

# 胆型螺旋杆菌(*Helicobacter bilis*) 的分离、鉴定与序列分析\*

邵伟娟 谢建云 陈鸿书 高 诚

(上海市实验动物质量监督检验站 上海 200032)

**摘 要** 鉴定分离到的微需氧菌为螺旋杆菌,并对该菌进行分型。小鼠皮下或肌肉注射地塞米松使其免疫抑制,取小鼠肠内容物培养,对分离到的细菌,经油镜、电镜观察。然后提取细菌 DNA,用根据螺旋杆菌(*Helicobacter* sp.) rRNA 保守区设计的引物 P7/P8 进行扩增,并对扩增产物分别用 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 内切酶酶切,酶切产物用 10% PAGE 分析。再用根据螺旋杆菌胆型(*H. bilis*) rRNA 设计特异引物 P7/Pb 扩增,将扩增产物测序分析。最后,将该细菌在 Scid 小鼠上作动物感染。细菌在油镜下呈鸟翼状,电镜下观察到双极鞭毛,无周质纤毛。引物 P7/P8 扩增出 374bp 的特异带,此片段能分别被 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 内切酶酶切。引物 P7/Pb 扩增出 364bp 的条带,测得的 DNA 序列中存在 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 的内切位点,与文献中 *H. bilis* 序列比较,同源率为 97.5%。动物感染试验符合 Koch 准则。分离到的细菌确为胆型螺旋杆菌。

**关键词**: 胆型螺旋杆菌,序列分析, Koch 准则

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)02-0169-05

螺旋杆菌(*Helicobacter* sp.) 为微需氧的革兰氏阴性菌,镜下呈鸟翼状、逗点状等特殊形态。目前,在分类上有 11 种型<sup>[1,2]</sup>,对啮齿类动物而言,有肝型(*H. hepaticus*)、鼠型(*H. muridarum*)和胆型(*H. bilis*)。胆型螺旋杆菌呈梭形,最初是在小鼠的胆汁、肝脏和肠道中被发现,主要引发小鼠多灶性慢性肝炎<sup>[3]</sup>,常呈潜伏性感染<sup>[4]</sup>,严重影响动物质量,干扰实验进行。我们在螺旋杆菌 PCR 检测方法建立的基础上<sup>[5]</sup>,从免疫抑制 BALB/c 小鼠的肠粘液中分离到一株螺旋杆菌,并用内切酶分型,测序比较,鉴定为胆型螺旋杆菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 免疫抑制小鼠**: 从上海市肿瘤研究所购进 SPF 级 BALB/c 小鼠 10 只,置普通级环境饲养,皮下和肌肉注射地塞米松 1mg/只(多次注射),取回盲肠粘液,微需氧培养<sup>[5]</sup>。

**1.1.2 内切酶 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I** 购自 TaKaRa(大连)生物工程有限公司。

**1.1.3 QIAquick 纯化试剂盒** 购自基因有限公司。

\* 上海市科技发展基金资助项目(994919037)

作者简介: 邵伟娟,女(1968-),浙江上虞人,副研究员,从事实验动物微生物检测和研究。 通讯地址: 上海市斜土路 2140 号,邮政编码 200032。电话 (021) 64049215 转 3515; E-mail: weijuanshao@hotmail.com

收稿日期 2002-07-22,修回日期 2002-10-28

## 1.2 方法

**1.2.1 电镜观察** 取纯化菌落,于戊二醛中固定,复旦大学医学院电镜教研室作透射电镜观察并照片,电镜型号为 JEM1200。

**1.2.2 Scid 小鼠感染试验** 洗下螺旋杆菌菌液,将菌液滴入 Scid 小鼠口内。1 周后取小鼠肠内容物和粪便同时培养并作 PCR 扩增。

**1.2.3 螺旋杆菌 DNA 提取** 刮下平皿中菌落,用“少量细菌 DNA 抽提试剂盒”(上海华舜公司生产)纯化细菌 DNA。

**1.2.4 引物** 根据螺旋杆菌的 rRNA 保守区设计引物, P7 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3'; P8 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3'。 *H. bilis* 的特异引物, Pb 5'-TCTCCCATACTCTA-GAAAAGT-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成,其中引物 P7/P8 扩增片段为 374bp, P7/Pb 扩增片段为 364bp。

**1.2.5 PCR** 50 $\mu$ L 反应体系中包含 DNA 模板 300ng ~ 500ng, 10 $\times$  PCR buffer 5 $\mu$ L, 引物各 1 $\mu$ mol/L, Taq 酶 5U, dNTP 0.2mmol/L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 2s, 53 $^{\circ}$ C 2s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 45cycles。由 MJ Peltier Thermol Cycler 225 扩增仪扩增。扩增产物分析: 1.5% 琼脂电泳, Tanon UV-2000 紫外分析仪分析。纯化和回收 PCR 产物。

**1.2.6 酶切反应** 反应体系是内切酶( *Mbo*I, *Hha*I, *Xsp*I) 1 $\mu$ L; 10 $\times$  buffer 2 $\mu$ L; DNA 17 $\mu$ L; 37 $^{\circ}$ C 过夜。酶切产物用 10% PAGE 检测, 电泳缓冲液为 TBE, 电压 40V。

**1.2.7 DNA 测序** PCR 产物送上海博亚生物技术有限公司测序。PCGENE 软件分析。

## 2 结果

### 2.1 电镜结果

纯化细菌经磷钨酸负染,透射电镜观察可见带有双极鞭毛的弯曲菌(如图 1),其膜上带有膜泡,电镜透射图(如图 2)上可见其核为弯曲型,未见周质纤毛。

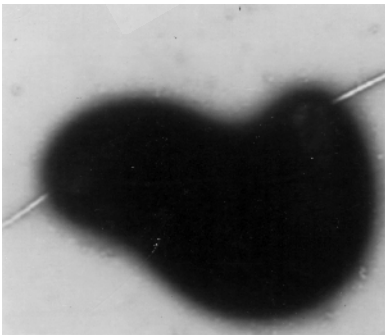


图 1 螺旋杆菌鞭毛的透射电镜图

Fig.1 Transmission electron micrographs of *H. bilis* flagellum(  $\times 25000$  )

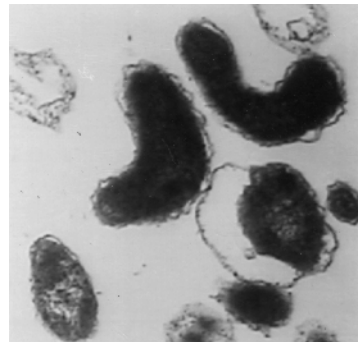


图 2 螺旋杆菌核型的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron micrographs of *H. bilis* nucleus(  $\times 30000$  )

### 2.2 PCR 扩增结果( P7/P8 和 P7/Pb )

根据螺旋杆菌 rRNA 保守区设计出的引物 P7/P8 扩增分离纯化的螺旋杆菌,出现

374bp 的扩增带(如图 3);用 *H. bilis* 特异引物 P<sub>b</sub>/P<sub>7</sub> 扩增,出现 364bp 的特异带(如图 4)。

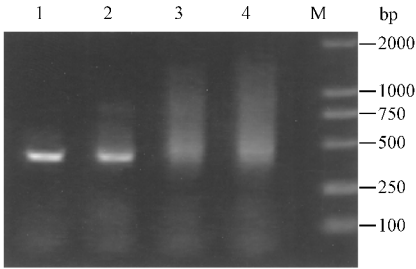


图 3 螺旋杆菌 P<sub>7</sub>/P<sub>8</sub> 扩增结果

Fig.3 PCR amplification products  
from *Helicobacter* DNA( P<sub>7</sub>/P<sub>8</sub> )

1 2 :*Helicobacter* ; 3 :*E. coli* ; 4 :*Streptococcus* ;  
M :Marker2000.

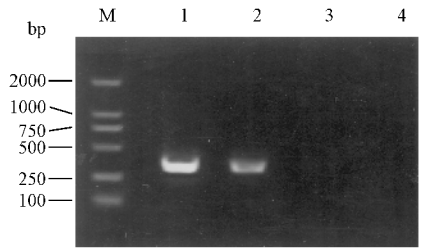


图 4 螺旋杆菌 P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> 扩增结果

Fig.4 PCR amplification products  
from *Helicobacter* DNA( P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> )

1 , 2 : *Helicobacter* ; 3 : *E. coli* ; 4 : *Streptococcus*  
M :Marker 2000.

### 2.3 Scid 小鼠感染结果

将口中滴入螺旋杆菌的 Scid 小鼠的肠粘液和粪便,按螺旋杆菌培养条件培养,洗下平皿菌液,用 P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> 引物扩增,结果肠粘液有特异条带,粪便无特异带(如图 5)。

### 2.4 酶切反应

将 P<sub>7</sub>/P<sub>8</sub> 引物扩增的产物,回收纯化后分别用 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 进行酶切,结果 *Mbo*I 切得 347bp, *Hha*I 为 278bp 和 97bp, *Xsp*I 为 348bp,酶切产物经 PAGE 检测,结果见图 6。

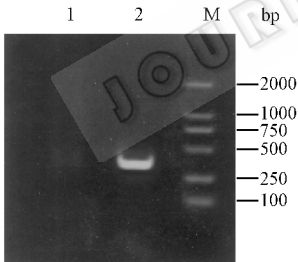


图 5 P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> 对 Scid 小鼠样品扩增结果

Fig.5 PCR amplification products  
from sample of Scid mouse( P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> )

1 : feces of mouse ; 2 : cecum mucosa  
of mouse ; M :Marker 2000.

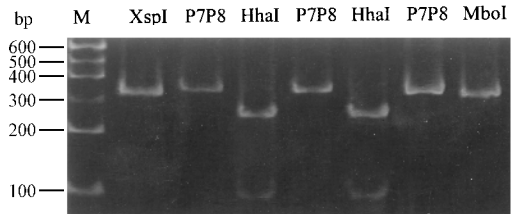


图 6 酶切产物的聚丙烯酰胺电泳

Fig.6 Restriction enzyme analysis  
of amplification products( PAGE )

### 2.5 同源性分析

将螺旋杆菌特异引物 P<sub>7</sub>/P<sub>b</sub> 扩增的 PCR 产物 364bp 片段进行测序,结果如图 7,并将此序列与文献 2 的 Fox Hb1 菌株序列进行比较。

|                    |   |
|--------------------|---|
| Helicobacter bilis | CTATGACGGGTATCCGGCCTGAGAGGGT <b>GATCGGACACACT</b> GGAAGT <b>GAGACACGGTCCAG</b>        |
| Fox Hb1            | CTATGACGGGTATCCGGCCTGAGAGGGT <b>GATCGGACACACT</b> GGAAGT <b>GAGACACGGTCCAG</b>        |
| Helicobacter bilis | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGG <b>CGAAAGCCTGAAGCAGCAA</b>                  |
| Fox Hb1            | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGG <b>CGAAAGCCTGAAGCAGCAA</b>                  |
| Helicobacter bilis | CGCCGCGTGGAGGATGAAGGTTTTAGGATTG <b>TAAACTCCTTTTGT</b> <b>TAGAGAAGATTATGAC</b>         |
| Fox Hb1            | CGCCGCGTGGAGGATGAAGGTTTTAGGATTG <b>TAAACTCCTTTTGT</b> <b>TAGAGAAGATTATGAC</b>         |
| Helicobacter bilis | GG TATCT <b>ACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT</b>                   |
| Fox Hb1            | GG TATCT <b>TACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT</b>                  |
| Helicobacter bilis | GCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAG <b>CGCGTAGGCGGGA</b> <b>AGTAAGTCAGA</b>            |
| Fox Hb1            | GCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAG <b>CGCGTAGGCGGGA</b> <b>AGTAAGTCAGA</b>            |
| Helicobacter bilis | TGTGAAATCCT <b>ATGGCTTAACCA</b> <b>TAGAACTGCATTTGAACTACTTTTCT</b> <b>TAGAGTATGGGA</b> |
| Fox Hb1            | TGTGAAATCCT <b>GTAGCTTAACCA</b> <b>TAGAACTGCATTTGAACTACTTTTCT</b> <b>TAGAGTATGGGA</b> |
| Helicobacter bilis | GA  |
| Fox Hb1            | GA  |

图 7 胆型螺旋杆菌序列比较结果

Fig.7 Comparison of sequence of *H. bilis*

### 3 结果和讨论

螺旋杆菌在动物和人类中广泛存在,最常见的是幽门螺杆菌,引起人类的胃炎。小鼠中 *H. bilis* 最为普遍,Riley 曾对 508 份小鼠样品进行检测,*H. bilis* 占 17.1%,*H. hepaticus* 为 10.4%,*H. muridarum* 所占比率小于 1%<sup>[3]</sup>。本实验从免疫抑制小鼠的肠内容物中获取样品,按螺旋杆菌培养条件培养,革兰氏染色,油镜下观察到具有特征性的月牙形和鸟翼形细菌,初步判定为螺旋杆菌,电镜进一步观察,该菌为双侧单鞭毛,但未见周质纤毛,与 Mähler 报道的结果有差异<sup>[4]</sup>。

根据螺旋杆菌 rRNA 保守区设计出的引物用 PCR 方法检测分离到的螺旋杆菌,结果扩增出 374bp 的特异带,其他对照菌无扩增带,并将扩增产物纯化,分别用 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 内切酶酶切。据报道<sup>[3]</sup>,*H. hepaticus*、*H. muridarum*、*H. bilis* 均有各自独特的内切位点模式,*H. hepaticus* 能被 *Mbo*I 切成 27bp 和 347bp;*H. muridarum* 能被 *Hha*I 切得 278bp 和 97bp 和被 *Xsp*I 切得 348bp 和 26bp;*H. bilis* 分别被这 3 种酶内切,内切片段与上述两株细菌相同。图 6 酶切结果与 *H. bilis* 内切位点模式相符。另报道 *H. bilis* 和 *F. Rappini*(弯曲菌)的扩增片段、酶切结果完全一致<sup>[3]</sup>,为鉴别此两种菌,本实验设计了 *H. bilis* 的特异反义引物 Pb,与 P7 引物扩增螺旋杆菌 DNA,结果出现 364bp 的特异带(如图 4),对照菌无条带。由于酶切产物与原 PCR 产物相差 20 多个碱基,用常规琼脂糖电泳难以分辨两者差异,因此本文用 10% PAGE,结果较为理想。

将根据 *H. bilis* 的特异引物扩增的 PCR 产物纯化测序,测得的序列用 PCGENE 软件分析,分别在相应的位置找到了 *Mbo*I、*Hha*I、*Xsp*I 的一个酶切位点(见图 7 斜体字),与图 6 的酶切结果相符。再将序列与 GenBank 中 *H. bilis*1 基因序列(U18766)比较分析,结果表明在给出的 364bp 核苷酸序列中,与 Hb1 的第 432 碱基至 795 碱基之间共有 9 个碱基不相

同,两者同源性为 97.5%(见图 7)。

Scid 小鼠感染试验得出:小鼠肠内容物培养得到螺旋杆菌,PCR 方法检测获得螺旋杆菌的特异扩增带(图 5),这符合 Koch 准则<sup>[6]</sup>。

综上所述,本实验中获得的螺旋杆菌确为 *H. bilis* 型螺旋杆菌。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Stephen L W. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev*, 1996, **9**: 405 ~ 422.
- [ 2 ] Fox J G, Yan L L, Dewhurst F E, et al. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel helicobacter species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**: 445 ~ 454.
- [ 3 ] Riley L K, Franklin C L, Hook R R, et al. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**: 942 ~ 946.
- [ 4 ] Mähler M, Bedigian H G, Burgett B L, et al. Comparison of four diagnostic methods for detection of helicobacter species in laboratory mice. *Lab Anim Sci*, 1997, **48**: 85 ~ 91.
- [ 5 ] 邵伟娟, 谢建云, 沈志敏, 等. 螺旋杆菌 PCR 检测方法的建立及初步应用. 中国动物学杂志, 2001, **11**: 153 ~ 155.
- [ 6 ] 斯塔尼尔 R Y, 阿德尔伯格 E A, 英格拉哈姆 J L. 微生物世界. 北京: 科学出版社, 1980. 8 ~ 11.

## Isolation, Identification of *Helicobacter bilis* and Sequence Analysis

Shao Weijuan Xie Jianyun Chen Hongshu Gao Cheng

(Shanghai Quality Monitoring Center for Laboratory Animals, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** To identify a microaerophilic bacterium as *Helicobacter* sp. and classify the species as *H. bilis*. The cecal samples from immunosuppressive mouse were cultured. Transmission electron micrograph were performed. PCR products obtained with the genus-specific primers and template from bacterium were analyzed with restriction enzyme *Mbo*I, *Hha*I and *Xsp*I respectively and the restriction products were evaluated by 10% PAGE. DNA isolated from bacterium were amplified with the *H. bilis* genus specific primers(P7/Pb) by PCR. The product was sequenced and analyzed. Finally, Scid mouse were infected with bacterium. Higher magnification of the organism shows the spiral shape and one flagellum at either end, but not periplasmic fibers. PCR(P7/P8) products with 374bp were digested by *Mbo*I, *Hha*I and *Xsp*I. 364bp bands of *H. bilis* specific amplification were observed. Computer analysis of the DNA(364bp) sequence reveals a unique pattern of restriction enzyme cleavage sites for *H. bilis*. There is of 97.5% homology compared with the sequence of *H. bilis*. Animal-infected test accords with Koch postulates. The organism isolated from BALB/c mouse is ascertained *H. bilis*.

**Key words:** *Helicobacter bilis*, Sequences analysis, Koch postulates