, 通过三次腹腔注射, 每月收集被免疫动物的血清, 血糖浓度用自动生化分析仪测定。结果显示 HSP65-P277 免疫组小鼠血糖平均值及糖尿病的累积发病率和其余组相比均有显著差异($P < 0.01$), 融合蛋白 HSP65-P277 抗 NOD 小鼠糖尿病的作用显著高于单独的 P277 和 HSP65。为进一步开发能用于临床的 1 型糖尿病疫苗提供了良好的设计思路, HSP65-P277 极有可能进一步发展成为新的抗 1 型糖尿病的疫苗。

关键词: 热休克蛋白, 1 型糖尿病, 疫苗, 融合蛋白, 血糖

Improved Efficacy of P277 Fused to Heat Shock Protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* Against Diabetes in Nonobese Diabetic Mice

Aihua Zhu^{1,2}, Yong Lu¹, Liang Jin¹, Jie Wu¹, Taiming Li¹, and Jingjing Liu¹

1 Minigene Pharmacy Laboratory, School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2 School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China

Abstract: To improve the efficacy of peptide P277 in preventing autoimmune diabetes, heat shock protein 65 kD (HSP65) of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* was fused with linear polypeptide epitope of P277 and expressed as soluble protein in *Escherichia coli*. The fusion protein HSP65-P277 was purified by anion exchange column chromatography and then used to immunize prediabetic NOD mice with three ip inoculations in absence of adjuvants. Serum samples from the immunized mice were collected monthly and the concentration of blood glucose was measured. The study showed that administration of HSP65-P277 to NOD mice could prevent the development of diabetes more efficiently than the peptide P277 itself or HSP65. Fused to heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* could improve the efficacy of diabetes prevention of P277 in nonobese diabetic mice. The results suggest the fusion protein of HSP65-P277 would be useful for treating insulin-dependent diabetes mellitus.

Keywords: heat shock protein, type 1 diabetes mellitus, vaccine, fusion protein, blood glucose

Received: August 31, 2007; **Accepted:** November 15, 2007

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2002 AA217031-2), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30500458, 30672464) and Xuzhou Normal University Natural Science Fund (No. 05XLA10).

Corresponding author: Jingjing Liu. Tel: +86-25-83271242; Fax: +86-25-83204240; E-mail: minigene1@yahoo.com.cn

国家“863”高技术研究发展计划(No. 2002 AA217031-2)、国家自然科学基金项目(Nos. 30500458, 30672464)和徐州师范大学自然科学基金项目(No. 05XLA10)资助。

1 型糖尿病, 又称胰岛素依赖性糖尿病, 现已公认是由 T 细胞作用于胰岛, 引起产生胰岛素的 β 细胞损伤的自身免疫性疾病^[1]。P277 是人热休克蛋白 HSP60 中 ⁴³⁷VLGGGCALLRCIPALDSLTPANED⁴⁶⁰ 的一段多肽, 由 24 个氨基酸组成^[2], P277 至少含有对糖尿病发生有重要作用的一个 T 细胞表位^[3]。单次注射 P277 就可以阻止 1 型糖尿病发生的自身免疫过程, 这种作用可能是由于 P277 多肽可以诱导独特型抗体 IgG1 和 IgG2b 的产生, 引起 Th1 型细胞因子(IFN- γ)向 Th2 型细胞因子(IL-4, IL-10)转变^[4,5], 使引起胰岛素的 β 细胞损伤的炎症反应水平降低。HSP65(Heat shock protein 65 kD)是来自于卡介苗 BCG (Bacillus Calmette-Guérin, *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*)的热休克蛋白(MT-HSP65), 对非肥胖性糖尿病(nonobese diabetic, NOD)小鼠自身免疫性糖尿病的发生也有一定的预防作用^[6], 具体的抗病机制尚不清楚, 但 MT-HSP65 和 P277 没有任何交叉反应抗原表位^[6,7]。

为了提高 P277 抗 1 型糖尿病的作用, 我们把 P277 多肽融合在 HSP65 的 C 端, 构建了 pET28a-HSP65-P277 高效表达载体, 通过硫酸铵分级沉淀、阴离子交换柱层析等可得到纯化的融合蛋白 HSP65-P277。使用 HSP65-P277 在没有任何佐剂存在的情况下免疫 NOD 小鼠, 评估融合蛋白 HSP65-P277 对 1 型糖尿病的保护效果。

1 材料与方 法

1.1 材料

4~5 周龄 NOD/LT 小鼠, 雌性, 购自上海斯莱克实验动物中心, 许可证号: SCXK(沪)2003-0003; 宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)的由本实验室保存; 质粒 pED-P277 由本实验室构建和保存; 质粒 pET28a 购自 Novagen 公司; 限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Bam*HI、*Nco*I、*Bgl* II、T4 DNA 连接酶等工具酶购自大连宝生物工程公司; DNase I 及 RNA 酶, 上海华美生物工程公司; Pfu DNA 聚合酶及溶菌酶, 上海生工生物工程公司; PCR 纯化和胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; DNA marker、中分子量蛋白质 marker 是 Fermentas 公司产品; 阴离子交换树脂 Cellulose-DEAE 52 是美国 Whatman 公司产品; 硝酸纤维素膜是美国 Millipore 公司产品; DAB 显色试剂盒, 武汉

博士德公司; P277 多肽和抗 P277 抗血清由本实验室保存; 引物由上海生工合成; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pET28a-HSP65 和 pET28a-HSP65-P277 的构建

据 MT-HSP65 的基因序列及相应的限制性核酸内切酶位点设计合成 3 条引物: P1 (5'-TTCCG CCATGGCCAAGACAATTGCGTACG-3'), P2(5'-AA AAAGATCTGCGAAATCCATGCCACCCATGT-3')和 P3(5'TTCCGA AAGCTTAGAAAATCCATGCCACCCATG3')。以 BCG 基因组 DNA 为模板, 分别以 P1 和 P2 做为上、下游引物, 常规 PCR 扩增 MT-HSP65 基因。经限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 双酶切后将 HSP65 隆到 pED-P277 质粒中, 获得 pET28-HSP65-P277 质粒。然后以 pET28-HSP65-P277 为模板, 分别以 P1 和 P3(5'TTCCGA AAGCTTAGAAAATCCATGCCACCCATG3')做为上、下游引物, PCR 扩增 HSP65 经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆进 pET28a 质粒中, 获得 pET28-HSP65 质粒。经酶切电泳分析以及最终测序鉴定获得了目的质粒, 结构如图 1 所示。

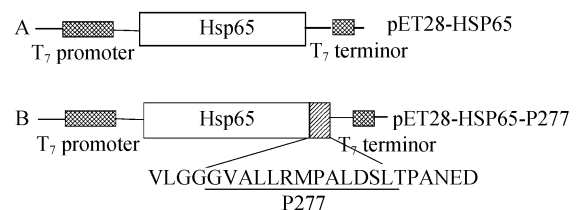


图 1 HSP65 and HSP65-P277 的结构示意图

Fig. 1 Construction of HSP65 and HSP65-P277

1.2.2 重组蛋白 HSP65-P27 和 HSP65 的表达及纯化

挑取含重组质粒 pET28-HSP65 或 pET28a-HSP65-P277 的单菌落分别接种于 5 mL 含有卡那霉素(50 μ g/mL)的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养过夜, 按 1%的接种量接种到新鲜的含卡那霉素的液体 LB 培养基中(含 50 μ g/mL 的卡那霉素), 通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。在扩大培养至 $A_{600}=0.4\sim 0.6$ 时加 IPTG 使终浓度 0.1 mmol/L, 诱导表达 5 h 后收集菌体。溶菌酶(10 μ g/mL)裂解后, 取上清用不同硫酸铵饱和度分级沉淀, 将含目的蛋白最多的硫酸铵沉淀物透析后, 用阴离子交换树脂 Cellulose-DEAE 52 分离化目的蛋白, 把目的蛋白收集, 透析除盐, 冷冻干燥后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.3 重组蛋白 HSP65-P277 中 P277 位点的 Western blotting 检测

将纯化后的重组蛋白 HSP65-P277 和 HSP65 用 12% SDS-PAGE 分离后, 于含甲醇的转移缓冲液中 25V 电压过夜转移至硝酸纤维素膜上。用丽春红短暂染色后, 拍照, 用蒸馏水洗掉丽春红, 然后将膜放置于室温下用 5%BSA TBS 溶液摇动封闭 2 h 后, 加入以 5% BSA TBS 溶液稀释 100 倍的抗 P277 抗血清进行杂交, 37°C 摇动杂交 1 h。以 TTBS 摇动洗涤膜 4 次, 每次 15 min。洗涤后, 加入 1:400 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 二抗, 37°C 作用 1 h。再以 TTBS 洗涤 4 次后, 加入显色液(10 mL 底物液中加入 10 μ L 30% H₂O₂), 直至出现明显条带后, 用蒸馏水冲洗膜以终止反应。膜晾干后扫描保存。

1.2.4 免疫动物

把 40 只 4~5 周龄 NOD 小鼠随机分成 4 组, 每组 10 只。HSP65-P277 给药组, 将纯化后的 HSP65-P277 重组蛋白用灭菌的 PBS 配制成 1 μ g/ μ L 浓度, 腹腔注射 NOD 小鼠, 注射量为 0.1 mL/只, 含 50 μ g 蛋白, 以后每隔 3 周免疫一次, 共 3 次; HSP65 给药组, 将纯化后的 HSP65 用灭菌的 PBS 配制成 1 μ g/ μ L 浓度, 同样的时间 3 次腹腔注射 NOD 小鼠, 注射量为 0.1 mL/只, 含 50 μ g 蛋白; P277 给药组, 将 P277 多肽用弗氏不完全佐剂(Sigma)配制成 1 μ g/ μ L 浓度, 同样时间腹腔注射 NOD 小鼠, 注射量为 0.1 mL/只, 含 50 μ g 蛋白, 共免疫 3 次; 空白对照组, 每只 NOD 小鼠腹腔注射 PBS 0.1 mL, 以后每隔 3 周注射一次, 共 3 次。

1.2.5 血糖的测定

每次免疫后 3 周小鼠眼眶后静脉丛取血一次, 每次 0.2 mL 左右, 4000 r/min, 离心 10 min 取血清。3 次免疫结束后, 小鼠每月眼眶后静脉丛取血一次, 4000 r/min, 离心 10 min, 取血清, 5 h 内用由全自动生化分析仪(Hitachi, model-7150) 测定血糖的浓度。具体步骤由东南大学医学院附属中大医院检验科完成。如果血糖浓度 >11.1 mmol/L 则判为糖尿病。数据通过 *t* 检验统计分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增 MT-HSP65 基因

BCG 含有大量的 HSP65 蛋白, 因此我们提取 BCG 的基因组作为扩增 HSP65 基因的模板。PCR

产物可得一亮带, 大小约为 1.6 kb(图 2), 与理论计算值相一致。

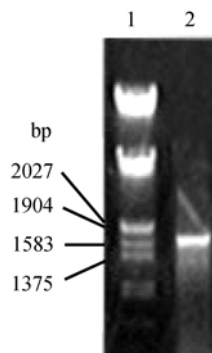


图 2 HSP65 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 2 PCR products analyzed by 1.0% agarose electrophoresis

1: λ DNA/EcoRI/Hind III; 2: PCR products (BCG as template)

2.2 HSP65 和 HSP65-P277 在大肠杆菌中的表达

含重组质粒 pET28-HSP65 或 pET28a-HSP65-P277 的单菌落扩大培养后, 通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。在扩大培养至 $A_{600}=0.4\sim 0.6$ h 加 IPTG 终浓度 0.1 mmol/L 诱导表达 5 h 后收集菌体。12% SDS-PAGE 分析显示 HSP65-P277 和 HSP65 融合蛋白可以在大肠杆菌中有效地表达(图 3)。经由 EXPASY(www.expasy.org) 网站中的 ProtParam 软件, 可以推算出 HSP65 理论分子量为 56726.69, HSP65-P277 理论分子量为 59540.88, 二者序列中均不含 Cys。

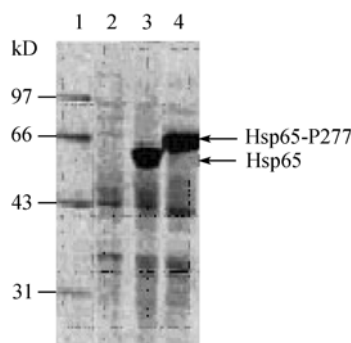


图 3 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression of fusion protein. HSP65-P277 fusion protein was analyzed in 12% SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue. 1: protein molecular weight markers; 2: total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing pET28-HSP65-P277 uninduced by lactose; 3: total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing pET28-HSP65 induced by lactose; 4: total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing pET28-HSP65-P277 induced by lactose

2.3 HSP65 和 HSP65-P277 的纯化

将裂解后的菌体离心, 上清和沉淀分别取样,

12% SDS-PAGE 检测, 目标蛋白出现在裂解上清液中。取上清液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀粗分离后, 再经 Cellulose-DEAE 52 阴离子交换柱分离, 采用 NaCl 浓度梯度洗脱, 各洗脱峰经 12% SDS-PAGE 检测, 收集目的峰。由图 4 可以看出, 采用 DE-52 阴离子交换柱可有效地对 HSP65-P277 作进一步地分离纯化, 纯化后可得到经 SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝染色单一条带的蛋白。

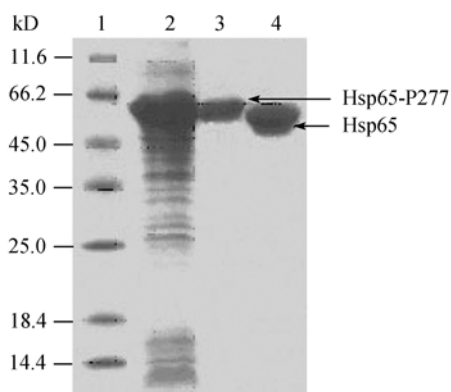


图 4 SDS-PAGE 分析纯化后的融合蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified HSP65-P277 and HSP65
Fusion protein was analyzed in 12% SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue. 1: protein molecular weight markers; 2: the sample of partially purified HSP65-P277; 3: purified HSP65-P277; 4: purified HSP65

2.4 重组蛋白 HSP65-P277 中 P277 位点的 Western blotting 检测

用 P277 抗血清做为抗体通过 western blotting 方法检测重组蛋白 HSP65-P277 是否含有 P277 多肽的特异位点。图 5 显示 HSP65-P277 中含有可和抗 P277 抗血清特异性结合的抗原, 而 HSP65 中不含有。结果表明已成功把 P277 多肽融合在 HSP65 的 C 端。

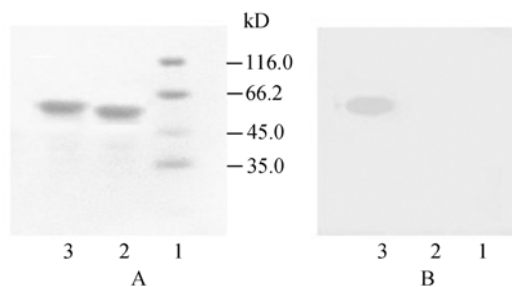


图 5 Western blotting 方法鉴定重组蛋白 HSP65-P277 中的 P277 多肽位点

Fig. 5 P277 of recombinant protein HSP65-P277 assayed by Western blotting

A: proteins on nitrocellulose membrane stained by ponceau after being transferred from 12% SDS-PAGE gel. B: result of Western blotting. 1: protein markers; 2: rHsp65; 3: rHsp65-P277

2.5 动物实验结果

用 HSP65-P277 在不添加佐剂的情况下免疫 NOD 雌性小鼠, 于 4、7、10 周龄分别免疫, 共 3 次, 每次腹腔注射 50 μg 。同时分别给予另三组 PBS、P277 和 HSP65 作为对照。免疫后每月取血, 用全自动生化分析仪测定小鼠血清中的血糖含量(表 1)。在 NOD 小鼠 7 月龄时, 空白对照组(PBS)组血糖平均值就达到 20.5 mmol/L, 而 HSP65-P277 腹腔注射组血糖平均值仅有 4.4 mmol/L, HSP65 腹腔注射组仅到 7.0 mmol/L, 这两组和对照组相比均有显著差异 ($P < 0.01$)。PBS 对照组中最终 NOD 小鼠 8 月龄时血糖的平均值达到 22.8 mmol/L, 而 HSP65-P277 腹腔注射组仅到 6.1 mmol/L, P277 组为 13.6 mmol/L, HSP65 组为 10.3 mmol/L, 和对照组相比均有显著差异 ($P < 0.01$), 同时 HSP65-P277 组和 HSP65 组、P277 组之间血糖差异也显著 ($P < 0.01$)。在 NOD 小鼠 7 月龄时 PBS 对照组小鼠已经有 5 只(50%)发生自发性

表 1 各组小鼠血糖浓度及糖尿病发病率

Table 1 Effect of administering antigens on development of diabetes

Group	Antigene	6 months		7 months		8 months	
		Incidence	blood glucose/(mmol/L)	Incidence	blood glucose/(mmol/L)	Incidence	blood glucose/(mmol/L)
A	PBS	4/10	13.9 \pm 13.5	5/10	20.5 \pm 14.8	7/10	22.8 \pm 14.4
B	P277/IFA	2/10	12.8 \pm 16.3	3/10	13.6 \pm 14.8	3/10	13.6 \pm 14.9
C	HSP65-P277/PBS	0/10	3.9 \pm 1.9	0/10	4.4 \pm 2.5	0/10	6.1 \pm 1.7
D	HSP65/PBS	0/10	4.1 \pm 1.4	1/10	7.0 \pm 3.2	2/10	10.3 \pm 2.6

Four-week-old NOD female mice were treated by ip inoculation with PBS or with 50 μg of the indicated antigens ($n=10$). The mice were inoculated other twice at 7 weeks and 10 weeks of age respectively. Spontaneous IDDM was assayed at ages 6, 7 and 8 months as hyperglycemia (blood glucose ≥ 11.1 mmol/L). The blood glucose data were expressed as mean \pm SD. Paired Student's *t*-test was used. The HSP65-P277 could reduce significantly the severity of spontaneous diabetes developing ($^cP < 0.01$ vs A). Administration of the peptide P277 itself resisted the development of spontaneous IDDM appearing ($^bP < 0.01$ vs A). Incidence of IDDM and blood glucose concentration of group C and group B showed that HSP65-P277 could promote efficacy of prevention the diabetes by the peptide P277 itself ($^cP < 0.01$ vs B) or HSP65 ($^cP < 0.01$ vs D)

糖尿病, 到 8 月龄时最终 10 只 NOD 小鼠中有 7 只自发地发生糖尿病, 而 HSP65-P277 组尚无小鼠产生高血糖, HSP65-P277 组和 PBS 对照组相比具有显著差异($P<0.01$)。HSP65 组中 NOD 小鼠到 8 月龄也仅有 2 只小鼠最终产生自发性糖尿病, P277 组中有 3 只小鼠发病, 这两组和 PBS 对照组相比也具有显著差异($P<0.01$)。三组给药组中 NOD 小鼠糖尿病的发生数和严重程度均低于对照组, HSP65-P277 组和 HSP65 以及 P277 组相比也有显著差异。

3 讨论

线性多肽 P277 可以融合在 HSP65 的羧基端, 我们加入了一个连接肽 Ala-Ser-Ala 柔性接头, 这样可以确保 HSP65 很少受到 P277 中疏水性氨基酸的影响, 能正确折叠。同时 HSP65 为细菌的分子伴侣类蛋白, 可以防止蛋白质在逆境下发生解聚、变性或错误折叠, 还可以帮助新生肽正确折叠。正是由于 HSP65 的超强分子伴侣作用, 融合表达于其羧基端的 P277 似乎并不影响其自身正确折叠, 而形成正确构象后的 HSP65 又可以发挥其分子伴侣的作用辅助其后的 P277 正确折叠, 使整个蛋白质分子以其自然构象而存在, 从而表现为融合蛋白在细菌中仍以可溶性蛋白的形式表达, 而非形成包涵体。这对于将 HSP65 以及 P277 的抗原表位呈现给体内的免疫系统十分重要。

药理实验结果表明 P277 多肽具有明显的预防 NOD 小鼠糖尿病发生的作用。2001 年有学者^[8]利用人工合成的 P277 肽进行了一次随机的, 双盲的二期临床实验, 发现这种多肽对于即使已经诊断(6 个月内)为 1 型糖尿病的患者, 也具有显著的疗效, 且没有任何副作用, 这表明 P277 能挽救机体内未受损 β 细胞的功能, 使其能继续释放内源性胰岛素。

HSP60 是引起胰岛 β 细胞损伤的重要自身抗原之一, 热休克蛋白 HSP60/65 家族高度保守, 细菌和人热休克蛋白之间有很大程度的同源性^[9]。鼠源 HSP60 分子和人 HSP60 分子在氨基酸水平上有 97% 的同源性(DNA 水平上 90%), P277 序列上只有一个氨基酸不同(455 上是 K 而不是 T), MT-HSP65 和人 HSP60 也有大约 50% 的同源性。现已发现几个和 HSP65 相关的自身免疫性疾病, 如大鼠的佐剂性关节炎、人的类风湿性关节炎和动脉粥样硬化^[10,11]。

让人感到有点矛盾的是 HSP65 可以引发关节炎和动脉粥样硬化, 即引起炎症反应, 但我们用 MT-HSP65 免疫 NOD 小鼠却起到了很好的抗 1 型糖尿病作用, 在 1 型糖尿病中发挥作用的 HSP65 表位也许是和 HSP60 相同的抗原表位也许有自己独特的表位。由于 HSP65 和 P277 没有交叉抗原表位, 尽管它们都有预防 1 型糖尿病的作用, 但它们抗糖尿病的机制可能不同。HSP65 分子上有多个 T 淋巴细胞的表位^[12]已被确定, 已经确定和关节炎有关的是 HSP65 180-188 氨基酸, 这是一个可变区, 但人 HSP60 则缺乏这段氨基酸序列。可能机体针对不同的 HSP65 表位反应也许会导致不同的结果, HSP65 上不同的表位可能和不同的自身免疫病有关。因此进一步对 HSP65 表位的辨识将有助于解决这些矛盾。

HSP65 除可作为分子伴侣外, 也可作为分子载体起辅助 T 细胞表位的作用, 并被抗原呈递细胞的 MHCII 分子所识别, 从而激发机体内 CD4+ 细胞的分化增殖。国外有人将疱疹病毒 E7 蛋白和 HSP65 融合表达后免疫小鼠, 在缺乏佐剂的情况下仍可激发小鼠体内产生细胞和体液免疫, 从而有效地保护小鼠抵抗表达 E7 蛋白的 TC-1 肿瘤细胞系的侵袭。Barrios^[13]等采用戊二醛交联的方法将 HSP65 和疟原虫特异性抗原(NANP)₄₀ 相偶联, 在无免疫佐剂存在的情况下也可诱导机体长期产生高水平的抗 (NANP)₄₀ 特异性抗体。此外, 还可以将 HSP65 和细菌多糖相偶联, 无免疫佐剂也可诱导机体产生抗多糖的抗体。我们把 HSP65 和 P277 融合表达, 在不添加佐剂的情况下诱发机体产生免疫反应, 抑制机体对胰岛 β 细胞的自身免疫性攻击, 对 1 型糖尿病具有一定的保护性作用。出于安全性考虑, 免佐剂疫苗具有更强的实用价值。

融合蛋白 HSP65-P277 可以显著减轻 NOD 小鼠自发性糖尿病的发生率和严重程度, 而且不需要任何佐剂, 为人类研究 1 型糖尿病的适当疫苗, 提供了有价值的数据库。

REFERENCES

- [1] Castano L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol*, 1990, 8: 647-679.
- [2] Harrison LC. Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes: Pandora's box revisited. *Immunol Today*, 1992,

- 13: 348–352.
- [3] Nussbaum G, Zanin-Zhorov A, Quintana F, Lider O, Cohen IR. Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. *Int Immunol*, 2006, **18**(10): 1413–1419.
- [4] Ablamunits V, Elias D, Reshef T, Cohen IR. Islet T cells secreting IFN-gamma in NOD mouse diabetes: arrest by P277 peptide treatment. *J Autoimmunity*, 1998, **11**(1): 73–81.
- [5] Sia C. Imbalance in the cell polarization and its relevance in type 1 diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud*, 2005, **2**(4): 182–186.
- [6] Elias D, Tikochinski Y, Frankel G, Cohen IR. Regulation of NOD mouse autoimmune diabetes by T cells that recognize a TCR CDR3 peptide. *Int Immunol*, 1999, **11**(6): 957–966.
- [7] Horvath L, Cervenak L, Oroszlan M, Prohaszka Z.; Uray K, Hudecz F, Baranyi E, Madacsy L, Singh M, Romics L, Fust G, Panczel P. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunology Letters*, 2002, **80**: 155–162.
- [8] Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. β -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomized, double-blind, phase II trial. *Lancet*, 2001, **358**: 1749–1753.
- [9] Jindal S, Dudani AK, Harley CB, Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65 kD mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**: 2279–2283.
- [10] Res PC, Schaar CG, Breedveld FC, van Eden W, van Embden JD, Cohen IR, de Vries RR. Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet*, 1988, **2**: 478–480.
- [11] Metzler B, Mayr M, Dietrich H, Singh M, Wiebe E, Xu Q, Wick G. Inhibition of arteriosclerosis by T-cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **8**: 1905–1911.
- [12] De-Jong WW, Hendriks W, Mulders JW, Bloemendal H. Evolution of eye lens crystallins: The stress connection. *Trends Biochem Sci*, 1989, **14**: 365–368.
- [13] Barrios C, Lussow AR, Van Embden J, Van der Zee R, Rappuoli R, Costantino P, Louis JA, Lambert PH, Del Giudice G. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70 kD mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guerin priming. *Eur J Immunol*, 1992, **22**: 1365–1372.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

益生乳酸细菌——分子生物学与生物技术

郭兴华 主编

978-7-03-020039-6 ¥ 68.00 2008年3月21日出版

本书分上、下两篇。篇有十二章，主要介绍：一、益生乳酸细菌的遗传组织结构及功能，包括基因组学中的结构基因组学、蛋白质基因组学和功能基因组学。二、益生乳酸细菌的基因工程及其调控，各类载体和受体的分子克隆体系及转化方法；细胞表面工程及应用；益生乳酸细菌作为抗原基因载体和药物分子载体的应用和前景；食用乳酸菌的代谢及基因修饰。三、益生乳酸细菌对生产和应用中遇到的各种环境的应激反应机理。四、益生乳酸细菌的主要代谢产物和次生代谢产物。五、益生乳酸细菌的发酵工程，包括直投式发酵、高密度培养、细胞的浓缩收集和噬菌体的防治。六、益生乳酸细菌在生产和应用中防御各种环境对细胞损伤的措施和定向靶位给药(菌)的方法。下篇有 20 个与上篇有关的实验，包括菌的生理功能、分子生物学方法的鉴定、噬菌体的分离、DNA 的提取、遗传转化和 DNA 洗牌育种等。

本书对从事微生物学、微生物生态学、食品科学、免疫学、疫苗、分子克隆、乳酸、多糖、细菌素等研究人员、教师、研究生以及从事益生菌、乳品工业、食品工业、制药工业、发酵工业的工作人员和其他相关人员具有重要的参考价值。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>