

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(4) 0460-0464; 4 April 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 幽门螺杆菌 Cag 致病岛 *hp0523* 基因的缺失及其对 CagA 蛋白转运能力的影响

钟桥<sup>1</sup>, 邵世和<sup>1\*</sup>, 母润红<sup>1</sup>, 王华<sup>1</sup>, 黄世腾<sup>1</sup>, 韩军<sup>2</sup>, 黄河<sup>2</sup>, 田树伟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学基础医学与医学技术学院病原生物学研究室, 镇江 212013)

(<sup>2</sup>江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

**摘要** 【目的】构建幽门螺杆菌 Cag 致病岛编码的 *hp0523* 基因缺失株, 为研究 *hp0523* 基因的功能奠定基础。【方法】本研究利用同源重组原理, 设计并扩增了 *hp0523* 基因上下游同源臂片段, 构建 *hp0523* 基因缺失自杀质粒 pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523*, 电击转化进入幽门螺杆菌后, 通过抗生素筛选后并经 PCR 验证无误后, 获得 *hp0523* 基因缺失株 *H. pylori* 11637 $\Delta$ *hp0523*; 采用幽门螺杆菌与胃癌上皮细胞 BGC-823 共培养后, 分析该基因缺失前后对细胞毒性蛋白 CagA 转运能力的影响; 并分析比较了缺失前后, CagA 蛋白的表达能力变化; 【结果】构建幽门螺杆菌 *hp0523* 基因缺失的自杀质粒, 并成功获得一株 *hp0523* 基因缺失株; CagA 转运实验表明, *hp0523* 基因缺失后, 可以导致细菌转运 CagA 蛋白的能力丧失; 此外, 还发现 *hp0523* 基因缺失可以影响 CagA 蛋白表达。【结论】成功获得了幽门螺杆菌 *hp0523* 基因缺失株, 初步研究发现 *hp0523* 基因是幽门螺杆菌 Cag 致病岛中重要致病因子之一, 参与 CagA 蛋白的转运, 可能是其转运装置中组成成分之一。

**关键词**: 幽门螺杆菌; Cag 致病岛; IV 型分泌装置; 同源重组

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0460-05

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 简称 *H. pylori*) 感染在世界范围内流行, 现已证实感染 *H. pylori* 者, 特别是 I 型 *H. pylori* (即基因组中含 Cag 致病岛者, Cag-PAI), 可以导致慢性胃炎、消化性溃疡, 甚至胃癌和黏膜相关性淋巴瘤(MALT) 的发生<sup>[1-2]</sup>。目前研究认为, Cag-PAI 是一大小约 40 kb 的基因片段, 编码约 27 个基因。其中, CagA 是其重要的毒力因子, 可以通过致病岛编码的 IV 型分泌装置(type IV secretion apparatus) 转运进入宿主细胞的<sup>[3]</sup>; 而在细胞内特定部位被磷酸化, 干扰细胞内信号传导或是活化转录因子 NF- $\kappa$ B 诱导炎症反应的发生<sup>[4-5]</sup>。此外, CagA 还可以使得胃上皮细胞内活性氧(ROS) 增多, 导致 DNA 损伤, 从而诱发胃癌发

生<sup>[6]</sup>。鉴于此, 有学者将 CagA 蛋白称之为癌蛋白(oncoprotein)<sup>[7]</sup>。但对于参与 CagA 蛋白转运的 IV 型分泌装置的研究相对较少, 其转运机制也尚未阐明。

*hp0523* 基因也是 Cag-PAI 编码的基因之一, 但其基因功能尚未阐明, 特别是在 CagA 蛋白的转运过程中所起的作用, 尚不清楚。因此, 本研究采用同源重组的方法, 构建 *hp0523* 基因缺失的自杀质粒, 电击转化 *H. pylori*, 筛选获得目的基因缺失株; 分析基因缺失前后, CagA 蛋白的转运能力变化; 旨在深入研究 *hp0523* 基因在 Cag-PAI 编码的 IV 型样分泌装置中的作用, 为进一步研究 Cag-PAI 编码的 IV 型样分泌装置的转运机制奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870096); 江苏省高校自然科学基金项目(08KJB310001)

\* 通信作者。Tel: +86-511-85038965; Fax: +86-511-85038449; E-mail: shaoshihe2006@163.com

作者简介: 钟桥(1983-) 男, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 主要从事幽门螺杆菌致病机理研究。E-mail: zhongqiao83@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-18; 修回日期: 2009-01-15

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和细胞:** *H. pylori* NCTC11637 由中国疾病预防控制中心传染病预防研究所张建中教授馈赠,大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  为江苏大学基础医学与医学技术学院中心实验室保存。*H. pylori* 自杀质粒 pBlueKM40(含卡那霉素抗性基因盒的 pBluescript SK II(-)载体)由韩国国立庆尚大学微生物学教研室 Seung-chul Baik 教授馈赠;胃癌上皮细胞株 BGC-823 购自中科院上海细胞生物研究所。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 哥伦比亚培养基、厌氧袋购自 OXOID 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 *Eco*R I、*Kpn* I、*Bam*H I 及 *Xho* I、T4-DNA 连接酶、DL2000 DNA Marker 及蛋白质分子量标准(低)购自 TaKaRa 公司;DL1Kb DNA marker 购自 Genescript 公司;pGEM-T 载体购自 Promega 公司;绵羊血购自杭州天和生物公司;犊牛血清购自上海华美生物公司;RPMI1640 购自 GibcoBRL 公司;CagA 蛋

白抗体购自 Santa Cruz 公司; $\beta$ -actin 内参抗体购自武汉博士德公司;其他常规试剂按照文献[8]要求配制。核酸紫外检测仪(Eppendorf Biophotometer);PCR 仪(Eppendorf);凝胶成像系统(GeNius);电转化仪(BD-RAD Gene Pulser-II)。

**1.1.4 细菌和细胞培养:** 将 *H. pylori* NCTC11637 接种于含 10% 羊血的哥伦比亚平板上,微需氧培养 72 h。胃癌上皮细胞 BGC-823 接种于含 10% 犊牛血清的 RPMI1640 培养液中,于 5% CO<sub>2</sub> 37°C 条件下培养。

### 1.2 自杀质粒同源臂片段的扩增

根据 GenBank 公布的 *H. pylori* 全基因组序列,在 *hp0523* 基因 ORF 的上游和下游,设计 2 个同源臂 F1、F2 的引物(如图 1)。图中(1~510)为 *hp0523* 基因的编码区,全长 510 bp;P1/P2、P3/P4 为该基因上下游特异性引物,扩增后获得用于构建自杀质粒的同源臂 F1(555 bp)和 F2 片段(549 bp)。

引物由上海生工生物技术有限公司合成,详细序列如表 1。

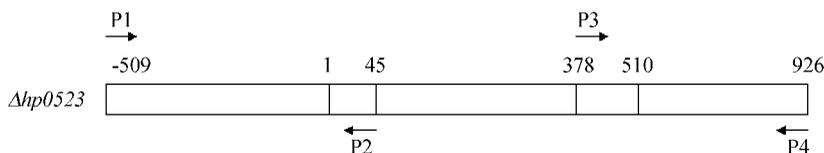


图 1 *hp0523* 基因缺失引物设计

Fig. 1 Primer design of *hp0523* gene deletion.

表 1 构建 *hp0523* 基因缺失自杀质粒所用引物列表

Table 1 List of primers used in this study

Fragment	Primer	Sequenc(5'→3')	Product/bp
F1	P1	CAAGGTACCAAAAGAAGCTATGAGGGGACT( <i>Kpn</i> I)	555
	P2	TATCTCGAGAGCGGTGTTTAGGGTGAT( <i>Xho</i> I)	
F2	P3	CTCGAAATTCCTCCAAACAAAAGCGTGTATCA( <i>Eco</i> R I)	549
	P4	TTAGGATCCCTTCTATCAGCAACAAAGAGC( <i>Bam</i> H I)	

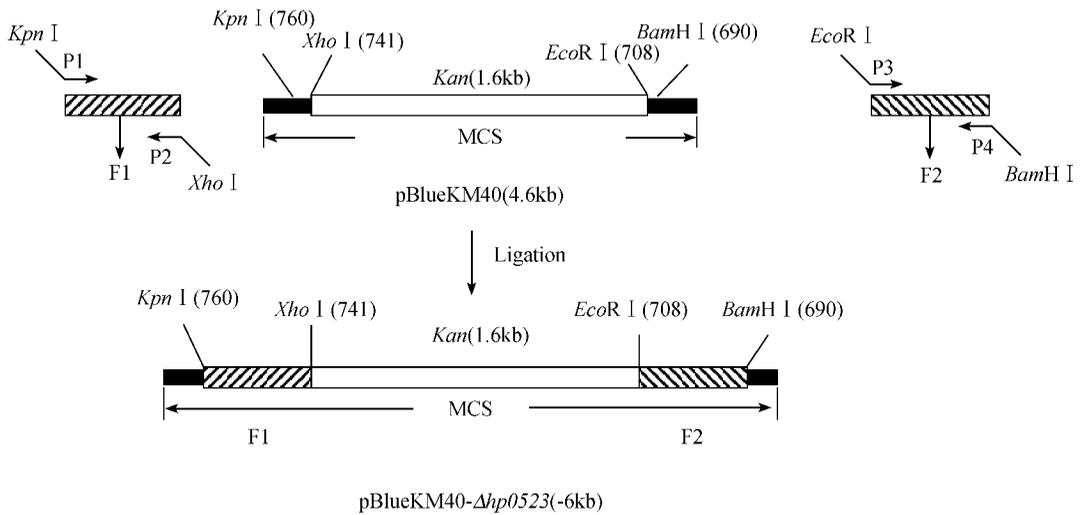
以 *H. pylori* NCTC11637 菌株基因组 DNA 为模板,用 Ex Taq 聚合酶进行 PCR 扩增(25  $\mu$ L 反应体系)。扩增条件为 94°C 5 min,94°C 30 s,52°C 30 s,72°C 1 min,30 个循环,72°C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,GeNius 凝胶电泳图像分析系统分析鉴定并用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

### 1.3 自杀质粒 pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523* 的构建

胶回收的 PCR 产物与 pGEM-T 载体,加 1  $\mu$ L T4-DNA 连接酶,4°C 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。转化后的细菌涂布于含

50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上,37°C 培养 16 h。挑取菌落转种于含氨苄青霉素 50  $\mu$ g/mL 的 LB 液体培养基,37°C 振荡 12 h,用碱裂解法进行质粒提取,并进行酶切鉴定。

胶回收获得同源臂片段 F1、F2,分别与载体 pBlueKM40 连接,构建自杀质粒 pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523*,如图 2 所示。将构建好自杀质粒转化感受态细菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,转化好的细菌涂布含 100  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂培养基培养 12~16 h,挑选单菌落接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中,置 37°C 摇床振荡培养 12 h,抽提质粒,酶切鉴定。



2 *hp0523* 基因缺失自杀质粒的构建图

Fig.2 The construction map of the suicide plasmid for *hp0523* gene mutant.

#### 1.4 *hp0523* 基因缺失株的构建与鉴定

自培养 72 h 的哥伦比亚培养基上收取 *H. pylori* ( $10^{10}$  CFU/mL), 10% 甘油-蔗糖溶液洗涤, 4°C 下离心  $7860 \times g$  5 min, 沉淀重悬于 100  $\mu$ L 甘油-蔗糖溶液, 4°C 放置 10 min, 加自杀质粒 10  $\mu$ g, 混匀, 移入冰预冷的电击杯, 冰浴 5 min 后置于电穿孔架上, 电击条件: 25 F, 2.5 kV, 200  $\Omega$ , 5 s, 电击后, 用 SOC 缓冲液 20 倍稀释 *H. pylori*, 涂布于 25 mg/L 卡那霉素的血平板上, 37°C 微需氧条件, 培养 72 h, 收取细菌。

收获细菌经尿素酶以及细菌染色鉴定后, 提取细菌基因组 DNA 进行鉴定: 以扩增上游片段 F1 的上游引物 P1 和下游片段 F2 的下游引物 P4, 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94°C 5 min, 94°C 30s, 52°C 2 min, 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 10 min。以野生株 11637 为对照。扩增结果送上海生工生物工程公司测序鉴定无误后, 将突变株命名为 *H. pylori* 11637 $\Delta$ *hp0523*。

#### 1.5 对 CagA 蛋白转运能力的影响

胃癌上皮细胞 BGC-283 常规培养 2~3 d 后, 按照 MOI = 300:1 比例加入新鲜培养的野生株和缺失株 *H. pylori* 11637 $\Delta$ *hp0523*。在 5% CO<sub>2</sub> 培养条件下作用 4 h。PBS 洗涤 3 次后, 收集细胞重悬于 Western blot 细胞裂解液中。

取裂解后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后, 然后 4°C 电转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 3 h, 换新鲜的封闭液, 加入一抗 (CagA 单克隆抗体), 37°C 摇床反应 1 h。1  $\times$  PBST 洗涤 3~5 次, 每次 5 min, 于 1  $\times$  PBST 中加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 37°C 摇床反

应 1 h, 最后 ECL 显色。同时以  $\beta$ -actin 蛋白为内参。

#### 1.6 对 CagA 蛋白表达的影响

取野生株和基因缺失株  $\Delta$ *hp0523* 常规培养 1 h 后, 刮取细菌重悬于 Western blot 细胞裂解液中。裂解后的蛋白按照 1.5 Western blot 法检测 CagA 蛋白表达变化情况。

## 2 结果

#### 2.1 *hp0523* 基因缺失自杀质粒的构建

*hp0523* 基因缺失株的自杀质粒 pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523* 按照图 2 连接后, 进行酶切鉴定, 结果显示经 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切后, 电泳图下方产生约 550 bp 片段 (F1); 经 *Eco* R I、*Bam* H I 双酶切后, 电泳图下方产生约 550 bp 片段 (F2); 而经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切后, 获得一条约为 2.7 kb 片段 (F1 + Kan + F2), 与设计结果完全相符。

#### 2.2 *hp0523* 基因缺失株的鉴定

采用卡那霉素筛选获得的 *hp0523* 基因缺失株和野生株, 采用引物 P1 和 P4 进行 PCR 鉴定。结果显示, 野生株经 PCR 扩增后获得了一大约 1.4 kb 的片段, 而 *hp0523* 基因缺失株, 则获得了一约 2.7 kb 大小片段, 与理论设计相符。测序结果进一步证实 *hp0523* 基因同源重组成功。

#### 2.3 *hp0523* 基因缺失前后 CagA 蛋白转运能力的影响

将野生株和 *hp0523* 基因缺失株, 分别与 BGC-823 细胞共培养, 细胞裂解后进行 Western blot 分析; 结果表明 (如图 3-A), 野生株作用组, 可以检测到 CagA 蛋白, 说明 CagA 蛋白可以转运进入 BGC-823

细胞内,而 *hp0523* 基因缺失株作用组,和阴性对照组均未能检测到。结果说明,*hp0523* 基因缺失可以导致 CagA 蛋白转运能力的丧失。

#### 2.4 *hp0523* 基因缺失前后对 CagA 蛋白表达的影响

野生株和 *hp0523* 基因缺失株直接收取细菌,进行 Western blot 分析,结果表明(如图 3-B),在野生株和 *hp0523* 基因缺失株中,均能检测到 CagA 蛋白的表达。然而,*hp0523* 基因缺失株较野生株中 CagA 蛋白的表达水平有所下降,提示 *hp0523* 基因的缺失可以下调 CagA 蛋白的表达。

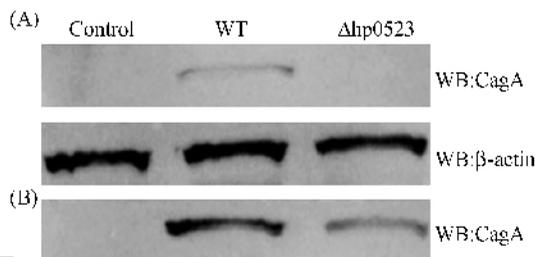


图 3 野生株和 *hp0523* 基因缺失株的 CagA 转运 (A) 和 CagA 表达 (B) 能力比较

Fig. 3 The comparison result of CagA's translocation and expression between wild-type and  $\Delta hp0523$  mutant. A: CagA translocation assay. Control, BGC-823 without *H. pylori* treated; WT, BGC-823 was treated by wild-type 11637;  $\Delta hp0523$ , BGC-823 was treated by  $\Delta hp0523$  mutant. B: The expression level of CagA in wild-type *H. pylori* and  $\Delta hp0523$  mutant.

### 3 讨论

幽门螺杆菌是重要的人类胃肠道致病菌,可以引起慢性活动性胃炎、胃溃疡,甚至胃癌,然而其致病机制尚未阐明。分子流行病学证据表明,Cag-PAI 是其重要的致病因子之一,其中 CagA 与 *H. pylori* 感染致病和感染后不良结局,都具有重要关系。研究表明,CagA 蛋白是通过 Cag-PAI 编码的 IV 型样分泌装置转运进入宿主细胞。进入宿主细胞的 CagA 蛋白被磷酸化并与 SHP-2 磷酸酪氨酸连接,引起生长因子样细胞反应和宿主细胞分泌细胞因子<sup>[1]</sup>。因此,对 Cag-PAI 转运 CagA 蛋白的作用机制研究,对于预防和治疗 *H. pylori* 感染具有重要的意义。

大多数致病菌,都是采用分泌装置向宿主细胞转运毒力因子,发挥毒性作用的。其中,根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, 简称 *A. tumefaciens*) 的 VirB/D 系统研究的较为透彻,是 IV 型分泌装置研究的公认模型<sup>[9]</sup>。它是由 *virB* 操纵子编码的 12 个蛋白产物 (VirB1-B11 蛋白) 和 VirD4 (偶联蛋白) 装配而成,通过形成跨膜通道来易位酶作用底物。VirB4、VirB11 是 ATPase,位于菌体的内膜,为转运提供能

量, VirB2 和 VirB5 是主要菌毛和次要菌毛组分,位于细菌的外膜,可能涉及细菌与宿主细胞之间粘附作用与识别; VirB7、VirB8、VirB9 和 VirB10 组成转运通道,是整个转运系统的核心组分。在 *H. pylori* 中, Cag-PAI 编码一个 IV 型样分泌装置研究也取得了一系列的进展,主要的结构性基因已经得到鉴定<sup>[10]</sup>。Tanaka 等用免疫金电镜技术发现, VirB7 和 VirB9 的同系物 HP0532 和 HP0528 沿着菌毛的长度定植,而 Rohde 等描述 VirB7/HP0532 在菌毛的基部环形分布。*A. tumefaciens* VirB10 的同系物 HP0527 位于内膜,围绕菌毛内部核心形成一个鞘,诱导宿主细胞接触。且 HP0527 比 *A. tumefaciens* VirB10 大,含有许多反转重复序列,促进编码序列基因重排,很可能提供表面结构的抗原变异来进行免疫逃避。另外, Buhrdorf 等通过拓朴分析发现 HP0530 的功能可能类似于这个内膜结合的蛋白 (VirB8)。

本研究利用同源重组的原理,构建了 Cag-PAI 中 *hp0523* 的基因缺失株,并分析比较该基因缺失前后,对于 CagA 蛋白转运能力的影响。研究中采用的自杀质粒 pBlue-KM40 是在 pBluescript SK II(-) 载体基础上,通过在多克隆位点插入一个卡那霉素抗性基因盒而构建的 *H. pylori* 自杀质粒<sup>[11]</sup>。由于 pBluescript SK II(-) 载体,在 *H. pylori* 内不能复制,而具有自杀特性。而本研究中,插入的卡那霉素抗性基因盒,是一个含启动子的卡那霉素基因盒。当自杀质粒转化进入 *H. pylori* 内后,能发生同源重组的,就能在含 25 mg/mL 的卡那霉素平板上生长;反之,则不能。进一步采用 PCR 的方法,进一步验证。结果证实,本研究中获得一株 *hp0523* 基因缺失的 *H. pylori* 基因缺失株,为进一步研究 *hp0523* 的基因功能和 *H. pylori* Cag-PAI 致病机制奠定了基础。通过将 *H. pylori* 与胃癌上皮细胞共培养过程中,可以发现, *hp0523* 基因缺失后,可以导致 CagA 蛋白的转运能力丧失。因此,可以推测 *hp0523* 基因参与 CagA 蛋白的转运,可能是其转运装置的组成成分之一。有意思的是,本研究发现,在 *hp0523* 基因缺失株中, CagA 蛋白的表达水平较野生株有所下降,提示 *hp0523* 基因的缺失可以下调 CagA 蛋白的表达。然而其中的下调机制,以及 *hp0523* 基因在转运装置中的具体作用如何,还有待于我们进一步深入研究下去。

致谢 衷心感谢韩国国立庆尚大学微生物学教研室 Seung-chul Baik 教授在幽门螺杆菌基因缺失株构建中给予的指导和帮助!

## 参考文献

- [ 1 ] Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 2008 ,11 :30 – 37.
- [ 2 ] Hatakeyama M ,Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006 ,11 Suppl 1 :14 – 20.
- [ 3 ] Odenbreit S ,Puls J ,Sedlmaier B ,et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000 287 :1497 – 1500.
- [ 4 ] Stein M ,Rappuoli R ,Covacci A .Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000 97 :1263 – 1268.
- [ 5 ] Yamazaki S ,Yamakawa A ,Ito Y ,et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *The Journal of Infectious Diseases* 2003 ,187 :334 – 337.
- [ 6 ] Handa O ,Naito Y ,Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori* : a hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochemical Pharmacology* ,2007 ,73 :1697 – 1702.
- [ 7 ] Mimuro H ,Suzuki T ,Nagai S ,et al. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host & Microbe* 2007 2 :250 – 263.
- [ 8 ] David W. Russell Joseph Sambrook. 分子克隆实验指南 (*Molecular Cloning*). 黄培堂,等译. 第三版. 北京: 科学出版社 2002.
- [ 9 ] Backert S ,Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 2006 9 :207 – 217.
- [ 10 ] 崔蕾蕾,邵世和. 幽门螺杆菌 cagPAI 编码的IV型分泌系统. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) ,2007 47 (4) :743 – 745.
- [ 11 ] Kim KM , Lee SG , Park MG , et al. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007 355 :562 – 567.

## Construction of *hp0523* gene mutant in *Helicobacter pylori* Cag-PAI and the influence on the ability of CagA protein translocation

Qiao Zhong<sup>1</sup>, Shihe Shao<sup>1\*</sup>, Runhong Mu<sup>1</sup>, Hua Wang<sup>1</sup>, Shiteng Huang<sup>1</sup>, Jun Han<sup>2</sup>, He Huang<sup>2</sup>, Shuwei Tian<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical Technology School of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

(<sup>2</sup> Institute for life sciences of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

**Abstract** [ Objective ] To construct the *hp0523* gene mutant of *Helicobacter pylori* and investigate the function of *hp0523* gene. [ Methods ] We designed and amplified the upstream homologous fragment and downstream homologous fragment of *hp0523* gene via PCR method. We constructed the suicide plasmid pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523* based on allelic exchange. We introduced the suicide plasmid pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523* into *Helicobacter pylori* 11637 by electroporation and screened the mutant based on antibiotic selection. We checked the mutant using the PCR and gene sequenced. We performed the coculture of *Helicobacter pylori* and gastric cell BGC-823 and detected the ability of CagA's translocation and expression via Western blot. [ Results ] We constructed the suicide plasmid pBlueKM40- $\Delta$ *hp0523* successfully and got the *hp0523* deletion mutant. PCR and gene sequenced results showed the gene *hp0523* was deleted. The results of CagA translocation assay showed that *hp0523* interrupted the translocation of CagA. The comparison between wild-type and mutant showed that *hp0523* affected the expression of CagA. [ Conclusions ] We constructed the *hp0523* deletion mutant of *Helicobacter pylori* NCTC11637. This study suggests that *hp0523* gene is an important virulence factor, which may be a component of the apparatus for CagA's translocation.

**Keywords** : *Helicobacter pylori* ; Cag Pathogenicity Island ; type IV secretion apparatus ; allelic exchange

( 本文责编 : 张晓丽 )