

# NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN PROTEIN CAGA CỦA *HELICOBACTER PYLORI*

NGUYỄN THỊ THU HỒNG, NGUYỄN QUANG TRƯỜNG,  
NGUYỄN THỊ PHƯƠNG LAN, DIỆP THẾ TÀI  
Khoa Vi sinh Miễn dịch, Viện Pasteur Tp.HCM

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) được chứng minh có liên quan đến các bệnh về dạ dày-tá tràng và ung thư dạ dày. Đây là vi sinh vật thể hiện tính đa dạng sinh học cao gây khó khăn trong chẩn đoán và điều trị. Nghiên cứu về sự biểu hiện protein *cagA* tạo tiền đề cho việc phát triển phương pháp chẩn đoán nhanh và chính xác *H.pylori* cũng như phương pháp điều trị mới. **Phương pháp:** PCR được dùng trong thu nhận gen *cagA* mã hóa protein *CagA*. Kỹ thuật tạo dòng dùng để tạo dòng tái tổ hợp *E. coli*/pET-*cagA*. Biểu hiện *CagA* được cảm ứng bằng IPTG và được xác nhận bằng điện di SDS-PAGE và lai Western blot với kháng thể anti-His. **Kết quả:** Thu nhận thành công gen *cagA* với kích thước 420bp. Gen *cagA* được gắn vào plasmid pET22b tạo vector tái tổ hợp pET-*cagA* và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Cảm ứng sự biểu hiện của *CagA* bằng IPTG thu được protein đích có trọng lượng 18kDa. **Kết luận:** Protein *CagA* đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) tạo tiền đề cho những nghiên cứu mới về phương pháp chẩn đoán và điều trị *H. pylori* tại Việt Nam.

**Từ khóa:** *Helicobacter pylori*, *cagA* gene, protein.

## EXPRESSION OF *HELICOBACTER PYLORI* CagA PROTEIN

### SUMMARY

**Backgrounds:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), living in human stomach, helix-shaped gram negative bacterium, is related to digestive system and stomach cancer. This pathogen represents a highly biological variety which make difficult decision for diagnostic and treatment. Research of *CagA* protein expression is the first stage for the development of fast and accurate diagnostic methods of *H. pylori* as well as new treatments. **Methods:** Target gene was collected by PCR and cloning technique was used for construction of vector pET-*cagA*. The expression of *CagA* is induced by the IPTG and verified by SDS-PAGE, Western blot method with His-probe antibody. **Result:** Collecting success *cagA* gene with 420bp size. *CagA* gene is attached to the plasmid pET22b(+) to create recombinant vector pET-*cagA* and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Induced the expression of *CagA* protein by IPTG obtained target weight of 18kDa. **Conclusion:** *CagA* protein has been successful cloning and expression in bacterial cells *E. coli* BL21 (DE3) set the stage for further research on

methods of diagnosis and treatment of *H. pylori*.

**Key words:** : *Helicobacter pylori*, *cagA* gene, protein.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

*Helicobacter pylori* là một trong những tác nhân gây nhiễm khuẩn mạn tính phổ biến nhất trên thế giới. Các chủng *H. pylori* khác nhau có độc tính khác nhau trong quá trình gây bệnh trên người[1][2][3]. Gen *cagA* chỉ hiện diện trên khoảng 50-60% các chủng *H. pylori* thuộc các nước phương Tây và Bắc Mỹ. Tuy nhiên, tại khu vực Đông Á và Đông Nam Á gần như các chủng *H. pylori* đều mang gen *cagA*[2][4]. Đặc biệt, sự hiện diện của *H. pylori* có *cagA* dương tính thường liên quan đến những biểu hiện lâm sàng nghiêm trọng cho người bị nhiễm, nhất là đối với bệnh ung thư dạ dày[5].

*CagA* protein có trọng lượng 120kD[6] và được tiêm trực tiếp vào tế bào biểu mô thông qua hệ thống tiết số IV. Sau khi vào tế bào, *CagA* được phosphoryl hóa và kết hợp với SHP-2 tyrosine phosphatase tạo nên yếu tố đáp ứng phát triển tế bào (growth factor – like cellular) và sản xuất cytokine của tế bào ký chủ[2][4][7].

*H. pylori* là vi sinh vật thể hiện tính đa dạng sinh học cao nhờ vào quá trình đột biến, tái tổ hợp, trao đổi DNA xảy ra trong hệ gen [8][9]. Điều này đã gây khó khăn trong quá trình điều trị *H. pylori* do vi khuẩn này trở nên kháng thuốc nhanh chóng, khả năng tái nhiễm cao. Vì vậy, nhằm phục vụ cho những nghiên cứu sâu hơn về bệnh học cũng như phát triển phương thức chẩn đoán, điều trị *H. pylori* mới, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen *cagA* bảo tồn của vi khuẩn *H. pylori* và biểu hiện gen mã hóa *CagA* trong *E. coli*.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 1. Chủng vi sinh vật và plasmid

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [F- *endA1 hsdR17* (*rk- /mk-*) *supE44 thi  $\lambda$ -recA1 gyrA96*

*$\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 *lacZ  $\Delta$ M15)*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid.*

*E.coli* BL21(DE3) [F-*dcm ompT hsdSB* (*rB-mB-*) *gal met*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện protein mục tiêu dưới sự cảm ứng của IPTG.

DNA chủng vi khuẩn *H.pylori* NCTC 11637. Plasmid pET-22b do hãng Novagen cung cấp được sử dụng làm vector biểu hiện gen *cagA*. Cặp mồi dùng nhận gen *cagA* do hãng Sigma tổng hợp, và các hóa chất khác.

#### 2. Thu nhận gen mã hóa protein *CagA* bằng

### phương pháp PCR

Cặp mồi dùng cho phản ứng PCR được thiết kế và tổng hợp mang trình tự nhận biết của enzym cắt hạn chế *EcoRI* và *NotI* ở 2 đầu nhằm khuếch đại đoạn gen *cagA* dài 420 bp.

CAG F: 5'GGCGAATTCATACACCAACGCCTCCAAG 3'

CAG R: 5'AATGCGGCCGCATTGTTGCCGCTTTTGCTCTC 3'

Phản ứng PCR gồm Master mix 1X; 1,25mM MgCl<sub>2</sub>; 16mM KCl; 0,4 μM mỗi loại mồi và 2 μl DNA khuôn trong tổng thể tích phản ứng là 25 μl. Chương trình phản ứng PCR bao gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 1 bước biến tính ở 940C trong 1 phút, 1 bước bắt cặp ở 650C trong 1 phút và 1 bước kéo dài ở 720C trong 1 phút; cuối phản ứng là 1 bước kéo dài 10 phút ở 720C. Sản phẩm PCR sau đó được bảo quản ở 40C.

### 3. Thiết lập vector tạo dòng biểu hiện protein CagA

Sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng cặp enzym cắt hạn chế *EcoRI* và *NotI* sẽ được nối vào vector pET22b đã được cắt mở vòng cũng bằng hai enzym trên. Vector tái tổ hợp pET-*cagA* tạo thành

Chúng *E. coli* tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện bằng nuôi cấy lắc trong môi trường LB có bổ sung ampicillin 50μg/ml ở 370C, tốc độ lắc 250 rpm, nồng độ IPTG 1,0mM và thời gian cảm ứng là 4 giờ.

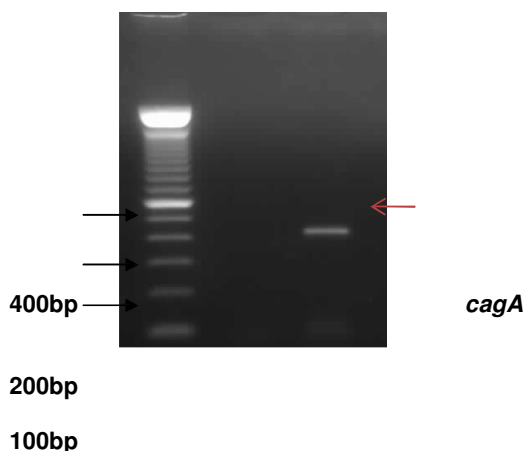
### 7. SDS-PAGE và lai Western blot

Mẫu protein được thu nhận bằng phương pháp shock nhiệt sẽ được điện di trên gel polyacrylamide 16% và so sánh kích thước với thang protein chuẩn. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai và thực hiện lai Western blot với kháng thể anti-His, sử dụng kháng thể thứ cấp anti IgG chuột-HRPO để phát hiện phản ứng chuyên biệt giữa kháng thể anti-His với chuỗi histidine.

### KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

#### 1. Thu nhận gen *cagA*

Gen *cagA* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu đã cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 420bp (**Hình 1**) tương ứng với kích thước gen *cagA* lý thuyết. Như vậy, phản ứng PCR đã khuếch đại thành công đoạn gen mã hóa cho protein CagA của vi khuẩn *H. pylori*.



được biến nạp vào *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp sử dụng CaCl<sub>2</sub> lạnh. Thể mang sản phẩm plasmid tái tổ hợp được sàng lọc và kiểm tra trước khi biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3).

### 4. Sàng lọc thể biến nạp và kiểm tra plasmid pET-*cagA*

Thể biến nạp *E. coli* DH5α/pET-*cagA* và *E. coli* BL21(DE3)/pET-*cagA* được sàng lọc trên môi trường thạch LB có bổ sung Ampicilin 50μg/ml. Thu nhận các thể biến nạp và tách plasmid bằng kit (*QIAgen*). Plasmid thu nhận được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu T7-promoter/Cag-R và phản ứng cắt với hai enzym *XbaI* và *BsaI*.

### 5. Giải trình tự và phân tích

Plasmid tái tổ hợp sẽ được giải trình tự vùng có đoạn gen được chèn bằng cặp mồi T7 promoter và Cag-R theo phương pháp Sanger cải tiến. Trình tự nucleotide thu nhận được phân tích và so sánh với trình tự lý thuyết bằng chương trình Clustal.

### 6. Điều kiện môi trường cảm ứng biểu hiện protein CagA

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR.

Giếng M: thang chuẩn DNA 100bp; giếng 1: chứng âm (H<sub>2</sub>O); giếng 2: sản phẩm PCR gen *cagA* từ *H. pylori* NCTC 11637

#### 2. Tạo vector tái tổ hợp pET-*cagA*

Sản phẩm khuếch đại gen *cagA* sau khi xử lý bằng 2 enzyme *EcoRI* và *NotI* được tinh chế và nối vào plasmid pET22b. Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α và sàng lọc bằng môi trường LB-Amp50. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch LB-Amp50 được dự đoán mang plasmid pET-*cagA* sẽ được kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn và PCR plasmid.

Hình 2. Kết quả cắt plasmid bằng enzyme cắt hạn chế.

Giếng M: thang 1kb DNA plus. Giếng 1: (chúng âm)pET22b được cắt với XbaI và BsaI. Giếng 2: plasmid pET-cagA được cắt với XbaI và BsaI

Hình 3: Kết quả PCR plasmid với cặp mồi T7-promoter/Cag-R.

Giếng M: thang DNA 100bp. Giếng 1, 2: sản phẩm PCR plasmid từ 2 dòng EC DH5α cho kết quả dương tính với PCR khuẩn lạc. Giếng 3: sản phẩm PCR plasmid pET22b

Khi 2 plasmid pET22b và pET-cagA được cắt mở vòng bằng cùng 2 enzyme XbaI và BsaI (Hình 2) thì có sự khác biệt về kích thước của các sản phẩm tạo thành. Kích thước sai khác khoảng 420bp tương ứng với kích thước gen cagA mục tiêu. Và kết quả điện di trên Hình 3 cho thấy sản phẩm PCR plasmid là vạch có kích thước xấp xỉ 600bp phù hợp với kích thước dự đoán của gen mục tiêu. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công vector tái tổ hợp pET-cagA mang gen cagA của vi khuẩn *H. pylori*.

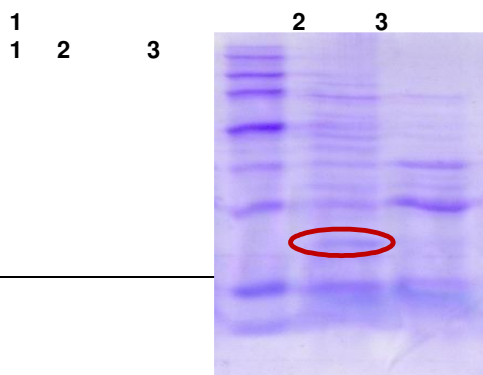
	110	120	Met:130	140	150
CagA-sequence	CGCTGCCAG	CCGGCGATGG	CCGCGATAT	CGGAATTAAT	TCGGATCCGA
cagA-protein	-----	-----	---G	GATAT	CGGAATTAAT
CagA-sequence	ATTCATACAC	CAACGCCCTCC	AAGAGTCCTG	ATAAGGGTGT	AGGCGTTTAA
cagA-protein	ATTCATACAC	CAACGCCCTCC	AAGAGTCCTG	ATAAGGGTGT	AGGCGTTTAA
CagA-sequence	AATGGCGTTT	CCCATTTAGA	CGCAGGCTTT	AGCAAGGTAG	CTGTCTTTAA
cagA-protein	AATGGCGTTT	CCCATTTAGA	CGCAGGCTTT	AGCAAGGTAG	CTGTCTTTAA
CagA-sequence	ITTGCCGTGAT	TAAATAATC	TCGCTATCAC	TAGTTTCGTA	AGGCGGAATT
cagA-protein	ITTGCCGTGAT	TAAATAATC	TCGCTATCAC	TAGTTTCGTA	AGGCGGAATT
CagA-sequence	TGGAGAAATA	ACTAGTCACT	GAAGGATTGT	CCCTACAGA	AGCTAATAAG
cagA-protein	TGGAGAAATA	ACTAGTCACT	GAAGGATTGT	CCCTACAGA	AGCTAATAAG
CagA-sequence	CTTATCAAG	ATTITTTGAG	CAGCAACAA	GAATTGTTG	GAAAGCTTT
cagA-protein	CTTATCAAG	ATTITTTGAG	CAGCAACAA	GAATTGTTG	GAAAGCTTT
CagA-sequence	AAACTTCAAT	AAGCTGTAG	CTGACGCTAA	AAACACAGCC	AACTATGATG
cagA-protein	AAACTTCAAT	AAGCTGTAG	CTGACGCTAA	AAACACAGCC	AACTATGATG
CagA-sequence	AAGTGAAAAN	AGCTCAGAAA	GATCTTGAAA	AATCTCTAAG	GAAACGGAG
cagA-protein	AAGTGAAAAN	AGCTCAGAAA	GATCTTGAAA	AATCTCTAAG	GAAACGGAG
CagA-sequence	CATTTAGAGA	AAGAAGTAGA	GAAAAAATTG	GAGAGCAAAA	GCGGCAACA
cagA-protein	CATTTAGAGA	AAGAAGTAGA	GAAAAAATTG	GAGAGCAAAA	GCGGCAACA

Hình 4. Kết quả giải trình tự

So sánh kết quả giải trình tự với trình tự lý thuyết trên cơ sở dữ liệu (Hình 4) đã khẳng định gen cagA được tạo dòng vào vector pET22b đúng khung đọc mở đảm bảo cho quá trình biểu hiện protein mục tiêu.

### 3. Biểu hiện protein CagA ở tế bào *E.coli* BL21 (DE3)

Quá trình biểu hiện CagA của dòng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3)/ pET-cagA được cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 1,0mM, điều kiện nuôi cấy lắc 250rpm, 37C trong 4 giờ.



25 kDa

a

25kDa

Hình 5.(a). Kết quả điện di SDS-PAGE. (b). Kết quả lai western blot với kháng thể anti-His.  
Giếng 1: thang protein phân tử lượng thấp. Giếng 2: *E. coli* BL21/pET-cagA được cảm ứng với IPTG ở pha nổi. Giếng 3: *E. coli* BL21/pET-cagA không được cảm ứng với IPTG ở pha nổi

Kết quả phân tích SDS-PAGE (**Hình 5a**) cho thấy giếng 2 xuất hiện một vạch protein biểu hiện vượt mức (so với đối chứng là giếng 3) nằm giữa 2 vạch 25 và 15kDa của thang chuẩn, phù hợp với kích thước dự kiến của protein dung hợp đuôi histidine là 18kDa. Và kết quả **Hình 5b** có xuất hiện vạch tủa đen của protein chứa đuôi his, và vạch này phù hợp với kích thước protein mục tiêu trên điện di SDS-PAGE (18-20kDa).

Như vậy, từ kết quả giải trình tự gen *cagA*, kết quả điện di SDS-PAGE và kết quả lai western blot với kháng thể anti-his, chúng tôi có thể khẳng định protein CagA của vi khuẩn *Helicobacter pylori* đã được biểu hiện thành công.

#### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình tạo dòng gen *cagA* vào các chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 $\alpha$  và *E.coli* BL21. Đã cảm ứng và biểu hiện thành công protein CagA trong chủng vi khuẩn *E.coli* BL21 bằng IPTG.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lorenzo F và cs., J Gastrointest Oncol, người dịch BS. Nguyễn Triền. *Ung thư dạ dày, nhiễm Helicobacter Pylori và các yếu tố nguy cơ khác*. Thời sự y học, 2011, 60.

2. Blaser MJ, Nomura A et al. *Infection with*

*Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 1995. 55(10): p. 2111-5.

3. Furuta Y, Yahara K et al. *Evolution of cagA oncogene of Helicobacter pylori through recombination*. *PLoS one*, 2011. 6(8).

4. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis*. *Cancer Sci*, 2005. 96(12): p. 835-843.

5. Konturek SJ, Bielanski W et al. *Helicobacter pylori and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation*. *J Physiol Pharmacol*, 2006. 57: p. 29-50.

6. Kusters JG, Vliet AHM, and Kuipers EJ. *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19(3): p. 449-90.

7. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Omata M. *Structure of cag pathogenicity island in Japanese Helicobacter pylori isolates*. *Gut*, 1999. 44(3): p. 336-41.

8. Salih BA, Bolek BK, Arikan S. *DNA sequence analysis of cagA 3' motifs of Helicobacter pylori strains from patients with peptic ulcer diseases*. *J Med Microbiol*, 2010. 59(Pt): p. 144-8.

9. Yilmaz O, Sen N, Küpelioğlu AA, Simşek I. *Detection of H. pylori infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients*. *WJG*, 2006. 12(33): p. 5375-8.