论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1006-04

HP0318基因在幽门螺杆菌适应性定植中的作用研究

郭 刚,童文德,邹全明,吴 超,刘开云 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 通过构建幽门螺杆菌(Hp) HP0318缺失突变株,初步探明该基因在Hp适应性定植中的作用。**方法** 通过基因克隆和重组技术在HP0318基因上下游片段之间连入氯霉素抗性基因(catGC)作为筛选标记,并克隆到质粒pBluescript SK中构建成缺失突变的打靶载体,将其转化沙鼠适应株M_{13},经过同源重组,对出发菌的HP0318基因进行置换突变,然后用经氯霉素抗性筛选的突变菌株感染蒙古沙鼠,观察其与未突变的M_{13}出发菌在定植能力和致病性上的差异。**结果** 经PCR鉴定成功构建1株缺失HP0318基因的Hp菌株。突变株与非突变株对蒙古沙鼠的感染率相差显著($P<0.05$),2个菌株在胃内的定植密度有显著性差异($P<0.05$),突变株定植密度有约5倍的减少。**结论** HP0318基因在Hp的沙鼠适应性定植过程中发挥了重要的作用。

关键词: 幽门螺杆菌;HP0318;同源重组;突变体

中图法分类号: R378.99;R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Role of HP0318 gene for adaptive colonization of *H. pylori* in Mongolian gerbils

GUO Gang, TONG Wen-de, ZOU Quan-ming, WU Chao, LIU Kai-yun (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct and identify a deficiency mutant of *H. pylori* strains without HP0318 gene. Methods Two cloning PCR fragments containing two-end regions of HP0318 and a selectable chloramphenicol resistance marker between them were engineered into pBluescript plasmid. Then the HP0318-deleted derivative plasmid was electrotransformed into adaptive strain M_{13} and constructed a HP0318-negative mutant of *H. pylori via* homologous recombination resulting in allelic exchange. M_{13} and the mutant were inoculated to Mongolian gerbils, respectively. The level of colonization and pathological change were assessed at 4 weeks after infection. Results An HP0318 negative mutant of *H. pylori* strain has been constructed successfully. The infectious rate and colonization levels of the HP0318 mutant in Mongolian gerbils were significantly lower as compared with M_{13} ($P<0.05$). Conclusion These results demonstrate the importance of HP0318 gene for adaptive colonization of *H. pylori* in Mongolian gerbils.

Key words: *Helicobacter pylori*; HP0318; homologous recombination; mutant

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是人类慢性活动性胃炎和消化溃疡的重要原因,与胃癌和胃淋巴样组织淋巴瘤的发生也极度相关[1]。目前人类对其生物学特点、致病机制及其与宿主的关系等方面均还未完全阐明。随着对Hp在分子水平上的研究不断深入,人们发现Hp较其他细菌表现出更高的生物多样性[2,3],提示该菌面对复杂的定居环境,具有高度的变异性和独特的适应性机制。研究Hp在定植前后的适应性变化可能会为整体上阐明Hp的适应性定植机制打下基础,也有助于阐明Hp的致病机制及其与宿主之间的相互关系。

我们在前期通过双向电泳技术对Hp菌株M_0及其沙鼠适应株M_{13}全菌蛋白谱进行了比较分析,结果显示功能未定蛋白HP0318在适应株中显著高表达,提示其可能与Hp的适应性定植相关。本研究通过构建插入抗性基因失活的打靶载体,并将其转化沙鼠适应株M_{13},经同源重组对该菌株的HP0318基因进行置换突变,然后用该突变菌株感染蒙古沙鼠,观察其定植能力和致病性的改变,从而为确定HP0318在Hp适应性定植中的作用提供依据。

基金项目: 国家自然科学基金(30400019)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400019)

作者简介: 郭 刚(1970-),男,四川省宜宾县人,博士,副教授,主要从事病原细菌诊断与防治方面的研究。电话:(023)68752315, E-mail: guog@mail.tmmu.com.cn

通讯作者: 邹全明,电话:(023)68752316

收稿日期: 2006-10-24;**修回日期:** 2006-12-16

1　材料与方法

1.1　质粒和菌株

1.1.1　Hp 沙鼠适应株 M_{13}　　系本室用 Hp 临床分离株 M_0 经沙鼠体内连续传代驯化获得。

1.1.2　pBluescript Ⅱ SK 质粒　　在 Hp 中无复制功能，用于 Hp 的同源重组突变。由本校医学遗传学教研室惠赠。

1.1.3　pHel2 质粒　　由德国 Ludwig-Maximilians 大学 Haas 教授惠赠，含有来源于空肠弯曲菌的氯霉素乙酰转移酶基因盒（catGC），该基因单元在大肠杆菌和幽门螺杆菌中均能表现氯霉素抗性。

1.2　主要设备

Hp 培养装置：抽气换气培养罐，由本室自行研制。饲喂针（直径 0.9 mm × 长度 50 mm）购自上海茂生生物科技公司。

1.3　细菌培养及基因组 DNA 的分离

Hp 菌株在含 10 % 脱纤维羊血及 Skirrow's 抗生素添加剂的弯曲菌选择培养基上，37 ℃，微需氧条件（5% O_2、10% CO_2、85% N_2）培养 72 h，并经尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶活性检测和组织染色鉴定。收取 Hp 菌落重悬于 1 ml TE 缓冲液，基因组 DNA 的提取参照《精编分子生物学实验指南》[4] 中细菌基因组 DNA 制备的技术操作略加修改进行。抽提的 DNA 重溶于 50 μl去离子双蒸水中，置 −20 ℃保存备用。

1.4　PCR 扩增

针对 HP0318 基因两端区域的保守序列，合成 2 对带酶切位点的 PCR 引物：P1 5′-CGAGCTCTTTTGTGTGGTGTTAGCCC-3′（含 *Sac* Ⅰ 酶切位点）；P2 5′-GCTCTAGAGTTATAAAACCAAC-GCTCG-3′（含 *Xba* Ⅰ 酶切位点）；P3 5′-GGGTCTTTAACTTCGT-GG-3′；P4 5′-AGCAAGACAGCTCAAACC-3′。扩增反应体系的构成参照 Clontech 公司的 advantage genomic PCR 试剂盒说明操作。

1.5　PCR 产物的重组及克隆

PCR 产物重组进 T 载体及转化 *E. coli.* DH5α 感受态菌按常规进行，然后将转化的大肠杆菌在含 X-gal 、IPTG 及氨苄青霉素（Amp）的 LB 琼脂培养基中筛选培养。挑取单个白色菌落置含 Amp 的 LB 培养液中 37 ℃振摇过夜培养，参照文献[4]的技术方法进行质粒的抽提及酶切鉴定。

1.6　目的基因片段的制备

含 HP0318 两端区域基因片段的重组质粒、含 catGC 的质粒 pHel2 及用作载体的质粒 pBluescript Ⅱ SK 分别经双酶切、低熔点琼脂糖电泳及胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段，分别取 3 μl 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶（含 0.5 μg Pml 溴化乙锭）中电泳分析，产物置 4 ℃保存备用。

1.7　突变载体的构建

将回收的目的基因片段上游序列 p1p2、抗性基因 catGC、下游序列 p3p4 依次在 4 ℃与 pBluescript Ⅱ SK 线性片段连接，并进行双酶切及电泳分析鉴定。

1.8　突变菌株的构建

自培养 72 h 的固体培养基上收取 Hp（10^{10} cfu/ml），15 % 甘油 29 % 蔗糖溶液洗涤，4 ℃下 640 × *g* 离心 5 min，沉淀重悬于 50 μl 甘油蔗糖溶液，4 ℃放置 10 min，加载体 DNA 10 μg，混匀，移入 220 ℃预冷的电击池，冰浴 5 min，电击池置电穿孔架上，电击条件：25 F，2.5 kV，200 Ω 电击后，用 SOC 缓冲液 20 倍稀释 *H. pylori*，涂布于含 Skirrow's 抗生素添加剂及 25 mg PL 氯霉素的培养基上，37 ℃、微需氧条件，培养 72 h，收取细菌。

1.9　突变菌株的鉴定

收获的细菌经尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶活性检测及细菌染色证实为 Hp，制备突变菌株基因组 DNA ，针对 HP0318 基因，采用 PCR 方法扩增相关的基因片段。扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.10　突变菌株与适应株对沙鼠定植力的比较

取一经鉴定成功突变的 HP0318 基因突变株以及突变前的适应菌 M_{13} 按照本室建立方法[5,6] 分别感染 20 只蒙古沙鼠。感染 4 周后，剖杀沙鼠。10 只通过胃黏膜分离培养、快速脲酶试验及涂片镜检判断感染率；另外 10 只取胃黏膜作定量培养[7] 和病理学检查。

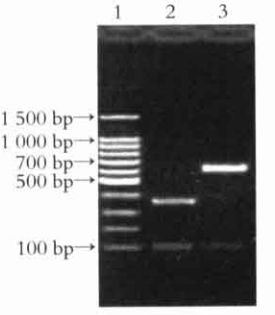
1.11　统计学方法

采用 PEMS 统计软件行 χ^2 检验和方差齐性分析。

2　结果

2.1　打靶同源片段的扩增

根据 GenBank 公布的 Hp26695 株的 HP0318 基因序列及其上下游核苷酸序列设计出分别针对其上、下游序列的 1 对引物，采用该 2 对引物通过 PCR 技术分别从 Hp M_{13} 株基因组中成功扩增出 2 段核苷酸片段，1.0% 琼脂糖凝胶电泳在 380 bp 和 640 bp 位置可各见 1 条清晰条带，大小与预计的相符。见图 1。

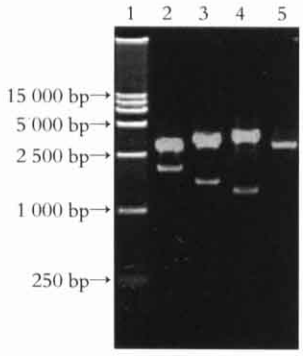


1：100 bp DNA 标准；2：P1P2 PCR 产物（380 bp）；3：P3P4 PCR 产物（640 bp）

图 1　HP0318 基因上下游片段 PCR 扩增产物电泳图

2.2　突变打靶载体 pBHC 的构建及酶切鉴定

将抽提的重组质粒 pSK-p1p2-catGC 用 *Sma* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 酶切，获得一 4.3 kb 的线性片段，再将其与经同样双酶切回收的 p3p4 片段进行连接和转化，从阳性菌落中抽提出重组载体 pSK-p1p2-catGC-p3p4，即 pBHC。经酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果见 *Sac* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 酶切产生 2.9 kb 和 2.0 kb 2 个片段，*Xba* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 酶切产生 3.3 kb 和 1.6 kb 2 个片段，*Sac* Ⅰ + *Sma* Ⅰ 酶切产生 3.5 kb 和 1.4 kb 2 个片段，pBluescript Ⅱ SK 空质粒经 *Sac* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 酶切只在 2.9 kb 处出现一条带。见图 2。

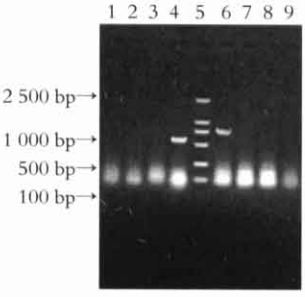


1：DNA 标准(DL 15000)；2：*Sac* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切 pBHC (2.0、2.9 kb)；3：*Xba* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切 pBHC (1.6、3.3 kb)；4：*Sac* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ 双酶切 pBHC (1.4、3.5 kb)；5：*Sac* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切 pBSK 对照 (2.9 kb)

图2 打靶载体 pBHC 的酶切鉴定

2.3 HP0318 基因缺失突变菌株的构建与鉴定

pBHC 打靶载体电转化 Hp 沙鼠适应性菌株 M13 后，其同源序列与宿主菌基因组产生交叉互换，经氯霉素和氨苄青霉素的双重筛选，共挑选出 4 个氯霉素耐药而氨苄敏感的菌株，即为疑似 HP0318 缺失突变株。挑选其中 3 株加上作为对照的适应株 M_{13}，抽提基因组后进行 PCR 鉴定，可见对照菌株用 2 对引物分别扩增出包含缺失片段上半段的 546 bp 片段以及包含缺失片段下半段的 761 bp 片段，而 3 株突变株均未扩增出特异性条带，表明突变成功，见图 3。将该突变株命名为 M_{13}△HP0318。



1－3：3 株突变菌 P1Q1 扩增结果；4：适应株 M_{13} 扩增 546 bp 的 P1Q1 片段；5：DNA 标准(DL 2000)；6：适应株 M_{13} 扩增 761 bp 的 Q2P4 片段；7－9：3 株突变菌 Q2P4 扩增结果

图3 Hp 突变菌 M_{13}△HP0318 的 PCR 鉴定结果

2.4 突变菌株与适应株对沙鼠定植力的比较

突变株 M_{13}△HP0318 以及适应株 M_{13} 对蒙古沙鼠感染率分别为 60% (6/10) 和 100% (10/10)，经 χ^2 检验，差异显著($P<0.05$)，定量培养显示突变株在沙鼠胃内的定植密度显著低于非突变株，对 2 组沙鼠定植的 Hp 菌落形成单位的常规对数平均值[分别为(4.74 ± 1.26) 和(5.43 ± 0.98)]作方差齐性与 t 检验，相差显著($P<0.05$)。2 个菌株在感染后 4 周均引起沙鼠胃黏膜固有层充血及炎性细胞浸润，所致病理改变无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

在研究细菌的基因结构和功能时，通过对染色体的定点诱变、缺失或融合，然后观察其突变后的表型变化，能够有效地简化研究这类复杂生物学问题时所遇到的难题。基于同源重组理论的基因突变技术在细菌的基因功能研究中得到了广泛的应用。对于幽门螺杆菌来说，利用同源重组技术构建 Hp 中相关基因失活的突变体是研究该基因在 Hp 菌中地位和作用的一个极为有效和实用的手段，许多重要的定植、黏附、毒力等相关基因功能都通过这种方法得到了验证[8,9]。本研究首先选择质粒 pBluescript Ⅱ SK(－)作为突变打靶载体。该质粒由于在大肠杆菌中能自主复制，但不能在 Hp 中复制，以及对 Hp 有较好的转化效率而在 Hp 的基因功能研究中得到广泛应用[10,11]。此外，我们选择了 catGC(氯霉素乙酰转移酶)基因作为插入抗性基因。这是由于在 Hp 中尚未发现由质粒介导的抗性基因，目前在 Hp 相关研究中均采用来自于空肠弯曲菌的 cat 基因或 aph3(卡那霉素抗性)基因作为筛选标记[12,13]。这 2 个抗性基因在大肠杆菌与 Hp 中均能表达。

我们先利用根据 HP0318 基因及上下游序列设计的引物扩增出两个同源打靶片段 p1p2 和 p3p4，分别有 380 bp 和 640 bp，前者包括 HP0318 基因 ORF 中起始片段(255 bp)及其上游片段(125 bp)，后者包括 HP0318 基因终止片段(191 bp)及其下游片段(449 bp)，HP0318 基因中段有 309 bp 长的区域未扩增。通过基因体外操作将 cat 基因连接到两个目的片段之间，并共同连接到 pBluescript Ⅱ SK(－)载体的多克隆位点中，从而构建出带氯霉素抗性筛选标志、HP0318 基因缺失突变的 pBHC(△HP0318::cat)载体，经限制性内切酶分析，该突变载体的构建结果与设计相符。

带缺失突变基因的打靶质粒转化进出发菌后一个关键步骤是对阳性突变菌株的筛选。由于发生同源重组后，带有氯霉素抗性基因的缺失突变基因置换了基因组中正常的 HPP0318 基因，因此该突变菌株表现出氯霉素抗性，而没有发生同源重组的 Hp 因本身并不具有氯霉素抗性则在含氯霉素的平板上不会生长。我们通过氯霉素平板成功筛选到 4 个阳性克隆。为了进一步确证 HP0318 基因已被缺失突变，我们通过 PCR 进行了验证。在设计的两对引物中，分别有 1 条位于 HP0318 被缺失的片段内，这样未突变菌可以扩增出预计的片段，而已成功缺失的突变菌则不会出现扩增带。结果挑选的 3 个阳性菌株的 PCR 均未扩增出特异性条带，但对照的 M_{13} 出发菌分别扩增出预计的 546 bp 和 761 bp 片段，表明筛选到的菌落其 HP0318 基因已

被缺失掉。结果也证明我们已成功构建出 Hp 沙鼠适应株 M_{13} 的 HP0318 基因突变株。

为了进一步观察该突变菌株在沙鼠体内感染力的变化，我们将其口服感染蒙古沙鼠，同时以出发菌 M_{13} 作为对照。感染后 4 周，对所有实验鼠进行了剖杀，检测感染率、定植密度以及所致病理学改变。结果两个菌株的感染率相差显著，分别是 60% 和 100%，两个菌株在胃内的定植密度也存在显著的差异，突变株定植密度较适应株有约 5 倍的减少。虽然病理学检查显示两个菌株均在沙鼠胃内激发了轻微的充血和炎症反应，差别不明显，但是，HP0318 基因的失活对其 Hp 的定植能力和感染力还是产生了较大的影响，基本可以确定 HP0318 基因在 Hp 的沙鼠适应性定植过程中发挥了重要的作用。当然，一个细菌的致病性往往是多因素的，由多基因编码和调控。在 Hp 的定植和致病过程中，HP0318 基因是如何发挥作用以及与哪些因子相互作用？HP0318 基因还有何其他的重要生理功能？对该 HP0318 突变菌株开展进一步的研究将有助于阐明这些问题，这也是本课题后续的研究方向。

参考文献：

[1] Wang R T, Wang T, Chen K, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 1103 - 1107.

[2] Tan S, Fraley C D, Zhang M, *et al*. Diverse phenotypes resulting from polyphosphate kinase gene (ppk1) inactivation in different strains of *Helicobacter pylori*[J]. J Bacteriol, 2005, 187(22): 7687 - 7695.

[3] Kuipers E J, Israel D A, Kusters J G, *et al*. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 273 - 282.

[4] 奥斯伯 FM，布伦特 R，金斯顿 RE，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖，王海林，译. 北京：科学出版社，1998：55 - 56，683 - 686.

[5] 郭　刚，王毅超，刘开云，等. 蒙古沙鼠感染幽门螺杆菌后的胃部病理学变化研究[J]. 中国人兽共患病杂志，2002，18(3)：25 - 26，47.

[6] 刘开云，郭　刚，解庆华，等. 沙鼠感染幽门螺杆菌后胃黏膜 INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 表达水平的分析[J]. 第三军医大学学报，2005，27(13)：1320 - 1322.

[7] 郭　刚，刘开云，解庆华，等. 幽门螺杆菌沙鼠感染模型的定量分析研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：286 - 288.

[8] Davis G S, Mobley H L. Contribution of dppA to urease activity in *Helicobacter pylori* 26695[J]. Helicobacter, 2005, 10(5): 416 - 423.

[9] Ryan K A, Karim N, Worku M, *et al*. HP0958 is an essential motility gene in *Helicobacter pylori*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 248(1): 47 - 55.

[10] 刘　炯，许国铭，屠振兴，等. cag 致病岛缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2002，22(2)：206 - 210.

[11] Marchetti M, Rappuoli R. Isogenic mutants of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* in the mouse model of infection: effects on colonization efficiency[J]. Microbiology, 2002, 148(Pt 5): 1447 - 1456.

[12] Bereswill S, Schonenberger R, Van-Vliet A H, *et al*. Novel plasmids for gene expression analysis and for genetic manipulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 44(2): 157 - 162.

[13] Heuermann D, Haas R. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation[J]. Mol Gen Genet, 1998, 257(5): 519 - 528.

（编辑　汪勤俭）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪，20 世纪 90 年代，1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95′年；1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“：”分隔的形式，如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13：45：08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2 431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部