

## · 神经免疫学临床与基础研究 ·

空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因克隆与序列分析

邢丛丛 徐飞 白欣立 付金生 李文倩 卢晓卫 马海阳 李震中

**【摘要】** 目的 克隆空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因,并分析其遗传进化关系。方法 聚合酶链反应扩增空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因,构建 *pGEM-T-WaaF* 质粒,选择正确克隆质粒测序。自美国国家生物技术信息中心 Nucleotide 数据库下载 5 株吉兰-巴雷综合征相关菌株 *WaaF* 序列,1 株非吉兰-巴雷综合征相关菌株 *WaaF* 序列,利用 DNASTar v7.1 软件建立进化树,分析不同菌株间 *WaaF* 基因遗传关系。结果 完成了空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因的克隆,发现 *WaaF* 基因在吉兰-巴雷综合征相关菌株间存在聚类现象。结论 空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因是 807 bp 的片段,与 Lichang 株遗传进化关系最近。

**【关键词】** 弯曲杆菌,空肠; 基因; 序列分析,DNA; 进化; 遗传学

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.02.013

Cloning and alignment of *WaaF* gene of *Campylobacter jejuni* Lulei

XING Cong-cong<sup>1</sup>, XU Fei<sup>1</sup>, BAI Xin-li<sup>2</sup>, FU Jin-sheng<sup>1</sup>, LI Wen-qian<sup>1</sup>, LU Xiao-wei<sup>1</sup>, MA Hai-yang<sup>1</sup>, LI Zhen-zhong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, the Second Hospital of Hebei Medical University; Key Laboratory of Hebei Neurology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Corresponding author: LI Zhen-zhong (Email: Johndoctor@vip.163.com)

**【Abstract】 Objective** To clone the *WaaF* gene of *Campylobacter jejuni*, and analyse its relationship with *WaaF* genetic evolution. **Methods** Amplified *WaaF* gene of *Campylobacter jejuni* Lulei by PCR, and constructed *pGEM-T-WaaF* cloning plasmid. Downloaded five *WaaF* associated with Guillain-Barré syndrome (GBS) and one *WaaF* not associated with GBS, and then constructed phylogenetic tree. **Results** *pGEM-T-WaaF* cloning plasmid was constructed successfully. *WaaF* presented cluster phenomenon in *Campylobacter jejuni* associated with GBS. **Conclusion** *WaaF* gene of *Campylobacter jejuni* Lulei is the fragment of 807 bp, and has the nearest relationship with the genetic evolution of Lichang.

**【Key words】** *Campylobacter jejuni*; Genes; Sequence analysis, DNA; Evolution; Genetics

**Fund Project:** National Natural Science Foundation of China (No. 81072481); National High Technology Research and Development Program (No. 2006AA02A237)

空肠弯曲菌(Cj)被认为是吉兰-巴雷综合征(GBS)的主要前驱致病因子,而由空肠弯曲菌所导致的神经系统疾病主要源于其脂寡糖(LOS)与神经节苷脂之间的分子模拟。不同空肠弯曲菌菌株间LOS基因高度变异,河北省神经病学重点实验室迄今已完成了LOS基因序列中的Cj1136、Cj1138和Cj1139基因的比对分析<sup>[1]</sup>,以及*cst II*基因序列的实验室比对研究<sup>[2]</sup>。在本实验中,我们完成了空肠弯

曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因的克隆,并对 *WaaF* 基因在不同菌株之间的遗传进化关系进行对比分析。

## 材料与方法

## 一、材料

1. 菌株来源 空肠弯曲菌 Lulei 株于 1993 年由河北医科大学第二医院神经内科住院的急性运动轴索性神经病(AMAN)患者分离获得,由本实验室保存。E.Coli Top10 菌种、真核表达质粒 *pEGFP-N1* 及 293T 细胞由清华大学医学院常智杰教授惠赠。

2. 主要试剂 细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。Taq<sup>TM</sup> 和 dNTP Mixture 由大连宝生物工程有限公司提供。琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自美国 Omega 公

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81072481); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(项目编号:2006AA02A237)

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院神经内科河北省神经病学重点实验室(邢丛丛、徐飞、付金生、李文倩、卢晓卫、马海阳、李震中),儿科(白欣立)

通讯作者:李震中(Email:Johndoctor@vip.163.com)

司。*pGEM-T* 载体购自美国 Promega 公司。限制性内切酶 *Kpn I* 和 *BamH I* 均由大连宝生物工程有限公司提供。

3. *WaaF* 基因引物设计与合成 引物和聚合酶链反应(PCR)产物测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。以空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因序列分别合成上游引物 (Pfor: 5'-TATAGGT-ACCATGAAAATTTTATACATC-3') 和下游引物 (Prev: 5'-TATAGGATCCTCATAGATGAGAGTTTTT-AAG-3'), PCR 扩增产物预期为 807 bp。

## 二、研究方法

1. 细菌基因组提取 空肠弯曲菌 Lulei 株接种于哥伦比亚血培养基, 42 °C 微需氧(体积分数为 85% 氮气、10% 二氧化碳和 5% 氧气)培养 24~48 h, 刮取菌苔。采用细菌基因组提取试剂盒提取空肠弯曲菌基因组 DNA, 质量浓度为 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 序列的完整性, 分光光度计检测 DNA 质量浓度和纯度。

2. 聚合酶链反应 PCR 反应体系含模板 1 μl、Taq 1.25 U、引物各 20 μmol/L、dNTP 10 μmol/L 和 10×PCR Buffer 5 μl, 蒸馏水补充至 50 μl。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min 结束反应。将 PCR 扩增产物加样于质量浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下检测, 以 DNA Marker 作为对照判断扩增产物相对分子质量。

3. 空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因克隆 PCR 扩增产物电泳分离后, 以琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收相应片段, 连接于 *pGEM-T* 载体, 转化后提取 *pGEM-T-WaaF*, 采用引物酶切位点 *Kpn I* 和 *Bam H I* 双酶切鉴定, 选择正确插入的 *WaaF* 基因克隆进行测序分析。基因测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

4. 构建空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因进化树 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) Nucleotide 数据库下载 5 株自吉兰-巴雷综合征患者粪便分离获得的空肠弯曲菌 *WaaF* 基因序列, 以及 1 株由腹泻患者粪便分离获得的空肠弯曲菌 *WaaF* 基因序列, 采用 DNASTAR v7.1 软件构建不同菌株间聚

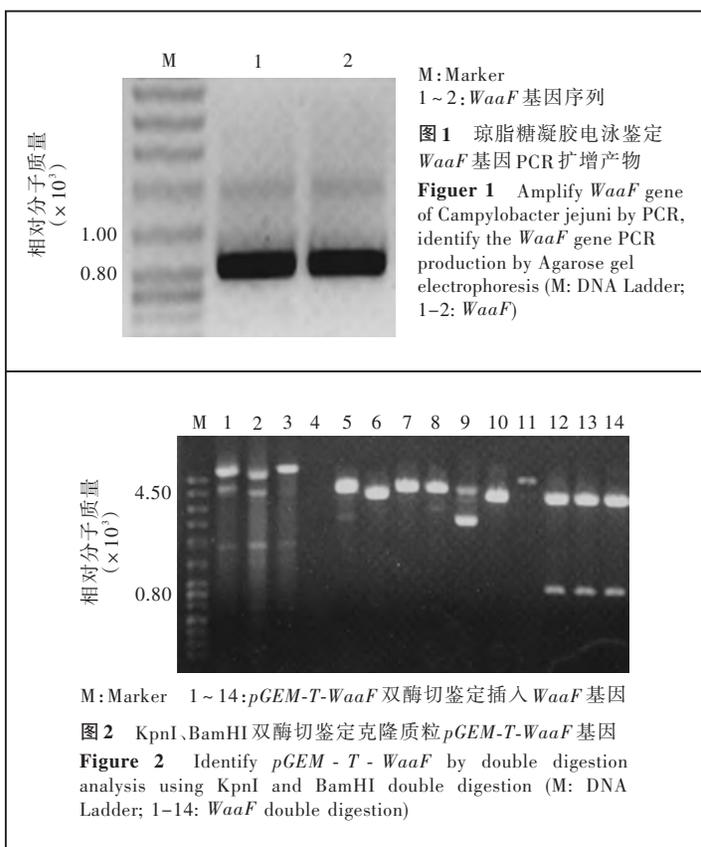
类进化树。

## 结 果

以空肠弯曲菌基因组 DNA 为模板扩增 *WaaF* 基因片段, 扩增后的 PCR 产物经质量浓度 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下可见约 800 bp 的 DNA 片段 (图 1)。将克隆后的 *WaaF* 基因连接到 *pGEM-T* 载体, 利用酶切位点 *Kpn I* 和 *BamH I* 双酶切鉴定克隆载体 (图 2), 并将准确克隆的载体进行 DNA 测序, 证实 *WaaF* 基因为 807 bp 片段。测序后的空肠弯曲菌 Lulei 株 *WaaF* 基因与下载的 5 株吉兰-巴雷综合征相关和 1 株非吉兰-巴雷综合征患者相关菌株的 *WaaF* 基因建立进化树, 显示吉兰-巴雷综合征相关菌株间存在聚类现象 (图 3)。

## 讨 论

空肠弯曲菌是广泛分布于自然界的重要的食源性人兽共患病病原菌<sup>[3]</sup>, 人被感染后可引起发热、急性肠炎、反应性关节炎和吉兰-巴雷综合征等疾病。为了研究空肠弯曲菌 Lulei 株的特性, 区别其表型分型和基因分型成为主要研究手段。常用的基因分型方法包括限制性酶切片段长度多态性



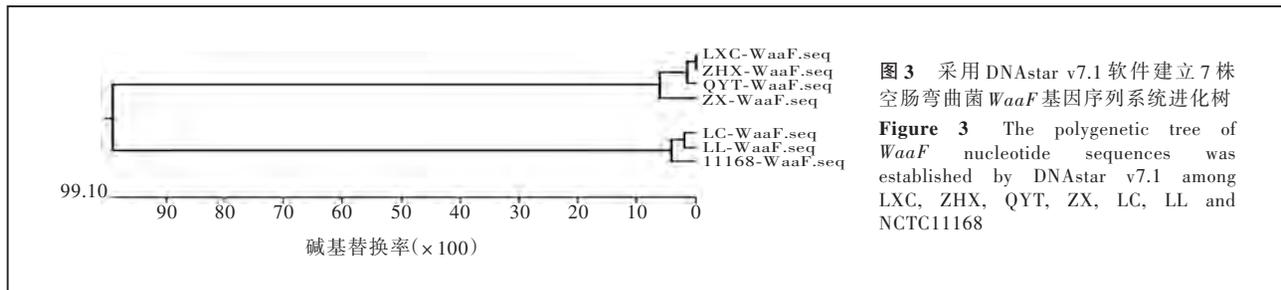


图3 采用DNASTar v7.1软件建立7株空肠弯曲菌WaaF基因序列系统进化树

Figure 3 The polygenetic tree of WaaF nucleotide sequences was established by DNASTar v7.1 among LXC, ZHX, QYT, ZX, LC, LL and NCTC11168

(RFLP)分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型、扩增片段多态性(AFLP)分型、核糖体分型、随机扩增多态性DNA分型(RAPD)、多位点序列分型(MLST)及测序分型等,而遗传进化树则分析研究了不同菌株间的进化关系及亲缘关系。

系统发生(phylogeny)系指一群有机体发生或进化的历史。系统发生树(phylogenetic tree)则是描述有机体发生或进化顺序的拓扑结构,可研究不同物种间的进化关系,重构生命的进化史并以系统树的形式描述进化史,此为目前生物学的研究热点。系统进化树的构建方法有距离法<sup>[4]</sup>、最大似然法、最大简约法<sup>[5]</sup>等。本实验室目前已经完成了空肠弯曲菌 Qiaoyuntao 株、Zhanxing 株和 Lulei 株的全基因组测序研究<sup>[6]</sup>,并建立此3株空肠弯曲菌与已知菌株的比对分析及遗传学分析,对菌株间的遗传进化关系进行分析。

空肠弯曲菌脂寡糖与神经节苷脂间的分子模拟现象是空肠弯曲菌诱导吉兰-巴雷综合征的主要致病因素。Susuki 等<sup>[7]</sup>经对空肠弯曲菌致吉兰-巴雷综合征动物模型进行研究发现,脊神经根、周围神经沉积 IgG 型 GM1 单克隆抗体;光谱分析证明二者的模拟成分为 Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4(NeuAc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1。脂寡糖主要分为 A~H 共 8 型<sup>[8]</sup>,Godschalk 等<sup>[9]</sup>的研究结果证实,LOS 基因可以作为吉兰-巴雷综合征相关空肠弯曲菌的分子标志物;孙世超等<sup>[2]</sup>对进化树的研究进一步阐述了 *cst II* 基因在吉兰-巴雷综合征相关菌株间的聚类现象;李鑫等<sup>[1]</sup>亦对 *Cj1136*、*Cj1138* 和 *Cj1139* 基因在吉兰-巴雷综合征相关菌株间的聚类现象进行了研究。在本实验中,我们完成了空肠弯曲菌 *WaaF* 基因的克隆及测序,经与已知序列比对分析建立了进化树,研究结果显

示:吉兰-巴雷综合征相关菌株间存在聚类现象,其中空肠弯曲菌 Lulei 株与 Lichang 株 *WaaF* 基因间的亲缘关系最近。推测 *WaaF* 基因可能是致吉兰-巴雷综合征菌株的致病基因之一。

#### 参 考 文 献

- [1] Li X, Li ZZ, Bai XL, et al. Comparison of Cj1136, Cj1138 and Cj1139 genes among Campylobacter jejuni strains. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2009, 30:829-831. [李鑫, 李震中, 白欣立, 等. 空肠弯曲菌 Cj1136、Cj1138、Cj1139 基因对比研究. 中华流行病学杂志, 2009, 30:829-831.]
- [2] Sun SC, Bai XL, Chen J, et al. Comparison of *cst II* gene in Guillain - Barré syndrome - associated Campylobacter jejuni strains. Zhonghua Wei Sheng Wu Xue He Mian Yi Xue Za Zhi, 2011, 31:554-559. [孙世超, 白欣立, 陈娟, 等. 吉兰-巴雷综合征相关空肠弯曲菌 *cst II* 基因序列对比研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31:554-559.]
- [3] Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of Campylobacter jejuni infections. J Infect Dis, 1997, 176 Suppl 2:103-105.
- [4] Pauplin Y. Direct calculation of a tree length using a distance matrix. J Mol Evo, 2000, 51:41-47.
- [5] Henning W. Phylogenetic systematics. Urbana: University of Illinois Press. 1966.
- [6] Li ZZ, Liu H, Liu XD, et al. Three genome sequences of Campylobacter jejuni associated with GBS are completed. Nao Yu Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2008, 16:449-450. [李震中, 刘慧, 刘晓东, 等. 三株致 GBS 的空肠弯曲菌全基因组序列完成. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16:449-450.]
- [7] Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, et al. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. Ann Neurol, 2003, 54:383-388.
- [8] Parker CT, Horn ST, Gilbert M, et al. Comparison of Campylobacter jejuni lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. J Clin Microbiol, 2005, 43:2771-2781.
- [9] Godschalk PC, van Belkum A, van den Braak N, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of Campylobacter jejuni genes involved in lipooligosaccharide biosynthesis identifies putative molecular markers for Guillain-Barré syndrome. J Clin Microbiol, 2007, 45:2316-2320.

(收稿日期:2012-03-15)