

# 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法 检测幽门螺杆菌的分子流行病学研究

代敏 段广才 范清堂 郝园林 代丽萍 李倩 施侶元

本研究应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法对来自不同临床标本的幽门螺杆菌(Hp)进行分析,通过聚类分析进行基因分型,并在此基础上探讨不同基因型别的Hp与不同疾病的关系。

## 1. 材料与方法:

(1)菌株来源与培养:50株Hp菌株分离自消化道疾病行胃镜检查的患者标本(男30例,女20例);25株来自消化道溃疡患者,25株来自其他胃病患者,Hp菌株用布氏肉汤培养基、在37℃恒温、微需氧条件下培养3~4天,观察细菌形态,进行菌株鉴定,然后传代,-80℃保存。

(2)DNA制备:收集纯培养3~4天的Hp于500 μl TE (pH 8.0)中,以10 mg/ml溶菌酶,37℃消化1h,加10%SDS 60 μl和20 mg/ml蛋白酶K 6 μl,37℃过夜,加入RNase至终浓度为20 μg/ml,55℃ 20 min。以等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)和氯仿-异戊醇(24:1)各抽提2次,加1/10体积3 mol/L醋酸钠,以冷无水乙醇沉淀DNA,DNA溶于50 μl双蒸水中,-20℃保存。

(3)PCR-RFLP分析:分别对ureB和htrA两个基因进行PCR-RFLP分析,ureB引物:引物1(1 020~109) 5'-GAA CAT GAC TAC ACC AT-3';引物2(1 020~110) 5'-TGG TTT GAG GGC GAA TC-3';htrA引物:引物3(1 213~128) 5'-AAT TTT ATA AGT GGC GGT G-3';引物4(1 213~129) 5'-TGG TTA AAA TCC GCA ACG C-3'。PCR扩增体系:总体积为50 μl,含基因组DNA 2 μl(10~20 ng),1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,引物各25 pmol/L,1 U Taq DNA聚合酶,4种dNTPs的浓度均为250 μmol/L,双蒸水空白做阴性对照。PCR扩增条件为:先以95℃ 5 min,而后94℃ 30 s,50℃ 1 min,72℃ 2 min,ureB扩增35个循环(htrA扩增40个循环),最后72℃ 10 min(T-gradient PCR扩增仪)。PCR扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳,有目的条带者进一步做酶切。PCR产物酶切:根据DNAsis软件酶切位点分析结果,分别选用Sau3A I和Hpa II酶切ureB PCR扩增产物,cfb I和Hpa II酶切htrA PCR产物。各酶切体系总体积为20 μl,其中10×buffer 2.0 μl,PCR产物10 μl,酶1.0 μl,ddH<sub>2</sub>O 7 μl。37℃水浴3h,65℃灭活20 min。然后用2%琼脂糖凝胶进行电泳,记录每株Hp扩增产物的条带数及条带分子量。

基金项目:河南省医学科技创新人才基金(2000-84);河南省分子医学重点学科开放实验室资助项目

作者单位:450052 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室(代敏、段广才、郝园林、代丽萍、李倩);河南省分子医学重点学科开放实

验室(范清堂);华中科技大学同济医学院流行病学教研室(施侶元)

(4)统计学分析:将上述结果中单个基因的所有分子量的条带作为变量,分别输入SPSS 10.0软件的数据库中,并进行聚类分析。然后将两个基因的分析结果综合到一个数据库中,进行综合聚类分析。

## 2. 结果:

(1)ureB基因的PCR-RFLP分析:部分菌株的酶切图谱完全一致,也有部分菌株的酶切图谱不同。50株Hp可分为三个基因型别(I型、II型和III型),该三个基因型别在溃疡组和非溃疡组中的比例分别为:溃疡组6/25、14/25、5/25;非溃疡组6/25、11/25、8/25;I、II、III型在溃疡组和非溃疡组中的比例差异无显著性( $P>0.05$ ),不能说明不同基因型别的Hp与不同的疾病结局有关。

(2)htrA基因的PCR-RFLP分析:大部分菌株的酶切图谱不同,由聚类分析可将50株Hp分为四个基因型别(I型、II型、III型和IV型),该四个基因型别在溃疡组和非溃疡组中的比例分别为:溃疡组8/25、7/25、1/25、9/25;非溃疡组14/25、3/25、2/25、6/25。该四个基因型别在溃疡组和非溃疡组中的比例差异无显著性( $P>0.05$ ),也不能说明不同基因型别的Hp与不同的疾病结局有关。

(3)PCR-RFLP的综合分析:将上述两个基因的PCR-RFLP图谱量化结果综合到一个数据库中进行聚类分析。结果表明,50株Hp可分为四个基因型别,分别为I、II、III、IV型。此四个基因型别与不同疾病的关系为:溃疡组I~IV型分别为5、4、3、13株,非溃疡组I~IV型分别为14、4、1、6。I型在非溃疡组较多,IV型在溃疡组中较多,溃疡组和非溃疡组间差异有显著性,说明不同基因型别的Hp与不同的疾病结局有关,其中IV型与溃疡有关。

3. 讨论:本课题采用PCR-RFLP法对两个基因(ureB、htrA)的分析结果显示,单个基因的分型结果均未能提示Hp基因型别与不同疾病结局相关( $P>0.05$ ),但两个基因的综合分析结果则可将50株Hp分为四个基因型别,该四个基因型别在溃疡组和非溃疡组中的比例不同,其中IV型在溃疡组明显比例高,而I型在非溃疡组较高,两组差异有显著性( $P=0.044$ )。该结果从多基因水平说明了不同Hp基因型别确实与不同的疾病结局有关,其中IV型与溃疡有关。同时也说明对于Hp来说,多基因性状数值分类法的分型效率高于单基因数值分类法,这为建立Hp多基因的数值分类系统打下了基础。

(收稿日期:2002-03-20)

(本文编辑:尹廉)