

医学研究

幽门螺杆菌 *hpaA* 基因 RFLP 研究\*

洪 愉 邹全明\*\* 毛旭虎 井申荣

(第三军医大学医学检验系临床微生物和免疫学教研室 重庆 400038)

摘要: 用限制性片段长度多态性 (RFLP) 的方法评价幽门螺杆菌不同菌株鞭毛粘附素基因 (*hpaA*) 的变异性。PCR 扩增 9 株幽门螺杆菌 710bp 的 *hpaA* 基因, 用 *Hha* I、*Hae* III 限制性内切酶对该基因片段进行酶切分析。*hpaA* 基因 *Hae* III 单酶切可见 4 种带型, *Hha* I 单酶切出现 5 种带型。从临床分离的 *H. pylori* 菌株 *hpaA* RFLP 互有差异, 且不同于国际标准菌株; 临床分离株感染动物后分离得到的动物适应株其 *hpaA* 基因也发生了变异。不同 *H. pylori* 菌株间 *hpaA* 基因表现出明显的多态性, 为开展 *H. pylori* 的分子流行病学调查提供了一种有效的方法。

关键词: 幽门螺杆菌, 粘附素, *hpaA*, RFLP

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 03-0042-04

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) OF ADHESIN GENE *HPAA* FROM DIFFERENT *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS

HONG Yu ZOU Quan-Ming MAO Xu-Hu JING Shen-Rong

(Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: To assess the variability of adhesin gene *hpaA* in different *H. pylori* strains with PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). A 710-bp gene *hpaA*, obtained from 9 different *H. pylori* strains, were digested by *Hha* I and *Hae* III individually and analyzed by agarose gel electrophoresis. Four different polymorphic types were found in *hpaA* digested with *Hae* III and five types with *Hha* I. Clinical isolates of *H. pylori* from Chongqing showed difference among them and remarkably distinguished from foreign standard strains. Mongolia gerbil adapted *H. pylori* strain, which were obtained from Mongolia gerbil infected with clinical isolate, also showed inconsistency in *hpaA* RFLP. The *hpaA* gene from different *H. pylori* strains revealed 1-variability, and this might provide an effective method for developing molecular epidemiology of *H. pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*, Adhesin, *hpaA*, RFLP

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种参与多种胃十二指肠疾病的重要人类病原体, 可引起慢性胃炎和消化性溃疡, 并与胃癌密切相关, 对人类健康构成严重危害。目前, 该菌的传染源、传播途径及治愈后复发的原因尚未完全阐明, 由于 *H. pylori* 的表型特征, 如生物学特性、表面抗原等无明显差异, 因而传统分型方法不适用于该菌, 随着分子生物学的发展及新技术的应用, 细菌分类和流行病学研究已由表型特征的鉴别深入到基因特征的鉴定。近年来, 国外采用了多种分子生物学方法对

\* 国家重点科技攻关计划项目 (No. 96-901-01-54)

“863”生物与现代农业技术领域生物工程技术主题课题 (No. 2001AA215161)

\*\* 联系人 Tel: (023) 68752316, E-mail: clinimmu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2002-07-29, 修回日期: 2003-01-06

*H. pylori* 进行分型取得了很大进展。建立准确有效的分型方法, 不仅可以从分子水平区分 *H. pylori* 菌株, 比较不同来源 *H. pylori* 菌株的相似性, 追踪传染源, 研究传播途径, 还可以开展 *H. pylori* 的分子流行病学调查, 探讨其分布状况和流行规律等。

本研究采用 PCR 技术分别从 *H. pylori* 的 2 株标准菌株、4 株临床分离株以及 3 株动物适应株克隆 710bp 的 *hpaA* 基因, 选择限制性内切酶 *Hha*I、*Hae*III 分别对该目的片段进行酶切, 并对其 RFLP 进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 *H. pylori* 菌种选择

9 株 *H. pylori* 菌株分别为标准菌株 NCTC11637、SS1; 临床分离株 CCS9803、CCS9809、CCS9810、CCS9813, 其中 CCS9809 分离自十二指肠溃疡病人的活检样本, CCS9803、CCS9810、CCS9813 分离自胃炎及胃溃疡病人活检样本; 动物适应株: 由临床分离株 CCS9803 感染蒙古沙鼠分离培养胃粘膜标本得到动物适应株第一代 (简称 M1 株), 依次传代得到动物适应株第九代 (简称 M9 株)。

### 1.2 主要试剂

Ex-Taq 酶、*Hha*I、*Hae*III、*Nco*I、*Xho*I、*Bam*H I、DNA marker、pMD-18 载体购自大连 Takara 公司, 质粒抽提试剂盒、DNA 片段胶回收试剂盒购自 Omega 公司。

### 1.3 PCR

上游引物 ( $P_7$ ): 5'-ccatgggcagcccgcatattatt-3'; 含 *Nco*I 酶切位点, 下游引物 ( $P_4$ ): 5'-ctcagtgctgttttttcc-3', 含 *Xho*I 酶切位点, 以 *H. Pylori* 基因组为模板扩增 *hpaA* 基因。

### 1.4 目的片段获取

回收 PCR 产物中 710bp 片段, 连接于 pMD-18 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 抽提质粒, 用 *Nco*I、*Xho*I 双酶切鉴定后回收小片段 (710bp) 做 RFLP 分析。

### 1.5 RFLP

选择 *Hae*III 和 *Hha*I 对 *hpaA* 基因进行 RFLP 分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 结果

PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 在 710bp 处可见目的片段 (如图 1 所示), 与设计结果吻合。

### 2.2 TA 阳性克隆鉴定

图 2 示 pMD-18-*hpaA* 阳性克隆 *Nco*I、*Xho*I 双酶切电泳结果, 可见于 710bp 处出现目的片段, 载体片段大小与 pMD-18 载体 *Bam*H I 单酶切相同。回收目的片段。

### 2.3 RFLP 结果

*Hae*III 和 *Hha*I 分别单酶切 710bp *hpaA* 基因 (图 3)。由图可见, *Hae*III 单酶切见 4 种带型, *Hha*I 单酶切见 5 种带型, 可将 9

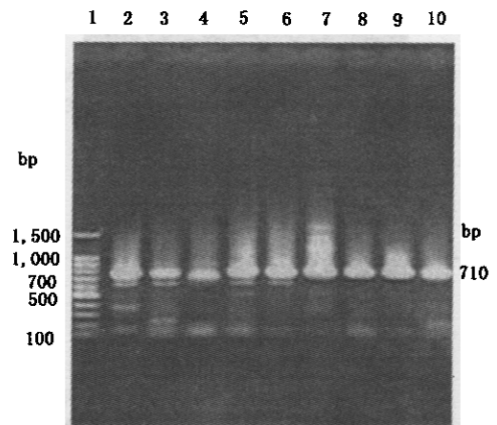


图 1 不同菌株 PCR 扩增结果  
1 100bp DNA ladder marker,  
2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 NCTC11637, SS1,  
CCS9803, CCS9813, M1, M3, M9, CCS9809, CCS9810

种菌株分成5组(表1)。

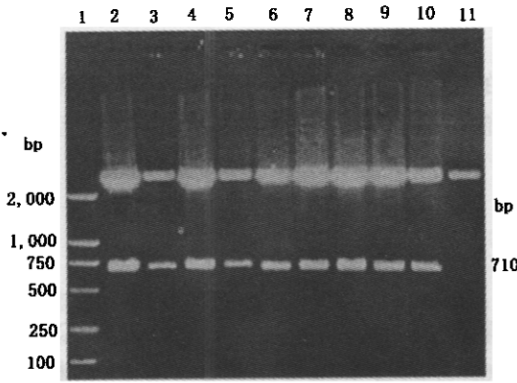


图2 pMD-18-*hpaA* *Nco* I、*Xho* I 双酶切

1 DNA marker DL 2, 000, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 NCTC11637, SS1, CCS9803, CCS9813, M1, M3, M9, CCS9809, CCS9810, 11 pMD18 digested with *Bam*HI

### 3 讨论

细菌与宿主细胞的特异性粘附是由粘附素-受体系统介导的,通常这种粘附作用依赖于粘附分子上某些特定氨基酸位点与受体的结合。*H. pylori* 感染最基本的条件之一是粘附定居,能在胃内定植是 *H. pylori* 致病的前提,而粘附则是定植的关键<sup>[1-3]</sup>,其定居因素包括活动力、尿素酶活性和粘附素等。*H. pylori* 与胃上皮细胞间的粘附力很强,具有组织特异性、宿主特异性及明显的部位特异性。此外,不同 *H. pylori* 菌株在粘附同一胃粘膜组织时表现出明显的差异,提示 *H. pylori* 与宿主间存在着复杂的粘

表1 9株 *H. pylori* 菌株 *hpaA* 基因 *Hha* I、*Hae* III 单酶切

组别	菌株	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I
I	NCTC11637、SS1	108、602	122、173、415
II	CCS9809	108、602	40、80、180、410
III	CCS9810	120、280、310	80、180、450
IV	CCS9803	280、430	50、120、260、280
V	CCS9813、M1、M3、M9	110、120、180、300	120、260、330

附素和受体系统。早在1988年,Evans等<sup>[4,5]</sup>就发现 *H. pylori* 上存在的N-乙酰神经氨酰乳糖结合原纤维血凝素(NLBH, *HpaA*)是 *H. pylori* 的主要粘附素之一,可与胃粘膜上皮细胞上的特异性受体如神经节苷脂(GM3)、硫酸脑苷脂(SLC)及层粘蛋白上的涎酸乳

糖成分结合,使 *H. pylori* 紧密粘附于胃上皮细胞,从而进一步发挥其对胃粘膜的损伤作用<sup>[6-8]</sup>。

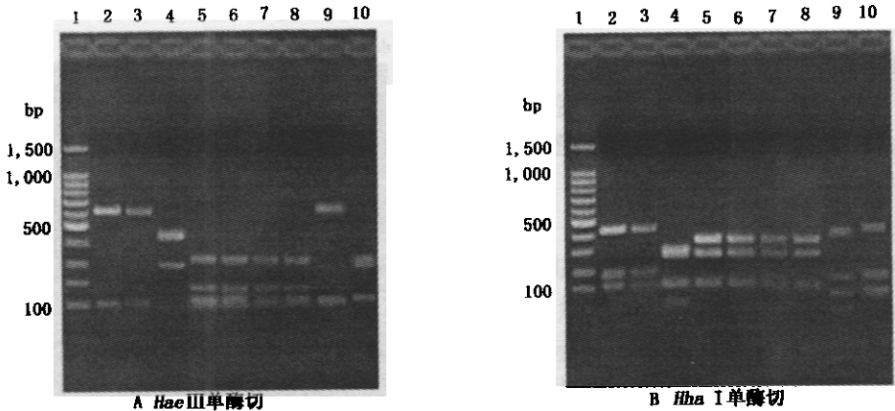


图3 9种不同 *H. pylori* 菌株 710bp-*hpaA* 酶切片凝胶电泳

A fragments of 710bp-*hpaA* digested with *Hae* III, B fragments of 710bp-*hpaA* digested with *Hha* I

1 100bp DNA ladder marker, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 NCTC11637, SS1, CCS9803, CCS9813, M1, M3, M9, CCS9809, CCS9810

Dolores G等采用 *Sau3A*、*Hin*Ⅰ限制性内切酶对 *hpaA* 中 375bp PCR 扩增产物进行酶切分析后发现,从 50 例胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡病人中分离的 *H. pylori* 的 *hpaA* 基因存在 7 种多态性,经测序证明 *hpaA* 碱基序列存在 10% 的变异,但由此所推定的氨基酸序列变异程度较小,而且这种变异并不影响 *HpaA* 蛋白的功能和抗原性。

本研究挑选 *H. pylori* 标准菌株、临床分离株和动物适应株共 9 株,扩增了长 710bp 的 *hpaA* 基因,选择 *Hha*I、*Hae*Ⅲ两种限制性内切酶进行 *hpaA* RFLP 分析,结果显示 *Hae*Ⅲ单酶切见 4 种带型,*Hha*I 单酶切呈现 5 种带型,可将 9 株 *H. pylori* 菌株分成 5 组,即 NCTC11637、SS1; CCS9809; CCS9810; CCS9803 和 CCS9813、M1、M3、M9。NCTC11637、SS1 为国际标准菌株,两者之间酶切带型完全相同并与 GenBank 的检索结果一致,国内临床分离株 CCS9810、CCS9813、CCS9803 各自具有独特的酶切带型且不同于国外菌株,CCS9809 *Hae*Ⅲ单酶切带型与 NCTC11637、SS1 相同,而 *Hha*I 酶切带型则不与任何其他菌株相同,说明:①国内外 *H. pylori* 菌株 *hpaA* 基因存在一定的多态性;②来自不同胃肠疾病的 *H. pylori* 国内临床分离株之间 *hpaA* 基因在 *Hha*I、*Hae*Ⅲ限制性内切酶所识别的碱基位点上也存在差异。由此可见, *hpaA* 基因在核酸水平上存在比较丰富的多态性。

在感染动物模型的建立过程中,为了利于 *H. pylori* 在胃粘膜的顺利定植, M1 至 M8 菌株在感染前均用药物预处理致沙鼠胃粘膜损伤,再灌喂活菌,定植后于体外分离培养获得,而 M9 株是未经任何药物预处理直接灌喂活菌获得,提示 *H. pylori* 在连续感染过程中,定植沙鼠胃粘膜的能力越来越强。另外,3 株动物适应株之间 *hpaA* RFLP 带型完全一致,却明显异于 CCS9803 菌,可能是 *H. pylori* 为更好地适应不同宿主所产生的变异。临床分离的 CCS9813 菌株 *Hha*I、*Hae*Ⅲ的 RFLP 带型与动物适应株相同,推测 CCS9813 可能源于动物。

综上所述, *H. pylori hpaA* 基因 *Hha*I、*Hae*Ⅲ的 RFLP 分析为我们提供了一种从分子水平区分 *H. pylori* 菌株、研究其传播途径的手段,通过对不同菌株 RFLP 相似性分析可以调查 *H. pylori* 的分子流行病学、探讨其分布状况和流行规律。

### 参 考 文 献

- [1] Valkonen K H, Wadstron T, Maran A P, et al. *Infect Immun*, 1997, 65: 916 ~ 923.
- [2] Mobley H L T. *Gastroenterology*, 1997, 113: S21 ~ S28.
- [3] Chow J Y C, Ma L, Cho C. *World J Gastroentero*, 1998, 4: 467 ~ 468.
- [4] Evans D G, Karjalainen T K, Evans D J J R, et al. *J Bacteriol*, 1993, 175: 674 ~ 683.
- [5] Evans D G, Evans D J J R, Moulds T J, et al. *Infect Immun*, 1998, 56: 2896 ~ 2906.
- [6] Evans D G, Evans D J J R, Lampert H C, et al. *Am J Gastroenterol*, 1995, 90 (8): 1282.
- [7] Paul W, Otoole H. *Bacteriology*, 1995, 11: 6049 ~ 6057.
- [8] Talor N J, Zinsmeister A R, Weaver A, et al. *J Natl Cancer Inst*, 1991, 83: 1771 ~ 1776.