

幽门螺杆菌菌落 PCR 的优化*

刘芳^{1,2**}, 王彩霞^{1,2}, 綦廷娜^{1,2}, 吴芳草^{1,2}, 文学琴^{2,3}, 陈峥宏^{1,2***}, 崔古贞^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 基础医学院 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 通过对常规菌落 PCR 方法进行优化, 探索提高幽门螺杆菌(*H. pylori*) 菌落 PCR 扩增效率的方法。方法: 提取 *H. pylori* 26695 基因组 DNA 作为阳性对照组, 以未经任何处理的 *H. pylori* 26695 菌落作为阴性对照组, 经煮沸裂解速冻法获得的 *H. pylori* 26695 菌落作为试验组, 随机选择 8 个不同的基因(16S rDNA、*cagA-U*、*cagA-D*、*iceA*、*ureA*、*hetA*、*ropN*、*Hp0792*) 作为菌落 PCR 的候选基因进行菌落 PCR 验证, 最后以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。结果: 在选择的目标基因中, 阴性对照组未扩增出目的条带, 试验组与阳性对照组均扩增出目的相应大小的条带; 与常规菌落 PCR 比较, 煮沸速冻裂解法能显著提高 *H. pylori* 菌落 PCR 的扩增效率。结论: 煮沸速冻裂解法可用于 *H. pylori* 的高通量筛选鉴定和分子诊断。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 高通量筛选; 分子诊断技术; 煮沸速冻裂解法; 菌落 PCR

[中图分类号] R378.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0762-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.004

Optimization of Colony PCR Method for Genotyping *Helicobacter pylori*

LIU Fang^{1,2}, WANG Caixia^{1,2}, QI Tingna^{1,2}, WU Fangcao^{1,2}, WEN Xueqin^{2,3},
CHEN Zhenghong^{1,2}, CUI Guzhen^{1,2}

(1. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;
2. Key Laboratory of Medical Microbiology and Parasitology of Higher Learning of Guizhou, Guiyang 550025, Guizhou, China;
3. College of Laboratory Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To improve the PCR amplification efficiency of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonies by optimizing the conventional colony PCR method. **Methods:** The genomic DNA from *H. pylori* 26695 strain was extracted as a positive control group, and *H. pylori* 26695 colonies without any treatment were used as a negative control group. Lysates derived from boiling - freezing *H. pylori* 26695 colonies were used as experimental groups. Eight genes (16S rDNA, *cagA-U*, *cagA-D*, *iceA*, *ureA*, *hetA*, *ropN*, *Hp0792*) were randomly selected for colony PCR. PCR products were finally detected by electrophoresis on a 1% agarose gel. **Results:** Electrophoresis results show that all selected genes could be amplified in positive control and experimental group, however, it could not be amplified in negative control group. Compared to positive control group, all eight selected genes were also well-amplified in experiment group. **Conclusion:** The boiling-freezing method can be used for high-throughput screening and molecular diagnosis of *H. pylori*.

[Key words] *Helicobacter pylori*; high-throughput screening; molecular diagnosis; boiling-freezing lysis; colony PCR

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31760318, 81460314); 贵州省研究生科研基金立项项目(11348); 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2018)1132、(2019)1441]; 贵州医科大学学术新苗及创新探索项目[黔科合平台人才(2018)5779-17]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn; cuiguzhen@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0039.004.html>

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是由澳洲医师 Warren 和 Marshall 从胃黏膜组织样本中培养并分离获得的一种定植于胃黏膜上皮细胞表面的微需氧、革兰阴性螺旋杆菌^[1]。已有研究表明,慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)的主要病因与 *H. pylori* 感染相关,胃癌的发生亦与其有密切联系^[2-3]。有研究表明,*H. pylori* 的致病作用及所致疾病和进展与多种因素有关,包括细菌的毒力因子、细菌黏附与定植、宿主炎症与免疫反应、氧化应激、细胞增殖与凋亡及细菌自身的基因多态性等^[4-5]。目前诊疗指南均推荐确诊为 *H. pylori* 感染者采用质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)或(和)铋剂联合两种抗生素的三联或(和)四联疗法进行根除治疗,常用抗生素有克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑等。随着抗生素的广泛应用,*H. pylori* 对常用抗生素的耐药性日趋严重,导致 *H. pylori* 的根除效果不佳^[6],如果能明确 *H. pylori* 致病及耐药的分子机制,则有望实现精准治疗。开发快速简便的分子生物学检测方法是研究 *H. pylori* 感染机制的先决条件,菌落 PCR 检测是一种从大量样品中快速鉴定和分析目标基因型的实用方法,已应用于分子生物学的许多领域^[7-8],如基因扩增^[9]、质粒构建、菌株鉴定^[10-11]、分子诊断^[12-13]等。菌落 PCR 方法只需要少量的菌细胞,不需要使用试剂盒提取基因组 DNA 作为 PCR 反应模板,既方便又经济,已经被广泛用于细菌^[14-15]、真菌^[16-17]和微藻^[7]的鉴定。

H. pylori 生长缓慢,通常需要 3~5 d 才能形成典型的针尖状菌落,使用常规菌落 PCR 方法扩增 *H. pylori* 基因,其效率低、不稳定、重复性差。因此,为了提高 *H. pylori* 菌落 PCR 的扩增效率,本研究选择 *H. pylori* 大小不同的 8 种基因进行菌落 PCR 优化,拟在常规菌落 PCR 的基础上开发一种快速、高通量、经济且具有良好重复性的分子诊断方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、试剂及引物 *H. pylori* ATCC 26695 由山东大学病原生物学研究所馈赠,贵州医科大学微生物学教研室传代保存。无菌新鲜脱纤维绵羊血由鼎国生物技术有限公司代购,脑心浸液琼脂(brain heart infusion agar, BHI)、*H. pylori* 选择性添加剂购自英国 OXOID 公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,2 × Taq PCR Master MIX 购自北京天根生化科技有限公司,琼脂糖购自生工生物(上海)有限公司],8 对引物[16S *rDNA*^[18]、*cagA-U*(细胞毒素蛋白基因 A^[19]的上游片段)、*cagA-D*(细胞毒素蛋白基因 A 的下游片段)、*iceA*^[20-21](表皮细胞接触诱导基因 A)、*ureA*^[22-23](编码尿素酶亚基基因 A)、*hetA*(鞭毛合成相关基因)、*ropN*^[24](σ⁵⁴转录调控因子)和 *Hp0792*(Fis 家族转录调节因子)]由生工生物(上海)有限公司合成,见表 1。

表 1 8 种基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	目的片段大小(kb)
16S <i>rDNA</i>	16SrDNA-F	CTTGCTAGAGTGCTGATTA	0.55
	16SrDNA-R	TCCCACACTCTAGAATAGT	
<i>cagA-U</i>	CagA-U-F	ATCCGAACGGATCAAAAGTTC	0.9
	CagA-U-R	TTTCCCATAATCTTTGAGAGTG	
<i>cagA-D</i>	CagA-D-F	ATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGC	0.9
	CagA-D-R	CAATTTTCGCTGACAAACTAGCAG	
<i>Hp0792</i>	0792-F	ATGATTAACACGATGTTTTGC	0.7
	0792-R	CCCAGCGCTAGCGATCAAAGC	
<i>iceA</i>	IceA-F	GCTTGTAACGATAAGAAACGCCAGAT	0.3
	IceA1-R	GGAATGAGCTTGTTATTAGAGCCGAT	
<i>hetA</i>	HetA-F	GCAAATCTACATGCTCATCAC	1.6
	HetA-R	CTTCACAGCGTTCAATCGTGC	
<i>ureA</i>	UreA-F	TTTACATAGTTGTCATCGCTT	0.7
	UreA-R	GACAAAGAGCGAGCGAGCCC	
<i>ropN</i>	RopN-F	ATGGCGATCTTACGCGCAAACC	1.25
	RopN-R	TCAAGCGCGCATCAAATAGAGC	

1.1.2 主要仪器 PCR 扩增仪(日本,BIO-Rad 10213 型),琼脂糖凝胶电泳仪(北京市六一仪器制造厂,DYY-8C 型),凝胶成像分析仪(北京市六一仪器制造厂,WD-9413B 型),台式高速离心机(上海安亭,TGL-16B),超纯水机(成都艾柯,DZG-303A)。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 26695 的培养 接种 *H. pylori* 26695 于 BHI 血琼脂平板(含 10% 无菌脱纤维绵羊血),37 °C 微需氧条件(10% CO₂、5% O₂、85% N₂)培养 2~3 d。

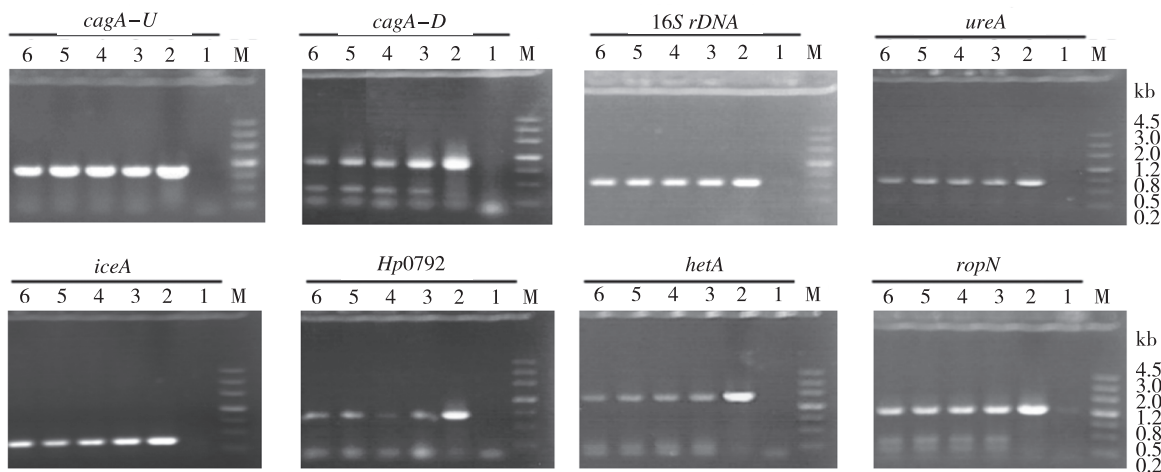
1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 用接种环刮取培养 2~3 d 的 *H. pylori* 的菌落于去离子水 100 μL 中,参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤制备基因组 DNA。PCR 反应体系为模板 DNA 0.5 μL,2 × Taq PCR Master MIX(12.5 μL),正向和反向引物(各 1.25 μL),去离子水 9.5 μL。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min 30 个循环;最后

72 °C 终延伸 5 min。

1.2.3 菌落 PCR 反应的优化 (1)将去离子水(10 μL)加入 PCR 管或 96 孔板中、使用无菌接种针或牙签从血琼脂平板上挑取培养 2~3 d 的单菌落、并重悬于去离子水中,(2)将 PCR 管或 96 孔板(含有 10 μL 幽门螺杆菌悬浮液)置于沸水中煮沸 10 s,(3)将 PCR 管或 96 孔板快速转移至冰上冷冻 5 min,(4)将正向和反向引物(各 1.25 μL)及 2 × Taq PCR Master MIX(12.5 μL)加入到 PCR 管或 96 孔板中、总反应体积为 25 μL,(5)混匀后按基因组 DNA 的 PCR 反应条件进行扩增,(6)1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。步骤如图 1。

2 结果

如图 1 所示,PCR 扩增幽门螺杆菌的 8 个基因均未显示清晰条带,阳性对照组(基因组 DNA 作为模板,泳道 2)显示单一清晰条带,试验组(菌落经煮沸裂解速冻作为模板,泳道 3~6)条带与阳性对照组一样显示单一透明条带。



注:M 为 Trans2K Plus II DNA Marker,泳道 1 为阴性对照(菌落未经任何处理),泳道 2 为阳性对照(基因组 DNA 作为模板),泳道 3~6 为试验组(菌落经煮沸裂解速冻作为模板)

图 1 菌落 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR products for colony PCR amplification

3 讨论

菌落 PCR 可从大量转化子或平板样本中方便、快速获得目标基因,是一种常规分子诊断技术。对于决大多数革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌),PCR 过程中的预变性步骤可以快速破坏细菌细胞壁,使细菌染色体释放

到胞外,从而可用于 PCR 扩增的模板;对于多数革兰氏阳性细菌(如金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌),虽然其细胞壁较厚,有多层肽聚糖组成,但 PCR 过程中预变性的高温条件仍然足以破坏其细胞壁,其染色体释放到胞外用于 PCR 扩增的模板^[25]。然而,对于多数真菌(细胞壁含几丁质、壳多糖等)和放线菌,因其特殊的细胞壁结构或生长特性,利用常规菌落 PCR 方法进行分子鉴定仍存

在一定的困难,需要对常规菌落 PCR 方法进行特定改造或优化^[26]。

尽管 *H. pylori* 属于常规的革兰氏阴性细菌,然而,常规菌落 PCR 方法在 *H. pylori* 中应用时效果不明显、稳定性较差,这可能与 *H. pylori* 的特殊生长环境(强酸环境)或特殊的细胞结构有关^[27-28],其具体原因尚不清楚。在本研究中,我们随机选择 8 个大小不同的基因,利用常规菌落 PCR 方法进行扩增,不能获得扩增条带,尽管在阴性对照组中可以看到一些基因(例如 *ropN* 或 16S *rDNA*)的模糊扩增条带,但亮度较弱不能用于进一步分析。而将 *H. pylori* 菌落进行煮沸裂解速冻后作为 PCR 模板,均可显示出与阳性对照组相似的清晰条带,表明煮沸裂解速冻法可以应用于 *H. pylori* 的菌落 PCR 扩增。

综上所述,本研究优化的菌落 PCR 技术对于 *H. pylori* 的鉴定效果较好,有助于快速进行 *H. pylori* 的高通量分类,转化体筛选和分子诊断。

4 参考文献

- [1] WARREN J R, MARSHALL B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. Lancet, 1983,1(8336):1273-1275.
- [2] SGAMBATO D, MIRANDA A, ROMANO L, et al. Gut microbiota and gastric disease[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2017,63(4):345-354.
- [3] MAKOLA D, PEURA D A, CROWE S E. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases[J]. J Clin Gastroenterol, 2007,41(6):548-558.
- [4] GENG X, LI W, CHEN Z, et al. The bifunctional enzyme SpoT is involved in the clarithromycin tolerance of *Helicobacter pylori* by upregulating the transporters HP0939, HP1017, HP0497, and HP0471[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017,61(5).
- [5] LAI C, FISCHER T, MUNROE E. Homologous recombination using bacterial artificial chromosomes[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015,2015(2):180-190.
- [6] THUNG I, ARAMIN H, VAVINSKAYA V, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016,43(4):514-533.
- [7] PACKEISER H, LIM C, BALAGURUNATHAN B, et al. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013,169(2):695-700.
- [8] YAN M, LI W, ZHOU Z, et al. Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony[J]. Microb Pathog, 2017,102:1-7.
- [9] WEISS D, ENGELMANN I, BRAUN S D, et al. A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA-48[J]. J Microbiol Methods, 2017,142:20-26.
- [10] CUI G Z, ZHANG J, HONG W, et al. Improvement of ClosTron for successive gene disruption in *Clostridium cellulolyticum* using a pyrF-based screening system[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014,98(1):313-323.
- [11] SHAHMORADI M, FARIDIFAR P, SHAPOURI R, et al. Determining the biofilm forming gene profile of *Staphylococcus aureus* clinical isolates via multiplex colony PCR method[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2019,7(2):181-188.
- [12] JAMAL M, SHARMA S P, CHUNG H J, et al. Ultra-high efficient colony PCR for high throughput screening of bacterial genes[J]. Indian J Microbiol, 2017,57(3):365-369.
- [13] WAN M, ROSENBERG J N, FARUG J, et al. An improved colony PCR procedure for genetic screening of chlorella and related microalgae[J]. Biotechnol Lett, 2011,33(8):1615-1619.
- [14] MOHR G, HONG W, ZHANG J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*[J]. PLoS One, 2013,8(7):e69032.
- [15] AZHAHIANAMBI P, GHOSH S, ASHOK K C, et al. Cost effectiveness of colony lysis and colony PCR methods for screening of recombinant *Escherichia coli* colonies a comparative study[J]. Indian J Exp Biol, 2008,46(10):731-735.
- [16] LIN X, YANG F, ZHOU Y, et al. Highly-efficient colony PCR method for red yeasts and its application to identify mutations within two leucine auxotroph mutants[J]. Yeast, 2012,29(11):467-474.
- [17] WALCH G, KNAPP M, RAINER G, et al. Colony-PCR is a rapid method for DNA amplification of hyphomycetes[J]. J Fungi (Basel), 2016,2(2):212-215.
- [18] GUO C, LIU F, ZHU L, et al. Analysis of culturable microbiota present in the stomach of children with gastric symptoms[J]. Braz J Microbiol, 2019,50(1):107-115.
- [19] CHEN S Y, ZHANG R G, DUAN G C. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced

- gastric cancer (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2016,36(6): 3087-3094.
- [20] MA Y J, DUAN G C, ZHANG R G, et al. Mutation of ice A in *Helicobacter pylori* compromised IL-8 induction from human gastric epithelial cells[J]. *J Basic Microbiol*, 2010,50(Suppl 1):83-88.
- [21] PEEK R J, THOMPSON S A, DONAHUE J P, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome[J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110(6):531-544.
- [22] ZHAO H, WU Y, XU Z, et al. Mechanistic insight into the interaction between *Helicobacter pylori* urease subunit alpha and its molecular chaperone Hsp60[J]. *Front Microbiol*, 2019,10:153.
- [23] HU L T, FOXALL P A, RUSSELL R, et al. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB[J]. *Infect Immun*, 1992,60(7):2657-2666.
- [24] TSANG J, HOOVER T R. Basal body structures differentially affect transcription of RpoN- and FliA-dependent flagellar genes in *Helicobacter pylori*[J]. *J Bacteriol*, 2015,197(11):1921-1930.
- [25] SAHIN F, KIYAN M, KARASARTOVA D, et al. A new method for the disruption of cell walls of gram-positive bacteria and mycobacteria on the point of nucleic acid extraction: sand method[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2016, 50(1):34-43.
- [26] ALSHAHNI M M, MAKIMURA K, YAMADA T, et al. Direct colony PCR of several medically important fungi using ampdirect plus[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2009,62(2): 164-167.
- [27] WANG F, MENG W, WANG B, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014,345(2):196-202.
- [28] BUGAYTSOVA J A, BJORNHAM O, CHERNOV Y A, et al. *Helicobacter pylori* adapts to chronic infection and gastric disease via pH-responsive BabA-mediated adherence[J]. *Cell Host Microbe*, 2017,21(3):376-389.
- (2019-03-15 收稿,2019-06-27 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 张启芳

(上接第 761 页)

- [20] OH-HASHI K, FURUTA E, FUJIMURA K, et al. Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in neuro2a cells[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2017, 12:40-45.
- [21] HOWDEN S, MCCOLL B, GLASER A, et al. A Cas9 variant for efficient generation of indel-free knockin or gene-corrected human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(3):508-517.
- [22] LIN S, EWEN-CAMPEN B, Ni X, et al. In vivo transcriptional activation using CRISPR-Cas9 in drosophila[J]. *Genetics*, 2015, 201(2):433-442.
- [23] YAO L, CENGIC I, ANFELT J, et al. Multiple gene repression in cyanobacteria using CRISPRi[J]. *Acs Synthetic Biology*, 2016, 5(3):1-22.
- (2019-04-21 收稿,2019-06-17 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森