

## 幽门螺旋杆菌 *cagA* 基因失活突变株的构建<sup>\*</sup>

洪伟<sup>1</sup>, 陈学书<sup>1</sup>, 吴昌学<sup>1</sup>, 郜双林<sup>1</sup>, 赵艳<sup>1</sup>, 谢渊<sup>1</sup>, 陈峥宏<sup>2</sup>, 官志忠<sup>1</sup>, 周建奖<sup>1\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院微生物教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 通过同源重组基因失活方法, 构建幽门螺旋杆菌(*H. pylori*) *cagA* 基因失活突变株。方法: 使用分子克隆方法构建包含 *cagA* 基因上、下游同源臂及氯霉素转乙酰基酶(CAT)的自杀型 *cagA* 基因靶向失活质粒 pHG1, 经 PCR 验证后将该质粒电转化入 *H. pylori* 11639 菌株中, 通过氯霉素抗性筛选出 *cagA* 基因失活突变株。结果: pHG1 质粒构建成功并转化进入 *H. pylori* 11639 菌株, 氯霉素筛选获得 *cagA* 基因组区段发生重组的  $\Delta cagA$  突变株( $\Delta cagA::groEL-cat$ ); PCR 结果表明, *cagA* 基因突变株构建成功。结论: 使用自杀型同源重组质粒 pHG1 成功构建幽门螺旋杆菌(*H. pylori*) *cagA* 基因失活突变株。

**[关键词]** 幽门螺旋杆菌; 质粒; DNA, 重组; 突变

**[中图分类号]** R735.2; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)12-1318-03

## Construction of *cagA* Gene Inactivation Mutant of *Helicobacter pylori*

HONG Wei<sup>1</sup>, CHEN Xueshu<sup>1</sup>, WU Changxue<sup>1</sup>, GAO Shuanglin<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>1</sup>, XIE Yuan<sup>1</sup>,  
CHEN Zhenghong<sup>2</sup>, GUAN Zhizhong<sup>1</sup>, ZHOU Jianjiang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct *H. pylori cagA* gene inactivation mutant by using homologous recombination method. **Methods:** Suicide *cagA* gene targeted inactivation plasmid pHG1 with the upstream and downstream homologous arms of *cagA* gene and chloramphenicol transacetylase (CAT) marker was constructed by standard molecular clone method. After PCR validation, pHG1 plasmid was transformed into *H. pylori* 11639 strain by electroporation and  $\Delta cagA$  inactivation mutants was screened by chloramphenicol resistance. **Results:** pHG1 plasmid was successfully constructed and transformed into the *H. pylori* 11639 strain.  $\Delta cagA::groEL-cat$  mutants was obtained by chloramphenicol screening. PCR results showed that *cagA* gene was successfully constructed. **Conclusion:** *H. pylori cagA* gene inactivation mutant strain was successfully constructed by suicide homologous recombination plasmid pHG1.

**[Key words]** *Helicobacter pylori*; plasmid; DNA, recombinant; mutant

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是胃炎、胃溃疡及胃癌发病的主要诱因之一。由 *H. pylori* 基因组中 *cag* 毒力岛(*cag* pathogenicity island, PAI)编码的 CagA 蛋白(Cytotoxin-associated gene A antigen, CagA)是 *H. pylori* 的最重要的毒力

因子。PAI 长 40 kb, 包含大约 31 个基因的多基因簇, *cagA* 基因位于其 C 末端。PAI 编码的 IV-型分泌系统将编码的 CagA 注入胃上皮细胞<sup>[1-2]</sup>, 根据 CagA 蛋白编码区的不同可以将 *H. pylori* 分为 I 型和 II 型<sup>[3]</sup>。I 型 *H. pylori* 细菌 PAI 岛编码 CagA 蛋

\*[基金项目] 国家自然科学基金(No. 31560318); 贵州省科技厅重大专项[黔科合计 Z 字(2012)4010]; 贵州医科大学博士启动基金[院博合 J 字(2014)07]

\*\*通信作者 E-mail: 851827202@qq.com

网络出版时间: 2015-11-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151113.2106.008.html>

白和Ⅳ型分泌系统,Ⅱ型 *H. pylori* 细菌 PAI 岛编码区不完整,不编码 CagA 蛋白。研究表明Ⅰ型 *H. pylori* 体外及体内毒性及致病性远高于Ⅱ型 *H. pylori* [4],因此普遍认为 CagA 蛋白是 *H. pylori* 最重要的毒力因子[5-7]。然而,CagA 蛋白的功能可能比想象的更加复杂,获得 *cagA* 基因失活的 *H. pylori* 菌株是深入研究 CagA 蛋白毒力、致病机理的重要的前提。本文通过同源重组基因失活方法,成功构建幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)*cagA* 基因失活突变株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株课题组保存,用于质粒的构建。幽门螺旋杆菌 11639 菌株(*H. pylori* 11639)由中国幽门螺旋杆菌菌株管理与保存中心馈赠,*H. pylori* 11639 突变株筛选时额外加入  $2 \times 10^{-2}$  g/L 的氯霉素。

### 1.2 方法

**1.2.1** *H. pylori* 11639 菌株的培养 在含有 10 g/L 万古霉素、5 g/L 两性霉素 B 及 5 g/L 三甲氧苄氨嘧啶的哥伦比亚血琼脂培养基中接种 *H. pylori* 11639 菌株并,置于微需氧环境中培养(10% 羊血,5% O<sub>2</sub>,85% N<sub>2</sub>,10% CO<sub>2</sub>)。

**1.2.2** 抗生素敏感性检测 野生型 *H. pylori* 11639 菌株涂布于分别含有  $2 \times 10^{-2}$  g/L 氯霉素、氨苄青霉素、红霉素、链霉素、卡那霉素、四环素的哥伦比亚培养皿上,置于 37 °C 微需氧培养,每隔 24 h 观察幽门螺旋杆菌生长情况。

**1.2.3** pHG1 *cagA* 基因打靶质粒构建及筛选 使用 pMD19-T(Takara)质粒作为 *H. pylori* 11639 *cagA* 基因失活质粒骨架,*cagA*-up-F/R 引物扩增 *cagA* 基因内部 500 bp 上游同源臂,*cagA*-down-F/R 引物扩增 *cagA* 基因内部 500 bp 下游同源臂。*cagA*-up-R 引物与 *cagA*-down-F 引物都含有一段由四个酶切位点(*Pst* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Nhe* I)组成的 linker,通过 linker,使用 overlap PCR 方法将上下游同源臂连接起来,并转移至 pMD19-T 载体上获得 pHG0 质粒。*cat*-F/R 引物用于克隆位于 pHK 质粒上的 *groEL-cat* 氯霉素乙酰基转移酶表达框[8],将该表达框 *Bam*H I-*Eco*R I 双酶切后连接至 pHG0 载体。pHG0 载体连接 *groEL-cat* 基因后,获得氯霉素抗性基因,可以使用含有氯霉素  $2 \times 10^{-2}$  g/L 的 LB 培养基筛选,即获得 pHG1 质粒(质粒构建所需引物序列见

表 1)。pHG1 质粒使用 RV-M, M13 - 47 引物测序,结果去除载体序列后使用 Vector NTI 软件分析其与理论序列的相似性。

**1.2.4** *H. pylori* 11639 感受态细胞制作与电转化条件 刮取生长于哥伦比亚琼脂的 *H. pylori* 11639 菌体,重悬于电转化缓冲液中(10% 甘油,9% 蔗糖),稀释至浓度为  $10^{12}$  个/L。取 100  $\mu$ L 加入冰冷的 0.2 cm BioRed 电转杯中,加入 pHG1 打靶载体 50  $\mu$ g,冰上放置 10 min。使用 BioRed Gene pluser 调节电转参数至 2.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ,电击一次,加入 SOC 培养基 100  $\mu$ L,立即涂布至没有抗性的哥伦比亚血平板上,微需氧培养 48 h 后转移至含  $2 \times 10^{-2}$  g/L 氯霉素的哥伦比亚血平皿上培养 72 h。

## 2 结果

### 2.1 *H. pylori* 11639 菌株抗生素敏感性

经检测,*H. pylori* 11639 菌株对青霉素、氯霉素、红霉素、链霉素、卡那霉素、四环素敏感,在抗性培养基中无菌落形成。根据前期构建的氯霉素转乙酰基酶(*groEL-cat*)表达框,选择氯霉素作为筛选抗生素。

### 2.2 pHG1 质粒构建及鉴定

如图 1(a) 1, 2 泳道所示,成功克隆 *cagA* 基因上下游同源臂,大小分别为 467 bp 和 494 bp。上下游同源臂使用 overlap PCR 方法连接,并克隆至 pMD19-T-simple 载体中,获得 pHG0 质粒(表 1)。如图 1(a) 3 泳道所示,成功克隆了来源于 pHK 质粒的 *groEL-cat* 氯霉素转乙酰基酶基因,大小为 1 400 bp。将 *groEL-cat* 片段连接至 pHG0 质粒上下游同源臂之间的多克隆位点(*Bam*H I, *Eco*R I),获得 *cagA* 基因失活质粒 pHG1[图 1(a) 4 泳道,大小为 4 898 bp、表 1]。

如图 1(c) 所示,pHG1 测序结果与 *H. pylori* 11639 up-*groEL-cat*-down 理论序列相似性为 99.37%,有 15 个碱基发生突变,且突变位点集中在上、下游同源臂上,*groEL-cat* 表达框中无点突变[图 1(c)],这些突变不会对基因失活实验造成影响。

### 2.3 电转化效率

转化子培养 72 h 后,*H. pylori* 11639 转化子在哥伦比亚平皿上形成针尖大小、白色透明菌落。对三块复板进行计数,平均转化子数量为  $(30 \pm 6)$

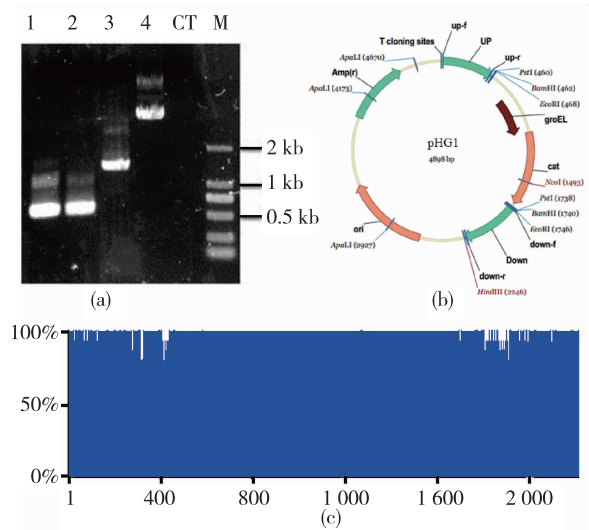
个,转化效率为  $3 \times 10^{-7}$ 。

表 1 引物序列及质粒组成

Tab. 1 The list of plasmids and primer sequences

引物及质粒名称	序列或组成
cagA-up-F	cgctctagactcattgttagattctcc
cagA-up-R	gctagcgaattcggatccctgcagtgatgtcggtgggta
cagA-down-F	ctgcagggatccgaattcgcctagcatacacaacgcctccaa
cagA-down-R	gggaagcttcgcctcttgcctcctac
cat-F	cgcggatccggtaattctctatgtgtggt
cat-R	cgggaattcgtcagtcggcattatctca
cagA-F3	aacaatgactaacgaaacca
cagA-R3	taaagaatggctcaaattgt
pHG0	pMD19T-simple, cagA-up, cagA-down
pHG1	pMD19T-simple, cagA-up, cagA-down, groEL-cat

注:酶切位点使用下划线标出



(a)为琼脂糖电泳图,1泳道为 *cagA* 上游同源臂,2泳道为 *cagA* 下游同源臂,3泳道为 *groEL-cat* 筛选标记,4泳道为构建完成的 pHG1 质粒,CT 泳道为性对照,M 为 DNA 分子量标准;(b)为 pHG1 质粒图谱,标注酶切位点及片段功能,(c)为 pHG1 测序结果与理论序列相似性对比图,纵坐标表示相似度;蓝色区域相似度高,白色区域相似度低

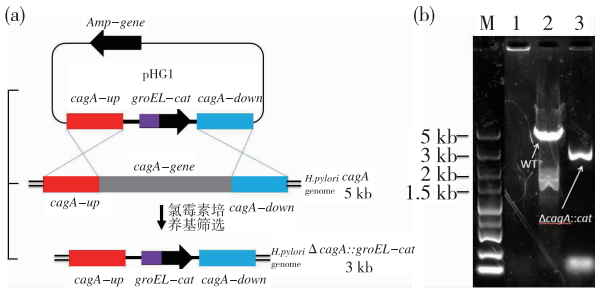
图 1 pHG1 质粒的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of pHG1 plasmid

2.4 *cagA* 基因缺失突变株的鉴定

如图 2(a)所示,pHG1 质粒具有 *cagA* 基因上、下游同源臂及 *groEL-cat* 氯霉素抗性筛选标记,该质粒转化进入 *H. pylori* 11639 菌株后,等位基因发生同源交换,获得氯霉素抗性的  $\Delta cagA::groEL-cat$  突变株,PCR 检测可见扩增产物减小 2 kb。如图 2

(b) 2, 3 泳道,野生型与氯霉素抗性 *H. pylori* 菌株 *cagA*-F3/R3 引物扩增产物大小分别为 5 kb 和 3 kb (减小 2 kb),表明 *cagA* 基因失活突变株构建成功。



(a)为 *cagA* 基因失活示意图,(b)为使用 *cagA* 基因两侧引物鉴定 *H. pylori* 11639  $\Delta cagA$  突变株,1 为空白对照,2 为野生型,3 为  $\Delta cagA::cat$  突变株

图 2 同源重组基因失活示意图及 *cagA* 基因缺失突变株的 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Diagram of *cagA* gene knockout by homologous recombination

3 讨论

*cagA* 作为 *H. pylori* 最重要的毒力因子,受到广泛关注。流行病学研究发现,感染 I 型 *H. pylori* 菌株比感染 II 型 *H. pylori* 菌株,患十二指肠溃疡和胃癌等严重胃肠疾病的风险明显增高<sup>[9-10]</sup>。因此许多研究者都通过体外克隆 *cagA* 基因深入研究了 *cagA* 蛋白的致病机制,明确了 *cagA* 作为 *H. pylori* 核心致病因子的地位<sup>[11-12]</sup>。然而,最近的研究表明,*H. pylori* 本身对 *cagA* 蛋白的修饰与加工,对其致病力起着决定性的作用<sup>[13]</sup>。因此,研究 *H. pylori* 自身分泌的 *cagA* 蛋白的生物学功能具有重要意义。*cagA* 基因失活突变株的构建,提供了一个无 *cagA* 蛋白表达的 *H. pylori* 对照菌株,对于研究 *H. pylori* 自身分泌的 *cagA* 蛋白的生物学功能具有积极的推动作用。除此之外,本研究还建立了 *H. pylori* 的遗传操作技术平台,为进一步研究 *H. pylori* 基因功能及与宿主之间的相互作用奠定了基础。

综上所述,本研究成功构建了 *cagA* 基因失活突变株,该模型有助于更好的理解 *cagA* 蛋白在自然状态下生物学功能。另外,构建标准菌株 *cagA* 基因失活突变株,对于将来临床菌株的基因功能研究具有借鉴意义。

(下转第 1324 页)

佳碳氮源比为葡萄糖 1.0%, 蔗糖 0.5%, 玉米粉 0.5%, 大豆粉 0.75%。通过发酵培养基的优化, DA07405 发酵粗提物的抗 FOC4 抑菌圈直径从优化前的 15.0 mm 提高到 19.0 mm。

#### 4 参考文献

- [1] 何欣, 黄启为, 杨兴明, 等. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学, 2010(18): 3809-3816.
- [2] Koenig RL, Ploetz RC, Kistler HC. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages[J]. Phytopathology, 1997(6): 915-923.
- [3] 郭立佳, 杨腊英, 彭军, 等. 不同药剂防治香蕉枯萎病效果评价[J]. 中国农学通报, 2013(1): 188-192.
- [4] 覃柳燕, 孙嘉曼, 韦弟, 等. 5 株香蕉枯萎病菌(Foc4)菌株对桂蕉号的致病力测定[J]. 南方农业学报,

2014(12): 2153-2157.

- [5] 黄穗萍, 莫贱友, 郭堂勋, 等. 广西香蕉枯萎病 4 号生理小种发生情况及香蕉品种抗性鉴定[J]. 南方农业学报, 2013(5): 769-772.
- [6] Cao LX, Qiu ZQ, Dai X, et al. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2004(5): 501-504.
- [7] 胡一凤, 井涛, 王梦颖, 等. 抗 FOC4 香蕉内生放线菌的筛选及菌株 NJQG-3A1 鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015(1): 127-131.
- [8] 吴少杰. 从胶州湾海洋放线菌中发现的新型星形孢菌素等 7 种新结构化合物[D]. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2005.

(2015-09-28 收稿, 2015-10-16 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 1320 页)

#### 4 参考文献

- [1] 崔蕾蕾, 邵世和. 幽门螺旋杆菌 cag PAI 编码的 IV 型分泌系统[J]. 微生物学报, 2007(4): 743-745.
- [2] Zhong Q, Shao SH, Cui LL, et al. Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into pathogenicity[J]. Chin Med J (Engl), 2007(23): 2138-2142.
- [3] Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996(25): 14648-14653.
- [4] Censini S, Stein M, and Covacci A. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*[J]. Curr Opin Microbiol, 2001(1): 41-46.
- [5] Buti L, Spooner E, Veen AG, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011(22): 9238-9243.
- [6] Cheng YS, Kuang LP, Zhuang CL, et al. Effects of cytotoxin-associated gene A (CagA) positive *Helicobacter pylori* infection on anti-platelet glycoprotein antibody producing B cells in patients with primary idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)[J]. Pak J Med Sci, 2015(1): 121-126.
- [7] Furuta Y, Yahara K, Hatakeyama M, et al. Evolution of

cagA oncogene of *Helicobacter pylori* through recombination[J]. PLoS One, 2011(8): 23499.

- [8] Hong W, Zhang J, Feng YG, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons[J]. Biotechnol Biofuels, 2014(7): 80-96.
- [9] Zeng X, He LH, Yin Y, et al. Deletion of cagA gene of *Helicobacter pylori* by PCR products[J]. World J Gastroenterol, 2005(21): 3255-3259.
- [10] Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia[J]. J Gastroenterol, 2004(2): 97-103.
- [11] Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008(3): 1003-1008.
- [12] 谢渊, 周建奖, 赵艳, 等. JAK2-ERK1 干扰对幽门螺杆菌毒素相关蛋白 CagA 调控胃泌素基因表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010(22): 2317-2321
- [13] Ferreira JM, Batista SA, Vidigal PV, et al. Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)[J]. Eur J Histochem, 2015(2): 2489.

(2015-09-25 收稿, 2015-10-30 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周凌