

幽门螺杆菌毒力蛋白 *cagA* 基因敲除突变株构建及鉴定^{*}

李抄, 陈定宇, 张晓怡, 赵艳, 王琴容, 周建奖, 谢渊^{**}

(贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 构建幽门螺杆菌(*Hp*)毒力蛋白 *cagA* 基因敲除突变株并进行鉴定。方法: 采用基因打靶技术, 从 *Hp*1004 基因组扩增 *cagA* 基因的上、下游同源重组臂序列, 从 pACYC184 质粒上扩增氯霉素(Cm)序列, 通过融合聚合酶链式反应(PCR)技术获得 *cagA* 基因敲除打靶片段, 克隆入载体 pUCmT, 得到打靶载体 pUCmT- $\Delta cagA::Cm$; 再通过电转化法将 pUCmT- $\Delta cagA::Cm$ 质粒直接转入 *Hp*1004, 氯霉素抗性平板筛选 *cagA* 基因敲除株并命名为 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$; 采用 PCR 进行鉴定, 并用 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 和 *Hp*/*cagA* 感染原代胃癌细胞, 检测胞内 *cagA* 的表达和对细胞形态的影响。结果: 融合 PCR 构建打靶片段长度为 1 794 bp, 打靶载体转化 *Hp* 并筛选后, 用 *cagA* 外侧引物 PCR 扩增 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 和野生型 *Hp*/*cagA*, 产物长度分别为 2 150 bp 和 5 014 bp; *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 和 *Hp*/*cagA* 分别感染细胞后, 细胞死亡数量多于感染 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 突变株, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 野生型 *Hp*/*cagA* 菌株及其感染细胞内 *cagA* 蛋白表达水平较 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 突变型菌株及其感染细胞明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 成功构建 *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ 突变株, 并在感染细胞中得到验证, 表明 *cagA* 蛋白对细胞有一定的毒性作用。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 基因打靶; 感染; 细胞毒性相关蛋白 *cagA*; 聚合酶链式反应; 电转化

[中图分类号] R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)02-0125-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.02.001

Construction and Identification of a Knockout Mutant of *Helicobacter Pylori* Virulence Protein *cagA* Gene

LI Chao, CHEN Dingyu, ZHANG Xiaoyi, ZHAO Yan, WANG Qinrong, ZHOU Jianjiang, XIE Yuan
(Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education; Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a knockout mutant strain of helicobacter pylori (*Hp*) virulence protein *cagA* by gene targeting and identify it. **Methods:** Gene targeting technology was used to amplify the *cagA* gene's upstream and downstream homologous recombination arm sequences from the *Hp*1004 genome, and the chloramphenicol (Cm) sequence was amplified from the pACYC184 plasmid. The *cagA* gene knockout target fragment was obtained by fusion PCR technology and cloning. The vector pUCmT was inserted to obtain the target vector pUCmT- $\Delta cagA::Cm$; and then the pUCmT- $\Delta cagA::Cm$ plasmid was directly transferred into *Hp*1004 by electroporation. The chloramphenicol-resistant plate was screened for the *cagA* gene knockout strain and named *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$; PCR was used to identify it, *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ and infection of *Hp*/*cagA* original generation of gastric cancer cells were used to detect the expression of intracellular *cagA* and effect on the cell morphology. **Results:** Fusion PCR was used to construct the target fragment with a length of 1 794 bp. After the target vector was transformed into *Hp* and screened, *Hp*/ $\Delta cagA::Cm$ and wild-type *Hp*/*cagA* were

^{*}[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660031, 31960028); 贵州省科技计划项目黔科合平台人才项目[(2017)5652]; 贵阳市科技计划项目筑科合同项目[(2017)5-16], 贵州省科技基金项目[黔科合 LH 字(2016)7347]

^{**}通信作者 E-mail: xieyuan1974@163.com

amplified by the *cagA* lateral primer PCR, the product lengths were 2 150 bp and 5 014 bp respectively. After *Hp*/ Δ *cagA*:: Cm and *Hp*/*cagA* infected cells respectively, cell deaths were more than *Hp* infection/ Δ *cagA*:: Cm mutant strains, and the difference was statistically significant (compared with WZK*Hp*/*cagA*, YHD*Hp*/*cagA* group $P < 0.01$; compared with HZM*Hp*/*cagA* group $P < 0.05$); The expression level of *cagA* protein in wild-type *Hp*/*cagA* strain and its infected cells was significantly lower than that of *Hp*/ Δ *cagA*::Cm mutant strain and its infected cells, and the difference was statistically significant. ($P < 0.01$ compared with each *Hp*/ Δ *cagA*:: Cm infection group).

Conclusion: The *Hp*/ Δ *cagA*::Cm mutant is successfully constructed and verified in infected cells, indicating that the *cagA* protein has a certain toxic effect on the cells.

[Key words] *Helicobacter pylori* (*Hp*); gene targeting; infection; *cagA*; polymerase chain reaction (PCR); electrical transformation

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤。据 2018 年全球流行病学资料显示,全球胃癌的发病率居恶性肿瘤的第 6 位,死亡率居第 5 位;在中国,胃癌的发病率和死亡率分别占全部肿瘤的第 4 位和第 2 位^[1-2]。胃癌的发生发展涉及多个方面,主要包括宿主遗传学、环境因素和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)感染^[3]。*Hp* 是一种螺旋状革兰阴性微需氧菌,它定殖在人类的胃黏膜上皮,是引起胃炎、消化性溃疡、胃癌的主要病因。*Hp* 的发现加深了人类对慢性感染、炎症和癌症之间关系的认知,1994 年世界卫生组织将 *Hp* 列为 I 类致癌因子^[4-5]。全世界有近半数人感染 *Hp*,但仅少数会发展成胃癌,究其原因,除宿主与环境因素外,*Hp* *cagA* 毒力表达是导致其感染后不同临床结局的可能原因^[6]。细胞毒素相关基因 A 蛋白(cytotoxin associated gene A, *cagA*)是由 *Hp* *cagA* 致病岛编码的一种 120 ~ 145 kDa 的蛋白质,通过 IV 型分泌系统(type IV secretion system, TFSS)注入胃上皮细胞,参与胃癌的发生发展,是目前所知的唯一被 *Hp* 注入胃上皮细胞并能模拟细胞内蛋白发挥作用的“癌蛋白”(oncoprotein),但其致癌机制还不完全清楚^[7-9]。基因打靶(gene targeting)是 20 世纪 80 年代发展起来的一项重要的分子生物学技术,是利用基因转移方法将外源 DNA 序列导入靶细胞后,通过外源 DNA 序列与靶细胞内染色体上同源 DNA 序列间的重组,将外源 DNA 定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点,或对某一预先确定的靶位点进行定点突变,从而改变细胞遗传特性的方法^[10-11]。目前基因打靶技术已应用在改造生物、培育新的生物品种,研究基因结构与功能、表达与调控,研究细胞生活周期调控机制,遗传病的基因治疗等多方面。为进一步明确 *cagA* 在 *Hp* 致胃癌

发生发展中的作用,本实验运用基因打靶技术构建敲除 *cagA* 基因的 *Hp* 突变株,为后续研究 *cagA* 致病机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂及仪器

1.1.1 材料 pACYC184 质粒、pUCmT 载体及细菌 DNA 提取试剂盒(上海生工生物公司),幽门螺杆菌 HP1004 及胃癌原代细胞(贵州医科大学分子生物重点实验室保存)。

1.1.2 主要试剂和仪器 双抗(美国 HyClone 公司),改良型 RPMI-1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司),氯霉素(chloramphenicol, Cm, 中国 Beyotime 公司),哥伦比亚血琼脂培养基(英国 Oxoid 公司),Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA ligase(日本 TAKARA 公司),anti-*cagA* antibody 和 anti-GAP-DH antibody(美国 CST 公司);电转化仪 Electroporator 2510(中国 Eppendorf),全制动化学发光成像分析仪(中国上海天能科技公司);Primer5.0 设计引物合成于上海生工,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 *cagA* 基因的上、下游同源重组臂扩增 高保真 PCR 酶从 *Hp* 基因组上扩增 *cagA* 基因的上、下游同源重组臂,反应体系为 50 μ L [*Hp* 基因组 DNA 0.5 μ L、10 \times pfu buffer 5 μ L、dNTP (2.5×10^{-2} mol/L) 0.5 μ L、*cagA*-5F/3F 及 *cagA*-5R/3R (5×10^{-6} mol/L)各 0.5 μ L, pfu DNA polymerase (5×10^{-3} U/L) 0.5 μ L, DMSO (5%) 2.5 μ L, ddH₂O 补足体积];聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)循环程序为 95 $^{\circ}$ C、5 min, 95 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、60 s, 5 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

基因	引物名称	引物序列(5' - 3')	目的片段大小/bp
上,下游同源重组臂引物 F	cagA-5F	CATGTGCATTCCCTAAAGTGAATTTTC	245
	cagA-3F	TGTTTCTCCTTACTAACCTAATTTGGTATCAAAG	
上,下游同源重组臂引物 R	cagA-5R	AGGATCGAGGAATATTAGAAGCACCC	509
	cagA-3R	GCGTTTCCTTTCAAATTGAAATAACGGT	
卡那霉素抗性基因扩增引物	cagA-Cm-F	GGGTGCTTCTAATATTCCTCGATCCTTTACGCCCCGCCCTGCCACTC	660
	cagA-Cm-R	CTTTGATACCAAATTAGGTTAGTAAGGAGAAACAATGGAGAAAAAAA TCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCC	
外侧鉴定引物	cagA-outF	CTGAAGTGGTTATTTTAGGTTGCACGC	5 014
	cagA-outR	TAGTCTCAGTAACGCCTGTTGCAG	
氯霉素抗性基因内部测序引物	CmSeqF	GACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTG	2 150
	CmSeqR	CACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTC	

1.2.2 *Cm* 的表达框序列扩增 从 pACYC184 质粒上扩增 *Cm* 的表达框序列, *Cm* 抗性基因的扩增反应体系为 50 μL : pACYC184 质粒 DNA 0.5 μL , 10 \times pfu buffer 5 μL , dNTP (2.5×10^{-2} mol/L) 0.5 μL , cagA-Cm-F 和 cagA-Cm-R (5×10^{-6} mol/L) 各 0.5 μL , pfu DNA polymerase (5×10^{-6} U/L) 0.5 μL , ddH₂O 补足; PCR 循环程序同方法 1.2.1。

1.2.3 融合 PCR 构建打靶片段 *cagA* 基因上、下游同源重组臂经设计与 *Cm* 抗性基因序列有部分重叠, 可通过 PCR 直接融合, 获得全长的打靶片段。反应总体积 100 μL : 上、下游同源重组臂 PCR 产物、*Cm* 抗性基因 PCR 产物、5% DMSO 各 5 μL , 10 \times pfu buffer 10 μL , dNTP (2.5×10^{-2} mol/L)、cagA-5F、cagA-3R (5×10^{-6} mol/L) 及 pfu DNA polymerase (5×10^{-6} U/L) 各 1 μL , ddH₂O 补足; PCR 循环程序同方法 1.2.1, 循环数为 25 次。

1.2.4 打靶载体 (pUCmT- Δ cagA:: *Cm*) 的构建 在打靶片段 PCR 产物中直接加入 Taq DNA 聚合酶 (5×10^{-6} U/L), 于 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 电泳并切胶纯化后与然后与 50 mg/L pUCmT 载体进行连接反应, 反应体系 10 μL : pUCmT (5×10^7 ng/L) 2 μL , 打靶片段 (5×10^7 ng/L) 6 μL , 10 \times T4 buffer 1 μL , T4 DNA ligase (5×10^{-6} U/L) 1 μL ; 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

1.2.5 打靶载体的电转化 取 4 mL 液体培养 (布氏肉汤加 10% 胎牛血清) 的 *Hp* 分装于 2 mL 无菌 Ep 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体; 等体积无菌去离子水轻柔吹打洗涤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 相同方法重复洗涤 1 次; 用 100 μL 无菌 10% 甘油轻柔悬浮菌体,

取 40 μL 分装在预冷的 0.5 mL 无菌 Ep 管中即可用作电转化细胞。取 500 ng 预冷的打靶质粒加入 40 μL 新鲜制备的电转化细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 min, 转移入 2 mm Eppendorf 电击转化杯, 迅速放入电转化仪, 2 500 V 电压下电击转化; 加入 *Hp* 培养液 1 mL 悬浮菌体, 转入 50 mL 无菌尖底离心管, 加入液体培养基 5 mL, 2.5 L 厌氧罐内 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 震荡培养过夜。

1.2.6 *cagA* 基因敲除菌株 *Hp*/ Δ cagA:: *Cm* 的筛选 吸取 500 μL 打靶载体电转化后的细菌培养液转接 5 mL 液体培养液 (含 *Cm* 2×10^{-2} $\mu\text{g/L}$), 于上述同样培养条件继续培养 3~4 d, 直至培养液浑浊; 取微量浑浊培养液划线接种固体培养基 (Karmali 培养基, 加 10% 脱纤维绵羊血和 2×10^{-2} $\mu\text{g/L}$ *Cm*), 于微需氧厌氧罐内培养至单克隆形成。

1.2.7 *cagA* 基因敲除菌株 *Hp*/ Δ cagA:: *Cm* 的 PCR 鉴定 随机挑选若干阳性克隆, 分别接种 3 mL 布氏肉汤 (含 10% 胎牛血清), 厌氧罐条件下 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 培养至菌体明显浑浊, 取少量菌液进行 PCR 扩增; 用 *cagA* 外侧引物扩增时, 如 *cagA* 基因未被替换, PCR 产物长度为 5 014 bp; 而打靶载体替换成功时, 产物长度则缩短为 2 150 bp; 反应体系 50 μL : 基因组 DNA 0.5 μL , 10 \times TaqPlus buffer 5 μL , dNTP (2.5×10^{-2} mol/L) 0.5 μL , cagA-outF 及 cagA-outR (5×10^{-6} mol/L) 各 0.5 μL , 5% DMSO 2.5 μL , Taq Plus DNA polymerase (5×10^{-6} U/L) 0.5 μL 及 ddH₂O 补足; PCR 循环程序同方法 1.2.1, 循环数为 35 次, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.8 原代胃癌细胞培养及 *Hp*/ Δ cagA:: *Cm*、*Hp*/

cagA 感染原代胃癌细胞 按 1.0×10^6 /孔细胞数量接种于含 DMEM 完全培养基(10% FBS)6 孔板中,37 °C 的 5% CO₂ 孵育箱常规培养,感染前将 6 孔板中换成无双抗含 Gibco 血清培养基;Hp/ Δ cagA::Cm 和 Hp/cagA⁺ 培养 3 d,感染复数(multiplicity of infection, MOI) 30:1 的比例分别感染原代胃癌细胞,24 h 后倒置荧光显微镜下观察细胞形态,并分别收集各组细胞,血球计数板计数。

1.2.9 Western blot 检测原代胃癌细胞内 cagA 存在 按全蛋白提取试剂盒进行细胞全蛋白提取,按 BCA 蛋白含量检测试剂盒进行蛋白定量,10% PAGE 分离蛋白,上样蛋白体积 20 μ L,电泳,湿转 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭,4 °C 孵育 cagA 一抗(1:1 000/4 000)过夜,二抗(1:10 000)室温孵育 2 h,TBST 清洗 3 次,按化学发光底物试剂盒进行反应,利用荧光凝胶成像系统曝光、显影及分析。

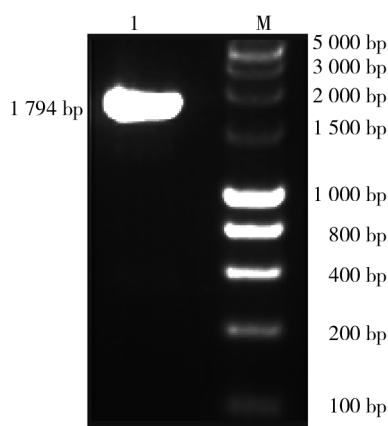
1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,Graphpad Prism 7.0 软件绘图,组间比较使用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 融合 PCR 构建打靶片段鉴定

cagA 基因上、下游同源重组臂经设计与 Cm 抗性基因序列有部分重叠,可通过 PCR 直接融合,获得全长的打靶片段,长度为 1 794 bp,见图 1。



注:1 为打靶片段,M 为标准分子量参照(DNA Maker)。

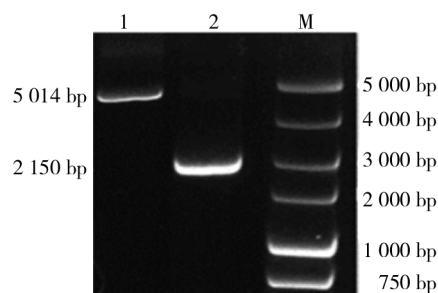
图 1 打靶片段融合 PCR 结果

Fig. 1 Target fragment fusion PCR map

2.2 Hp/ Δ cagA::Cm 突变株 PCR 鉴定

PCR 扩增鉴定结果显示,Hp/ Δ cagA::Cm 阳性克隆扩增产物为 2 150 bp,野生型 Hp/cagA 菌株扩

增产物为 5 014 bp,表明成功获得 Hp/ Δ cagA::Cm 敲出突变菌株,见图 2。



注:1 为野生 Hp/cagA 菌株,2 为 Hp/ Δ cagA::Cm 突变株,M 为 DNA 分子量标准。

图 2 Hp/ Δ cagA::Cm 突变株 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Hp/ Δ cagA::Cm mutant PCR identification map

2.3 Hp/ Δ cagA::Cm 和 Hp/cagA 感染的原代胃癌细胞形态

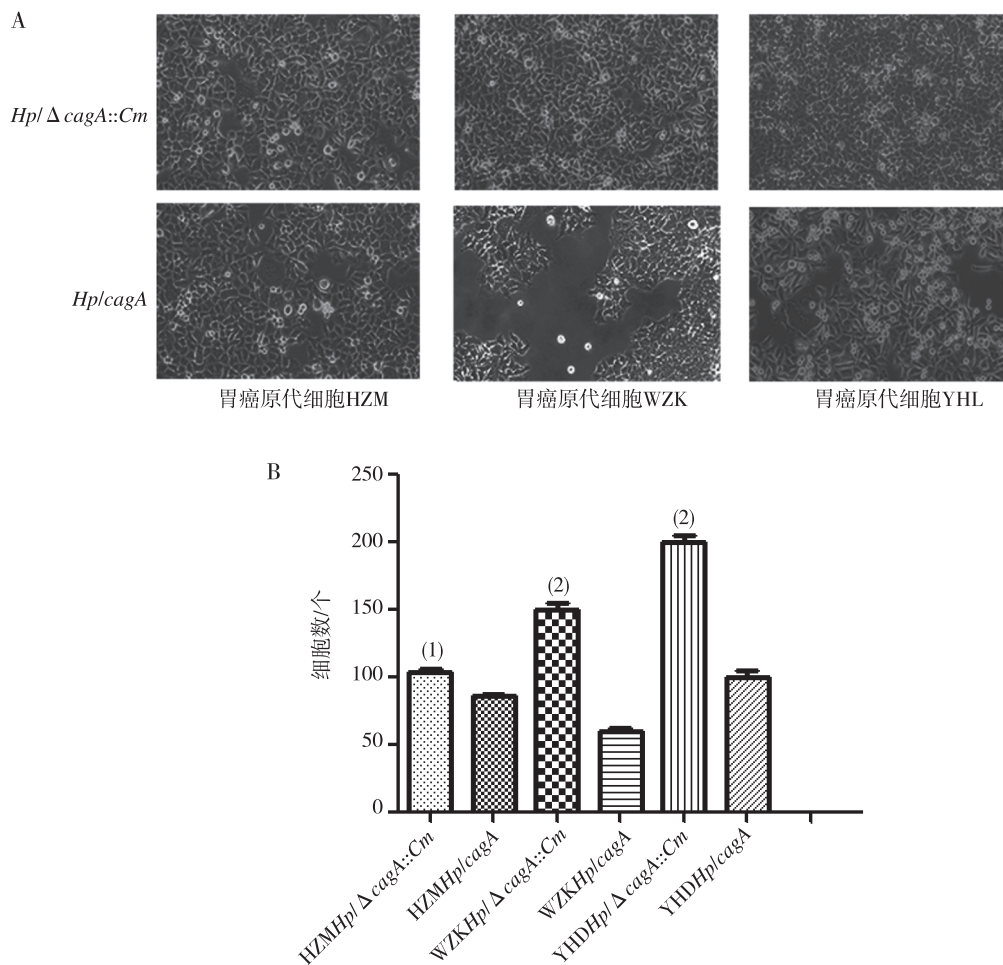
Hp/ Δ cagA::Cm 和 Hp/cagA 分别感染 3 株胃癌原代细胞,24 h 后荧光倒置显微镜下观察细胞形态改变,可见感染野生型 Hp/cagA 的原代胃癌细胞发生明显的细胞形态改变,由钝圆变为长梭形、纺锤形、不规则形,细胞死亡数量多,感染 Hp/ Δ cagA::Cm 突变株的细胞形态改变较小,死亡细胞数量少,且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 3。

2.4 原代胃癌细胞内 cagA 蛋白表达

Western blot 检测 cagA 蛋白(分子量 135 kDa)表达情况,结果表明野生型 Hp/cagA 菌株及其感染 3 株原代细胞内 cagA 蛋白表达水平较 Hp/ Δ cagA::Cm 突变型菌株及其感染 3 株原代细胞明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。

3 讨论

全球约 50% 人口存在 Hp 感染,多数感染患者为无症状胃炎,少数发展为萎缩性胃炎甚至胃癌^[12]。cagA 是 HP 感染引起炎症反应的重要效应蛋白,被 Hp 注入胃上皮细胞的 cagA 发生磷酸化,磷酸化的 cagA 和 Scr 同源区 2 结合激活 Scr 同源区的磷酸化酶活性,从而引起瀑布式的级联反应;通过干扰细胞信息传导通路引起组织严重的炎症损伤,参与胃癌的形成过程^[13]。cagA 可引起胃癌细胞的增殖和凋亡紊乱^[14]。临床检出的 Hp 包括 cagA 阳性和 cagA 阴性 2 种类型;cagA 阳性 Hp 感



注: A 为 *Hp/ΔcagA::Cm* 和 *Hp/cagA* 感染 3 株胃癌原代细胞, B 为细胞数量的直条图; ⁽¹⁾ 与 *WZKHp/cagA*, *YHDHp/cagA* 组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾ 与 *HZMHp/cagA* 组比较, $P < 0.05$ 。

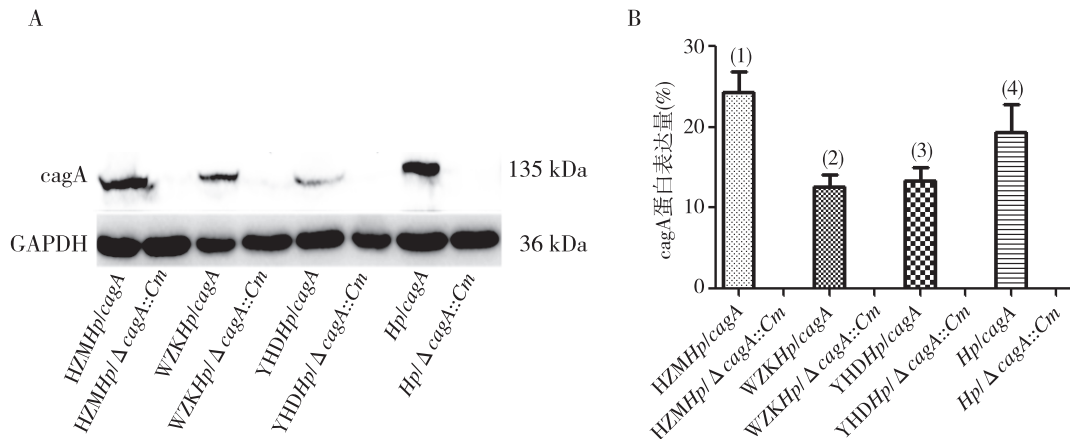
图 3 *Hp/ΔcagA::Cm* 和 *Hp/cagA* 感染细胞形态改变 (100 ×)

Fig. 3 *Hp/ΔcagA::Cm* and *Hp/cagA* infected cell morphology changes (100 ×)

染患者发生胃癌的风险高于 *cagA* 阴性者^[15]。现有研究认为 *cagA* 与 *Hp* 引起疾病的严重程度相关; *Hp/cagA* + 菌株可引起更严重的炎症反应, 更容易引起胃萎缩和胃腺癌的发生, 是 *Hp/cagA*-菌株的 2.0 ~ 28.4 倍^[16-17]; 因此 *cagA* 在胃癌的发生发展过程中发挥重要作用。为了更好地研究 *Hp* 中 *cagA* 蛋白的致病功能, 通过基因打靶的同源重组原理构建了 *HpΔcagA* 基因缺失突变株, 为系统研究 *cagA* 基因功能创造了条件, 也为进一步阐明 *Hp* 致病机制奠定基础。

基因打靶是分析基因功能的重要技术, 用于定位功能基因, 研究模式生物和一些重要微生物的全基因组功能, 被广泛应用于生命科学与医学研究领域^[18]。基因打靶技术以同源重组为理论基础,

同源重组机制在原核和真核生物中普遍存在, 是保证物种遗传信息稳定性和多样性的一种重要机制^[19]。有研究发现, 新的遗传物质可以通过同源重组引入生物细胞的基因组, 并对基因进行特异性修饰和改造^[20-22]; 也有研究报道, 构建出了 *cagA* 全基因缺失的 *H. pylori* 突变株^[23-24], 本研究利用高保真 PCR 酶从 *Hp* 基因组上扩增 *cagA* 基因的上、下游同源重组手臂; 从 pACYC184 质粒上扩增 *Cm* 表达框序列。通过融合 PCR 技术获得 *cagA* 基因敲除用的打靶片段 (上游同源手臂 - 氯霉素抗性基因 - 下游同源手臂), 将其克隆入通用载体 pUCmT, 获得打靶载体 pUCmT-*ΔcagA::Cm*。然后通过电转化, 将 pUCmT-*ΔcagA::Cm* 质粒直接转入 *Hp*, 在抗生素压力的帮助下, 打靶片段和菌体基因



注:A为Western blot检测cagA蛋白条带,B为cagA蛋白表达量的条图;⁽¹⁾与HZM Δ cagA::Cm组比较, $P < 0.01$;⁽²⁾与WZKH Δ cagA::Cm组比较, $P < 0.01$;⁽³⁾与YHDH Δ cagA::Cm组比较, $P < 0.01$;⁽⁴⁾与Hp Δ cagA::Cm组比较, $P < 0.01$ 。

图4 细菌及其感染细胞内cagA表达情况

Fig.4 CagA expression in bacteria and infected cells

组发生同源重组,通过氯霉素抗性筛选得到带有抗性标记的重组菌,随后因突变载体不能在Hp1004菌体内生长复制而丢失。

检测突变株Hp/ Δ cagA::Cm是否还存cagA基因或蛋白,是最后认证cagA基因缺失突变株构建成功与否的关键。本研究对Hp/ Δ cagA::Cm突变型菌株和野生型Hp/cagA菌株的基因组进行了PCR鉴定,用cagA外侧引物扩增时,野生株可以扩出完整的cagA基因和非编码序列的长约5 014 bp,而cagA缺失突变株cagA基因被打靶载体替换,产物长度则缩短为2 150 bp。另外本研究用Hp/ Δ cagA::Cm突变型菌株和野生型Hp/cagA菌株感染原代胃癌细胞,Western blot实验均能从野生型Hp/cagA菌株及其感染细胞检出cagA蛋白,而Hp/ Δ cagA::Cm突变型菌株及其感染细胞内均不能检出cagA蛋白,从而在蛋白水平上证实了上述实验结果,表明本次cagA缺失突变株Hp/ Δ cagA::Cm构建成功。同时本研究还发现感染野生型Hp/cagA的原代胃癌细胞发生明显的细胞形态改变,由钝圆变为长梭形、纺锤形及不规则形,细胞死亡数量多,而感染Hp/ Δ cagA::Cm突变株的细胞形态改变较小、死亡细胞数量少;这进一步证实cagA被Hp注入细胞后对细胞有一定的毒性作用。

综上所述,本实验成功构建了Hp/ Δ cagA::Cm突变株,并在感染细胞中成功验证,且证实cagA蛋白对细胞有一定的毒性作用,为进一步研究Hp中

cagA基因的功能,阐明其在Hp致病中的地位及作用奠定了实验基础。

4 参考文献

- [1] JIN Y P, FORMAN D, WASKITO L A, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and cagA-positive infections and global variations in Gastric Cancer [J]. Toxins, 2018, 10(4):163.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in china [J]. Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115 - 132.
- [3] WHITE J R, WINTER J A, ROBINSON K. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes [J]. Journal of Inflammation Research, 2015, 8:137 - 147.
- [4] AMIEVA M, PEEK R M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer [J]. Gastroenterology, 2016, 150(1): 64 - 78.
- [5] PARK B, LIM J W, KIM H. Lycopene treatment inhibits activation of Jak1/Stat3 and Wnt/ β -catenin signaling and attenuates hyperproliferation in gastric epithelial cells [J]. Nutrition Research, 2019, 70(1): 70 - 81.
- [6] NAUMANN M, SOKOLOVA O, TEGTMEYER N, et al. *Helicobacter pylori*: A paradigm pathogen for subverting host cell signal transmission [J]. Trends In Microbiology, 2017, 25(4): 316 - 328.
- [7] JANG S, SU H, BLUM F C, et al. Dynamic expansion

- and Contraction of *cagA* copy number in *Helicobacter pylori* impact development of Gastric Disease. [J]. MBIO, 2017, 8(1):e01779–16.
- [8] HUANG L U, WANG Z Y, PAN D D, Penicillin-binding protein 1A mutation-positive *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the suppression of microRNA-134 [J]. International Journal of Oncology, 2019, 54: 916–928.
- [9] SILJA W, STEFFEN B. A novel basolateral type IV secretion model for the *cagA* oncoprotein of *Helicobacter pylori*. [J]. Microbial Cell, 2018, 5(1):60–62.
- [10] 李景芬, 袁野, 于浩, 等. 猪 *MSTN* 基因敲除载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2008(1):45–47.
- [11] 陈相好, 刘芳, 王彩霞, 等. 高效严谨型大肠杆菌 *Targetron* 基因打靶系统的构建[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6):213–220.
- [12] CHEY W D, LEONTIADIS GRIGORIOS I, HOWDEN C W, et al. Correction: ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. [J]. The American Journal of Gastroenterology, 2018, 113(7): 1102.
- [13] WANG Y Z, XIAO H J, WU H T, et al. G protein subunit α_q regulates gastric cancer growth via the p53/p21 and MEK/ERK pathways[J]. Oncology Reports, 2017, 37(4): 1998–2006.
- [14] CAI H K, CHEN X, ZHANG J B, et al. 18 β -glycyrrhetic acid inhibits migration and invasion of human gastric cancer cells via the ROS/PKC- α /ERK pathway [J]. Journal Of Natural Medicines, 2018, 72(1): 252–259.
- [15] 龙妮娅, 熊林, 周建奖, 等. 幽门螺杆菌东、西方株 *cagA* 的序列差异及其对胃癌细胞生长与凋亡的影响[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 848–855.
- [16] FARZAM V, SAMIRA T, ABOLFAZL F, et al. New insights of *Helicobacter pylori* host-pathogen interactions: The triangle of virulence factors, epigenetic modifications and non-coding RNAs[J]. World Journal of Clinical Cases, 2018, 6(5):64–73.
- [17] AMIEVA M R, VOGELMANN R, COVACCI A, et al. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori cagA*[J]. Science, 2003, 300 (5624): 1430–1434.
- [18] 谢尚训, 谢明琦, 陈治池, 等. 利用基因打靶技术构建转基因小鼠及其在生物学中的应用[J]. 生物医学工程与临床, 2016(5):540–544.
- [19] 贺飞燕, 闫建俊, 冯瑞云, 等. 基因组编辑技术的原理及应用[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 20(2): 350–356.
- [20] KAWANO Y, HONDA A. Gene targeting in rabbits: single-step generation of knock-out rabbits by microinjection of CRISPR/Cas9 plasmids. [J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1630: 109–120.
- [21] 吴璐, 王磊, 任远, 等. 基因组编辑技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(11):84–90.
- [22] 张丽娜, 刘国安, 杨红. 基因打靶技术的研究进展[J]. 生物技术通报, (9):55–59.
- [23] 黄志刚, 段广才, 范清堂, 等. *cagA* 基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(33):3190–3194.
- [24] 洪伟, 陈学术, 吴昌学, 等. 幽门螺旋杆菌 *cagA* 基因失活突变株的构建[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(12):1328–1324.
- (2019-12-06 收稿, 2020-02-03 修回)
中文编辑: 严征; 英文编辑: 冉海勇