

随机扩增多态性 DNA 分析法在幽门螺杆菌鉴定中的应用^{*}

胡素侠¹, 杨立新², 程龙强¹, 蔡霞¹, 张荣波^{3△} (安徽省淮南市第一人民医院: 1. 检验科; 2. 耳鼻喉科 232001; 3. 安徽理工大学分子免疫实验室, 安徽淮南 232001)

【摘要】 目的 探讨随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析法在幽门螺杆菌(HP)菌株鉴定中的应用价值。**方法** 选取该院 65 例 HP 感染的慢性胃炎或消化性溃疡患者, 获取胃窦、胃体部黏膜进行 HP 培养, 提取及纯化 HP DNA 后进行 PCR 反应, 并采用 RAPD 分析 HP 基因指纹图谱; 以同一 HP 菌株验证 RAPD 可重复性; 65 例患者均进行 6 个月以上的 HP 治疗, 治疗后 4~6 周评估 HP 治愈情况; 对复发病例再次进行 RAPD 分析, 观察 RAPD 指纹图谱变化。**结果** 65 株菌株 PAPD 指纹图谱各不相同, 但同一菌株传 4 代后, 原代株与传代株进行 PCR 扩增, RAPD 指纹图谱完全一致。6 例 HP 治疗后复发, 3 例 RAPD 指纹图谱与治疗前基本一致; 3 例产生不同 RAPD 指纹图谱。**结论** RAPD 分析法适用于 HP 基因多态性鉴定, 是临床研究 HP 感染的实用方法, 可用于 HP 复发和再感染鉴定。

【关键词】 幽门螺杆菌; 随机扩增多态性 DNA; 菌株; 基因多态性

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 12. 013 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)12-1623-02

Application of random amplified polymorphic DNA analysis in the identification of *Helicobacter pylori* strains HU Su-xia¹, YANG Li-xin², CHENG Long-qiang¹, CAI Xia¹, ZHANG Rong-bo^{3△} (1. Department of clinical laborator; 2. Department of ENT, Huainan First People's Hospital, Huainan, Anhui 232001, China; 3. Molecular and Immunological Laboratory of Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001, China)

【Abstract】 Objective To investigate application value of random amplified polymorphic DNA analysis in the identification of HP. **Methods** 65 patients with peptic ulcer or chronic gastritis, which confirm as HP infection, get or get gastric body mucosa carried HP culture, after HP DNA extraction and purification, and analysis using HP RAPD genetic fingerprinting; strains of the same HP RAPD verify repeatability, 65 patients underwent six months or more HP eradication therapy, assess the situation Hp eradication 4-6 weeks after treatment; recurrence again on RAPD analysis, the changes of RAPD fingerprint were observed. **Results** 65 strains PAPD fingerprints are different, but RAPD fingerprints of the original generation plants and extend the plant after 4 passages is same. Three cases is consistant in RAPD fingerprinting before and after treatment, 3 cases have different RAPD fingerprints in six cases of relapse after HP eradication. **Conclusion** RAPD analysis of genetic polymorphisms identified for HP, is a useful tool for clinical studies, it can be used to identify HP relapse and reinfection.

【Key words】 helicobacter pylori; random amplified polymorphic DNA; strains; gene polymorphism

幽门螺杆菌(HP)被认为是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等疾病的致病因素。国内外多项研究报道, 不同个体感染 HP 具有显著的基因多态性, 特定的基因类型可影响 HP 的定植、繁殖, 并引发不同的感染结局^[1]。因此, 建立一种快速、准确的 HP 菌株基因多态的鉴定、分析方法对 HP 感染个体的病情、治疗及预后具有重要意义。本研究采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析法鉴定 65 例消化道疾病患者 HP 基因类型, 建立一种快速、准确的 HP 菌株鉴定方法, 为 HP 感染胃肠道疾病的诊治提供参考。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 65 例均为 2011 年 1 月至 2013 年 12 月在该院消化内科经快速尿素酶试纸(珠海市克迪科技公司生产)检测为 HP 阳性的患者, 并且胃镜检查及病理学检查确诊慢性胃炎 41

例、消化性溃疡 23 例, 均符合《实用消化病学》中相关诊断标准^[2]。其中男性 38 例, 女性 27 例; 年龄 36~65 岁, 平均年龄(52.1±6.8)岁。

1.2 RAPD 分析方法

1.2.1 HP 菌株的采集、分离及培养 在电子胃镜下采集患者胃窦、胃体部黏膜组织, 接种于选择性琼脂培养基中(北京朋利驰科技有限公司生产), 于 37℃ 微氧条件下(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)培养 3~5 d。分离菌落, 经菌落形态、涂片染色及尿素酶/氧化酶和触酶等生化反应证实为 HP 菌落。用分区划线接种法从各例菌株中分离出 10 个单克隆菌株, 并继续传代培养 2 次。

1.2.2 模板 DNA 的制备 培养 48 h 后刮取菌落, 于 PBS 中清洗 1~2 次后采用 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 提取试剂盒(德国

^{*} 基金项目: 安徽省淮南市科技计划项目(2012A01402)。

作者简介: 胡素侠, 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事分子病原生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail: zh_angrb@163.com。

QIAGEN 公司生产)提取 HP DNA, -70°C 保存备用。

1.2.3 PCR 反应条件 随机引物参照文献[3-4]设计, 5'-CCG CAG CCA A-3' 由上海捷瑞生物技术有限责任公司合成。PCR 反应总体积为 25 μL , 其中含引物 1.6 $\mu\text{mmol/L}$ 、dNTP 400 $\mu\text{mol/L}$ 、MgCl 23 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 0.5 μL 、模板 DNA 5.0 μL , 无菌双蒸水扩容至 25 μL 。反应条件: 94°C 5 min, 36°C 5 min, 72°C 5 min, 4 个循环; 94°C 1 min, 36°C 1 min, 72°C 2 min, 共 30 个循环; 72°C 10 min, 1 个循环。PCR 反应在 480Thermal cycles(美国 PE 公司生产)中进行, 每次反应均设置空白对照。

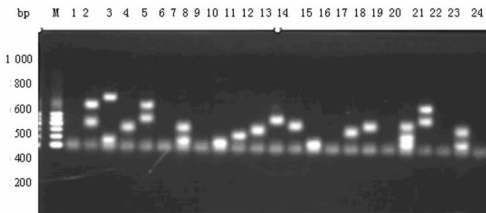
1.2.4 RAPD 指纹图谱分析 取 PCR 产物 20 μL 在含 0.5 g/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳(40V, 1 h), 用 GDS 8000 型凝胶分析仪成像观察, 比较不同菌株的指纹图谱。

1.2.5 重复性实验 随机选取 5 株来源于同一病例的菌株重复进行 PCR 产物纯化, 并选取镜下为典型形态的 HP 菌株进行传代, 传 4 代后, 将原代株与传代株 DNA 再次进行 RAPD 检测。

1.3 治疗方法 65 例患者受检后均给予奥美拉唑、泮托拉唑、西咪替丁、雷尼替丁、铋剂, 并联合抗菌药物三联或四联治疗, 持续治疗 6 个月以上。治疗结束后 4~6 周进行 ^{14}C -尿素呼气试验评估 HP 治愈情况, 获取复发患者胃窦、胃体黏膜进行 HP 分离、培养、鉴定, 并采用 RAPD 指纹分析法检测菌株来源, 方法同上。

2 结 果

2.1 RAPD 的可重复性 同一菌株传 4 代后, 原代株与传代株进行 PCR 扩增, RAPD 指纹图谱基本一致。见图 1、2。



注: M 为 DNA 标准相对分子质量标志物; 1 为空白对照组。

图 1 HP 原代菌 RAPD 指纹图谱



注: M 为 DNA 标准相对分子质量标志物; 1 为空白对照组。

图 2 HP 4 代均为 RAPD 指纹图谱



注: M 为 DNA 标准相对分子质量标志物; 1 为空白对照组。

图 3 65 株菌株 RAPD 指纹图谱

2.2 HP 菌株的 RAPD 指纹图谱 65 株菌株的 RAPD 指纹图谱具有显著差异, 提示不同病例的 HP 菌株 DNA 序列具有多态性, 可按照 RAPD 图谱的不同将其逐一区别。见图 3。

2.3 RAPD 对复发病例 HP 的鉴别 65 例患者经半年以上的治疗后, 59 例 HP 根除成功, 6 例复发。取 6 例患者 HP 基因进行 RAPD 分析发现, 3 例患者治疗前、后的菌株具有相同的指纹图谱, 证实为原菌株复发; 3 例所得图谱与治疗前所得图谱则存在明显差异, 后经证实为发生新的 HP 菌株感染。

3 讨 论

HP 是上消化道疾病的主要致病菌, 国际癌症研究中心将其列为一类致癌病原菌。HP 具有高度进化性及适应性, 每个感染 HP 的患者 HP 菌株通过遗传、重组而具备自身独特的基因组大小、顺序、遗传信息及等位基因谱。国内外研究均认为, HP 感染和胃肠道疾病的关系与 HP 菌株的毒力因素有关, 而 HP 菌株的毒力程度与其基因多态性相关[5]。因此, 准确鉴定不同 HP 感染患者的 HP 基因类型有利于治疗方案的制订。

HP 的特点决定了其不能通过表型特点来进行 HP 菌株的区分。随着分子生物学的发展, 国内外研究主要通过基因型对不同毒力的 HP 进行区分, 包括 PCR 产物的酶切分析和基因组 DNA 的限制性内切酶分析等方法, 前者需要至少 1 对 PCR 引物, 并对此 PCR 产物进行酶切分析; 后者则需要较多的 HP DNA 模板, 方法较为复杂, 花费也较大。因此, 本研究采用 RAPD 分析法对 HP 菌株进行鉴定, 建立一种 HP 基因多态性快速、准确的鉴定方法。

RAPD 分析法通过利用 8~10 bp 的随机寡核苷酸片段为引物, 对 HP 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 产物经 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离后显色, 研究 HP DNA 的多态性, 由于 HP 基因组相应片段中碱基产生缺失、突变、重排、插入等引发了扩增产物 DNA 片段的多态性。与其他方法比较, RAPD 的优势在于: (1) 只需很少的 DNA 样本。(2) 无需专门设计 RAW 反应引物, 只需随机设计长度为 8~10 个碱基的核苷酸序列即可进行分析检测。(3) 无需了解 HP 基因组的任何序列, 即使很少纯度不高的反应模板也能够检测出大量有用的信息。(4) 不受 HP 数量性状、发育情况、环境等因素影响, 可提供客观、高分辨性的 HP DNA 差异, 且能够检测重复顺序区。(5) 操作相对更为简单, 不涉及分子杂交和放射自显影等技术, 客观上减少了影响结果的外部因素。本研究中, 65 例病例 HP 菌株产生的 RAPD 指纹图谱各不相同, 说明 RAPD 分析具有很高的分辨性。Shiota 等[6]研究认为, 来自同一患者活检标本的 HP 菌株的 RAPD 带形是基本一致的, 表明同一患者胃肠道 HP 基因具有同源性。李大欢等[7]的研究也有相同发现, 对胃体和胃窦配对 HP 菌株的 RAPD 指纹图相同或高度相似, 仅 4 对菌株的指纹图有较小差异。本研究中, 65 例病例中各自不同时间进行的 RAPD 指纹图谱基本一致, 这充分证明 RAPD 分析法具有较好的重复性。

Amjad 等[8]研究报道, 多数 HP 感染患者为单一 HP 菌株感染, 治愈后一般很少复发; 但部分混合基因 HP 感染者, 由于不同 HP 菌株间耐药性存在差异, 治疗后对药物敏感的菌株根除后, 耐药株大量繁殖进而引发新的感染。本研究对 6 例复发患者, 3 例检测所得指纹图谱与治疗前所得图谱完全一致, 后经病理诊断证实为原菌株复发; 3 例所得图谱与(下转第 1627 页)

时间,善待压力,把压力看着是不可分割的一部分,学会释放压力、调整情绪,以保证健康、良好的心境;及时调整生活规律,保证充足睡眠;增加户外体育锻炼,每天保证一定的运动量。

综上所述,医护人员应更加注意劳逸结合、加强体育锻炼、合理饮食,为了加强健康管理,建议定期参加健康体检。学会适当释放压力,提高自身身体素质,减少疾病的发生率。医院方面应积极组织一些体育比赛,鼓励医护人员参加一些室外体育活动,同时要定期组织人员进行体检,定期体检,可以掌握自己身体机能状态,有针对性地进行调整,对病情做到早发现、早治疗,为提高生活质量提供必要的保证。

参考文献

[1] 邱春芳,林敏霞.某三级甲等医院职工健康体检结果分析[J].中国社会医学杂志,2009,25(5):284-286.

[2] 闫丽娜,苏便苓,李震中,等.医务人员工作倦怠、工作满意度与心理健康的关系[J].中国医疗卫生与健康,2012,2(4):204-206.

[3] 孙荣,王永红,刘正淑.健康体检满意度问卷调查结果分析与质量控制[J].重庆医学,2012,41(14):1435-1436.

[4] 张俊权,李伟,李彦昌.对医院健康体检发展方向的探讨[J].中国医院,2007,11(1):72-73.

[5] 中华医学会修订委员会.中国高血压防治指南 2005 年修

订版[M].北京:人民卫生出版社,2006:43-44.

[6] 中华医学会.中国成人血脂异常防治指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(5):390-419.

[7] 叶任高,陆再英.内科学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2004:797.

[8] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪肝病诊断标准[J].中华肝病杂志,2003,26(11):71-73.

[9] 郑永玲.某军校教师健康体检结果分析[J].吉林医学,2012,33(20):4336-4337.

[10] 孔庆滨,陈铁梅,石越.高等院校教师体检结果分析[J].中国公共卫生,2010,26(5):608-609.

[11] 武琴,刘鹏.军队某科研机构干部健康体检 128 例分析[J].中国疗养医学,2010,20(2):185-186.

[12] 刘红.三甲医院临床护士心理健康状况及工作满意度现状调查[J].齐鲁护理杂志,2011,17(18):54-56.

[13] 赵铁梅,李俊丽.某军队综合医院护士个性特征与心理健康水平调查分析[J].解放军医药杂志,2012,24(11):67-69.

(收稿日期:2013-10-24 修回日期:2013-12-22)

(上接第 1624 页)

治疗前所得图谱则存在明显差异,后经证实为发生新的 HP 菌株感染,说明 RAPD 在鉴定 HP 菌株的复发及再感染上作用明显。但是,需要看到的不足是,RAPD 对反应条件较为敏感,在某些情况下可靠性和可重复性较差,因此,要求操作者在反应操作过程中需要加强对各个反应环节的控制。

综上所述,RAPD 在 HP 菌株的分析鉴定中敏感性高,可重复性好,且更加经济、快速,可用于 HP 复发和再感染中的鉴定,只要加强对反应过程的控制,是 HP 感染临床研究中的实用方法。

参考文献

[1] 陈莫耶,宫月华,袁媛.不同胃疾病来源幽门螺杆菌菌株 PPIase 编码基因分布频率及其意义[J].世界华人消化杂志,2012,20(2):155-159.

[2] 张亚历.实用消化病学[M].北京:清华大学出版社,2009:221.

[3] Tanih NF, Millan M, Naidoo N, et al. Prevalence of helicobacter pylori vacA, cagA and iceA genotypes in south

african patient with upper gastrointestinal diseases[J]. Acta Trop,2010,116(1):68-73.

[4] Matsuda M, shiota S, Matsunari O, et al. Prevalence of two homologous genes encoding gaycosy transferases of helicobacter pylori in the unite state and Japan[J]. J Gastroenterol Hepato,2011,26(9):1451-1456.

[5] 钱明,袁君君,林雅媛.珠海市 2 840 例体检者幽门螺杆菌感染状况分析[J].检验医学与临床,2011,8(22):2709-2710.

[6] Shiota S, Watada M, Matsunari O, et al. Helicobacter pylori icaA, clinical outcome, and correlation with cagA: ameta analysis[J]. PLoS One,2012,7(1):303-354.

[7] 李大欢,刘苓,刘娅琳,等.贵州省某院幽门螺杆菌致病性的优势基因型特征[J].重庆医学,2013,42(5):504-507.

[8] Amjad N, Osman HA, Razak NA, et al. Clinical significance of helicobacter pylori cagA and iceA genotype status[J]. World J Gastroenterol,2010,16(35):4443-4447.

(收稿日期:2013-12-02 修回日期:2014-02-10)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。