

幽门螺杆菌实验室长期传代cagA启动子的进化分析

宋衍燕, 王海滨, 何利华, 张建中

宋衍燕, 王海滨, 北京市朝阳区疾病预防控制中心 北京市 100021

宋衍燕, 王海滨, 何利华, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病所 北京市 102206

作者贡献分布: 本研究由宋衍燕与张建中设计; 引物设计以及PCR扩增由宋衍燕完成; 序列分析由王海滨与宋衍燕完成; 细菌培养由何利华与宋衍燕完成; 论文写作由宋衍燕与张建中完成。

通讯作者: 张建中, 102206, 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所. helico99@sina.com

电话: 010-58900754

收稿日期: 2011-09-09 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-18

Evolution of the cagA promoter in a laboratory strain of *Helicobacter pylori* after long-term multiple subcultures

Yan-Yan Song, Hai-Bin Wang, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang

Yan-Yan Song, Hai-Bin Wang, Chaoyang District Centre for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China
Yan-Yan Song, Hai-Bin Wang, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang, Department of Infectious Disease, National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, Department of Infectious Diseases, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. helico99@sina.com

Received: 2011-09-09 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-18

Abstract

AIM: To assess the genetic stability of the cagA promoter in a laboratory strain (26695) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) after long-term multiple subcultures.

METHODS: The promoter regions in the cagA genes of 54 subclones of the *H. pylori* 26695 strain, which has been subcultured many times for a long term, were amplified. PCR products were sequenced and analyzed using Vector NTI Suite 6 software.

RESULTS: Twenty-two (40.74%) strains had identical sequence with the *H. pylori* 26695 strain, while 32 strains (59.26%) had mutations (including substitutions, deletions and insertions) at differ-

ent sites. Mutations in T17C and A199C were found in 5 (15.63%) and 14 (43.75%) strains, respectively. Both single nucleotides or dinucleotides at positions 159 and 160 were found missing in 12 (37.5%) strains, while one strain had two A insertions after position 160 in the promoter of cagA.

CONCLUSION: Subcultures can lead to mutations in the cagA promoter in *H. pylori* 26695.

Key Words: *Helicobacter pylori*; cagA promoter; Gene mutation; Evolution

Song YY, Wang HB, He LH, Zhang JZ. Evolution of the cagA promoter in a laboratory strain of *Helicobacter pylori* after long-term multiple subcultures. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(32): 3365-3369

摘要

目的: 评价实验室长期多次传代对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)标准菌株26695 cagA启动子基因稳定性的影响。

方法: PCR方法扩增54个不同批次保存的经过多次传代的*H. pylori* 26695克隆子的cagA启动子, 并进行测序, 使用Vector NTI Suite 6软件比对序列。

结果: 54个*H. pylori* 26695克隆子的cagA启动子序列有22个(40.74%)与NCBI公布的序列完全一致, 32个(59.26%)在不同位点发生碱基置换、缺失、插入等突变, 其中第17位碱基有5个(15.63%)发生T→C突变, 第199位碱基有14个(43.75%)发生A→C的变异, 在159-160重复碱基A处有12个(37.5%)发生缺失1个或者2个A, 还有一个多出2个A。

结论: 长期多次传代会导致*H. pylori* cagA启动子突变, 实验室使用标准菌株要注意传代记录, 建立不同等级实验室质控, 根据使用标准菌株研究内容的水平决定实验室质控的等级。

关键词: 幽门螺杆菌; cagA启动子; 基因突变; 进化

宋衍燕, 王海滨, 何利华, 张建中. 幽门螺杆菌实验室长期传代

■背景资料

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 26695为全基因组测序菌株, 是目前*H. pylori*研究中常用标准菌株, 在各实验室之间也被广泛交流, 但多次传代对*H. pylori* 26695的影响值得进一步探讨。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■研究前沿

*H. pylori*的致病机制尚待研究,但cagA是重要的毒力因子,且不同地域人种携带cagA阳性菌株宿主疾病的种类具有差异性。

表 1 32个*Helicobacter pylori* 26695克隆子的cagA启动子序列与NCBI公布序列比对结果

菌株编号	变异位点(bp)	菌株编号	变异位点(bp)	菌株编号	变异位点(bp)
T35	4: A→C	T6	170: A→G	33	17: C→T
T39	159-160: -2A	3,4,6,10,34	199: A→C	40	16: +C
T4	187: A→G	25,50,56,t25,t3	160: -A	T5	13: A→G
13	58: T→C	29,11,19	17: C→T	T19	19: A→G
			99: A→C		
8	7: +A	21	20: A→C	22	168: A→G
	199: A→C		166: T→G		199: A→C
T20	115: T→C	43	17: C→T	T31	160: -2A
	160: -A		160: +2A		167: T→C
5	17: C→T	35	17: C→T	51	160: -2A
	60: T→C		129: A→T	30	163: G→C
	165-6: TT→GG		131: A→C		199: A→C
	199: A→C		168: A→G		
			199: A→C		

+C, 插入1C; -A, 缺失1A; -2A, 缺失2A; A-C, A突变为C。

cagA启动子的进化分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(32): 3365-3369
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3365.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)26695是目前*H. pylori*研究中常用标准菌株,为全基因组测序菌株^[1],常作为标准株进行生物学特性以及致病机制等相关的研究^[2,3]。其在各实验室之间也被广泛交流,丁香园、螺旋网等微生物网站存在专门方便菌株质粒交流的平台。这种广泛的交流以及实验室管理不够严格等原因很容易造成传代记录不详的现象。然而,多次传代对*H. pylori* 26695的影响并不清楚,究竟有哪些基因会发生变化,以及这种变异对试验结果造成多大程度的影响,值得我们进一步研究。因此,本试验以cagA基因启动子序列为目的基因,来分析菌株在实验室长期传代后的实验室进化和稳定性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* 26695菌株,由美国华盛顿大学医学院分子生物学系惠赠,由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室保存。伯乐公司PCR仪、凝胶电泳仪、Takara和Promega公司高保真酶等分子生物学试剂、Oxoid哥伦比亚琼脂、Nu-4950E三气培养箱。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养: 分别复苏实验室内不同传代次

数的*H. pylori* 26695菌株共计54批,编号分别为t1、t2、t3、t4、t5、t6、t19、t20、t23、t25、t39、t31、t33、t35、t40、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、21、22、25、26、29、30、33、34、35、40、41、43、44、45、47、48、50、51、54、55、56、58、59、60,编号为实验中的不同克隆子的代码,无特殊意义。在哥伦比亚琼脂中加入10%脱纤维羊血(兰伯瑞公司),置5%O₂、10%CO₂、85%N₂三气培养箱中,37℃培养48 h。

1.2.2 引物的设计与合成: 根据NCBI公布的26695菌株的序列,其中579567-579921正向为cagA启动子的序列,设计引物序列。cagAQF 5'-ACGGTACCTAGAACTTCATGCACTCA-3'cagAQR 5'-CCGGATCC TGTTTCTCCTTAC-TATACC-3'扩增条件: 95℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环后72℃延伸10 min。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色成像。

1.2.3 测序及序列分析: 使用两种高保真Taq酶分别进行扩增,由六合通测序公司进行双向测序,使用Vector NTI Suite 6软件进行比对分析。

2 结果

2.1 两种酶扩增产物测序结果比对

Takara和Promega两种酶扩增结果直接测序,Vector NTI Suite 6比对结果显示完全一致,排除由于taq酶导致在扩增过程中变异的可能。

2.2 54个*H. pylori* 26695克隆子cagA启动子序列

■相关报道

*H. pylori*的cagA蛋白的表达上调胃泌素基因的表达;乙肝病毒的变异以及结核杆菌的变异导致抗原表达以及耐药性等的改变,为乙肝和结核病的防治带来更大的困难,细菌和病毒本身的进化是最重要的因素。

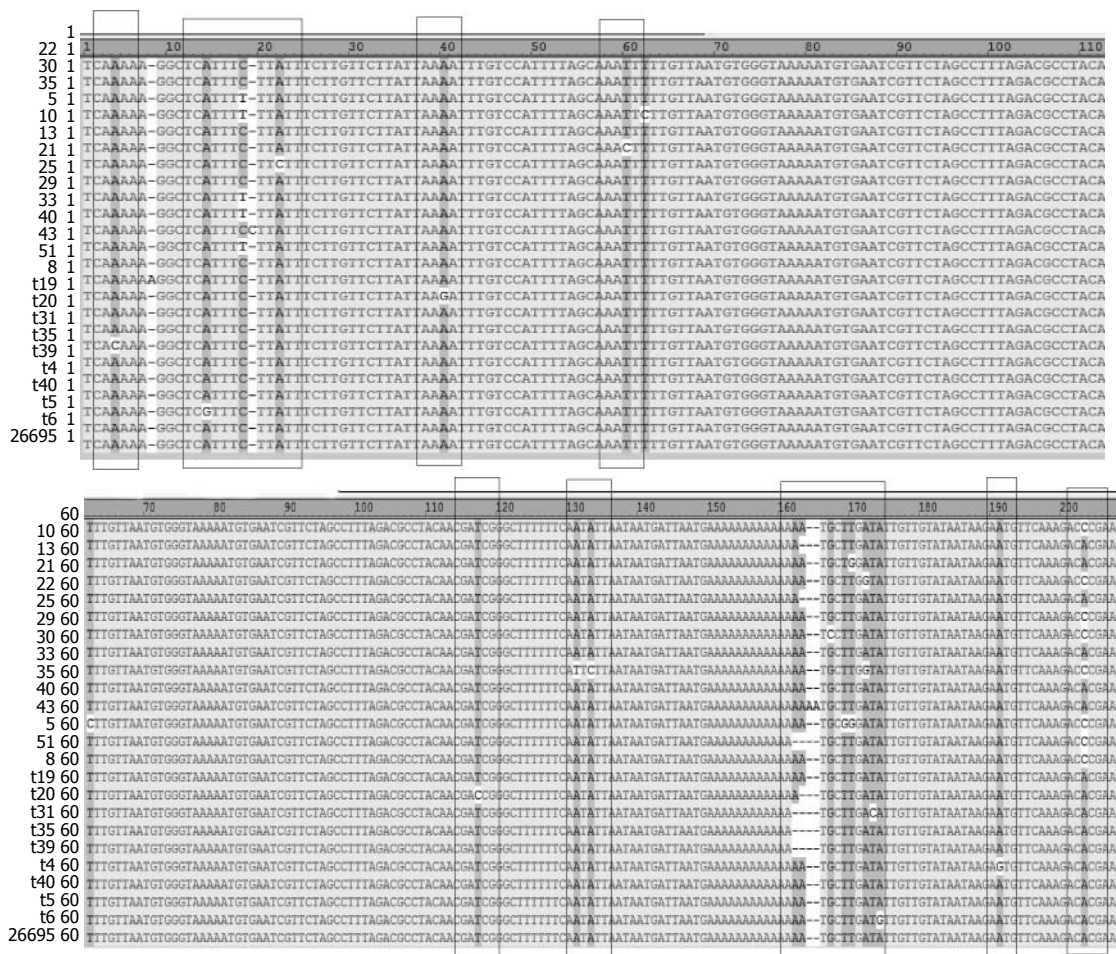


图 1 24个*Helicobacter pylori* 26695克隆子的cagA启动子序列与NCBI公布序列比对结果。

比较 多序列比对结果显示, 22(40.74%)个克隆子的启动子序列与NCBI公布的26695完全一致, 分别是2、9、12、14、15、18、26、41、44、45、47、48、54、55、58、59、60、t1、t2、t23、t33和t40, 其余32个(59.26%)克隆子在不同位点表现出不同的变异, 包括碱基置换、缺失和插入。其中25、50、56、t25、t3序列完全一致, 在第160 bp处缺失1个A; 10、3、34、4、6序列完全一致, 均在第199 bp处A→C的变异; 29、11、19完全一致, 均在第17 bp处发生C→T变异, 在第199 bp处A→C的变异。5、35发生5处碱基突变, 且均包含17 bp和199 bp处变异(表1)。

2.3 选取代表不同变异类型共计cagA启动子序列进行比对 选取代表不同变异类型共计cagA启动子序列进行比对见图1。

2.4 序列聚类分析 将54个*H. pylori* 26695克隆子的cagA启动子序列做聚类分析(图2), 编号为8、11、19、21、22、29、30、43、t20、t31的克隆子发生2处碱基变异; 5、35发生5处碱基突变, 是变异位点最多的克隆。根据聚类分析图直线

创新盘点

*H. pylori*的致病机制研究中更多的关注其毒力岛、毒力因子, 其毒力基因相关的启动子的变异有可能导致毒力因子表达和功能的改变尚未引起足够的重视。

标尺和指示距离可以显示变异的差异。

3 讨论

本研究对54个经实验室长期多次传代的*H. pylori* 26695克隆子的cagA启动子进行了PCR扩增和测序, 并与NCBI公布的原始序列进行了对比。*H. pylori* 26695常作为标准菌株作对照或实验研究标准。结果显示多次传代的菌株其cagA启动子发生了多种突变, 包括碱基缺失、置换或插入碱基, 其中17位、199位变异较多, 分别有5株和14株发生了这2个部位的变异, 但是这些菌株之间还存在其他碱基位置的差异, 说明不属于同一株菌的重复扩增结果。

从达尔文的自然选择学说可以看出, 生物在繁衍后代的过程中, 会产生各种各样可遗传的变异, 这些可遗传的变异是生物进化的原材料。现代遗传学的研究表明, 可遗传的变异主要来自突变和基因重组。突变的利弊取决于生物的生存环境。本实验室26695菌株曾被培养过的环境是脑心浸液琼脂, 哥伦比亚琼脂, 10%脱纤维

■应用要点

本文对探讨相应基因在*H. pylori*致癌的机制有着重要的意义,也为胃癌及其癌前病变防治策略提供新的理论和实验依据;标准菌株的使用必须建立起严格的质控程序,根据研究内容决定质控等级,以免菌株变异影响实验结果。

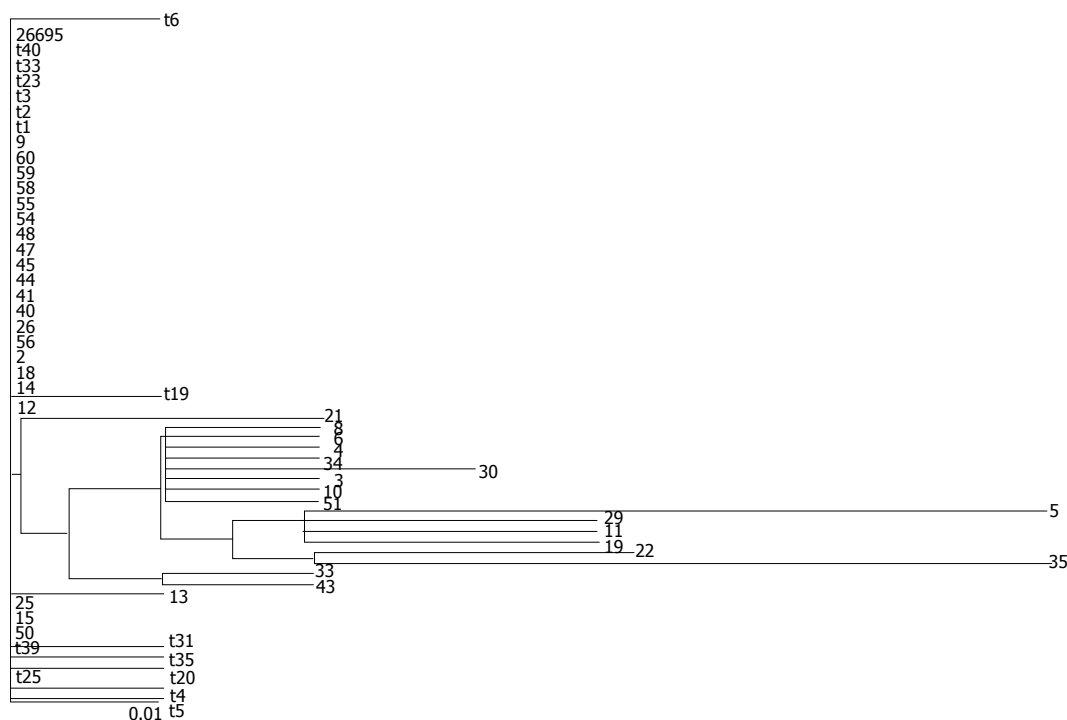


图2 54个*Helicobacter pylori* 26695克隆子的cagA启动子序列与NCBI公布序列聚类分析结果。

羊血,厌氧罐微需氧环境培养。

菌株在实验室进行培养过程中,不同培养基、气体环境会诱发不同变异,各实验室这些条件不完全相同会导致变异方向不同。基因表达存在组织特异性、细胞周期特异性和外界信号响应特异性,这些特异性都是由细胞内复杂而有序的调控机制实现的。基因转录在基因表达环节中起非常重要的作用。本实验研究的基因是*H. pylori* cagA启动子,从理论上来说启动子变异更容易引发其所调控基因转录以及蛋白功能的改变。cagA是*H. pylori*致病岛上的1个主要毒力基因^[5],启动子突变决定其相关基因转录开启或关闭,转录强弱等。cagA启动子正向25位处开始反向是cagC启动子的起始,其第4、7、8、13、16、17、19、20位碱基均有变异,其中17位碱基有15.63%变异,这些位置碱基的变异理论上不仅影响cagA也影响cagC的转录,并可能引起相应蛋白表达和功能改变。还有研究证明cagA能上调胃泌素表达^[6],可见cagA启动子的变异会引发与其基因调控以及蛋白调控相关的连锁反应,引起*H. pylori*生物学性状和功能改变。本研究中17位碱基以及199位碱基处多株菌都发生变异,其诱发因素及突变后会影响到cagA和cagC的何种功能以及引发哪些相关基因的表达等,都需进一步研究验证。很多学者^[6-9]对HBV启动子变异研究表明HBV核心区启动子变异能够

引发HBeAg表达缺失,引发免疫逃逸,在致病机制中发挥重要作用。卡介苗初始菌株和目前卡介苗的菌株基因的差异^[10]以及结核杆菌基因突变导致的耐药菌株出现^[11]都表明菌株在环境压力下的进化。亚洲人群携带菌株多为cagA阳性,但与宿主的疾病种类无明显相关^[12-15],cagA启动子的这种变异和这种现象是否有一定的关系尚待进一步研究,即cagA启动子在环境压力下的变异也可能提示一定的临床意义,*H. pylori*在人群间传播感染,可能会因人种以及个体的差异导致*H. pylori*致病基因的变异,从而使得携带同一传染源的宿主疾病的种类和进程却不一致。

本研究中*H. pylori*在环境压力下cagA启动子区域发生突变属于*H. pylori*菌进化范畴,这类进化为实验室研究带来的影响应引起高度重视。如果实验室对标准菌株管理不严格,就会导致传代次数记录不详。一旦发生变异应立即停止作为标准菌株使用,或者要根据实际情况选择。本次试验中选用的54个克隆子有59.26%发生了不同程度的变异,变异率相对较高。因此,建立实验室标准菌株不同等级质控标准,并根据研究项目内容确定质控等级是非常必要的,以确保试验数据准确性和代表性。

4 参考文献

- 1 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP,

- Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Wathley L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547
- 2 Marais A, Mendz GL, Hazell SL, Mégraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 642-674
- 3 Wen Y, Marcus EA, Matrubutham U, Gleeson MA, Scott DR, Sachs G. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003; 71: 5921-5939
- 4 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; 295: 683-686
- 5 汪苏, 周建奖, 单可人, 赵燕, 谢渊. 幽门螺杆菌毒素相关蛋白cagA上调胃泌素基因表达. *中华微生物和免疫学杂志* 2009; 29: 976-980
- 6 房继莲, 丛旭, 李若冰, 许军, Erwin Sablon, 孙焱, 王豪, 王宇, 魏来. 乙型肝炎病毒基本核心启动子及前C区突变对疾病进展的影响. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 233-235
- 7 刘悦晖, 丁静娟, 张权. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒前C区和基本核心启动子区变异检测及意义. *中华消化杂志* 2005; 25: 526-529
- 8 Li MS, Lau TC, Chan SK, Wong CH, Ng PK, Sung JJ, Chan HL, Tsui SK. The G1613A mutation in the HBV genome affects HBeAg expression and viral replication through altered core promoter activity. *PLoS One* 2011; 6: e21856
- 9 Lee SA, Kim KJ, Kim H, Kim BJ. Nucleotide change of codon 182 in the surface gene of hepatitis B virus genotype C leading to truncated surface protein is associated with progression of liver diseases. *J Hepatol* 2011; Aug 7. [Epub ahead of print]
- 10 Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284: 1520-1523
- 11 Zhang L, Ye Y, Duo L, Wang T, Song X, Lu X, Ying B, Wang L. Application of genotype MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volume laboratory in Southern China. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 2185-2192
- 12 Thjodleifsson B, Asbjörnsdóttir H, Sigurjonsdóttir RB, Gíslason D, Olafsson I, Cook E, Gíslason T, Jogi R, Janson C. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* and cagA antibodies in Iceland, Estonia and Sweden. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 683-689
- 13 朱永良, 杜勤, 钱可大, 方平楚, 郑树. 幽门螺杆菌CagA C端功能域特征及其生物学功能研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 278-281
- 14 Lazebnik LB, Tsaregorodtseva TM, Serova TI, Sokolova GN, Klishina MV, Gubina AV. [Antibodies to *Helicobacter pylori* in gastric diseases]. *Ter Arkh* 2006; 78: 15-19
- 15 Suriani R, Venturini I, Colozza M, Bona F, Cardesi E, Mazzucco D. *Helicobacter pylori* antibodies (CagA and VacA) detection. The link between cancer and infection. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2002; 48: 159-164

■同行评价

本研究探讨了实验室长期多次传代对*H. pylori*标准菌株26695 cagA启动子基因稳定性的影响, 发现长期多次传代会导致*H. pylori* cagA启动子突变, 提示菌种传代实验室质控的重要性. 文章选题准确, 内容新颖, 结果可靠.

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊). (编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)