

幽门螺杆菌临床分离株的 REP-PCR 分析

彭颖¹, 吕建新¹, 叶嗣颖², 黄庆华²

(1. 温州医学院 细胞与分子医学研究所, 浙江 温州 325027; 2. 华中科技大学同济医学院微生物学教研室, 武汉 430030)

摘要:应用 REP-PCR 对来自 20 例单纯性胃炎和 20 例消化性溃疡病人的幽门螺杆菌菌株进行基因分型, 并运用 SAS 软件进行聚类分析。结果显示这些菌株按照基因型被分为两大类, 但两种来源的菌株在两大类中的比例无明显差异($P>0.1$), 提示幽门螺杆菌临床分离株 REP-PCR 基因型与致病性之间不存在明显相关性。

关键词:幽门螺杆菌; REP-PCR; 基因分型

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)06-0684-03

REP-PCR Analysis of *Helicobacter pylori* Clinical Strains

PENG Ying¹, LU Jian-xin¹, YE Si-ying², HUANG Qing-hua²

(1. Institute of Cellular and Molecular Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China;

2. Department of Microbiology, Tongji Medical College, Wuhan 430030, China)

Abstract: *Helicobacter pylori* strains isolated from 20 gastritis patients and 20 peptic ulcer patients was genotyped by REP-PCR and was clustered with SAS software. These strains are divided into two categories according to their genotype. But the rate of the two sources of strain in the two categories shows no apparent difference ($P>0.1$), indicating that there is no significant close relationship between the genotype and the pathogenicity.

Key words: *Helicobacter pylori*; REP-PCR; genotype

自 1983 年幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 作为一种重要致病菌被发现以来, 其基因多样性引起了人们的普遍关注。学者们使用了多种方法试图对 HP 进行基因分型, 但所有的研究都得到令人吃惊的结论: 分离自不同病人的 HP 菌具有不同的基因型。这种基因高度多样性的情况还从未在其他致病菌中发现^[1]。另一方面, 世界上有大约 50% 的人感染了 HP, 与 HP 密切相关的消化系统疾病也有多种, 包括慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌, 以及胃 B-细胞淋巴瘤^[2]。还有一部分 HP 感染病人没有任何临床表现, 也没有任何病理损伤。那么, HP 菌株之间遗传学上的差异性和它们致病性之间的差

异性是否存在着一定的相关性呢?

本文采用 REP-PCR 方法对 40 例 HP 临床株进行基因分型, 并进行聚类。在此基础上探讨这种聚类和宿主疾病之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 菌株

HP 临床株分离自华中科技大学附属同济及协和医院胃镜室, 选取分离自病理诊断为单纯性胃炎及溃疡病人的 HP 各 20 株。

1.2 主要试剂

细菌培养试剂、DNA 提取试剂、工具酶、电泳

收稿日期: 2001-12-04; 修回日期: 2002-04-22

基金项目: 卫生部科学研究基金 (No. 98-1-123) 资助

作者简介: 彭颖 (1973-), 男, 硕士, 研究方向: 分子生物学

通讯联系人: 叶嗣颖 (1955-), 男, 教授, 项目负责人, Tel: 027-83662172, E-mail: Siyingye@Hotmail.com

试剂均为华美公司产品。

PCR 试剂、引物^[7]由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列如下:

REP1R-1;3'-CGGICTACIGCIGCIII-5';

REP2-I;5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

PCR 采用该公司 TaKaRaTaq 试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 HP 的分离、培养和鉴定 参照文献[3]进行。

1.3.2 HP 总 DNA 的提取和纯化 参照文献[4]进行。

1.3.3 REP-PCR 反应 PCR 扩增体系按试剂盒说明配置,循环参数为:预变性 95℃ 5min,热启动 80℃ 2min 此时加入 Taq 酶(5U/μl)0.5μl;94℃ 30s,40℃ 1min,72℃ 3min 共 30 个循环;最后 72℃ 10min。每次反应均设置空白对照。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 反应产物 10μl

在 1% 琼脂糖凝胶中(含 EB 0.5μg/ml)进行电泳(60V, 30min),以 λDNA/EcoRI + HindIII 作为 Marker,在分析仪下成像。

1.3.5 重复性及稳定性实验 任选 5 个样本重复进行 PCR 反应。随机选取 5 株原代镜下为典型形态的 HP 进行传代,传 3~4 代后,有 2 株变为球形,分别提取原代株和传代株 DNA,进行 REP-PCR。另选金葡菌标准株 ATCC 25923 作为对照。

1.3.6 聚类分析 应用 SAS 软件计算 DJ 值并进行聚类。

2 结 果

2.1 REP-PCR 指纹图

从 PCR 产物的凝胶电泳图可看出,40 份临床标本全部得到了相应的指纹图。和其它基因分型方法一样,REP-PCR 也显示出分离自不同病人的菌株具有不同的指纹图(图 1)。

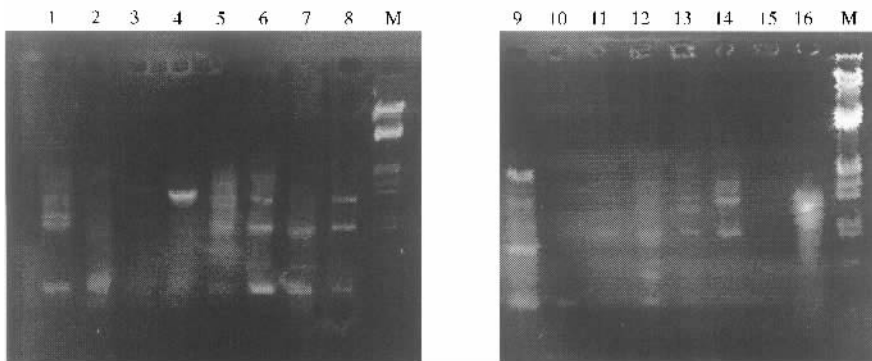


图 1 HP REP-PCR 指纹图

Fig. 1 Fingerpringting of the clinical strains

M:λDNA/EcoRI+HindIII Marker;1~14:HP 样本编号;15:空白对照;16:金葡菌标准株。

2.2 REP-PCR 指纹图的稳定性和可重复性

重复性试验显示,REP-PCR 具有良好的可重复性(图略)。REP-PCR 结果显示,原代株和传代株具有相同的 REP-PCR 图谱。可见传代对 REP-PCR 图谱无影响。

2.3 REP-PCR 图谱聚类及其与疾病关系的分析

经 SAS 软件分析,40 株 HP 的 REP-PCR 指纹图被分为两大类(图 2):

其中,第 I 类含 18 株,第 II 类含 22 株,列表如下:

	胃炎	溃疡	
I	8	10	18
II	12	10	22
	20	20	40

对以上四格表进行卡方检验($P>0.1$)。

3 讨 论

1984 年,Stern 发现,在原核生物基因组广泛存在着一种 REP(repetitive extragenic palindromic)序列,具有稳定 mRNA 的作用,能防止 3'~5' 外切

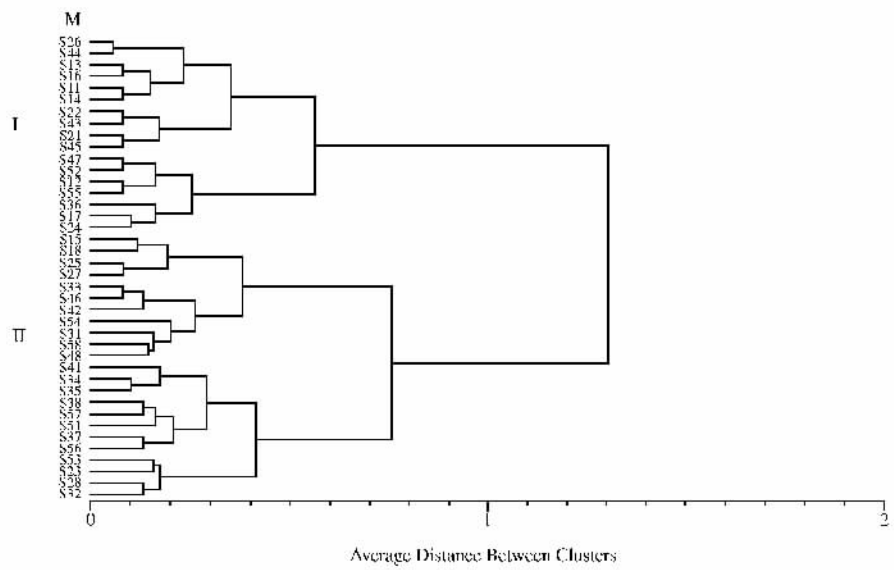


图 2 40 例 HP 临床株 REP-PCR 指纹图的聚类分

Fig. 2 Cluster analysis of REP-PCR fingerprinting of 40 HP clinical strains

酶的攻击^[5]。1991 年, Versalovic 和 Lupski 利用 REP 序列在原核生物染色体中广泛分布并具有高度保守性的特征, 根据不同原核生物 REP 序列间的共同有碱基, 设计出了一对通用引物(用次黄嘌呤“ I ”取代了保守性较差的碱基), 并发展了一种新的基因分型方法——REP-PCR^[6]。

REP-PCR 的原理类似于反向 PCR: 利用一对反向引物可扩增出两个 REP 序列之间的 DNA 片段。若以分布着大量 REP 序列的染色体 DNA 为模板, 则会产生 DNA 指纹图。所以 REP-PCR 可用于基因分型。

此外, 由于 REP 序列为“重复性基因外回文”序列, 所以和其它基因分型方法不同, REP-PCR 理论上扩增出的是完整的基因(一个或多个 ORF)片段, 而不是酶切片段或随机片段。如果说以往的基因分型方法产生的是细菌的 DNA 或染色体指纹图, 那么 REP-PCR 产生的则可称为基因组指纹图。所以, REP-PCR 理论上可称为“原核生物的差异显示法(DD, different display)”。

本实验结果显示, HP 的 REP-PCR 基因分型与致病性之间不存在明显相关性。其原因可能有两个: ①本来存在着这种相关性, 但由于 REP-PCR 方法的局限, 显示不出来。② HP 所致疾病的差异是由宿主因素(如免疫力)所决定的, HP 只在感染

初期起作用, 并且这种作用对于所有菌株来讲都是类似的。究竟是哪种原因, 尚需进一步完善 REP-PCR 的方法(如与长片段 PCR 相结合)及与其它分型方法相对照才能得出较为客观的答案。

尽管如此, 从本实验仍可看出 REP-PCR 用于 HP 的基因分型具有良好的稳定性、重复性和灵敏性。同时, 它也不失为一种初步筛选 HP 特殊基因片段(如致癌相关片段、耐药相关片段)的良好方法。

参考文献(References):

- [1] Logan R P H, Berg D E. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*[J]. Lancet, 1996, 384: 1462~1463.
- [2] Taylor D E, Blaser M J. The epidemiology of *Helicobacter pylori*[J]. Infection Epidemiol Rev, 1991, 13: 42~57.
- [3] 黄庆华, 佟素香, 廖芳, 等. 幽门螺杆菌分离培养技术的改进[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30: 145~147.
- [4] 姜泊, 张亚历, 周殿义. 分子生物学常用实验方法(第二版)[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997, 107.
- [5] Stern M J, Ames G F L. Repetitive extragenic palindromic sequence: a major component of the bacterial genome[J]. Cell, 1984, 37: 1015~1026.
- [6] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R, et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acid Res, 1991, 19: 6823~6831.