

DOI:10.13350/j.cjpb.220605

• 论著 •

幽门螺杆菌荧光蛋白报告系统的构建*

管玉祝^{1,2}, 王鑫鑫^{1,2}, 吴道艳^{1,2}, 洪伟^{1,3}, 向松^{1,2}, 吴晓娟^{1,2}, 张玉典^{1,2}, 崔古贞^{2,3**}, 陈峥宏^{1,2,3***}

(1. 贵州省病原生物学特色重点实验室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院微生物学教研室;
3. 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室)

【摘要】 目的 构建幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(RFP)两种报告系统。
方法 利用PCR方法扩增幽门螺杆菌内源组成型脲素酶基因启动子(*PureA*),利用重叠延伸PCR方法将*PureA*启动子分别与绿色荧光蛋白基因(*gfp*)和红色荧光蛋白基因(*rfp*)连接,构建两类荧光蛋白基因表达盒*PureA-gfp*和*PureA-rfp*。利用无缝组装技术将*PureA-gfp*和*PureA-rfp*表达盒分别与*EcoRI*单切的自杀质粒载体pSD连接,构建两类荧光蛋白基因表达报告质粒pSD-GFP和pSD-RFP。将上述两类荧光蛋白报告质粒分别转化幽门螺杆菌26695,涂布卡那霉素抗性平板,利用同源重组方法构建两类荧光蛋白基因工程菌株*Hp::gfp*和*Hp::rfp*。利用卡那霉素抗性和PCR方法筛选阳性工程菌株,并利用荧光显微镜检测两种荧光蛋白在幽门螺杆菌中的表达状况。
结果 工程菌株能够在卡那霉素抗性平板生长,PCR扩增目的基因片段与预期结果一致,表明*gfp*和*rfp*基因表达盒成功插入到幽门螺杆菌染色体靶位点。荧光显微镜下分别观察到明亮的绿色荧光和红色荧光,而野生型对照菌株无任何荧光,表明*gfp*和*rfp*基因在幽门螺杆菌中成功表达。
结论 在幽门螺杆菌中成功构建GFP和RFP两种荧光蛋白报告系统,为幽门螺杆菌的转录调控及致病机制研究提供了良好的检测手段。

【关键词】 幽门螺杆菌;绿色荧光蛋白;红色荧光蛋白;基因表达报告系统

【中图分类号】 R378.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0643-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jun.;17(6):643-648.]

Construction of fluorescent protein reporting system of *Helicobacter pylori*

GUAN Yu-zhu^{1,2}, WANG Xin-xin^{1,2}, WU Dao-yan^{1,2}, HONG Wei^{1,3}, XIANG Song^{1,2}, WU Xiao-juan^{1,2}, ZHANG Yu-dian^{1,2}, CUI Gu-zhen^{1,2,3}, CHEN Zheng-hong^{1,2,3} (1. Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, Guizhou 550025, China; 2. Department of Microbiology, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University; Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education)***

【Abstract】 **Objective** To construct two types of reporting system for green fluorescent protein (GFP) and red fluorescent protein (RFP) of *Helicobacter pylori*. **Methods** Firstly, the constitutive urease gene promoter (*PureA*) from *H. pylori* was amplified by PCR and ligated with green fluorescent protein gene (*gfp*) and red fluorescent protein gene (*rfp*), respectively, by overlapping extension PCR to construct two gene expression boxes *PureA-gfp* and *PureA-rfp*. These two expression boxes were respectively ligated with *EcoRI* digested suicide plasmid vector pSD by seamless assembly technology, and two types of fluorescent protein gene expression reporting plasmids pSD-GFP and pSD-RFP were constructed. Then, these two reporting plasmids pSD-GFP and pSD-RFP were transformed into *H. pylori* 26695, respectively, and coated on kanamycin resistant plate, and two engineered strains *Hp::gfp* and *Hp::rfp* were constructed by homologous recombination method. Finally, kanamycin resistance and PCR were used to screen positive engineering strains, and the expression of these two fluorescent proteins in *H. pylori* was detected by fluorescence microscope. **Results** The engineered strains could grow on the kanamycin resistant plate, and the PCR bands were consistent with the expected results, indicating that *gfp* and *rfp* gene were successfully expressed in *H. pylori*. **Conclusion** GFP and RFP fluorescence protein reporting systems were successfully constructed in *H. pylori*, which providing a good detection method for the study of transcriptional regulation and pathogenesis of *H. pylori*.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; GFP; RFP; gene expression reporting system

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32160015, No. 81860353, No. 82160390); 贵州省科技计划项目(No. [2019]1441, No. [2020]1Z067)和大学创新训练计划(No. 202110660003)。

** **【通讯作者】** 陈峥宏, E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn; 崔古贞, E-mail: cuiguzhen@gmc.edu.cn

【作者简介】 管玉祝(1997-), 女, 贵州遵义人, 硕士, 主要从事幽门螺杆菌分子生物学方面的研究。E-mail: 1023763700@qq.com

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一类螺旋杆状、端生鞭毛、微需氧、革兰阴性细菌,是引起人类胃炎、消化性溃疡、胃粘膜相关淋巴瘤、胃癌等疾病主要致病因子,1994年世界卫生组织(WHO)将其定义为I类致癌因子^[1-2]。2018年世界新增胃癌患者达100万,在所有癌症类型中占居第五位^[3-5]。目前,我国人群幽门螺杆菌感染率已超过55%,且呈现耐药性逐年上升、根除率显著下降的趋势^[6-7]。幽门螺杆菌在胃部定植并引发疾病需要多种因素的协同作用,包括细菌分泌的各种毒力因子、宿主免疫因素、胃部微环境等^[8-10],从细菌和宿主两个维度深入研究幽门螺杆菌致病机制是降低幽门螺杆菌感染、开发新型药物和疫苗的重要手段^[11-13]。

良好的检测表征手段是研究幽门螺杆菌遗传调控及其与宿主相互作用的基础。荧光蛋白是一类灵敏度高、背景干扰低、能够在活体细胞内应用的分子检测蛋白,且不同的荧光蛋白具有不同的发射光谱,对细菌和宿主毒性小,能够与多种基因共表达,如细胞分泌相关基因、细胞及亚细胞定位相关基因、信号筛选相关基因等,且不影响其荧光强度^[14-15],在生物体遗传调控、信号示踪、细胞及亚细胞定位等多个领域具有重要应用价值,目前已在动、植物及微生物等众多领域获得广泛应用^[16-17]。

目前获得广泛应用的荧光蛋白主要包括绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)^[18]、蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein)^[19]、青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein)^[20]、黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein)^[21]和红色荧光蛋白(red fluorescent protein)^[22]。其中绿色荧光蛋白研究最早且成熟,荧光稳定,无毒性,在微生物、植物、动物中成功表达,不受细胞种类和位置的限定。红色荧光蛋白稳定性好,光毒性较小,可用于活细胞及动物全身成像、探测深部组织等^[23-24]。本实验以GFP和RFP为基础,在幽门螺杆菌中构建两类荧光蛋白报告系统,为幽门螺杆菌的遗传调控、靶细胞定植、宿主相互作用研究等提供良好的检测分析平台。

材料与方 法

1 材料

1.1 主要试剂 高保真DNA聚合酶和无缝组装试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司;Taq DNA聚合酶和限制性内切酶购自赛默飞世尔科技公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒及细菌基因组DNA制备试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;抗生素购自索莱宝科技有限公司;引物由上海生物工程有限公司合成(表1)。

表1 PCR引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	注释 notes
ureA-RFP-1	TGGGCTTGGCGGTGGAATTCGATCT TTATAAATTCTAAAGGGGTATATAA CGCAC	扩增与 <i>rfp</i> 连接的 <i>PureA</i> 启动子
ureA-RFP-2	TTAATTCTGACATCTTATTCTCCTAT TCTTAAAGTGTTCCTTG	
ureA-RFP-3	TAGGAGAATAAGATGTCAGAATTA ATTAAGAAAATATGCACATG	扩增红色荧光蛋白基因(<i>rfp</i>)
ureA-RFP-4	CGGGTACCGAGCTCGAATTCTCAA CGATGTCCTAATTCGACGG	
ureA-GFP-1	TGGGCTTGGCGGTGGAATTCACG TCGTGGCCACCA	扩增与 <i>gfp</i> 连接的 <i>PureA</i> 启动子
ureA-GFP-2	TGCTCACCATCATCTTATTCTCCTAT TCTTAAAGTGTTCCTTGAAAG	
ureA-GFP-3	GAATAAGATGATGGTGAGCAAGGG CGAG	扩增绿色荧光蛋白基因(<i>gfp</i>)
ureA-GFP-4	CGGGTACCGAGCTCGAATTCATCC ACCGTCTCGAGTTACT	
CE-1	GGCACAACCTTAGGGCCTAT	转化学子检测引物
CE-2	TCAACACACTGCCTAAGAAACG	
CE-3	TCAACACACTGCCTAAGAAACG	

1.2 主要仪器 恒温培养箱(200AB-4型)为武汉精华科教仪器有限公司生产;PCR仪购于赛默飞世尔科技公司;DYY-7C型电泳仪为北京六一厂生产;凝胶成像分析系统购于北京百晶生物技术有限公司;HF151型CO₂培养箱为中国Heal Force公司生产;荧光显微镜(ci-e-ds-r11型)购于尼康公司。

1.3 菌株及质粒 大肠埃希菌 *E. coli* DH5a,在LB液体培养基(1%胰蛋白胨,0.5%酵母抽提物,1%氯化钠)中于37℃恒温摇床、180 r/min震荡培养,平板筛选时使用含有1.5%琼脂的LB固体培养基于37℃恒温培养箱中培养,必要时补充终浓度100 μg/mL氨苄青霉素或30 μg/mL卡那霉素。幽门螺杆菌,接种至含10%胎牛血清的液体培养基(2%胰蛋白胨,0.5%酵母抽提物,0.5%氯化钠,0.1%葡萄糖)中,于37℃、10% CO₂恒温摇床(120 r/min)微氧环境中培养;固体培养接种在血平板培养基(10%脱脂绵羊血的哥伦比亚培养基)上,置于37℃、10% CO₂的微氧环境中培养^[25]。其它菌株及质粒见表2。

2 方法

2.1 质粒构建

2.1.1 pSD-GFP质粒的构建 以幽门螺杆菌26695基因组为模板,以ureA-GFP-1/ureA-GFP-2为引物,PCR扩增幽门螺杆菌尿素酶基因启动子(*PureA*);以ptet-EGFP质粒为模板,以ureA-GFP-3/ureA-GFP-4为引物,以上述扩增获得的*PureA*启动子和*gfp*基因为模板,通过重叠延伸PCR扩增获得*PureA-gfp*基因表达盒。用无缝组装试剂盒将*PureA-gfp*片段与

经 *EcoRI* 单酶切的 pSD 质粒连接, 构建绿色荧光蛋白表达质粒 pSD-GFP, 构建流程如图 1A。

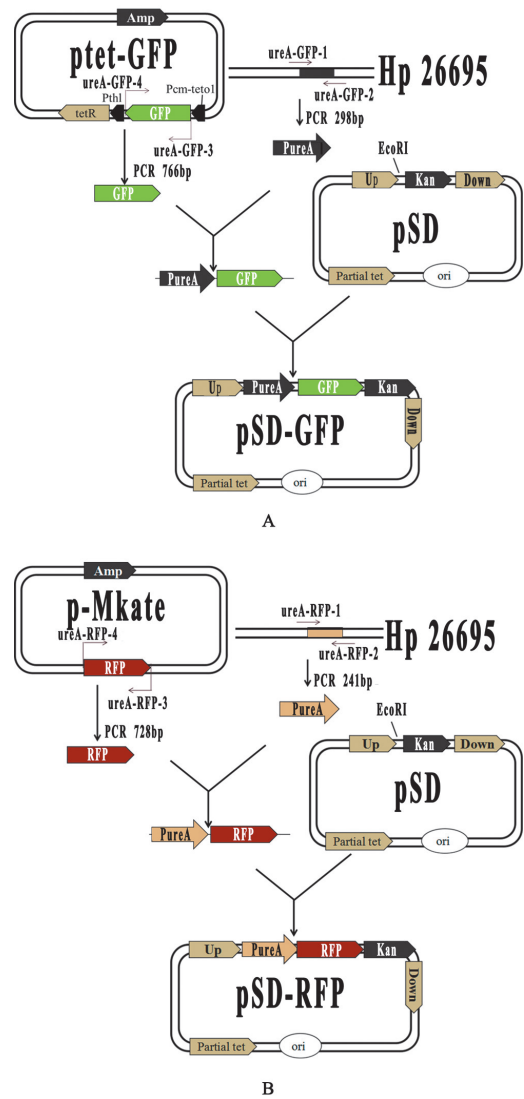
表 2 菌株及质粒
Table 2 Strains and plasmids used in this study

菌株及质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 References
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	Clone strain, <i>F⁻lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) relA1</i>	This lab.
DH5 α ::pSD	Derived from DH5 α , carrying plasmid pSD, <i>kan^r</i>	This lab.
DH5 α ::gfp	Derived from DH5 α , carrying plasmid pSD-GFP, <i>kan^r</i>	This study
DH5 α ::rfp	Derived from DH5 α , carrying plasmid pSD-RFP, <i>kan^r</i>	This study
<i>H. pylori</i>	ATCC26696, wild-type strain	This lab.
<i>Hp</i> ::gfp	<i>H. pylori</i> strain, expressing green fluorescent protein	This study
<i>Hp</i> ::rfp	<i>H. pylori</i> strain, expressing red fluorescent protein (RFP), <i>kan^r</i>	This study
Plasmids		
pSD	From pill570, suicide plasmid, <i>kan^r</i>	Shan Y 等 ^[26]
ptet-EGFP	Carrying green fluorescent protein gene (<i>gfp</i>), <i>Amp^r</i>	This lab.
p-Mkate	Carrying red fluorescent protein gene (<i>rfp</i>), <i>Amp^r</i>	Liu H 等 ^[27]
pSD-GFP	Recombinant plasmid, carrying green fluorescent protein gene (<i>gfp</i>), <i>kan^r</i>	This study
pSD-RFP	Recombinant plasmid, carrying red fluorescent protein gene (<i>rfp</i>), <i>kan^r</i>	This study

2.1.2 pSD-RFP 质粒的构建 以幽门螺杆菌 26695 基因组为模板, 以 ureA-RFP-1/ureA-RFP-2 为引物, PCR 扩增幽门螺杆菌尿素酶基因启动子 (*PureA*); 以 p-Mkate 质粒为模板, 以 ureA-RFP-3/ureA-RFP-4 为引物, PCR 扩增红色荧光蛋白基因 *rfp*。以 ureA-RFP-1/ureA-RFP-4 为引物, 以上述扩增获得的 *PureA* 启动子和 *rfp* 基因为模板, 通过重叠延伸 PCR 扩增获得 *PureA-rfp* 基因表达盒。用无缝组装试剂盒将 *PureA-rfp* 片段与经 *EcoRI* 单酶切的 pSD 质粒连接, 构建红色荧光蛋白表达质粒 pSD-RFP, 构建流程如图 1B。

2.2 遗传转化

2.2.1 大肠埃希菌转化 取 5~10 μ L 重组产物加入到 100 μ L *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰上静置 30 min 后, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 s, 立即放置冰上 2~3 min, 加入 900 μ L LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 1 h, 5000 r/min 离心 5 min, 弃 900 μ L 上清, 剩余培养基将菌体重悬, 用无菌涂布棒在含有卡那霉素抗性平板上轻轻涂匀。



A pSD-GFP 质粒构建示意图 B pSD-RFP 质粒构建示意图
图 1 质粒构建示意图

A Schematic diagram of pSD-GFP plasmid construction B Schematic diagram of pSD-RFP plasmid construction

Fig. 1 Schematic diagram of plasmid construction

2.2.2 幽门螺杆菌转化 将血平板培养基上生长良好的幽门螺杆菌 26695 接种至新的不含抗生素的哥伦比亚血琼脂平板上, 置于 10% CO₂ 微需氧培养箱中培养 5~6 h。取 50 μ L 质粒与菌混合, 置于微需氧培养箱继续培养 24 h。次日, 将无抗培养基上生长菌体全部接种至卡那抗性的血平板上培养 3~5 d, 收集抗性平板上生长的菌体进行 PCR 鉴定。

2.3 PCR 鉴定

2.3.1 大肠埃希菌菌落 PCR 鉴定 挑取 LB 平板上生长的单克隆, 用引物 CE-1/CE-2 进行 PCR 扩增。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 35 个循环; 94 $^{\circ}$ C 终延伸 2 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3.2 幽门螺杆菌 PCR 鉴定 因幽门螺杆菌菌落

PCR 鉴定不稳定,因此幽门螺杆菌采用基因组 DNA 为模板进行鉴定。挑取卡那抗性平板的单菌落接种于 BHI 液体培养基(含 10% 新生牛血清),37 °C、120 r/min 微需氧培养后收集菌体,利用细菌基因组提取试剂盒提取突变菌株 DNA,利用引物 CE-1/CE-3 进行 PCR 扩增。PCR 条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1.5 min,共 35 个循环;94 °C 终延伸 2 min。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.4 荧光蛋白表达观察 分别取 1 μL 培养至对数中期的大肠埃希菌 *DH5a::gfp/DH5a::rfp* 和幽门螺杆菌 *Hp::gfp/Hp::rfp* 涂布到载玻片上,使用 ci-e-ds-r11 型显微镜观察荧光蛋白表达情况,同时用野生菌株作为对照。GFP: Ex = 488nm, Em = 465-495nm ;RFP: Ex = 557nm, Em = 540-580nm。

结果

1 质粒载体的构建与鉴定

将两类荧光蛋白基因(*gfp* 和 *rfp*)分别置于幽门螺杆菌组成型尿素酶基因启动子(*PureA*)控制之下与卡那霉素抗性基因共表达,构建两类荧光蛋白报告质粒 pSD-GFP 和 pSD-RFP 质粒。上述质粒转化大肠埃希菌后挑取单菌落,以 CE-1/CE-2 为引物进行菌落 PCR 鉴定,经 1% 琼脂糖电泳分别获得约 1.3 kb(图 2A)和 1.2 kb(图 2B)的扩增片段,与预期结果一致。阳性质粒测序正确。

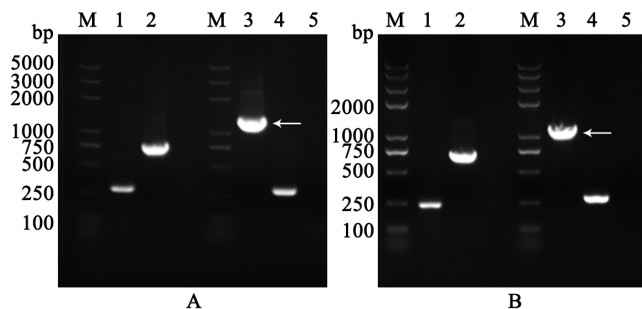


图 2 构建质粒的菌落 PCR 鉴定
A GFP 凝胶电泳 M DNA marker 1 *PureA* 2 *gfp* 3 *PureA-gfp* 4 阴性对照 5 空白对照 B RFP 凝胶电泳 M DNA marker 1 *PureA* 2 *rfp* 3 *PureA-rfp* 4 阴性对照 5 空白对照。

图 2 构建质粒的菌落 PCR 鉴定

A GFP gel electrophoresis results M DNA marker 1 *PureA* 2 *gfp* 3 *PureA-gfp* 4 Negative control 5 Blank control B RFP gel electrophoresis results M DNA marker 1 *PureA* 2 *rfp* 3 *PureA-rfp* 4 Negative control 5 Blank control.

Fig. 2 Plasmid was constructed by agarose gel electrophoresis

2 幽门螺杆菌荧光蛋白表达菌株的构建与鉴定

利用自然转化方法,将提取自大肠埃希菌的自杀质粒 pSD-GFP 和 pSD-RFP 分别转化 *H. pylori* 26695,利用细菌自身同源重组机制构建幽门螺杆菌荧

光蛋白表达菌株 *Hp::gfp* 和 *Hp::rfp*(图 3A)。挑取卡那抗性菌落培养后提取基因组 DNA,利用 CE-1/CE-3 引物进行突变株基因组检测,分别获得约 2.0 kb 的目的基因片段(图 3B、3C),与预期结果一致,幽门螺杆菌工程菌株构建成功。

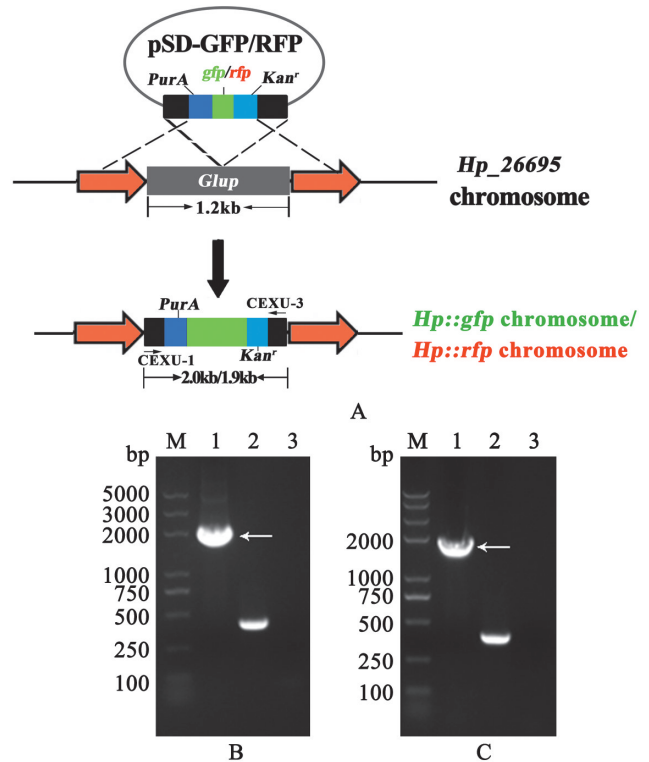


图 3 幽门螺杆菌荧光蛋白表达菌株的构建及 PCR 鉴定
A Schematic diagram of engineering strain construction B PCR identification of *Hp::GFP* M DNA marker 1 *Hp::GFP* 2 *H. pylori* 26695 3 空白对照 C PCR identification of *Hp::RFP* M DNA marker 1 *Hp::RFP* 2 *H. pylori* 26695 3 空白对照。

图 3 幽门螺杆菌荧光蛋白表达菌株的构建及 PCR 鉴定

A Schematic diagram of engineering strain construction B PCR identification of *Hp::GFP* M DNA marker 1 *Hp::GFP* 2 *H. pylori* 26695 3 Blank control C PCR identification of *Hp::RFP* M DNA marker 1 *Hp::RFP* 2 *H. pylori* 26695 3 Blank control

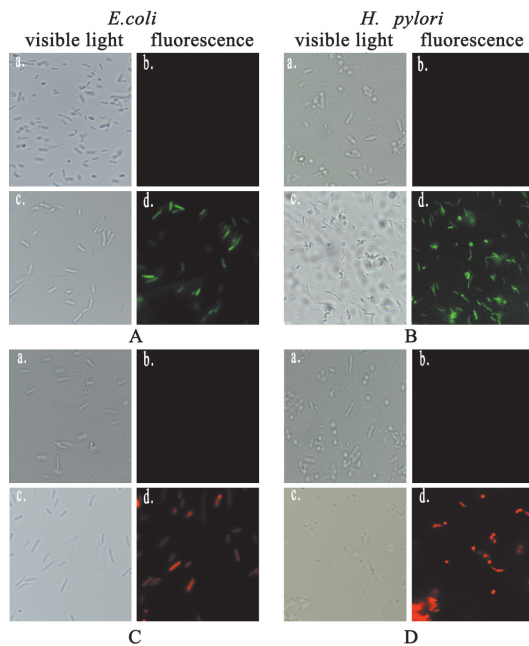
Fig. 3 Construction and PCR identification of *H. pylori* fluorescent protein expressing strain

3 荧光蛋白表达情况

将上述两类荧光蛋白表达工程菌株在 BHI 液体培养基中培养至对数期,分别取 1 μL 利用荧光显微镜检测荧光蛋白表达情况,同时以大肠埃希菌和幽门螺杆菌野生菌株作对照。图 4 显示,大肠埃希菌(图 4A、B)和幽门螺杆菌(图 4C、D)均可观察到明亮的绿色荧光和红色荧光,表明构建的两类荧光蛋白报告系统在大肠埃希菌和幽门螺杆菌中均可正常工作。

在荧光显微镜下还观察到大量球形幽门螺杆菌(图 4C-d,4D-d),即幽门螺杆菌形态变为球形菌,球形变是幽门螺杆菌体外培养经常存在的现象,与营养状态、生长条件、传代次数等多种因素有关^[28-29]。幽门螺杆菌尽管存在球形变,但并不影响荧光信号观察。另

外,通过分析幽门螺杆菌荧光报告系统的稳定性发现,在无抗生素培养基中连续传代 50 代后其荧光信号强度仍无任何变化,表明该系统在螺杆菌中具有较好的稳定性。



A 大肠埃希菌 GFP 显微镜观察 a *DH5a::pSD* 空白菌株对照,可见光观察 b *DH5a::pSD* 空白菌株对照,荧光观察 c *DH5a::pSD-GFP* 可见光观察 d *DH5a::pSD-GFP* 荧光观察 B 幽门螺杆菌 GFP 显微镜观察 a *H. pylori* 26695 空白菌株对照,可见光观察 b *H. pylori* 26695 空白菌株对照,荧光观察 c *Hp::gfp* 可见光观察 d *Hp::gfp* 荧光观察 C 大肠埃希菌 RFP 显微镜观察 a *DH5a::pSD* 空白菌株对照,可见光观察 b *DH5a::pSD* 空白菌株对照,荧光观察 c *DH5a::pSD-RFP* 可见光观察 d *DH5a::pSD-RFP* 荧光观察 D 幽门螺杆菌 RFP 显微镜观察 a *H. pylori* 26695 空白菌株对照,可见光观察 b *H. pylori* 26695 空白菌株对照,荧光观察 c *Hp::rfp* 可见光观察 d *Hp::rfp* 荧光观察

图 4 荧光显微镜观察工程菌荧光蛋白表达情况

A *E. coli* GFP microscopic observation a *DH5a::pSD* blank strain control, observed in visible light b *DH5a::pSD* blank strain control, fluorescence observation c *DH5a::pSD-GFP* observed in visible light d *DH5a::pSD-GFP*, fluorescence observation B *H. pylori* GFP microscopic observation a *H. pylori* 26695 blank strain control, observed in visible light b *H. pylori* 26695 blank strain control, fluorescence observation c *Hp::gfp* observed in visible light d *Hp::gfp*, fluorescence observation C *E. coli* RFP microscopic observation a *DH5a::pSD* blank strain control, observed in visible light b *DH5a::pSD* blank strain control, fluorescence observation c *DH5a::pSD-RFP* observed in visible light d *DH5a::pSD-RFP* fluorescence observation D *H. pylori* RFP microscopic observation a *H. pylori* 26695 blank strain control, observed in visible light b *H. pylori* 26695 blank strain control, fluorescence observation c *Hp::rfp* observed in visible light d *Hp::rfp* fluorescence observation

Fig. 4 Fluorescence microscopic examination

讨论

幽门螺杆菌作为 I 类致癌因子,可引起包括胃炎、胃溃疡、胃癌等多种胃部相关性疾病,尽管随着分子生物学技术的进步,其转录调控、致病机制等方面的研

究逐步深入,但在其定植、耐药、信号传导、遗传变异等多方面的机制仍不明确.因此,构建多种不同的报告系统及信号检测体系对深入研究其定植机制、信号示踪、与宿主及其他微生物之间的相互作用、感染途径等多方面具有重要意义。

Wen 等^[30]利用作为靶向 pH 指示剂的绿色荧光蛋白构建了用于快速测定幽门螺杆菌 pH 调节的荧光工具,为研究幽门螺杆菌在胃内的定植、致病性、迁移性等提供了良好的工具.绿色荧光蛋白在遗传调控、信号示踪等领域获得广泛应用,在动植物、微生物及人类细胞均可获得较好的荧光信号,但其发射光谱较为局限(激发波长 488 nm,发射波长 507 nm),而红色荧光相对绿色荧光,其激发和发射波长更宽(激发波长 270-510 nm,发射波长 600 nm,并且细胞内成像背景影响更低.因此,二者结合使用,可以解决单一绿色荧光存在的局限性^[22]。

此外,用荧光染料标记幽门螺杆菌也是研究其定植、信号追踪等的重要手段^[31],但与荧光蛋白相比存在一定的局限.例如,荧光染料很难在感染的活体细胞内进行标记,即使能标记,其信号强度也会随着细胞的传代、细菌的分裂而逐步减弱.而荧光蛋白基因整合到细菌染色体上,随着细菌的复制而复制,信号比较稳定,不存在信号减弱或变化的状况.但荧光蛋白的信号受启动子类型、细菌生长时期等因素的影响.本研究以两类不同的荧光蛋白为基础,将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 和红色荧光蛋白基因 *rfp* 分别置于幽门螺杆菌组成型尿素酶基因启动子(*PureA*)控制之下与卡那霉素抗性基因共表达,构建了两类荧光蛋白基因表达盒(*PureA-gfp-kan* 和 *PureA-rfp-kan*),该启动子是幽门螺杆菌组成型启动子,不受细菌生长时期的影响,避免了不同生长时期信号强度变化的影响.而且,该表达盒通过同源重组方式分别插入到幽门螺杆菌葡萄糖/半乳糖转运基因 *gluP* (glucose/galactose transporter) 内部,该基因不是幽门螺杆菌的必需基因,该基因的失活对幽门螺杆菌在常规培养基中的生长无显著影响.因此, *gluP* 基因可以作为幽门螺杆菌基因工程的靶点,用于插入其他功能基因。

本研究构建的两类荧光蛋白基因表达盒,使用的是来源于幽门螺杆菌内源的组成型尿素酶基因启动子 *PureA*,该启动子是幽门螺杆菌的特有基因,但构建的基因表达盒(*PureA-gfp-kan* 和 *PureA-rfp-kan*)在大肠埃希菌体系中也能很好地工作(图 4A、C),可能是因为幽门螺杆菌与大肠埃希菌均为革兰阴性细菌,具有相似的启动子序列特征,在不同物种之间具有通用性.因此, *PureA* 启动子不仅能够用于幽门螺杆菌基因的转录和表达,也可用于其他细菌的基因工程研

究,为其他细菌的遗传调控、信号示踪及分子生物学研究提供了良好的异源启动子。

本研究利用幽门螺杆菌自身的组成型尿素酶基因启动子(*PureA*)构建绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白两类报告系统,且该系统重组到幽门螺杆菌基因组中具有稳定遗传、发光信号强、对细胞毒性小等优点,因此可用于幽门螺杆菌遗传调控及信号示踪等多方面的研究,为探究幽门螺杆菌致病机制提供了良好的分析平台。

致谢:山东大学孙允东教授实验室馈赠 pSD,山东大学微生物国家重点实验室李焕杰馈赠 p-Mkate 质粒,在此一并表示感谢!

【参考文献】

- [1] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the maastricht iv/ florence consensus report [J]. Gut, 2012, 61(5): 646-664.
- [2] Yang H, Wei B, Hu B. Chronic inflammation and long-lasting changes in the gastric mucosa after *Helicobacter pylori* infection involved in gastric cancer [J]. Inflamm Res, 2021, 70(10-12): 1015-1026.
- [3] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [4] Kotilea K, Bontems P, Touati E. Epidemiology, diagnosis and risk factors of *Helicobacter pylori* infection [J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1149): 17-33.
- [5] de Brito BB, da Silva FAF, Soares AS, et al. Pathogenesis and clinical management of gastric infection [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(37): 5578-5589.
- [6] Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection [J]. N Engl J Med, 2019, 380(12): 1158-1165.
- [7] Mladenova I. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* infection [J]. J Clin Med, 2021, 10(16): 3473.
- [8] Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory [J]. Helicobacter, 2017, 22(4): e12386.
- [9] Fagoonee S, Pellicano R. *Helicobacter pylori*: Molecular basis for colonization and survival in gastric environment and resistance to antibiotics. A short review [J]. Infect Dis (Lond), 2019, 51(6): 399-408.
- [10] Isaeva GS, Fagoonee S. Biological properties and pathogenicity factors of *Helicobacter pylori* [J]. Minerva Gastroenterol Di- etol, 2018, 64(3): 255-266.
- [11] Stubljär D, Jukic T, Ihan A. How far are we from vaccination against *Helicobacter pylori* infection? [J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(10): 935-945.
- [12] Zhu XY, Liu F. Probiotics as an adjuvant treatment in *Helicobacter pylori* eradication therapy [J]. J Dig Dis, 2017, 18(4): 195-202.
- [13] Hu Y, Zhu Y, Lu N-H. Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(3): 335-343.
- [14] 毛洪丽, 刘雨, 张建国. 荧光蛋白及其在微生物过程工程中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 17(45): 252-257.
- [15] Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging [J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(10): 2887-2921.
- [16] Bialecka-Fornal M, Makushok T, Rafelski SM. A review of fluorescent proteins for use in yeast [J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2016(1369): 309-346.
- [17] Jones AM, Ehrhardt DW, Frommer WB. A never ending race for new and improved fluorescent proteins [J]. BMC Biol, 2012(10): 39.
- [18] Nienhaus K, Nienhaus GU. Chromophore photophysics and dynamics in fluorescent proteins of the gfp family [J]. J Phys Condens Matter, 2016, 28(44): 443001.
- [19] Seo PW, Jo ES, You SH, et al. Structure-guided generation of a redox-independent blue fluorescent protein from mbfp [J]. J Mol Biol, 2019, 431(17): 3191-3202.
- [20] Watabe T, Terai K, Sumiyama K, et al. Booster, a red-shifted genetically encoded forster resonance energy transfer (fret) biosensor compatible with cyan fluorescent protein/yellow fluorescent protein-based fret biosensors and blue light-responsive optogenetic tools [J]. ACS Sens, 2020, 5(3): 719-730.
- [21] Hinz AJ, Stenzler B, Poulain AJ. Golden gate assembly of aerobic and anaerobic microbial bioreporters [J]. Appl Environ Microbiol, 2021: AEM0148521.
- [22] 王飞, 杨海涛, 王泽方. 红色荧光蛋白的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 32-47.
- [23] Mishin AS, Belousov VV, Solntsev KM, et al. Novel uses of fluorescent proteins [J]. Curr Opin Chem Biol, 2015(27): 1-9.
- [24] Enterina JR, Wu L, Campbell RE. Emerging fluorescent protein technologies [J]. Curr Opin Chem Biol, 2015(27): 10-17.
- [25] Cai Y, Wang C, Chen Z, et al. Transporters hp0939, hp0497, and hp0471 participate in intrinsic multidrug resistance and biofilm formation in *Helicobacter pylori* by enhancing drug efflux [J]. Helicobacter, 2020, 25(4): e12715.
- [26] Shan Y, Lu X, Han Y, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane protein 18 (hp1125) is involved in persistent colonization by evading interferon- γ signaling [J]. Biomed Res Int, 2015(2015): 571280.
- [27] Liu H, Fan K, Li H, et al. Synthetic gene circuits enable *Escherichia coli* to use endogenous h2s as a signaling molecule for quorum sensing [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(9): 2113-2120.
- [28] Nakamura A, Park A, Nagata K, et al. Oxidative cellular damage associated with transformation of *Helicobacter pylori* from a bacillary to a coccoid form [J]. 2000, 28(11): 1611-1618.
- [29] Krzyzek P, Grande R. Transformation of into coccoid forms as a challenge for research determining activity of antimicrobial substances [J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2020, 9(3): 184.
- [30] Wen Y, Scott DR, Vagin O, et al. Measurement of internal pH in *Helicobacter pylori* by using green fluorescent protein fluorimetry [J]. J Bacteriol, 2018, 200(14): e00178-18.
- [31] Athmann C, Zeng N, Kang T, et al. Local pH elevation mediated by the intrabacterial urease of *Helicobacter pylori* cocultured with gastric cells [J]. J Clin Invest, 2000, 106(3): 339-347.

【收稿日期】 2022-02-16 【修回日期】 2022-05-07