

DOI:10.13350/j.cjpb.240502

• 论著 •

## GFP 拆分方法示踪幽门螺杆菌 CagA 的转运研究\*

吴倩文<sup>1,2</sup>, 刘书振<sup>1</sup>, 张建辉<sup>1</sup>, 曹新颖<sup>1,2</sup>, 孙泽坤<sup>1</sup>, 贾钰刚<sup>1,2</sup>, 张莹<sup>1</sup>, 李波清<sup>1</sup>, 赵慧琳<sup>1\*\*</sup>, 季晓飞<sup>1\*\*</sup>

(1. 滨州医学院病原生物学教研室, 山东烟台 264003; 2. 滨州医学院第二临床医学院)

**【摘要】** 目的 用 GFP 拆分方法示踪幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染过程中 CagA 向胃上皮细胞内的转运过程。方法 ①PCR 扩增 CagA 基因的上下游同源臂, 连入敲除质粒 pSJHK4 中, 将质粒通过电击转化的方法转入 Hp 中, 利用卡那霉素筛选 CagA 敲除突变株  $\Delta$ CagA。②PCR 扩增绿色荧光蛋白 GFP 第 11  $\beta$  折叠(GFP11)的基因序列并与 CagA 基因序列的 3' 端相连, 将融合序列连入 Hp-大肠埃希菌穿梭质粒 pCHFHp 中, 并通过电击转化的方法转入  $\Delta$ CagA 中, 利用氯霉素筛选 CagA 与 GFP-11 的融合表达突变株。③PCR 扩增 GFP 第 1-10  $\beta$  折叠(GFP1-10)的基因序列, 包装慢病毒, 利用病毒感染的方法将其转入胃上皮细胞 GES-1 中。将②中构建的 Hp 突变株以 100:1 的感染复数感染③构建的表达 GFP(1-10)的 GES-1 细胞体系, 利用荧光显微镜观察细胞内的荧光情况, 通过 Western blot 检测细胞内的 CagA 蛋白含量。结果 构建了 CagA 敲除质粒 pSJHK4-cagA, 转入 Hp 中得到 CagA 敲除突变株  $\Delta$ CagA。构建了 CagA 与 GFP-11 的融合表达质粒 pCHFHp-cagAgfp11, 转入  $\Delta$ CagA 中获得 CagA 与 GFP-11 的融合表达突变株 HpG27-cagAgfp11。构建了含有 GFP1-10 基因序列的慢病毒, 感染 GES-1 细胞后获得 GFP1-10 稳定表达的细胞株。在 HpG27-cagAgfp11 感染 GES-1 模型中, 观察到细胞中的绿色荧光, 说明 CagA 被转运到 GES-1 细胞内部, 其融合表达的 GFP-11 与细胞内表达的 GFP1-10 结合发出荧光, Western blot 结果也证实 CagA 被转运至胞内。结论 在 Hp 感染 GES-1 细胞模型中, GFP 拆分方法能够示踪 CagA 向细胞的转运过程, 这为 CagA 的转运研究提供了新方法, 有助于 HpIV 型分泌系统(T4SS)作用机制的深入研究。

**【关键词】** 幽门螺杆菌; CagA; GFP 拆分; T4SS**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0502-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 May;19(5):502-506,513.]

Visualization of *Helicobacter pylori* CagA delivering by Split-GFPWU Qianwen<sup>1,2</sup>, LIU Shuzhen<sup>1</sup>, ZHANG Jianhui<sup>1</sup>, CAO Xinying<sup>1,2</sup>, SUN Zekun<sup>1</sup>, JIA Yugang<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, LI Boqing<sup>1</sup>, ZHAO Huilin<sup>1</sup>, JI Xiaofei<sup>1</sup> (1. Department of Pathogen Biology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 2. The Second Clinical Medical College, Binzhou Medical University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** Visualization of CagA delivering from *Helicobacter pylori* (Hp) into infected gastric epithelial cells by Split-GFP method. **Methods** ① The upstream and downstream homologous arms of *cagA* gene were amplified by PCR and inserted into knockout vector pSJHK4. The resulting plasmid was transformed into Hp G27 strain by electroporation. The CagA-knockout mutant  $\Delta$ cagA was selected by kanamycin resistance. ② Sequence of the 11<sup>th</sup> strand of GFP  $\beta$ -barrel (GFP-11) was amplified by PCR and linked into 3' terminal of *cagA* sequence. The fusion sequence was then inserted into the Hp-*E. coli* shuttle plasmid pCHFHp. The resulting plasmid was transformed into  $\Delta$ CagA strain by electroporation and transformants expressing CagA-GFP11 fusion protein were selected by chloramphenicol resistance. ③ Gene sequence of the first to tenth strands of GFP (GFP1-10) was amplified by PCR and packaged into lentivirus, and then transfected into GES-1 cells by viral infection. Hp mutant expressing fused CagA-GFP11 constructed in ② was co-cultured with this cell line expressing GFP1-10 at an MOI (multiplicity of infection) of 100. The fluorescence intensity of infected GES-1 cells was observed by fluorescence microscope, and the amount of CagA transferred into GES-1 cells was detected by Western blot. **Results**  $\Delta$ CagA-knockout mutant,  $\Delta$ CagA, was obtained by transforming a CagA knockout plasmid pSJHK4-cagA into Hp G27 strain. An expression plasmid pCHFHp constructed in our previous work was then inserted with CagA-GFP11 gene sequence and transferred into  $\Delta$ CagA to obtain the mutant Hp G27-cagAgfp11 expressing

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81702054), 山东省自然科学基金(No. ZR2020MH297, ZR2023MH101), 山东省高校青年创新科技支持计划(No. 2020KJK006)。\*\* **【通讯作者】** 赵慧琳, E-mail: zhaohuilin1984@163.com; 季晓飞, E-mail: jxf\_email@126.com**【作者简介】** 吴倩文(1999-), 女, 山东济南人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 幽门螺杆菌 CagA 的致病机制。E-mail: wqw199907@163.com  
吴倩文和刘书振为共同第一作者。

CagA-GFP11 fusion protein. Lentivirus packaging GFP 1-10  $\beta$  strands encoding genes was constructed to infect GES-1 cells and generate a cell line expression GFP1-10  $\beta$  strands stably. After Hp G27-cagAgfp11 infection, fluorescence was observed in the cytoplasm of infected GES-1 cells, indicating that CagA entered into the recipient cells, and the fused GFP-11  $\beta$  strand combined with the intracellular GFP1-10 part. Meanwhile, the presence of intracellular CagA was also confirmed by Western blot. **Conclusion** In the process of Hp infecting GES-1 cell, Split-GFP approach could be used to trace CagA delivering from Hp into infected gastric epithelial cells. It provides a new effective tool for the study of CagA translocation, which contributes to the in-depth study of the mechanism of Hp type IV secretion system (T4SS).

**【Key words】** *Helicobacter pylori*; CagA; Split-GFP; T4SS

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种专性寄生于胃黏膜的革兰氏阴性微需氧菌,世界范围内约有43.1%的人口体内携带该细菌<sup>[1]</sup>。Hp感染是慢性胃炎、消化性溃疡等胃肠道疾病发生的重要病因,并与胃癌、胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤的发生密切相关<sup>[2,3]</sup>。1994年,世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)将Hp定为I类致癌原<sup>[4]</sup>。世界卫生组织(WHO)估计2018年全球约有80万新发胃癌病例由Hp引起<sup>[5]</sup>,但其感染致癌的细节过程尚不完全清楚。

Hp能够编码多种致病因子,其中CagA是与癌症直接相关的致病因子,被称为“癌蛋白”。CagA的编码基因位于Cag致病岛(Cytotoxin associated gene pathogenicity island, Cag PAI)上,Cag PAI是普遍存在于高致病性Hp菌株中的一个约40 kbp的特殊基因片段。目前研究认为,在Hp的感染中,CagA通过同样由Cag PAI编码的IV型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)转运到宿主细胞中发挥致病作用<sup>[6]</sup>,但这一过程从未被直接观察到过。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是一个分子量约为27 ku的蛋白,由11个 $\beta$ 折叠片构成一个紧密的桶状结构。GFP具有自发荧光特性,使其作为报告分子在蛋白表达、细胞示踪、蛋白质相互作用等研究中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。但将其直接融合表达于CagA序列中以期示踪CagA转运过程的尝试并未成功,推测是由于GFP的融合增加了CagA穿过T4SS的空间位阻,导致转运失败<sup>[8]</sup>。2002年,Hu等<sup>[9-10]</sup>提出了双分子荧光互补概念,并建立了GFP拆分(Split-GFP)方法,即将GFP拆分为1-10  $\beta$ 折叠片(GFP1-10)和第11  $\beta$ 折叠片(GFP-11)两部分,将二者分别表达于待检测的两个体系,若二者结合,便可发出荧光,指示两个体系的互作关系。利用该方法可以十分巧妙地实现蛋白质互作以及细胞内目标蛋白动态变化的可视化研究,大大促进了一些生物进程的深入研究。近来有报道将该方法应用到分泌系统效应蛋白的转运研究中,转运过程可以被直观观察并精确指示效应蛋白在受体细胞中的亚细胞定位<sup>[11-12]</sup>,取得很好的效果。

在本研究中应用GFP拆分方法示踪Hp感染时CagA向胃上皮细胞内的转运过程,为CagA的转运提供更为详实的实验数据,进一步揭示CagA和T4SS的致病机制。

## 材料与方 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标准菌株G27, *E. coli* DH5 $\alpha$ 均为本实验室保存。Hp的培养使用加5%脱纤维羊血的Karmali空肠弯曲菌琼脂培养基(OXOID, CM0935),在37  $^{\circ}$ C微需氧(85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>)的条件下培养。*E. coli* DH5 $\alpha$ 菌株用于质粒的转化和扩增,使用LB培养基在37 $^{\circ}$ C下常规培养。在Hp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。GFP-11的基因序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成,并构建到质粒pCMV-gfp11上。引物通过Primer 7.0设计,由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

**1.2 主要试剂** 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒均购自北京擎科生物科技股份有限公司;限制性内切酶、T4 DNA连接酶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;聚凝胺Polybrene购自北京索莱宝科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 CagA敲除质粒的构建** Hp G27菌株的CagA蛋白由hp0507基因所编码,在hp0507基因上、下游分别设计引物0507-arm1-1、0507-arm1-2、0507-arm2-1、0507-arm2-2,用于扩增同源重组交换的同源臂arm1和arm2。之后两个同源臂分别经过BamHI、NdeI和XhoI、XbaI酶切后,连接到质粒pSJHK4上卡那霉素抗性基因两侧的相应酶切位点,构建敲除质粒pSJHK4-cagA。

表 1 实验中用到的菌株、质粒以及引物  
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒或引物 Strains, plasmids or primers	描述 Description	来源 Reference source
Strains		
Hp G27	Hp wild strain containing CagA	This
Hp G27-cagAgfp11	Hp G27, <i>cagA-gfp11</i> knock-in (Km <sup>r</sup> )	[14]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ strain used for gene cloning	study Clostech
Plasmids		
pSJHK4	Gene targeting template plasmid, Ap <sup>r</sup> (Km <sup>r</sup> )	[14]
pSJHK4-cagA	A CagA recombinant vector, Ap <sup>r</sup> (Km <sup>r</sup> )	This
pCMV-gfp11	A plasmid with the <i>gfp11</i> gene, Ap <sup>r</sup>	study
pCHFHp	Gene-targeting template plasmid, Ap <sup>r</sup> (Cm <sup>r</sup> )	[14]
pCHFHp-cagAgfp11	A CagA-S11 recombinant vector, Ap <sup>r</sup> (Cm <sup>r</sup> )	This study
Primers		
0507-arm1-1	GACCAGGGATCCAGTCTCAGTGACGCTGTTGCA	
0507-arm1-2	GGCCACCATATGATTATTGATAAAATGCTGCGGGT	
0507-arm2-1	GCGTCCCTCGAGTTGAACAATGCTGTAAAAGA	
0507-arm2-2	CGATGCTAGTCTAGAATATTTGCAGCAAAAAT	
0507-1	GTCATTGCTGACCCATACGA	
0507-2	GGCGTGATTGAGCAAGCATT	
Km-1	TGCCTCGTCTTGAGATTCATT	
Km-2	GTTGGCTACCCGTGATATTGCT	
YZ-pCHFHp-F	AAGTAGTGGGTTGGGAGTT	
YZ-pCHFHp-R	GCGTTATTGTGGTAGGTGGT	
YZ-CagA-F	CCCTAGTCGGTAATGGGTTAT	
YZ-CagA-R	GCGTTAGCTACCGGTCGCTT GTTAGGCTCGAGAACATATG	
CagA-F	ACTAACGAACCAATTGATCA	
CagA-R	TCCTCGGGTACCCAGATTTTGGAAACCACTTT	
GFP11-R	GCTACGGTTCGACGGTATGGCTGATTATGATCATCTAGA	

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 Hp 中表达; 抗性标记位于括号外, 指在 *E. coli* 表达。

**2.2 CagA 和 GFP-11 融合表达质粒的构建** 以 Hp G27 基因组 DNA 为模板, 利用引物 CagA-F 和 CagA-R 扩增 *hp0507* 基因序列, 经 KpnI 和 XhoI 酶切后与同样由该酶酶切的 pCMV-gfp11 质粒相连, 连接产物通过热击转化转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 利用含有氨苄青霉素的固体培养基筛选阳性克隆, 挑转化子扩增培养后, 提取质粒得到 pCMV-cagAgfp11。进一步以该质粒为模板, 以 CagA-F 和 GFP11-R 为引物扩增 *cagA-gfp11* 基因片段, 经 NdeI 和 SalI 酶切后连接到 Hp-*E. coli* 穿梭质粒 pCHFHp 相应的酶切位点上, 再次转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 利用氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆, 挑取转化子扩增培养后, 提取质粒得到 CagA 和 GFP-11 融合表达质粒载体 pCHFHp-cagAgfp11。

**2.3 Hp 的电击转化与转化子筛选** 按照季晓飞等描述的方法制备 Hp 电击转化感受态并进行电击转化<sup>[13]</sup>, 电击后的 Hp 涂布于含相应抗生素的平板上, 37 °C 微需氧条件培养 5~7 d, 获得转化子。利用验证引物 0507-1 和 Km-1、0507-2 和 Km-2 进行 PCR 筛选, 获得融合表达菌株 HpG27-cagAgfp11。

**2.4 GES-1 细胞的病毒转染** GFP1-10 过表达质粒

LV8N-GFP1-10 (EF-1aF/mCherry&Puro) 构建及慢病毒包装由苏州吉玛基因股份有限公司完成, 该质粒融合表达红色荧光蛋白 mCherry 和嘌呤霉素抗性基因。接种  $5 \times 10^4$  个 GES-1 细胞于 24 孔板中, 培养至细胞的融合率约为 40%~60% 时, 加入 5  $\mu$ g/mL 的 Polybrene 孵育 30 min, 之后更换培养基并加入 50  $\mu$ L 滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL 的病毒转染 24 h, 使用含嘌呤霉素 (1  $\mu$ g/mL) 的培养基筛选阳性细胞株, 通过荧光显微镜 (OPTIKA B-1000FL-HBO) 观察细胞的荧光情况并传代培养。

**2.5 Hp 感染 GES-1 细胞体系以及荧光观察** 接种  $2 \times 10^4$  个 GES-1 细胞于细胞爬片, 过夜培养。Hp 培养至对数生长期, 收集细菌重悬于 PBS 中, 用酶标仪调整菌液浓度, 使其在 600 nm 波长处的吸光值为 1.0, 此时细菌浓度约为  $5 \times 10^8$  个/mL。以感染复数 MOI=100 的比例取 Hp 加入 GES-1 细胞培养中, 置于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中共培养。间隔 1 h、4 h、8 h 后, 利用倒置显微镜 (Olympus CKX41) 观察细胞形态变化。之后去除培养基, 用 PBS 洗涤三次, 滴加 10  $\mu$ L 抗荧光猝灭剂, 盖到载玻片上, 利用荧光显微镜观察细胞中的绿色荧光情况。

**2.6 Western blot 检测** 将共培养的 Hp 和 GES-1 细胞体系弃去培养液, 用 PBS 洗涤 3 遍, 加入细胞裂解液冰上裂解 20 min, 收集蛋白于 1.5 mL EP 管中, 置预冷 4 °C 离心机中 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液通过 BCA 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳分离。凝胶中的蛋白通过湿转的方法转印至 PVDF 膜, 先用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后加入 CagA 抗体 (Santa Cruz) 进行孵育。次日洗去, 加入二抗, 室温避光孵育 1 h, 再次清洗后加入 ECL 化学发光液曝光显影观察。

## 结 果

### 1 基于 Hp G27 菌株构建 CagA 敲除株

为了构建 GFP-11 与 CagA 的融合表达, 我们首先在 HpG27 菌株中敲除 CagA 基因 (*hp0507*), 敲除方法使用同源重组双交换技术, 过程如图 1A 所示。首先通过 PCR 扩增 *hp0507* 基因两侧的同源臂, 并依次插入到敲除质粒 pSJHK4 得到 CagA 敲除质粒 pSJHK4-cagA。将其转入 Hp 中筛选得到 CagA 敲除株  $\Delta$ CagA。为了验证 *hp0507* 确实被敲除, 我们分别设计验证引物 Km-1、Km-2、0507-1、0507-2 (位置如图 1A 所示), 以 Hp 野生菌株和  $\Delta$ CagA 的基因组为模板进行 PCR 扩增。结果显示  $\Delta$ CagA 能够扩增出 1 752 bp 和 1 329 bp 的条带, 与预期结果相符, 而野生型不能扩增出目的条带 (图 1B), 表明  $\Delta$ CagA 中 *hp0507* 基



因的上、下游同源臂均发生同源重组, *hp0507* 基因被敲除。我们进一步通过 Western blot 检测了 Hp 野生株与  $\Delta$ CagA 中 CagA 的表达情况, 结果如图 2C 所示, 野生株中有 CagA 的表达, 而  $\Delta$ CagA 中 CagA 蛋白对应位置未出现条带, 表明 CagA 确已被敲除。

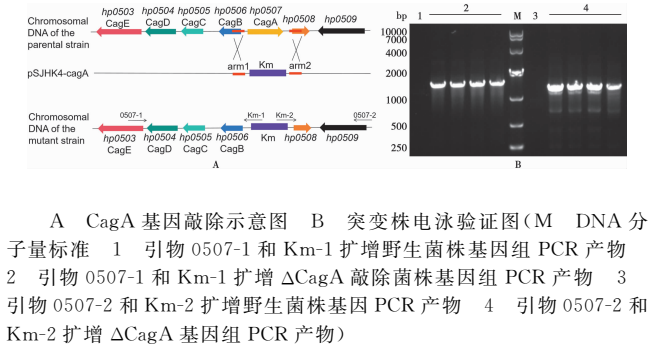
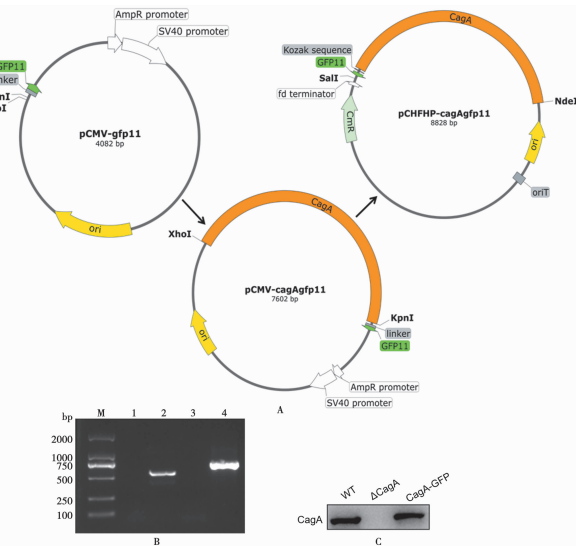


图 1 基于 HpG27 菌株构建 CagA 敲除株

A Schematic representation of CagA gene knockout B Electrophoretic verification of knockout mutant (M DNA molecular weight standard 1 Product amplified with primers 0507-1 and Km-1 from wild strain genome 2 Product amplified with primers 0507-1 and Km-1 from  $\Delta$ CagA genome 3 Product amplified with primers 0507-2 and Km-2 from wild strain genome 4 Product amplified with primers 0507-2 and Km-2 from  $\Delta$ CagA genome)

Fig. 1 Construction of CagA knockout strain based onHp G27



A CagA 和 GFP11 融合质粒构建示意图 B CagA 和 GFP11 融合表达菌株电泳验证图 (M DNA 分子量标准 1 引物 YZ-pCHFHP-F 和 YZ-pCHFHP-R 扩增  $\Delta$ CagA 质粒的 PCR 产物 2 引物 YZ-pCHFHP-F 和 YZ-pCHFHP-R 扩增 HpG27-cagAgfp11 质粒的 PCR 产物 3 引物 YZ-CagA-F 和 YZ-CagA-R 扩增  $\Delta$ CagA 质粒的 PCR 产物 4 引物 YZ-CagA-F 和 YZ-CagA-R 扩增 HpG27-cagAgfp11 质粒的 PCR 产物) C Western blot 检测融合表达菌株内的 CagA

图 2 CagA 与 GFP11 融合表达突变株的构建

A Schematic representation of CagA and GFP11 fusion plasmid B Electrophoretic verification of CagA and GFP11 fusion in mutation strain (M DNA molecular weight standard 1 Product amplified with primers YZ-pCHFHP-F and YZ-pCHFHP-R from  $\Delta$ CagA plasmid 2 Product amplified with primers YZ-pCHFHP-F and YZ-pCHFHP-R from HpG27-cagAgfp11 plasmid 3 Product amplified with primers YZ-CagA-F and YZ-CagA-R from  $\Delta$ CagA plasmid 4 Product amplified with primers YZ-CagA-F and YZ-CagA-R from HpG27-cagAgfp11 plasmid) C Western blot detection of CagA in bacteria expressing fused protein

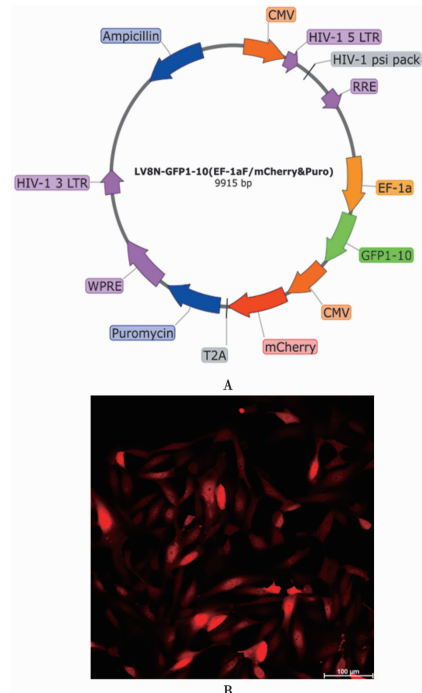
Fig. 2 Construction of Hp mutant expressing fused CagA and GFP11

## 2 构建 CagA 与 GFP-11 在 Hp 内的融合表达

以 Hp-*E. coli* 穿梭质粒 pCHFHp 为载体, 构建 CagA 与 GFP-11 的融合表达质粒 pCHFHp-cagAgfp11, 构建过程如图 2A 所示。将该质粒通过电击转化转入  $\Delta$ CagA 中, 利用含卡那霉素和氯霉素的固体培养基筛选到阳性克隆 HpG27-cagAgfp11。从 HpG27-cagAgfp11 及  $\Delta$ CagA 突变株中提取质粒, 分别用 pCHFHp 质粒特异性引物 YZ-pCHFHp-F、YZ-pCHFHp-R 及 CagA 特异性引物 YZ-CagA-F、YZ-CagA-R 进行 PCR 验证, 结果显示前者能够扩增出大小分别为 721 bp 和 543 bp 的条带(图 2B), 符合预期, 而  $\Delta$ CagA 不能扩增出该条带, 说明 pCHFHp-cagAgfp11 质粒转入到  $\Delta$ CagA 菌株中。之后我们通过 Western blot 进一步验证了该融合表达菌株中 CagA 的表达情况, 结果显示融合表达菌株中有 CagA 蛋白条带(图 2C), 表明该菌株能够正常表达 CagA 与 GFP-11 融合蛋白。

## 3 构建稳定表达 GFP1-10 的 GES-1 细胞系

将 GFP1-10 的基因序列构建到真核表达载体 LV8N(EF-1aF/mCherry&Puro) 上(图 3A), 包装慢病毒。利用慢病毒转染 GES-1 细胞, 通过嘌呤霉素筛选获得阳性细胞株。由于 LV8N 载体上含有红色荧光基因 mCherry 的表达盒, 因此转染成功的阳性细胞株能够发出红色荧光(图 3B)。



A GFP1-10 过表达质粒示意图 B 荧光显微镜检测质粒稳转细胞(200 $\times$ )

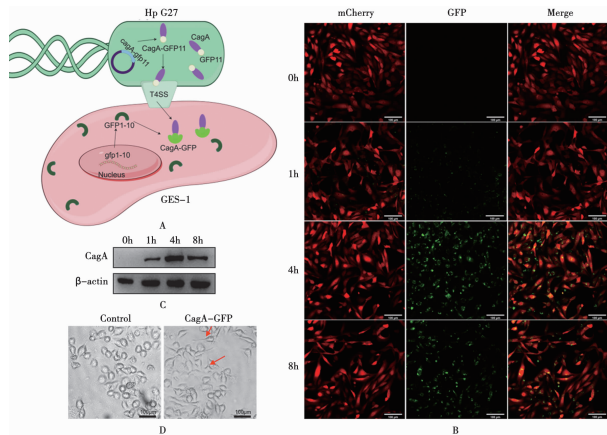
图 3 GFP1-10 稳定表达细胞株的构建

A Schematic diagram of GFP1-10 overexpressed plasmid B Fluorescence detection of cells stably harboring overexpression plasmid (200 $\times$ )

Fig. 3 Construction of cell lines stably expressing GFP1-10

#### 4 Hp 感染细胞中 CagA 转运的检测

为了示踪被注入受体细胞的 Hp CagA, 将上述构建的 HpG27-cagAgfp11 菌株和慢病毒转染的 GES-1 细胞共培养。当融合了 GFP-11 的 CagA 进入细胞内部后, 与胞内的 GFP1-10 组装成完整的 GFP 蛋白, 细胞内就能够发出绿色荧光(图 4A)。荧光显微镜观察结果如图 4B 所示, 感染 1 h 后, 可以观察到细胞内出现绿色荧光, 表明此时 CagA 蛋白已经进入细胞内部。感染 4 h 后, 细胞内荧光强度明显升高, 说明随着感染时间的延长, 更多的 CagA 被转运到细胞内部。然而, 感染 8 h 后, 细胞荧光强度较并没有进一步增强, 而是略有降低。我们推测, 随着感染时间的延长, 细菌和细胞的活力均出现下降, CagA 的注入量不再增加, 且部分被感染细胞死亡, 影响了荧光情况。



A GFP 拆分方法检测 CagA 转运原理图 B GES-1 细胞中 GFP 蛋白的荧光检测(200×) C Western blot 检测细胞内 CagA 的转运 D 统计细胞的蜂鸟状表型改变(200×)

图 4 Hp 感染细胞中 CagA 转运的检测

A Schematic diagram of Split-GFP method B Fluorescence detection of GFP protein in GES-1 cells (200×) C Western blot detection of CagA translocation in infected cells D Statistics of cellular hummingbird phenotypic alteration (200×)

Fig. 4 Detection of CagA transport in Hp-infected cells

同时, 通过 Western blot 检测了细胞内 CagA 浓度的变化, 结果也与荧光强度变化一致(图 4C)。感染 1 h 后, 细胞内能够检测到 CagA 的电泳条带, 4 h 后浓度明显高于 1 h, 而 8 h 后开始降低。此外, 还观察了被感染细胞的形态变化, 能够明显观察到 CagA 特有的致细胞病变表型——“蜂鸟样变”(图 4D), 证实融合 GFP-11 的 CagA 确实被转运进细胞内部, 进而诱导细胞出现形态学改变。

#### 讨论

Cag PAI 编码 CagA 和 T4SS 相关蛋白等 30 多个蛋白产物<sup>[15]</sup>, 是近年来 Hp 致病机制研究的热点。CagA 因与胃癌的发生密切相关而被称为“癌蛋白”, 其致病机理已经被深入研究<sup>[16]</sup>。T4SS 的蛋白组成、

结构与功能也已被广泛探索<sup>[17]</sup>。现有研究认为 CagA 是通过 T4SS 转运进入受体细胞的, Hohlfield 等<sup>[8]</sup>尝试利用 GFP 标记来示踪 CagA 的转运, 却以失败告终, 推测原因可能是全长的 GFP 过大, 其空间构象限制了融合蛋白通过 T4SS 通道。目前, 对于 CagA 是如何通过 T4SS 的转运进入宿主细胞的过程还不清楚, T4SS 除了转运 CagA 外还能转运其他哪些效应蛋白也不明确。

基于双分子荧光互补原理的 GFP 拆分方法很巧妙地将 GFP 拆分为两部分用于蛋白质相互作用研究中, 利用该方法可以实现细胞内目标蛋白动态变化的可视化研究。目前已有少量将其应用到病原菌分泌蛋白研究中的报道, 如 Engelenburg 和 Palmer 报道利用 GFP 拆分方法在沙门氏菌感染细胞过程中标记和示踪 III 型分泌系统(T3SS)效应蛋白 PipB2、SteA 和 SteC<sup>[11]</sup>。Sakalis 等报道了利用该方法研究 *A. tumefaciens* T4SS 效应蛋白 VirE2 的转运<sup>[12]</sup>。这些研究为揭示致病菌效应蛋白的转运机理及其致病机制提供了有效的手段。本研究将 GFP 拆分的方法应用到 Hp CagA 的转运研究中, 仅将 GFP 的第 11 β 折叠与 CagA 相连, 尽可能减小融合蛋白带来的空间位阻, 并最终示踪到 CagA 蛋白转运到受体细胞后发出的荧光, 为 CagA 的转运机制研究提供了更多的实验数据。

CagA 是目前 Hp 中唯一已知的通过 T4SS 转运的效应蛋白。以“效应蛋白转运假说”为代表的推测认为除了 CagA 之外, Hp 还编码其它经 T4SS 转运的效应蛋白<sup>[18]</sup>, 然而迄今为止, HpT4SS 是否转运 CagA 之外的其它效应蛋白仍是个未解之谜。Olbermann 等利用生物信息学手段比对分析了多株 HpCag PAI 的基因、蛋白序列, 在进化角度上预测了一些未知基因产物可能是分泌蛋白<sup>[19]</sup>, 然而目前还没有关于这些蛋白的进一步研究报道。而且有研究表明, 单独的 T4SS 也可以引起宿主细胞 IL-8 的产生和分泌, 并能激活细胞内 NF-κB、MAPK 等信号通路<sup>[20-21]</sup>。这些研究说明, 进一步研究 T4SS 的转运及作用机制对于揭示 Hp 的致病机制仍具有重要意义。本文尝试的 GFP 拆分的示踪方法为探究 T4SS 其他效应蛋白的转运及致病机制提供了手段。

#### 【参考文献】

[1] Li Y, Choi H, Leung K, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(6): 553-564.  
[2] Forman D. *Helicobacter pylori* infection and cancer[J]. Br Med Bull, 1998, 54(1): 71-78.  
[3] Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 28-37.

(下转 513 页)

- virus inactivation methods on the induction of antibody- and cell-mediated immune responses against whole inactivated H9N2 avian influenza virus vaccines in chickens[J]. *Vaccine*, 2018, 36(27):3908-3916.
- [29] Levenbook I, Merritt BA, Fitzgerald EA, et al. Sensitization Induced in guinea-pigs with beta-propiolactone-treated serum-albumin-experimental-evidence for the cause of allergic reactions in humans receiving human-diploid cell rabies vaccines[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1986, 80(1):110-111.
- [30] Monath TP, Fowler E, Johnson CT, et al. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(14):1326-1333.
- [31] She YM, Cheng K, Farnsworth A, et al. Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by  $\beta$ -propiolactone[J]. *Proteomics*, 2013, 13:3537-3547.
- [32] Gupta D, Parthasarathy H, Sah V, et al. Inactivation of SARS-CoV-2 by  $\beta$ -propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential[J]. *Virus Res*, 2021, 305:198555.
- [33] Quintel BK, Thomas A, Deraad DE, et al. Advanced oxidation technology for the development of a next-generation inactivated West Nile virus vaccine[J]. *Vaccine*, 2019, 37(30):4214-4221.
- [34] Quintel BK, Prongay K, Lewis AD, et al. Vaccine-mediated protection against *Campylobacter*-associated enteric disease[J]. *Sci Adv*, 2020, (26):eaba4511.
- [35] Dembinski JL, Hungnes O, Hauge AG, et al. Hydrogen peroxide inactivation of influenza virus preserves antigenic structure and immunogenicity[J]. *J Virol Methods*, 2014, 207:232-237.
- [36] Marzi A, Halfmann P, Hill-Batorski L, et al. Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates [J]. *Science*, 2015, 348(6233):439-442.
- [37] Woods CW, Sanchez AM, Swamy GK, et al. An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus Vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. [J]. *Vaccine*, 2019, 37(30):4222-4230.
- [38] Chen D, Gallagher S, Monson NL, et al. Inebilizumab, a B cell-depleting anti-CD19 antibody for the treatment of autoimmune neurological diseases: Insights from Preclinical Studies[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(12):107.
- [39] Cutrina-Pons A, De Sa A, Fear DJ, et al. Inhibition of PI3K p110 $\delta$  activity reduces IgE production in IL-4 and anti-CD40 stimulated human B cell cultures[J]. *Immunology*, 2023, 170(4):483-494.
- [40] Liu Y, Wu B, Paessler S, Walker DH, et al. The pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in alpha/beta interferon knockout mice: insights into the pathologic mechanisms of a new viral hemorrhagic fever[J]. *J Virol*, 2014, 88(3):1781-1786.
- [41] Jin C, Liang MF, Ning JY, et al. Pathogenesis of emerging severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in C57/BL6 mouse model[J]. *PNAS*, 2012, 109(25):10053-10058.
- [42] Yoshikawa R, Sakabe S, Urata S, et al. Species-specific pathogenicity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus is determined by Anti-STAT2 activity of NSs [J]. *J. Virol*, 2019, 93(10):e02226-18.
- [43] Park SC, Park JY, Choi JY, et al. Pathogenicity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in mice regulated in type I interferon signaling: Severe fever with thrombocytopenia and type I interferon [J]. *Lab Anim*, 2020, 36:38.

【收稿日期】 2023-11-22 【修回日期】 2024-02-12

(上接 507 页)

- [4] NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease [J]. *JAMA*, 1994, 272(1):65-69.
- [5] de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018; a worldwide incidence analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2):e180-190.
- [6] Odenbreit S, P Is J, Sedlmaier B, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion [J]. *Science*, 2000, 287(5457):1497-1500.
- [7] Vergunst AC, van Lier MC, den Dulk-Ras A, et al. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(3):832-837.
- [8] Hohlfeld S, Pattis I, P Is J, et al. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 59(5):1624-1637.
- [9] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(4):789-798.
- [10] Cali T, Ottolini D, Vicario M, et al. splitGFP technology reveals dose-dependent ER-mitochondria interface modulation by  $\alpha$ -synuclein A53T and A30P mutants [J]. *Cells*, 2019, 8(9):1072.
- [11] Van Engelenburg SB, Palmer AE. Imaging type-III secretion reveals dynamics and spatial segregation of *Salmonella* effectors [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(4):325-330.
- [12] Sakalis PA, van Heusden GP, Hooykaas PJ. Visualization of VirE2 protein translocation by the *Agrobacterium* type IV secretion system into host cells [J]. *Microbiologyopen*, 2014, 3(1):104-117.
- [13] 季晓飞, 赵慧琳, 张莹, 等. 基因敲除质粒载体的构建及其在幽门螺杆菌基因敲除中的应用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(12):1066-1073.
- [14] 吴豪, 陕江帆, 季晓飞, 等. 幽门螺杆菌中基因过表达体系的构建及应用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(02):168-173.
- [15] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1997, 388(6642):539-547.
- [16] Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(9):688-694.
- [17] Cover TL, Lacy DB, Ohi MD. The *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system [J]. *Trends Microbiol*, 2020, 28(8):682-695.
- [18] Naumann M, Wessler S, Bartsch C, et al. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44):31655-31662.
- [19] Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(8):e1001069.
- [20] Kim SY, Lee YC, Kim HK, et al. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8 [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(1):97-106.
- [21] Rieder G, Hatz RA, Moran AP, et al. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(9):3622-3630.

【收稿日期】 2023-11-29 【修回日期】 2024-02-19