

헬리코박터 파일로리 HP0231에 대한 항체 생산

이종욱¹ · 이순열² · 이재학³

건양대학교 의과대학 진단검사의학과¹, 한경대학교 생명공학과², 서일대학 식품영양과³

Production of Antibody against *Helicobacter pylori* HP0231

Jongwook Lee, M.D.¹, Soon Youl Lee, Ph.D.², and Jae Hag Lee, Ph.D.³

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Konyang University¹, Daejeon; Department of Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Hankyong National University², Anseong; Department of Food & Nutrition, Seoil College³, Seoul, Korea

Background : Stool antigen detection kits for diagnosis of infection of *Helicobacter pylori* have been widely used for their convenience, but are mostly imported. Since *Helicobacter pylori* strains show a distinctive genetic diversity, it is important to find a protein that is a common antigen among various strains and shows a strong immunogenicity for the development of a stool antigen detection kit. HP0231 protein strongly reacts with the sera of patients suffering from gastritis and peptic ulcer. Therefore, HP0231 is an excellent candidate as a target gene for this study.

Methods : Chromosomal DNA from *H. pylori* was isolated. HP0231 gene was amplified by PCR, cloned into pET28a(+) vector, and overexpressed using isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside in *E. coli* BL21 (DE3). HP0231 protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography followed by electroelution after SDS-PAGE. Rabbits were immunized with the purified HP0231 protein for the production of antibodies. Rabbit anti-HP0231 antibody was partially purified and tested for the sensitivity and specificity using ELISA and Western Blot Analysis.

Results : The sequence of the cloned HP0231 gene was identical with the gene sequence from Genbank (AA216016). HP0231 gene was overexpressed and HP0231 protein was purified. Rabbit anti-HP0231 antibody produced after immunization with the purified HP0231 protein reacted with the purified HP0231 protein, cell extracts from cultured *H. pylori*, and stomach biopsy tissue from patients, but not with cell extracts from cultured *E. coli* used as a negative control. After 1 million fold dilution, rabbit anti-HP0231 antibody still reacted with 1 μ g of HP0231 protein.

Conclusions : Rabbit anti-HP0231 antibody was produced to detect HP0231 protein of *H. pylori* and will be tested for the development of a stool antigen detection kit for *H. pylori*. (*Korean J Lab Med* 2006;26:98-102)

Key Words : *Helicobacter pylori* HP0231, Stool Antigen Detection, Antibody, Specificity, Sensitivity

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 만성 위염, 위궤양을 일으키

는 그람음성 미호기성 간균으로 호주의 병리학자 Warren과 Marshall이 발견하였다[1-5]. 1995년 세계보건기구는 *H. pylori*를 발암물질로 규정하였으며 위암의 원인 중 하나로 알려져 있다.

H. pylori 감염의 진단방법에는 내시경 실시 유무에 따라 비침습적 방법과 침습적 방법이 있다[6]. 침습적 방법은 내시경으로 조직을 얻어서 검사하는 방법으로 신속요소분해효소검사, 그람염색, 조직학적 검사 등이 있다. 비침습적 방법은 내시경이 필요 없는 검사 방법으로 혈청학적 검사, 요소호기검사(urea breath test, UBT), 중합효소연쇄반응검사(polymerase chain reaction, PCR) 및 대변항원검사 방법 등이 있다[6, 7]. UBT는 요소분해효소의

접 수 : 2005년 12월 14일 접수번호 : KJLM1911
수정본접수 : 2006년 3월 13일
게재승인일 : 2006년 3월 13일
교신저자 : 이재학
우 131-702 서울시 중랑구 면목 8동 49-3
서일대학 식품영양과
전화 : 02-490-7509, Fax : 02-490-7508
E-mail : wjison@seoil.ac.kr

*본 논문은 2004년도 서일대학 학술연구비에 의해 연구되었음.

활성을 측정하는 것으로 검사가 매우 정확하나, 비용이 고가이며, 시간이 많이 소비되고, 방사선 동위원소를 사용해야 하는 문제점 등을 가지고 있다. PCR 방법은 민감한 방법이지만 대변 속에 존재하는 PCR 억제제 처리에 대한 문제점과 통상적인 검사 방법으로서의 한계성을 갖고 있다[8]. 환자의 혈청이나 소변에서 *H. pylori*의 항체를 검사하는 혈청학적 방법은 검출이 용이하고, 저렴하며, 재현성이 높고, 일반적인 기술을 이용하기 때문에 사용이 용이한 장점이 있으나 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있다. *H. pylori* 대변항원검사는 대변 속에 존재하는 *H. pylori* 항원을 검출하는 검사로 방법이 비교적 쉽고, 민감도와 특이도가 높다. 이러한 *H. pylori* 대변항원검사를 개발하기 위해서는 선택적으로 반응하는 민감도가 높은 항체의 개발이 중요하다[9-13].

이에 저자들은 *H. pylori* 항원 검출을 위한 *H. pylori* 대변항원 검사키트의 개발을 위하여 *H. pylori*의 단백질 가운데 선택성과 면역성이 강한 HP0231의 유전자를 클로닝하고 발현시켜 순수 분리한 후 HP0231 단백질을 생산하는 항체를 개발하고자 하였다.

방법 및 재료

1. HP0231 유전자 클로닝

호주에서 분리된 균주인 *H. pylori* (KCTC 12083)를 한국생명공학연구원 유전자은행에서 구입하였다. HP0231 (gene ID 899084, coding region: 241193-241990) 유전자를 클로닝하기 위해 미호기성 조건에서 배양한 *H. pylori*로부터 염색체 DNA를 분리하고[14], 5' primer (5'-CGCATGATATTAAGAGCGAG-TGTG-3'), 3' primer (5'-GACCTCGAGAAAGTTAAAT-AAATCACAAAGAC-3')를 시발체로 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C 5분간 반응시키고 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 조건에서 35 cycle을 반응시킨 후 72°C 10분간 반응시켰다. 증폭된 HP0231 유전자를 *Nde*I과 *Xho*I로 절단한 후 pET28a(+) 벡터에 재조합 하고, *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환을 시켰다. 다량의 형질전환 균주로부터 재조합 DNA를 분리하고 재조합된 HP0231 유전자의 DNA염기 서열을 결정하였다.

2. 발현 및 정제

재조합된 DNA를 *E. coli* BL (DE3)[15]에 형질전환 후 1 L Luria-Bertani (LB)배지에서 OD₆₀₀=0.8까지 배양한 후 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 부가 후 매 시간 별로 시료를 채취하여 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)분석을 실시하였다. 가장 많이 발현되는 시간을 결정하여 발현 세포를 분리하고 세포를 용해완충액[lysozyme 2 mg/mL을 TES (50 mM Tris.Cl, 10 mM EDTA, 25% sucrose (pH 8.0)완충액에 부가 한 것)]으로 처리하였다. 세포 추출액

로부터 HP0231 단백질을 분리하기 위해 Ni-NTA 친화크로마토그래피법으로 정제한 후 Amicon Ultra-15 Centrifugal filter (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 농축하고 SDS-PAGE를 수행한 후 35 kDa 부분의 겔을 채취하여 전기영동법으로 HP0231 단백질을 정제하였다(www.Novagen.com).

3. 항체 생산 및 항체 특이성 확인

분리된 HP0231 단백질을 complete Freund's adjuvant (CFA)와 1:1 (300 µL:300 µL, 1 mg/mL)로 혼합하여 유상액화시킨 후, 3마리의 토끼 목덜미에 여러 부분으로 나누어 주사하였다. 최초 면역화 10일 후 채혈하여 항체의 역가를 ELISA법으로 측정하였고, 최초 면역화 2주 후 incomplete Freund's adjuvant (IFA)와 분리된 HP0231 단백질을 동일한 방법으로 1차 추가면역을 실시하고, 다시 2주 후 2차 추가면역을 하였고, 2차 추가면역 10일 후 채혈하여 생성된 항체의 역가를 ELISA 방법으로 측정하고, 전혈을 채취하고 혈장을 분리하였다. 혈청으로부터 다클론 IgG 항체를 부분적으로 분리하기 위해 Protein A agarose (Pierce, Rockford, USA)를 이용한 크로마토그래피를 수행하여 다클론 IgG 항체를 부분적으로 분리하였다. 분리된 항체의 항원특이성을 분석하기 위해 *H. pylori* 세포추출물과 위염환자의 위 감염조직 추출물을 SDS-PAGE한 후 분리된 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실시하였다[16].

4. 항체의 민감도 측정

항체의 민감도를 측정하기 위해 ELISA 방법을 사용하였다. 분리된 HP0231 단백질을 1 µg/100 µL을 96 well plate의 각 well에 도포한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 2% bovine serum albumin (BSA)을 다시 도포하고 PBS로 세척한 후 위에서 분리된 다클론 IgG 항체를 1:10으로 단계적으로 희석하고 각각의 희석액을 각각의 well에 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시키고 PBS로 세척하였다. 다음 2차 항체(mouse anti-rabbit antibody: horse radish peroxidase (HRP))를 1시간 동안 37°C에서 반응시키고 OPD (o-phenylenediamine) 기질(10 mg/100 µL)을 부가한 후 실온에서 30분간 반응시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. HP0231 유전자 클로닝과 염기서열 확인

H. pylori (KCTC 12083)로부터 염색체 DNA를 분리한 후 PCR을 수행하여 약 800 bp의 크기를 갖는 증폭된 DNA를 얻었다. 형질전환 세포로부터 재조합 DNA를 분리하여 유전자 염기서

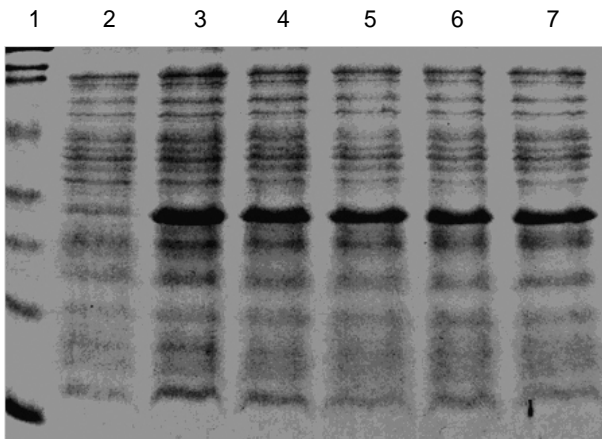


Fig. 1. Induction of HP0231 protein (35 kDa) after IPTG addition. Lane 1, Molecular weight marker; Lane 2, before induction; Lane 3, 1 hr after induction; Lane 4, 2 hr after induction; Lane 5, 3 hr after induction; Lane 6, 4 hr after induction; Lane 7, 5 hr after induction.

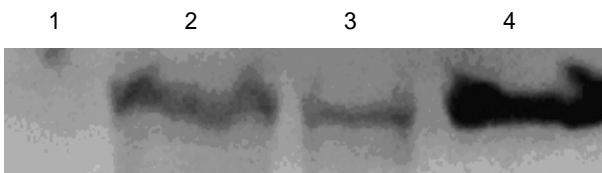


Fig. 3. Western Blot Analysis for Specificity of Rabbit Anti-HP0231 Antibody. Lane 1, *E. coli* BL21 (DE3); Lane 2, *H. pylori* cell extract; Lane 3, Stomach biopsy tissue extract; Lane 4, HP0231 protein.

열을 분석한 결과 Genbank에 보고된 HP0231 (AA216016) 유전자와 100% 동일한 염기서열을 갖고 있음을 확인하였다.

2. 발현 및 정제

유도발현 후 1시간이 지난 후부터 발현되었고 시간이 지남에 따라 HP0231 단백질의 발현되는 양에 있어 큰 변화는 없었다. 35 kDa 정도의 크기를 갖는 HP0231 단백질이 과발현 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

HP0231 단백질을 정제하기 위해 IPTG를 부과 후 3시간 된 배양세포 추출액을 Ni-NTA 친화크로마토그래피를 통과한 후 받은 여액에서는 HP0231 단백질이 검출되지 않음으로 Ni-NTA 레진에 대부분의 HP0231 단백질이 결합되어 있음을 알 수 있다 (Fig. 2, lane 2). 세척 후 받은 여액에서는 레진에 결합된 HP0231 단백질이 소량 분리됨을 알 수 있었다(Fig. 2, lane 3, 4). 세척 후 레진에 결합된 대부분의 HP0231 단백질들은 용출액에서 (Fig. 2, lane 5-8) 용출됨을 알 수 있었고, 특히 용출액 2에서 가장 많이 레진으로부터 떨어져 나왔다. 용출액 1, 2, 3을 모아 10배 농축하고 SDS-PAGE를 시행하여 HP0231 단백질 부분만을 회수하였고 전기영동 방법으로 정제하였다.

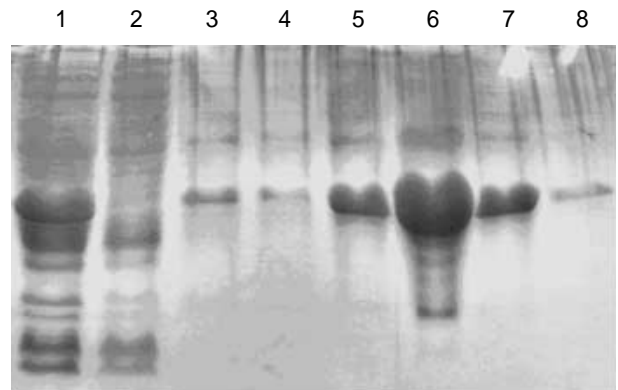


Fig. 2. Purification of overexpressed HP0231 protein using Ni-NTA column.

Lane 1, Whole cell lysate; Lane 2, Flow-through fraction from Ni-NTA column; Lane 3, 1st Wash fraction from Ni-NTA column; Lane 4, 2nd Wash fraction from Ni-NTA column; Lane 5, 1st Elution fraction from Ni-NTA column; Lane 6, 2nd Elution fraction from Ni-NTA column; Lane 7, 3rd Elution fraction from Ni-NTA column; Lane 8, 4th Elution fraction from Ni-NTA column.

3. 항체 생산 및 항체 특이성 확인

음성대조군(lane 1)에서는 어떤 특이 band도 나타나지 않았으나, 양성대조군으로 사용된 정제된 HP0231 단백질(lane 4), *H. pylori*의 배양 세포(lane 2) 및 *H. pylori* 환자의 조직세포에서 (lane 3)는 항체 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 항체 민감도 확인

항체의 희석 배수가 백만 배 되었을 때까지 490 nm에서 OD 0.5 이상의 값을 갖고 있음을 확인하였다. 반면 음성대조군에서는 반응이 전혀 일어나지 않았다(Fig. 4).

고 찰

전 세계 인구의 약 50% 절반 정도가 *H. pylori*에 감염이 되었을 것으로 추정되는데 대부분의 경우 5세 이하 어린이에서 감염된다 [17]. 소아기 감염에서는 만성복통을 일으키기도 하고 체중감소, 성장 장애의 원인이 될 수 있다. 우리나라에서는 성인의 80% 정도가 감염되었다고 보고되었고 이는 개발도상국보다는 낮고 선진국에 비하면 높은 편이다. 1995-1999년에 걸친 한 국내조사에 의하면 검사대상 중 82%가 위염에 걸린 것으로 조사됨으로 그 예방과 치료가 시급한 문제로 정확한 검사방법이 필요하다[18].

H. pylori 대변항원검사는 검사가 간편하고, 결과가 빠르며, 비싼 장비를 필요로 하지 않는 반면 대변을 검체로 받아야 하기 때문에 환자가 부담을 가질 수 있다. 현재 국내에는 Premier Platinum HpSA (Meridian Diagnosis Inc., Cincinnati, OH, USA),

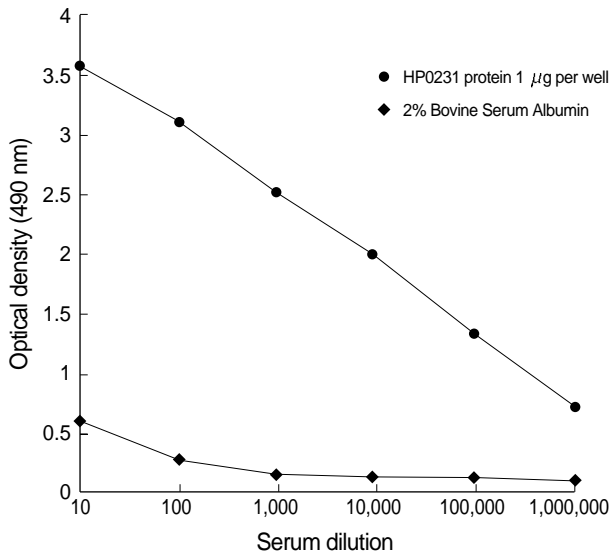


Fig. 4. Sensitivity of Rabbit Anti-HP0231 Antibody.

FemtoLab *H. pylori* (Connex Diagnostics, Martinsried, Germany) 등의 *H. pylori* 대변항원검사가 쓰이고 있는데 모두 수입 품으로 *H. pylori* 대변항원검사키트의 국산화가 필요하다.

본 연구는 민감도와 정확도가 높은 대변항원진단키트를 개발하기 위해 *H. pylori*의 항원과 반응하는 고역가의 항체를 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이러한 대변항원진단 키트를 개발하기 위해 *H. pylori*의 약 1,600개의 유전자 중에 항원성이 뛰어난 단백질을 찾아야 한다[19, 20]. 뿐만 아니라 지역적으로 다른 유전형질을 갖고 있고 연령에 따른 감염 정도의 차이 등으로 인해 진단 기준 값의 결정 등 해결되어야 할 문제점이 존재한다[21]. 다양한 항원을 이용하여 만들어진 항체가 항원-항체반응을 이용한 진단 시약의 개발에 이용되고 있다. 가장 많이 연구된 항원으로 강한 면역력을 갖고 있을 뿐 아니라 독성 검정의 척도로 사용되는 CagA가 있으나 CagA는 유전적 다양성이 존재하기 때문에 *H. pylori*의 다른 균주를 검출하는데 한계를 갖고 있다[22]. Haas 등은 immuno-proteomic 실험을 통해 강한 면역력을 갖고 있는 항원들을 검출하였다[23]. 위염이나 위궤양 환자로부터 얻어진 혈청 속에 존재하는 *H. pylori*에 대한 항체를 이용하여 2-D Gel 전기영동과 Western Blot 분석을 통해 150개의 *H. pylori*의 단백질들이 이 항체들과 반응을 보였고, 이들 단백질 중에 32개의 항원들이 강하면서 다양한 환자의 혈청에서 분리된 다양한 항체들과 반응하였다. 이들 단백질 중 최근에 밝혀진 HP0231 단백질은 기능이 알려지지 않았지만 강한 면역력을 갖는 단백질로 확인되었다[21, 23].

HP0231 단백질은 다양한 위염 환자들의 혈청 속에 존재하는 항체들과 반응하였고 많은 양이 검출되었다. 이러한 이유 때문에 HP0231 단백질은 같은 종의 다양한 균주 안에서 동일한 구조를 가지고 있으므로 이 단백질의 항체를 이용하면 *H. pylori*의 다양한 균주를 동일하게 검출할 수 있는 장점을 갖고 있을 뿐 아니라, 다른 단백질에 비해 많은 양이 존재함으로 동일한 조건하에서 보

다 민감한 검출 표적의 조건을 갖게 된다. 그러므로 HP0231 단백질을 이용하여 항체를 개발하여 우수한 대변항원검사키트를 개발할 수 있다[14, 24-26]. 또한 HP0231 단백질은 세포 밖으로 분비되는 분비 단백질로 N말단에 분비 펩티드 서열을 갖고 있다. 이러한 이유로 HP0231 단백질이 세포성 면역을 일으킬 수 있는 단백질로 높은 방어적 면역력을 가짐으로 백신으로 사용될 수 있는 단백질이기도 하다[21, 27].

결론적으로 본 실험에서 HP0231 유전자를 클로닝한 후 단백질을 발현하여 분리하고 항체를 만들어 민감도와 특이성을 확인하였다. 만들어진 항체를 이용하여 향후 *H. pylori* 대변항원진단키트를 개발할 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

배경 : *H. pylori*의 감염진단을 위한 널리 이용되는 대변항원검사는 간편하여 널리 사용되고 있으나 대부분 수입에 의존하고 있다. *H. pylori*는 균주 마다 다양한 유전형질을 가지기 때문에 대변항원검사키트를 개발하기 위해서는 공통항원이면서 동시에 강한 면역력을 갖는 단백질을 찾는 것이 중요하다. HP0231 단백질은 여러 만성위염이나 궤양 환자의 혈청과 강한 반응을 보였다. 그러므로 본 연구에서는 HP0231 유전자를 목표유전자로 하여 고역가의 항체를 생산하고자 하였다.

방법 : *H. pylori*의 염색체 DNA를 분리하고 PCR방법으로 증폭된 HP0231 유전자를 pET28a(+) 벡터에 클로닝하고 대장균에서 유도발현하였다. 발현된 HP0231 단백질을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피법과 전기영동법으로 분리하였다. 분리된 HP0231 단백질을 토끼에 면역화시켜 항체를 획득하였다. 획득한 항체를 부분적으로 분리하고 분리된 항체의 민감도와 특이성을 ELISA와 Western Blot 분석을 통해 확인하였다.

결과 : HP0231 유전자를 클로닝한 후 염기서열을 확인한 결과 Genbank (AA216016)의 염기서열과 동일하였다. HP0231 유전자를 과발현하고 HP0231 단백질을 분리하였다. 분리된 HP0231 단백질의 면역화로부터 얻어진 항체는 위염 환자의 조직 세포 추출물과 *H. pylori* 배양세포 추출물과 분리된 HP0231 단백질에 대해 특이적으로 반응했다. 음성대조군인 대장균 배양세포 추출물과는 반응하지 않았다. 백만 배 희석한 항체에서도 1 µg의 HP0231 단백질과 반응하였다.

결론 : *H. pylori*의 HP0231 단백질을 검출할 수 있는 항체를 만들었으며 향후 *H. pylori* 대변항원검사키트를 개발할 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Marshall BJ and Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stom-

- ach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1: 1311-5.
2. Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1986;39:353-65.
3. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990;161:626-33.
4. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127-31.
5. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;330:1267-71.
6. Perri F, Quitadamo M, Ricciardi R, Piepoli A, Cotugno R, Gentile A, et al. Comparison of a monoclonal antigen stool test (Hp StAR) with the ¹³C-urea breath test in monitoring *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005;11:5878-81.
7. Nakata H, Itoh H, Ishiguchi T, Iwata T, Sato H, Higashimoto Y, et al. Immunological rapid urease test using monoclonal antibody for *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:970-4.
8. Cover TL and Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 1996;41:85-117.
9. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 2001;19:523-63.
10. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 1998;188:2277-88.
11. Ferrero RL and Labigne A. *Helicobacter pylori* vaccine development in the post-genomic era: can in silico translate to in vivo. *Scand J Immunol* 2001;53:443-8.
12. 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; 92:6499-503.
13. Hocking D, Webb E, Radcliff F, Rothel L, Taylor S, Pinczower G, et al. Isolation of recombinant protective *Helicobacter pylori* antigens. *Infect Immun* 1999;67:4713-9.
14. Choi SS, Chi WJ, Lee JH, Kang SS, Jeong BC, Hong SK. Overexpression of the *sprD* gene encoding *Streptomyces griseus* protease D stimulates actinorhodin production in *Streptomyces lividans*. *J Microbiology* 2001;39:305-13.
15. Blanchard TG, Czinn SJ, Redline RW, Sigmund N, Harriman G, Nedrud JG. Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric *Helicobacter infection* in mice. *Cell Immunol* 1999;191:74-80.
16. Lee JH. Cloning and expression of Mammaglobin gene. *Korean J Food Nutr* 2004;17:47-52. (이재학. Mammaglobin 유전자 재조합 및 발현에 관한 연구. *한국식품영양학회지* 2004;17:47-52.)
17. Ndip RN, Malange AE, Akoachere JF, MacKay WG, Titanji VP, Weaver LT. *Helicobacter pylori* antigens in the faeces of asymptomatic children in the Buea and Limbe health districts of Cameroon: a pilot study. *Trop Med Int Health* 2004;9:1036-40.
18. Kim PS, Lee JW, Pai SH, Kim YB, Cho JK, Lee DH, et al. Detection of *Helicobacter pylori* Antigen in Stool by Enzyme Immunoassay. *Yonsei Med J* 2002;43:7-13.
19. Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 2000;68:915-20.
20. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:176-80.
21. Sabarth N, Hurwitz R, Meyer TF, Bumann D. Multiparameter Selection of *Helicobacter pylori* Antigens Identifies Two Novel Antigens with High Protective Efficacy. *Infect Immun* 2002;70:6499-503.
22. Asahi M, Tanaka Y, Izumi T, Ito Y, Naiki H, Kersulyte D, et al. *Helicobacter pylori* CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling in vivo. *Helicobacter* 2003;8:1-14.
23. Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2002;2:313-24.
24. Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2002;70:3396-403.
25. Cao P, McClain MS, Forsyth MH, Cover TL. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998;66: 2984-6.
26. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5791-5.
27. McAtee CP, Lim MY, Fung K, Velligan M, Fry K, Chow T, et al. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:537-42.