DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.050
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1240 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)10-1240-02

幽门螺杆菌 cagA 基因 PCR 检测方法初探

Detection of cagA gene of *Helicobacter pylori* with polymerase chain reaction

周建嫦[1],张建中[2],徐采朴[1],何利华[2],张茂俊[2],盛 涛[2],郭浩岩[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038;[2]中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所腹泻研究室,北京 102206)

提 要:目的 建立敏感性高的幽门螺杆菌菌株 cagA 基因 PCR 检测方法,为客观评价 CagA 在我国幽门螺杆菌感染致病中的作用提供基础。方法 通过分析比较 GenBank 中已知的 cagA 基因序列,设计了一对针对 cagA 基因保守序列、可扩增 297 bp 片段的PCR 引物,用PCR 方法检测幽门螺杆菌的 cagA 基因,与SDS-PAGE 检测 CagA 蛋白的结果进行比较。结果 PCR检测 82 株国内幽门螺菌杆菌的 cagA 基因,77 株为 cagA 阳性,阳性率为93.9%,SDS-PAGE 显示包括所有PCR 扩增阴性菌株在内的 74 株幽门螺杆菌均表达CagA,阳性率为 100%。PCR检测 cagA 基因的敏感性为 93.2%。结论 建立了敏感性高的幽门螺杆菌 cagA 基因 PCR检测方法。

CagA 蛋白(Cytotoxin asociated protein A)及其基因 cagA 的显著特点是具有多态性,这种多态性除可导致不同 CagA 功能和致病性差异外,还可引起不同检测方法敏感性差异,导致检出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)cagA/CagA 阳性率及评价 CagA 在 Hp 感染相关疾病中作用的误差[1~3]。不同 cagA/CagA 亚型分布的地区集中现象,更有可能引起各地菌株 cagA/CagA 阳性率的系统偏倚[4,5]。因此,建立一种敏感性高、特异性好的 cagA/CagA 检测方法,是客观评价 CagA 在幽门螺杆菌感染致病中作用的基础。我们通过比较已知 cagA 序列,找到了其中的一段保守区域,建立了 PCR 扩增该片段的 cagA 基因检测方法,研究证实具有很高的敏感性,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验用菌株及培养条件

82 株国内幽门螺杆菌菌株分离自北京、福建、香港、云南等地感染者,SS1 和 NCTC11637 株为国际标准株,均由中国幽门螺杆菌协作组菌种保藏中心提供。细菌在含 10% 羊血的幽门螺杆菌选择性培养基上,37 ℃微需氧环境下培养 3~4 d。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、pBR322/*Hae* Ⅲ小分子量 DNA 标准、SDS 购自华美生物工程公司;dNTP 购自上海生工生物工程公司;甘氨酸、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双叉丙烯酰胺及考马斯亮蓝 R250 为英国进口分装产品;低分子量蛋白质标准为中国科学院上海生物化学研究所产品。

1.3 实验方法

1.3.1 PCR 引物设计 上游(20mer):5′-GAT AGG GAT AAC AGG CAA GC-3′(NCTC11638 151);下游(20mer):5′-GGG GGT TGT ATG ATA TTT TC-3′(NCTC11638 427),通过分析比较 GenBank 中已知 cagA 基因序列,针对其保守序列设计,由上海生工生物工程公司合成并纯化。

1.3.2 PCR 扩增 cagA 基因 Hp 的 DNA 模板制备按常规方法进行。PCR 反应体系中含 6×10^4 U/L Taq DNA 聚合酶、2×10^{-3} mol/L dNTP、1×10^{-6} mol/L 引物、1 μg/L DNA 模板、1× 反应缓冲液,用灭菌三蒸水补足至 20 μl。PCR 反应程序如下:94 ℃ 预变性 5 min;随后进行94 ℃变性 1 min,54 ℃退火 1 min,72 ℃ 延伸1 min 的 35 个循环,最后于 72 ℃延伸5 min。扩增反应完毕后,取 3 μl 反应液与 2 μl 6× 溴酚蓝载样缓冲液混合,在 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml EB)中进行电泳。EAGLE EYE Ⅱ型读胶仪观察结果并照相。

1.3.3 SDS-PAGE 检测 CagA 蛋白 收集培养 3~4 d 的 Hp,用灭菌生理盐水洗涤 1 次,加入适量的 1× 蛋白加样缓冲液,使菌浓度为 10^9cfu/ml,100 ℃水浴5 min,制备蛋白样品。采用 5% 浓缩胶,10% 分离胶,120 V 恒压 2.5 h 电泳,电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸系统(pH 8.3),电泳结束后凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,EAGLE EYE Ⅱ型读胶仪观察结果并照相。

2 实验结果

2.1 PCR 检测 Hp 菌株 cagA 基因结果

82 株中国菌株中,77 株 cagA 基因阳性,其中北京菌株 23 株(23/24)、福建菌株 25 株(25/27)、香港菌株 13 株(13/13)、云南菌株 16 株(16/18)cagA 阳性。扩增产物长度为 297 bp,与预计产物长度一致,见图 1。国际标准株 SS1 和 NCTC11637 的 PCR 产物具有相同长度。

2.2 SDS-PAGE 检测 Hp 菌株 CagA 蛋白表达结果

SDS-PAGE 结果显示所有 74 株中国菌株(包括所有 PCR 扩增结果阴性的菌株)均表达 CagA,其中北京菌株 17 株、福建菌株 27 株、香港菌株 13 株、云南菌株 17 株。

2.3 PCR 检测 cagA 基因的敏感性评价

74 株 SDS-PAGE 显示表达 CagA 的国内 Hp 菌株中,PCR 可扩增出其中 69 株的 cagA 基因,敏感性为 93.2%(69/74),见表 1。

作者简介:周建嫦(1972—),女,湖南省道县人,博士,讲师,主要从事幽门螺杆菌与胃肠疾病关系及其致病机制方面的研究。电话:(023)65423260

收稿日期:2001-05-30;修回日期:2001-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

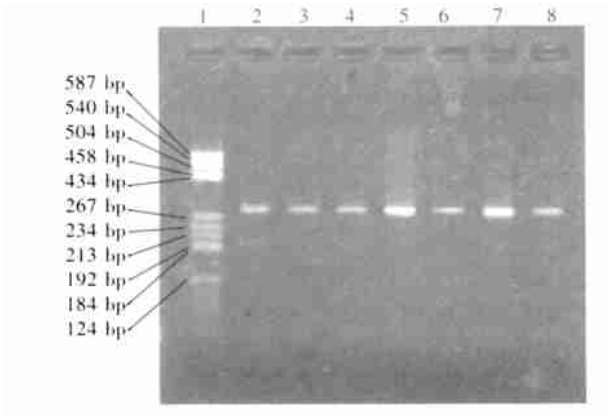


图 1　PCR 检测 cagA 基因结果(2%琼脂糖凝胶电泳)
1: pBR 322/ *Hae* Ⅲ分子量标准; 2: 阳性对照 SS1 株的 PCR 扩增产物; 3～8: 中国菌株的 PCR 扩增产物

表 1　PCR 检测 cagA 基因的敏感性

	北京	湖南	香港	云南	总计
Hp 菌株数	17	27	13	17	74
CagA$^+$ 菌株数	17	27	13	17	74
cagA$^+$菌株数	16	25	13	15	69

3　讨论

CagA 蛋白具有很强的免疫原性, 可导致感染者产生高滴度的血清和胃粘膜 CagA 抗体, 因此, ELISA 和免疫印迹杂交检测 CagA 抗体是目前判断 CagA 阳性菌株感染的常用手段。但不同菌株 CagA 抗原性多态性可造成血清学检测结果极高的假阴性。Cover 等[1] 发现, cagA$^+$菌株中, 有 4.5%的 CagA 不能被免疫血清识别。研究表明, 不同 CagA 抗原检测血清 CagA 抗体的阳性率很不一致[3,6]。Vaucher 等[7] 用 B225、B110、ATCC43579 的 CagA 作为抗原, 检测出胃癌患者血清 CagA 抗体阳性率分别为 93.3%、40%、13.3%。我们对 38 株国内菌株 CagA 抗原性分析的结果也显示, 不同 CagA 与同一 Hp 兔免疫血清反应强弱明显不同(结果待发表)。

PCR 能直接检测胃粘膜内 cagA 基因及转录产物, 可为是否存在多重感染提供直接证据, 有利于评价 cagA 与胃粘膜病理改变之间的关系。然而, 虽然有研究显示 RT-PCR 检测胃粘膜内 cagA mRNA, PCR 扩增相应分离株 cagA 基因, 与检测血清中抗体的结果基本一致[8～10], 但 Miehlke[11]、Pan[12] 和 Busolo 等[13] 的结果均提示, cagA 基因变异可导致 PCR 扩增假阴性, 尤其是同一对引物用于扩增不同地区菌株 cagA 基因时, 可能造成检测结果的系统偏倚。我们的结果显示, 与 SDS-PAGE 检测 CagA 的结果相比, 本研究中所建立的 PCR 方法扩增国内菌株 cagA 基因的敏感性达 93.2% (69/74), 提示这对引物具有极高的菌株覆盖率, 可用于分析幽门螺杆菌 cagA 基因携带情况, 研究 cagA 阳性菌株感染与疾病的关系。然而, 由于本实验 DNA 样品均来自纯培养菌株, 用这一方法检测胃粘膜标本 cagA 基因的敏感性和特异性如何, 还有待实验评估。如能推广用于检测胃粘膜标本中 cagA 基因, 则可以避免培养幽门螺杆菌所造成的分析病例数受限问题, 为评价 CagA 在 Hp 感染致病中的作用提供有效的研究手段。我们的结果还显示, 有 5 株国内菌株虽有 CagA 蛋白表达, 但 PCR 未见扩增产物, 提示我国 cagA 基因序列变异有一定复杂性, 对这几株特殊菌株 cagA 基因的序列分析, 将有助于将来设计出更为敏感的 PCR 引物。

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关基因 A; PCR
中图法分类号: R377; R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Cover T L, Glupczynski Y, Lage A P, *et al*. Serologic detection of infection with cagA$^+$ *Helicobacter pylori* strains[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(6): 1 344－1 347.
[2] 姒健敏, 高　敏, 王杭勇, 等. 幽门螺杆菌 CagA 抗体测定价值探讨[J]. 浙江医学, 1998, 20(12): 720－721.
[3] Maeda S, Yoshida H, Ogura K, *et al*. Assessment of gastric carcinoma risk associated with *Helicobacter pylori* may vary depending on the antigen used: CagA specific enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) versus commercially available *H. pylori* ELISAs[J]. Cancer, 2000, 88(7): 1 530－1 535.
[4] Yamaoka Y, Osato M S, Sepulveda A R, *et al*. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries[J]. Epidemiol Infect, 2000, 124(1): 91－96.
[5] Van der Ende A, Pan Z J, Bart A, *et al*. cagA-positive *Helicobacter pylori* populations in China and the Netherland are distinct[J]. Infect Immun, 1998, 66(5): 1 822－1 826.
[6] Yamaoka Y, Kodama T, Graham D Y, *et al*. Comparison of four serological tests to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(11): 3 433－3 434.
[7] Vaucher C, Janvier B, Nousbaum J B, *et al*. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: significance of anti-cagA antibodies[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(3): 463－467.
[8] Lage A P, Godfroid E, Fauconnier A, *et al*. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(10): 2 752－2 756.
[9] Peek R M Jr, Miller G G, Tham K T, *et al*. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(1): 28－32.
[10] van Doorn L J, Figueiredo C, Rossau R, *et al*. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(5): 1 271－1 276.
[11] Miehlke S, Kibler K, Kim J G, *et al*. Allelic variation in the cagA gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States[J]. Am J Gastroenterol, 1996, 91(7): 1 322－1 325.
[12] Pan Z J, van der Hulst R W, Feller M, *et al*. Equally high prevalences of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1 344－1 347.
[13] Busolo F, Bertollo G, Bordignon G, *et al*. Detection and characterization of *Helicobacter pylori* from patients with gastroduodenal diseases[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998, 31(4): 531－536.

(编辑　潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net