

DOI:10.13350/j.cjpb.230209

• 论著 •

幽门螺杆菌中基因过表达体系的构建及应用*

吴豪, 陕江帆, 季晓飞, 田月, 吴倩文, 陈思, 李波清, 封建凯**, 赵慧琳**

(滨州医学院, 山东烟台 264003)

【摘要】 **目的** 在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)体内构建外源基因以及自身基因的过表达系统。 **方法** 以绿色荧光蛋白基因 *gfp* 为报告基因,通过同源重组基因敲入和穿梭质粒两种方法构建 Hp 中基因过表达体系。同源重组法:以预先构建的基因敲除载体 pSJHK 的衍生质粒 pSJHK4 为载体,构建 *gfp* 基因敲入质粒 pSJHK4-gfp,使用 Hp 鞭毛高表达基因 *flaA* 的启动子调控 *gfp* 的表达;以 *hp0547* 基因区域为插入位点,通过自然转化的方式将质粒转入细菌,胞内通过同源重组将 *gfp* 插入到 Hp 基因组中,荧光显微镜观察 *gfp* 表达的荧光情况。穿梭质粒法:将含有鞭毛基因 *flaA* 启动子和 *gfp* 基因的表达盒连入 *H. pylori*-*E. coli* 穿梭质粒 pCHFHP 中,构建表达质粒 pCHFHP-gfp,自然转化到 Hp 中,荧光显微镜观察 *gfp* 表达的荧光情况。用同样方法构建 Hp CagA 蛋白(融合有 His-tag)的表达质粒 pCHFHP-CagA,转入预先构建的 Hp CagA 敲除株,通过亲和层析纯化重组蛋白,Western blot 检测 CagA 的表达情况。

结果 构建了 *gfp* 基因敲入质粒 pSJHK4-gfp,转入 Hp 后细菌发出绿色荧光;基于穿梭质粒构建了 *gfp* 基因表达质粒 pCHFHP-gfp,转入 Hp 中细菌同样发出荧光;进一步构建了 CagA 的表达质粒并转入 Hp CagA 敲除株中,Western blot 检测到 CagA 蛋白,并体外纯化获得一定量蛋白。 **结论** 基于同源重组基因敲入和穿梭质粒的方法可在 Hp 中构建外源基因及 Hp 自体基因的过表达体系,该方法能够为 Hp 的基因功能研究和致病因子的发掘提供基因操作工具。

【关键词】 幽门螺杆菌;基因过表达;同源重组;穿梭质粒;CagA

【中图分类号】 R378.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0168-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):168-173.]

Construction of gene over-expression systems in *Helicobacter pylori* and its application

WU Hao, SHAN Jiang-fan, JI Xiao-fei, TIAN Yue, WU Qian-wen, CHEN Si, LI Bo-qing, FENG Jian-kai, ZHAO Hui-lin (Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China)**

【Abstract】 **Objective** Construction of gene over-expression systems in *Helicobacter pylori* to realize the expression of its autogenes and exogenous genes. **Methods** Two strategies, genome homologous recombination and shuttle plasmid, were used to construct gene over-expression systems in *H. pylori*, and the green fluorescent protein gene was used as the reporter gene. For the homologous recombination method, plasmid pSJHK4 (derivated from pSJHK) was used as the skeleton for construction of *gfp* knock-in plasmid. A strong promoter (P-*flaA*) in *H. pylori* was used to start the gene's over-expression. The location of gene *hp0547* was chosen as the insertion site of the gene to be expressed. Gene *gfp* was constructed into the plasmid pSJHK4 between two homologous arms, resulting in plasmid pSJHK4-gfp. Then it was transformed into *H. pylori* by nature transformation, and gene *gfp* would inset into the genome of *H. pylori* through homologous recombination. GFP expression in the transformants was observed through fluorescence microscopy. For shuttle plasmid method, an expression cassette containing P-*flaA* and *gfp* gene was ligated into *H. pylori*-*E. coli* shuttle vector pCHFHP to construct the expression plasmid pCHFHP-gfp. The transformation and observation method were the same as above. CagA gene fragment fused with His-tag was manipulated to replace *gfp* gene to form plasmid pCHFHP-CagA. This plasmid was transformed into a CagA-deleted *H. pylori* strain we constructed previously. Recombinant CagA expressed in the transformants was detected by western blot and further purified by affinity chromatography. **Results** After transformation of the knock-in plasmid pSJHK4-gfp, fluorescence-labeled *H. pylori* strain was observed, suggesting the successful expression of GFP in *H. pylori*. Shuttle plasmid pCHFHP-gfp containing *gfp* gene-expression cassette was successfully constructed based on a *H. pylori*-*E. coli* shuttle vector. The fluorescence-labeled bacteria were also obtained after the plasmid transformation. Then, *cagA* gene-expression shuttle

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81702054);山东省高校青年创新科技支持计划项目(No. 2020JKJ006);山东省自然科学基金项目(No. ZR2020MH297)。

** **【通讯作者】** 赵慧琳, E-mail: zhaohuilin1984@163.com; 封建凯, E-mail: 15154502685@163.com

【作者简介】 吴豪(1996-),男,山东汶上人,硕士研究生。主要从事幽门螺杆菌的致病机制研究。E-mail: wuhao9618@163.com
吴豪和陕江帆为共同第一作者。

plasmid pCHFHP-CagA was further constructed, and transformed into CagA-deleted *H. pylori*. Western blot detected the expression product of CagA, and some amount of recombinant protein was also obtained by affinity chromatography.

Conclusion Gene over-expression systems in *H. pylori* can be realized by both homologous recombination knock-in and shuttle plasmids. This method can provide an effective gene manipulation tool for investigation of gene function and the discovery of novel pathogenic factors in *H. pylori*.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; over-expression; homologous recombination; shuttle plasmid; CagA

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤和胃癌的重要病因^[1-3],其多种毒力因子如细胞毒素相关基因 A 蛋白(CagA)^[4]、空泡性细胞毒素 A (VacA)^[5]和大量外膜蛋白(oipA、sabA、sabB、babB、babC 和 hopZ)^[6]等具有致病意义,对这些致病因子的研究加深了人们对 Hp 致病性的认识^[7-9]。然而,病原体和宿主之间的相互作用非常复杂,关于 Hp 致病机制尚不清晰^[10],而其感染导致不同致病结局的原因更需要进一步探讨。

构建基因敲除或基因过表达突变体是研究基因功能的常用策略,在 Hp 基因功能研究的过程中,转座子插入突变、定点突变和无痕敲除等方法先后被报道^[11-13]。作者前期研究中也开发了一些用于 Hp 基因操作的质粒,并基于此对一些未知功能基因进行了研究^[5,14]。然而,相较于基因敲除,却不容易实现对 Hp 基因的回补操作,可能是由于大部分 Hp 菌株具有严格的限制性修饰系统,使得外源质粒的转入效率低^[15]。此外,为了探索 Hp 的一些毒力因子的致病作用,常常需要体外纯化这些蛋白,但部分基因在 *E. coli* 中异源表达难以获得有生物活性的蛋白,可能是因为后者体内缺乏必要的分子伴侣。如果这些蛋白能在 Hp 中自体过表达并且能够分离纯化,对于探索这些致病因子的毒力作用很有帮助。因此,对 Hp 中基因过表达的探索仍是很有研究价值的课题之一。

本研究尝试通过两种方法在 Hp 中表达绿色荧光蛋白(GFP)。一种方法是通过同源重组双交换将 *gfp* 基因插入到其基因组中,另一种方法是基于 *H. pylori*-*E. coli* 穿梭质粒构建 *gfp* 基因的表达质粒。在 GFP 表达的基础上利用穿梭质粒构建融合有 His 标签的 Hp 癌蛋白 CagA 的自体过表达系统,获得重组蛋白,为 Hp 致病因子的功能研究提供有效工具。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 菌株、质粒、引物 实验用的菌株、质粒和引物见表 1。Hp 使用空肠弯曲菌琼脂培养基(OXOID)在 37 °C 微需氧(85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂)条件下培养。*E. coli*-DH5 α 用于质粒的转化和扩增,使用 LB 培养

基在 37 °C 下常规培养。在转化子的筛选中,使用卡那霉素(15 mg/L)或氯霉素(10 mg/L)筛选 Hp 阳性克隆,使用氨苄青霉素(100 mg/L)或氯霉素(30 mg/L)筛选 *E. coli* 阳性克隆。

1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒,基因组提取试剂盒,DNA 凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶、T4 DNA ligase 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DNA 聚合酶 Fast Pfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 质粒载体 pSJHK4 的构建 在构建的质粒 pSJHK^[14]的基础上,通过在多克隆位点处增加更多的限制性内切酶位点得到 pSJHK4。构建过程:设计含有多个酶切位点(SacI、XhoI、BamHI、NdeI)的卡那霉素抗性基因(*aphA*)的扩增引物 Km-F 和 Km-R,以质粒 pSJHK 为模板扩增 *aphA* 基因片段。该基因片段经过 SacI 和 BamHI 酶切后,重新连入 pSJHK 相应的酶切位点以替换原始的 *aphA* 基因序列,得到增加了 XhoI、NdeI 酶切位点的质粒 pSJHK4。

2.2 基于同源重组敲入的 *gfp* 表达质粒的构建 Hp 基因组中的 hp0547 基因编码其重要毒力因子 CagA 蛋白,该基因敲除不影响细菌的生长,选择该位点作为 *gfp* 的敲入位点。首先,在 hp0547 基因上、下游分别设计引物 0547-1,0547-2 和 0547-3,0547-4,用于扩增同源重组交换的同源臂 arm1 和 arm2。二者分别经过 BamHI、KpnI 和 SacI、XbaI 酶切后,连入 pSJHK4 的相应酶切位点,构建质粒 pSJHK4-0547。进一步扩增 *gfp* 基因表达盒(包含 Hp 鞭毛高表达基因 *flaA* 的启动子序列和 *gfp* 序列,前期构建),经 PstI 和 KpnI 酶切后连入质粒 pSJHK4-0547 中,获得 *gfp* 敲入质粒 pSJHK4-gfp。

2.3 包含 *gfp* 和 *cagA* 穿梭过表达质粒的构建 以已构建的 *H. pylori*-*E. coli* 穿梭质粒 pCHFHP^[5]为基础分别构建 *gfp* 和 *cagA* 的表达质粒。使用引物(gfp-3)和(gfp-4)扩增 *gfp* 基因表达盒,经 KpnI 和 SphI 酶切后连入 pCHFHP,得到 *gfp* 表达质粒 pCHFHP-gfp。使用引物 CagA-1 和 CagA-端 2(3'加入 His 标签序列)扩增 *CagA* 基因表达盒(3 825 bp),

利用同样方法构建 *cagA* 的表达质粒 pCHFHP-CagA。

2.4 Hp 的自然转化 利用自然转化方法^[16]将构建的表达质粒转入 Hp。将生长至对数期的 Hp 经 6 000 g 离心 5 min 收集菌体,使用脑心浸液洗涤 3 次。取 10 mg 质粒与 1×10^{10} 个细胞混合,使用固体培养基培养 24 h,收集细胞并转移至含有抗生素的筛选平板,进一步培养 45 d 后获得转化子。

2.5 荧光显微镜观察 Hp 中 GFP 的表达 收集培养至对数期的 Hp(6 000 g, 5 min),使用脑心浸液洗涤 3 次。将适量细菌置于载玻片上,用荧光显微镜(OPTIKA B-1000FL)进行观察。

2.6 CagA 过表达蛋白的纯化 收集培养至对数期的 Hp 细胞,用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 20 mmol/L)洗涤并重悬菌体后,超声波破碎细胞(200 W, 15 min)。细胞裂解液经过 12 000 g 离心 30 min,收集上清液,利用 His-Tag 亲和树脂(Sangon)纯化带有 His 标签的 CagA 重组蛋白。纯化蛋白经 SDS-PAGE 分离后转到 PVDF 膜上^[5],然后以 CagA 抗体(SANTN)为一抗,以酶标抗体为二抗进行 Western blot,通过化学发光成像系统对蛋白条带进行显示。

结 果

1 pSJHK 衍生质粒 pSJHK4 的构建

pSJHK4 质粒是由已构建的基因敲除质粒载体 pSJHK^[14] 衍生而来,载体的构建过程如图 1 所示。相较于质粒 pSJHK, pSJHK4 质粒的卡那霉素抗性基因(*aphA*)两侧增加了 2 个限制性内切位点(NdeI 和 XhoI),为同源臂的插入提供了更多的位点选择。同时去掉部分冗余序列,使得质粒缩小至 4 205 bp,提高了基因操作的效率。

2 基于 pSJHK4 的 *gfp* 敲入质粒的构建

使用绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为基因表达的报告基因,为了提高其表达量,将其置于 Hp 中的强启动子 *p-flaA* 的调控下。选择 Hp 基因组中 *hp0547* 基因位点作为外源基因的敲入位点,克隆同源臂 *arm-1* 和 *arm-2*。以 pSJHK4 质粒为载体,在卡那霉素抗性基因两侧分别插入同源臂,同源臂之间连入 *gfp* 表达盒(*flaA* 启动子和 *gfp* 基因的融合序列),得到 *gfp* 敲入表达质粒 pSJHK4-*gfp*(6889 bp,图 1)。

3 *gfp* 敲入 Hp 基因组后的组成型表达

通过自然转化的方法将质粒 pSJHK4-*gfp* 转入 Hp 细胞中,经过同源臂的同源重组交换,卡那霉素抗性基因(*aphA*)和 *gfp* 基因表达盒插入到 Hp 基因组中的 *hp0547* 基因区域(如图 2A)。挑取卡那霉素阳性转化子,分别使用引物(G27-YZ-1, km-2)和(km-3,

表 1 菌株、质粒及引物
Table 1 Stains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒或引物 Strain or plasmid or primer	描述 Description	来源 Reference or source
Strains		
<i>H. pylori</i> G27	<i>H. pylori</i> wild strain containing CagA	This study
<i>H. pylori</i> G27- <i>gfpkm</i>	<i>H. pylori</i> G27, <i>gfp</i> knock-in (Kmr)	This study
<i>H. pylori</i> G27- <i>gfpkm</i>	<i>H. pylori</i> G27, <i>gfp</i> knock-in (Cmr)	This study
<i>H. pylori</i> G27-CagAcm	<i>H. pylori</i> G27, CagA knock-in (Cmr)	This study
<i>E. coli</i> -DH5a	Strain used for gene cloning	Clontech
Plasmids		
pSJHK	Gene-targeting template plasmid, Apr (Kmr)	[14]
pSJHK4- <i>gfp</i>	A <i>gfp</i> recombinant vector, Apr (Kmr)	This study
pCHFHP	Gene-targeting template plasmid, Apr (Cmr)	[5]
pCHFHP- <i>gfp</i>	A <i>gfp</i> recombinant vector, Apr (Cmr)	This study
pCHFHP-CagA	A CagA recombinant vector, Apr (Cmr)	This study
primers		
0547-1	GACCAGGGATCC AGTCTCAGTGACGCTGTTGCA	
0547-2	GGCCACCTGCAG ATTATTGATAAAATTGCTGCGGGT	
0547-3	GCTTGGCTCGAG AAAATGCAGAGCATGGAATCA	
0547-4	CTCAAGGTCTAGA GGGCTATTTTATGGAACAT	
<i>gfp</i> -1	CGAATGCTGCAG TTAAAGGCTCCTTTTGGGA	
<i>gfp</i> -2	AGGTGTGGTACC TTATTTGTATAGTTCATCCA	
<i>gfp</i> -3	CGAATGGGTACC TTAAAGGCTCCTTTTGGGA	
<i>gfp</i> -4	AGGTGTGCATGC TTATTTGTATAGTTCATCCA	
CagA-1	GACTCGGGTACC AGCTGTCTTTGAAAATCTGTCT	
CagA-2	CTAGTGGCATGCTTACACCACCACCA CCACCACAGATTTTGGAAAACCACCT	
G27-YZ-1	GTCATTTGTGACCCATACGA	
G27-YZ-2	GGCGTGATTGAGCCAAGCATT	
Km-R	GGTACAGGAGCTCCCTCAAGAGCG- ATACCCCTCGAGTTGACGCGTCGAA	
Km-F	TTGGCGGGATCCACAAGGGCTGCAGCA AGCGCCATATG	
Km-2	AAAGCAGGTACCTTGCAGTGGGCTTACA	
Km-3	TGCCTCGTCTGGAGTTCATTC GTTGGCTACCCGTGATATTGCT	
pCHFHP-YZ-1	AAGCTAGTGGGTTGGGAGTT	
pCHFHP-YZ-2	GCGTTATTGTGGTAGGTGT	

注: Ap, 氨苄青霉素; Km, 卡那霉素; Cm, 氯霉素。抗性标记位于括号内, 指在幽门螺杆菌中表达; 抗性标记位于括号外, 指在大肠埃希菌中表达。

Notes: Ap, ampicillin; Km, kanamycin; Cm, chloramphenicol. Phenotypes in parentheses are expressed in *H. pylori*, phenotypes not in parentheses are expressed in *E. coli*.

G27-YZ-2)进行 PCR 验证。引物 G27-YZ-1 和 km-2 的扩增片段包含同源臂 *arm-1* 和部分 *aphA* 基因序列,理论长度 2.5 kbp;引物 km-3 和 G27-YZ-2 的理论扩增子大小为 1.5 kbp。如图 2B 所示,转化子中分别

扩增出 2.5 kbp 和 1.5 kbp 的片段,表明上、下游同源臂都发生了同源重组,即 *gfp* 基因表达盒已被整合到基因组中。对 PCR 产物测序,测序结果进一步确证了这一结论。

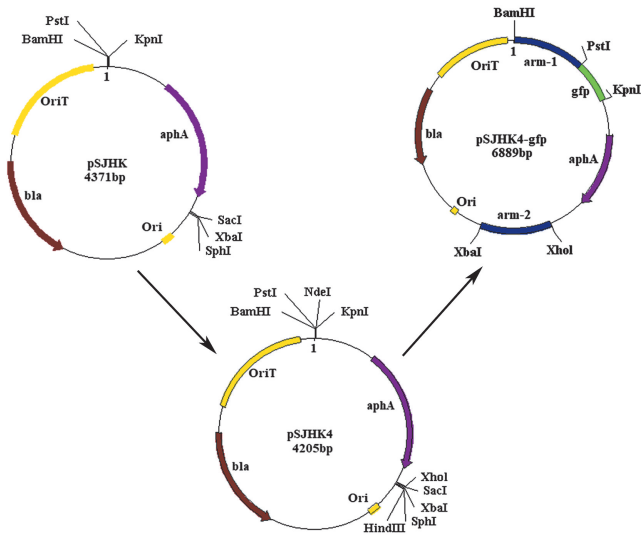
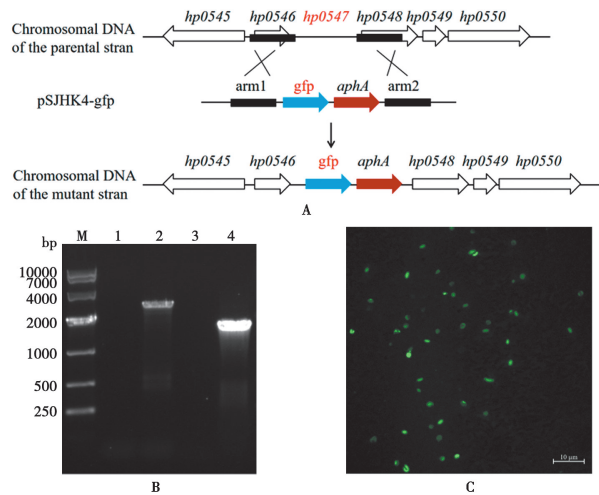


图 1 pSJHK 及其衍生质粒 pSJHK4 和 pSJHK4-gfp 的构建示意图
Fig. 1 Maps of pSJHK and its derived plasmids pSJHK4 and pSJHK4-gfp



A 通过同源重组双交换将 *gfp* 敲入 *hp0547* 位点示意图 B *hp0547* 位点发生同源重组双交换的 PCR 验证 M DNA 标志物 1 引物 G27-YZ-1 和 km-2 扩增野生型菌株的 PCR 产物 2 引物 G27-YZ-1 和 km-2 扩增突变菌株 PCR 产物 3 引物 km-3 和 G27-YZ-2 扩增野生型菌株的 PCR 产物 4 引物 km-3 和 G27-YZ-2 扩增突变菌株的 PCR 产物 C Hp 表达 *gfp* 基因后发出的绿色荧光

图 2 *gfp* 基因通过同源重组双交换敲入 Hp 基因组示意图及其验证和过表达检测

A Schematic representation of knocking *gfp* into the *hp0547* locus by homologous recombination; B Diagnostic PCR for verification of gene replacement at *hp0547* locus M DNA molecular weight standard 1 PCR products from wild-type strain using primers G27-YZ-1 and km-2 2 Amplicon from transformant using primers G27-YZ-1 and km-2 3 PCR products from wild-type strain using primers km-3 and G27-YZ-2 4 Amplicon from transformant using primers km-3 and G27-YZ-2; C Green fluorescence from *gfp* expressed in transformant cells

Fig. 2 Over-expression of *gfp* gene in *H. pylori* by knocking it into the genome

验证正确的转化子在荧光显微镜下可观察到发出绿色荧光的 Hp 细胞(图 2C),表明 *gfp* 敲入 Hp 基因组后成功表达。

4 *gfp* 穿梭表达质粒的构建及其在 Hp 体内的表达

利用 *H. pylori*-*E. coli* 穿梭质粒 pCHFHP^[5] 构建 *gfp* 表达载体 pCHFHP-*gfp* 的过程如图 3(仍然选择 *flaA* 的启动子调控 *gfp* 的菌内表达)。将 pCHFHP-*gfp* 转入 Hp 后,通过氯霉素筛选阳性转化子。在 *gfp* 基因内部设计验证引物 *gfp*-3 和 *gfp*-4 进行菌落 PCR。扩增结果如图 4A,转化子的特异性目的片段 pCHFHP-*gfp* 成功转入 Hp 中。荧光显微镜下观察到绿色荧光标记的 Hp 细胞(图 4B),表明穿梭质粒上的 *gfp* 基因同样在 Hp 内得到表达。

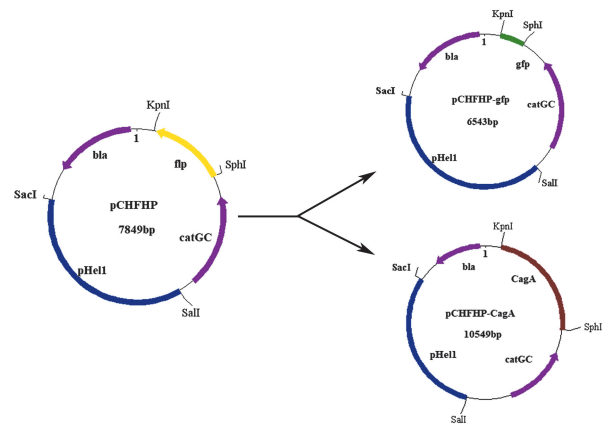
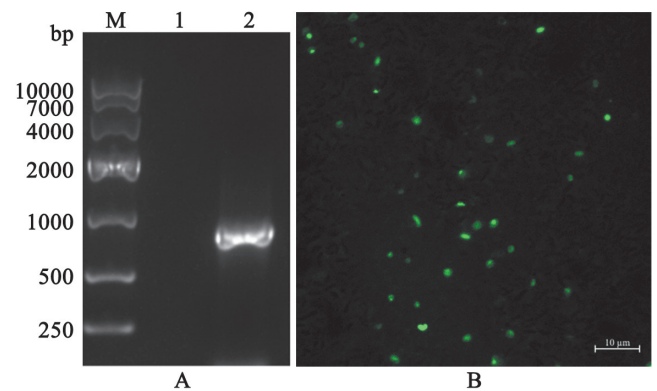


图 3 质粒 pCHFHP-*gfp* 和 pCHFHP-CagA 的构建示意图
Fig. 3 Schematic representations of plasmids pCHFHP-*gfp* and pCHFHP-CagA



A 质粒转化 PCR 确认 M DNA 标志物 1 野生型菌株 PCR 产物 2 突变体的扩增子 B Hp 表达 *gfp* 基因后发出绿色荧光

图 4 利用穿梭质粒在 Hp 体内过表达 *gfp* 基因

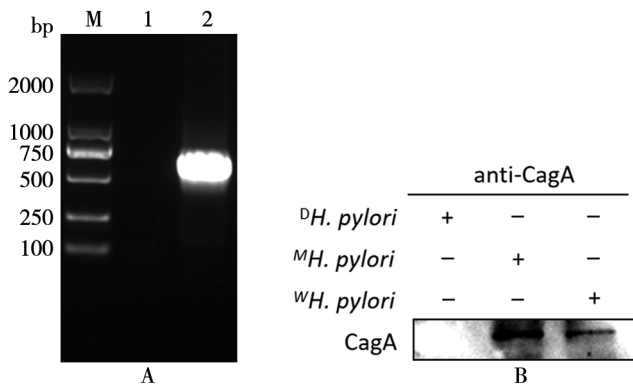
A Diagnostic PCR to confirm the plasmid transformation M DNA molecular weight standard 1 PCR products amplified from wild-type strain 2 Amplicon from the transformed mutant) B Green fluorescence from *gfp* expressed in *H. pylori* transformant cells

Fig. 4 Verification of *gfp* expression using shuttle plasmid pCHFHP-*gfp* transformation

5 利用穿梭质粒实现 *cagA* 基因在 Hp 体内的过表达

使用穿梭质粒 pCHFHP 构建 CagA 的表达质粒 (pCHFHP-CagA)。如图 3 所示,同时在 CagA 基因的 3'端融合了 His-tag,以便于纯化。为了排除 Hp 原有 CagA 的干扰,使用已构建的 Hp CagA 敲除突变株作为受体细胞,同样使用自然转化的方法将质粒 pCHFHP-CagA 转入细胞。PCR(pCHFHP-CagA 内部设计验证引物 pCHFHP-YZ-1 和 pCHFHP-YZ-2)验证质粒转入如图 5A 所示,转化子中扩增出特异性片段,表明质粒成功转入 Hp 中。

由于在 CagA 基因的 3'端融合了 His-tag,因此可通过亲和层析的方法进一步分离 CagA 蛋白。纯化的 CagA 进行 Western blot,结果显示该蛋白成功表达(图 5B),且从条带灰度来看,通过穿梭质粒表达的 CagA 的量高于野生菌株。



A CagA 过表达穿梭质粒 pCHFHP-CagA 转化的验证 M DNA 标志物 1 敲除 CagA 菌株 PCR 产物 2 突变体的扩增子 B 纯化重组蛋白 CagA 的 Western blot 检测 ^D *H. pylori* 为 CagA 缺失菌株的细胞裂解物 ^M *H. pylori* 从过表达菌株中纯化的 CagA 融合蛋白 ^W *H. pylori* 为野生型菌株的细胞裂解物

图 5 CagA 过表达检测

A Verification of *cagA* over-expression shuttle plasmid pCHFHP-CagA transformation M DNA molecular weight standard 1 PCR products amplified from the original CagA-deleted strain 2 Amplicon from the transformed mutant B Western blot detection of purified over-expression CagA ^D *H. pylori* Cell lysates of CagA-deleted strain ^M *H. pylori* Purified CagA fused with His tag from the transformed mutant ^W *H. pylori* Cell lysates of wild-type strain

Fig. 5 Detection of purified CagA from over-expression strain

讨论

尽管已对 Hp 的致病机制进行了深入研究,但是其感染过程仍有诸多细节尚不清楚,其感染后产生不同致病结果的原因也仍然是一个未解之谜。解析其基因组中大量未知基因的功能,发现其新的毒力基因仍然是 Hp 致病机制研究中的重要领域之一。近年来不断有新的致病因子被报道,如丝氨酸蛋白酶 HtrA 和外膜蛋白 OipA 等,均在 Hp 感染过程中发挥重要作用^[17-18]。而一些与特异性临床表现相关的毒力因子的发现,更为理解 Hp 多样化的感染结局提供了新的思

路。Zannoni 等^[19]和 Szczepanowski 等^[20]分别报道基因 *hp1043* 和 *hp1021* 与十二指肠溃疡和胃癌的风险增加有关。这对全面认识 Hp 的致病机制非常有必要。

基因敲除、基因回补和异源表达等遗传操作被广泛用于 Hp 致病相关基因的功能研究^[21-24],是解析新基因功能的重要手段。已构建的专门用于 Hp 基因敲除的质粒载体 pSJHK 和 pSJHC 分别携带卡那霉素和氯霉素抗性基因^[14],可以便捷地构建基于同源重组双交换的基因敲除盒。然而,由于绝大多数的 Hp 菌株均具有严格的限制性修饰体系^[25],向其内部导入外源质粒的效率并不高,因此其基因回补质粒的转入常常遇到困难。预先借助 Hp 菌体裂解液中的修饰酶甲基化修饰外源 DNA 后再进行转化,可能是一种提高质粒转化效率的方法^[26-27],但在应用中的效果并不稳定。

本研究中对 Hp 体内基因过表达体系的构建进行了一些尝试。首先通过增加限制性内切酶位点和减少冗余序列,进一步优化了已构建的基因敲除载体 pSJHK。在此基础上通过同源重组双交换敲入目标基因的方法将 *gfp* 基因插入 Hp 基因组中,实现了绿色荧光蛋白的组成型表达。同时,借助 *H. pylori*-*E. coli* 穿梭质粒实现了 *gfp* 基因在 *H. pylori* 中的质粒表达。这些质粒工具和方法为在 Hp 中进行基因敲除和基因表达提供了更多的选择。

CagA 是 Hp 重要的致病因子之一^[28],与胃癌的发生密切相关,是目前唯一被认定的细菌来源的癌蛋白^[29-31]。Hp 感染宿主后,CagA 通过 IV 型分泌系统 (T4SS) 注入宿主细胞,其氨基端固定在细胞膜上,羧基端形成无规则卷曲,游离于细胞质中,与细胞内多个蛋白相互作用,异常调控下游的信号通路,导致细胞恶性转化^[32]。然而由于其羧基端的无规则结构,其异源表达在 *E. coli* 中仍难以实现,直接导致其全长的结构数据一直未得到解析^[33],也限制了对该蛋白致病机制的深入研究。本实验利用穿梭质粒构建了 CagA 在 Hp 中的自体过表达系统,并通过融合 His-tag 得到了一定量的纯化蛋白。这一尝试为体外获得 CagA 蛋白提供了可能,为 CagA 整体结构的解析以及 CagA 致病机制的体外研究开辟了一条新的思路,同时为 Hp 其他无法异源表达的致病因子研究提供了一种可能的方法。

【参考文献】

[1] Forman D. *Helicobacter pylori* infection and cancer[J]. Br Med Bull, 1998, 54(1): 71-78.
[2] Kato S, Onda M, Matsukura N, et al. *Helicobacter pylori* infection and genetic polymorphisms for cancer-related genes in

- gastric carcinogenesis[J]. Biomed Pharmacother, 1997, 51(4): 145-149.
- [3] Peek RJ, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 28-37.
- [4] 陈定宇, 何小凤, 张瑜, 等. 幽门螺杆菌 CagA 对胃上皮细胞线粒体功能的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 2(16): 155-160.
- [5] Ji X, Wang Y, Li J, et al. Application of FLP-FRT system to construct unmarked deletion in *Helicobacter pylori* and functional study of gene hp0788 in pathogenesis[J]. Front Microbiol, 2017, 8(3): 2357-2368.
- [6] Wei S, Li X, Wang J, et al. Outer membrane vesicles secreted by *Helicobacter pylori* transmitting gastric pathogenic virulence factors[J]. ACS Omega, 2022, 7(1): 240-258.
- [7] Dailidienė D, Dailidė G, Kersulytė D, et al. Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 5908-5914.
- [8] Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, et al. DupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 5): 554-562.
- [9] Fazeli Z, Alebouyeh M, Rezaei Tavirani M, et al. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells[J]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2016, 9(Suppl1): S42-S46.
- [10] Shahini SAM, Ashrafi-Dehkordi K, Ahmadi R, et al. Frequency of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and their correlation with clinical outcome and histological parameters in infected patients[J]. Heliyon, 2021, 7(7): e7610.
- [11] Morero NR, Zuliani C, Kumar B, et al. Targeting IS608 transposon integration to highly specific sequences by structure-based transposon engineering[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(8): 4152-4163.
- [12] Johnson KS, Elgamoudi BA, Jen FE, et al. The dCache chemoreceptor TlpA of *Helicobacter pylori* binds multiple attractant and antagonistic ligands via distinct sites[J]. mBio, 2018, 12(4): e181921.
- [13] Dawson EM, Dunne KA, Richardson EJ, et al. Complete genome sequence of *Helicobacter pylori* B128 7. 13 and a single-step method for the generation of unmarked mutations [J]. Helicobacter, 2019, 24(4): e12587.
- [14] Ji X, Zhao H, Zhang Y, et al. Construction of novel plasmid vectors for gene knockout in *Helicobacter pylori* [J]. Curr Microbiol, 2016, 73(6): 897-903.
- [15] Lehours P, Dupouy S, Chainieux J, et al. Genetic diversity of the HpyCII restriction modification system in *Helicobacter pylori* [J]. Res Microbiol, 2007, 158(3): 265-271.
- [16] Copass M, Grandi G, Rappuoli R. Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori* vacA gene with a sucrose sensitivity marker[J]. Infect Immun, 2017, 65(5): 1949-1952.
- [17] Zhang Z, Huang Q, Tao X, et al. The unique trimeric assembly of the virulence factor HtrA from *Helicobacter pylori* occurs via N-terminal domain swapping[J]. J Biol Chem, 2019, 294(20): 7990-8000.
- [18] Al-Maleki AR, Loke MF, Lui SY, et al. *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein a (OipA) suppresses apoptosis of AGS gastric cells *in vitro* [J]. Cell Microbiol, 2017, 19(12): e12771.
- [19] Zannoni A, Pellicciari S, Musiani F, et al. Definition of the binding architecture to a target promoter of HP1043, the essential master regulator of *Helicobacter pylori* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7848.
- [20] Szczepanowski P, Noszka M, Zyla-Uklejewicz D, et al. HP1021 is a redox switch protein identified in *Helicobacter pylori* [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(12): 6863-6879.
- [21] Skoog EC, Morikis VA, Martin ME, et al. CagY-Dependent regulation of type IV secretion in *Helicobacter pylori* is associated with alterations in integrin binding[J]. mBio, 2018, 9(3): 1-16.
- [22] Barrozo RM, Cooke CL, Hansen LM, et al. Functional plasticity in the type IV secretion system of *Helicobacter pylori* [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(2): e1003189.
- [23] Humbert O, Dorer MS, Salama NR. Characterization of *Helicobacter pylori* factors that control transformation frequency and integration length during inter-strain DNA recombination[J]. Mol Microbiol, 2018, 79(2): 387-401.
- [24] Hayashi T, Senda M, Suzuki N, et al. Differential mechanisms for SHP2 binding and activation are exploited by geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA oncoproteins[J]. Cell Rep, 2017, 20(12): 2876-2890.
- [25] Lin TL, Shun CT, Chang KC, et al. Isolation and characterization of a HpyCII restriction-modification system in *Helicobacter pylori* [J]. J Biol Chem, 2014, 279(12): 11156-11162.
- [26] Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, et al. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(14): 3916-3926.
- [27] Usui G, Matsusaka K, Mano Y, et al. DNA methylation and genetic aberrations in gastric cancer [J]. Digestion, 2021, 102(1): 25-32.
- [28] Xia XJ, Zhang LF, Wu H, et al. CagA+ *Helicobacter pylori*, not CagA- *Helicobacter pylori*, infection impairs endothelial function through exosomes-mediated ROS formation[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 881372.
- [29] 张珊珊, 苗丰, 刘露, 等. 幽门螺杆菌毒力因子 CagA 对人正常胃上皮 HFE145 细胞 CDX1 表达及上皮间质转化的影响[J]. 中国医药导报, 2021, 25(18): 35-39.
- [30] 卢燕君, 吕玉华, 晁艳, 等. 黄连素通过 CagA 介导的 NF- κ B 信号通路抑制幽门螺杆菌感染小鼠胃粘膜炎症因子分泌的研究[J]. 华南国防医学杂志, 2021, 5(35): 323-328.
- [31] 程薇, 杨丽萍, 周建奖, 等. 过表达 CagA 对胃癌细胞中 GLUT1 表达的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2021, 4(46): 381-386.
- [32] Knorr J, Ricci V, Hatakeyama M, et al. Classification of *Helicobacter pylori* virulence factors: is CagA a toxin or not[J]. Trends Microbiol, 2019, 27(9): 731-738.
- [33] Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2017, 93(4): 196-219.