



幽门螺杆菌 *cgt* 基因表达量测定活菌的方法建立及应用研究*

唐智慧¹, 符立发¹, 张焱荣¹, 周博彦², 冯天勤², 杨文娟², 梁 鸽¹,
严茜雅¹, 郑璨璘¹, 别明江^{3,4Δ}, 王保宁^{1Δ}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院(成都 610041); 2. 四川大学华西临床医学院(成都 610041);

3. 四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院(成都 610041); 4. 四川大学学报(医学版)编辑部(成都 610041)

【摘要】目的 本研究旨在建立一种通过幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) *cgt* 基因表达量来检测活菌的方法, 以便为临床精准治疗开发快速、便捷的检测手段。**方法** 通过培养法对活菌计数, 并利用 RT-qPCR 方法测定相应 *H. pylori* 胆固醇- α -葡萄糖基转移酶(cholesterol- α -glucosyltransferase, CGT) 保守编码基因 *cgt* (*hp0421*) 的 mRNA 表达水平, 分析菌落数与 *cgt* 基因表达量之间的相关性, 并构建回归方程; 探索该方法可测定的线性范围、灵敏度和特异性。将此方法用于测定克拉霉素杀菌作用, 验证其在细菌耐药检测中有效性。**结果** *H. pylori* 菌落数为 10^2 、 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU/mL 的 *cgt* 的 Ct 值分别是 29.67 ± 0.14 、 23.37 ± 0.36 、 17.65 ± 0.37 、 11.38 ± 0.39 , 在 *H. pylori* 菌落数为 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内, RT-qPCR 法测定的 *cgt* 基因表达量和活菌数对应的回归方程: $y = -0.3501x + 12.49$, 决定系数 $R^2 = 0.9992$ 、灵敏度为 10^1 CFU/mL, 此方法与 13 种其他菌无交叉反应。用 0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的克拉霉素作用 12 h 后培养法测定 *H. pylori* 的活菌 lg 值分别为 2.57 ± 0.02 、 2.45 ± 0.01 、 2.19 ± 0.02 、 1.91 ± 0.07 、 1.33 ± 0.05 , 对应 *cgt* 基因的 Ct 值分别为 27.76 ± 0.09 、 28.37 ± 0.24 、 29.51 ± 0.14 、 30.11 ± 0.12 、 31.66 ± 0.11 , 将 *cgt* 基因表达量代入上述方程推算活菌数为 2.73 ± 0.03 、 2.52 ± 0.08 、 2.11 ± 0.05 、 1.89 ± 0.02 、 1.33 ± 0.04 , 经分析差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 本研究成功建立了通过测定 *H. pylori* 的 *cgt* 基因表达量反映活菌的方法, 有效缩短了检测周期, 为临床活菌检测提供了新方法。

【关键词】 幽门螺杆菌 *cgt* 基因 基因表达量 活菌测定

Viable Bacteria Assay of *Helicobacter pylori* by RT-qPCR Measurement of *cgt* Gene Expression Levels: Establishment and Application of a New Method TANG Zhihui¹, FU Lifa¹, ZHANG Yanrong¹, ZHOU Boyan², FENG Tianqin², YANG Wenjuan², LIANG Ge¹, YAN Qianya¹, ZHENG Canlin¹, BIE Mingjiang^{3,4Δ}, WANG Baoning^{1Δ}. 1. West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Sciences), Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, BIE Mingjiang, E-mail: 13941057@qq.com; WANG Baoning, E-mail: 345182273@qq.com

【Abstract】Objective To establish a viable bacteria assay for *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) by assessing the *cgt* gene expression, and to develop accordingly a rapid and novel testing method for clinical precision treatment. **Methods** Viable bacteria count was determined in bacterial cultures. The transcriptional expression level of *cgt* (*hp0421*), the conserved gene that encodes cholesterol- α -glucosyltransferase (CGT) in *H. pylori*, was measured by RT-PCR. The correlation between the number of colonies and *cgt* gene transcription expression was analyzed and the regression model was constructed. The linear range, sensitivity, and specificity of the new method were examined accordingly. The bactericidal action of clarithromycin was assessed using this method to verify the performance of the method in determining clinical bacterial drug resistance. **Results** The Ct values of *cgt* for *H. pylori* colony counts of 10^2 , 10^4 , 10^6 , and 10^8 CFU/mL were 29.67 ± 0.14 , 23.37 ± 0.36 , 17.65 ± 0.37 , and 11.38 ± 0.39 , respectively. In the range of $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL, the regression equation for *cgt* gene expression and viable bacterial counts determined by RT-qPCR was $y = -0.3501x + 12.49$, with the correlation coefficient being $R^2 = 0.9992$ and the sensitivity being 10^1 CFU/mL, showing no cross-reaction with 13 other bacteria. The lg values of live *H. pylori* bacteria treated with clarithromycin at 0, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ for 12 h were 2.57 ± 0.02 , 2.45 ± 0.01 , 2.19 ± 0.02 , 1.91 ± 0.07 , and 1.33 ± 0.05 , respectively. The corresponding *cgt* gene Ct values were 27.76 ± 0.09 , 28.37 ± 0.24 , 29.51 ± 0.14 , 30.11 ± 0.12 , and 31.66 ± 0.11 . By applying the *cgt* gene expression

* 国家自然科学基金项目(No. 82260402)、西藏自治区科技厅基金项目(No. XZ202201ZY0009N)和四川省科技厅基金项目(No. 2023YFQ0051, No. 2024YFFK0224)资助

Δ 通信作者, 别明江, E-mail: 13941057@qq.com; 王保宁, E-mail: 345182273@qq.com

出版日期: 2024-09-20

in the equation, the estimated counts of viable bacteria were found to be 2.73 ± 0.03 , 2.52 ± 0.08 , 2.11 ± 0.05 , 1.89 ± 0.02 , and 1.33 ± 0.04 , showing no significant difference in statistical analysis ($P > 0.05$). **Conclusion** The method for assessing viable bacteria account by evaluating *cgt* gene expression in *H. pylori* was successfully established, significantly reducing the time required to determine viable bacteria count and providing a new method for clinical viable bacteria testing.

【Key words】 *Helicobacter pylori* *cgt* gene Gene expression level Viable bacteria assay

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的活菌检测在消化道疾病的临床诊断和临床治疗中具有重要意义。目前,尽管培养法被视为*H. pylori*活菌检测的“金标准”^[1-2],但其培养条件苛刻,需要特殊的培养基和微需氧混合气体,且细菌生长缓慢(3~5 d),这使得临床上标准化培养的实施变得困难。因此,迫切需要开发新的方法来测定*H. pylori*的活菌来评估感染状态或耐药情况^[3-5]。本研究用逆转录定量聚合酶链反应(reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)建立一种通过测定*H. pylori*特定基因的mRNA间接检测活菌数量的方法,为临床活菌测定提供新选择^[6]。

有研究表明,在选择特定基因的mRNA靶点时,*H. pylori*的存活依赖胆固醇- α -葡萄糖基转移酶(cholesterol- α -glucosyltransferase, CGT),其由保守基因*cgt*(*hp0421*)编码^[7]。此外,16S rRNA基因是基于细菌分类和系统发育的保守序列,编码核糖体核糖核酸(rRNA),是核酸检测中的常用靶基因^[8-9];而尿素酶作为*H. pylori*高度保守的蛋白质,其尿素酶的亚单位UreB由*ureB*基因编码^[10-11],也是*H. pylori*的毒力因子之一。针对这些基因的特点,本研究拟建立一种RT-qPCR测定*H. pylori*特定基因的mRNA表达水平来间接检测活菌数的方法,并探讨其敏感性、特异性及测定范围等,同时利用耐药性实验检验该方法的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 菌株

*H. pylori*标准菌株(菌株号:26695;毒力因子:*vacA s1*, *cagA*⁺)由贵州医科大学基础医学院陈峥宏教授惠赠;大肠杆菌、沙门氏菌、宋内志贺菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、流感嗜血杆菌、乙型链球菌、甲型链球菌、乳酸菌、化脓链球菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌均为实验室保存菌种。实验流程根据相关规定在生物安全二级实验室[川卫BSL-2备(2014)第0198-03号]内进行。

1.1.2 主要材料与试剂

哥伦比亚血琼脂培养基(CM0331B,英国OXOID);水解酪蛋白胨(Mueller Hinton Broth, MH)肉汤培养基(028040,广东环凯);HiScript III RT SuperMix for

qPCR(+gDNA wiper)、FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(南京诺唯赞);克拉霉素(C129746,上海阿拉丁);DMSO(D8371,北京索莱宝)。

1.1.3 主要仪器

生物安全柜(青岛海尔);洁净工作台(苏州安泰);荧光定量PCR仪(德国Analytik Jena AG);水平电泳仪(美国Bio-Rad);UT105厌氧罐(重庆基恩赛斯)。

1.2 方法

1.2.1 幽门螺杆菌的培养

根据*H. pylori*的培养方法^[12-14],*H. pylori*接种于哥伦比亚血琼脂培养基,在37℃、微需氧(体积分数85%N₂、10%CO₂、5%O₂)条件培养48 h至对数期。

1.2.2 培养法计数活菌

将对数期生长期的*H. pylori*用MH肉汤培养基制成悬液,用紫外分光光度计调整OD₆₀₀=1.0(10⁸ CFU/mL)后,以10倍梯度稀释,配制终浓度为:10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ CFU/mL,取每个浓度的菌悬液100 μ L涂布于直径90 mm的哥伦比亚血琼脂平板上,每个浓度3重复。培养120 h后观察细菌形态,并计算菌落形成单位(colony-forming unit, CFU),获得*H. pylori*的活菌数目。

1.2.3 幽门螺杆菌保守基因的RNA测定方法建立

1.2.3.1 引物设计

在NCBI上下载*H. pylori*全基因组序列(GenBank: GCA_002906535.1),并将全基因组信息导入Geneious软件中,选择*H. pylori*的管家基因*cgt*、16S rRNA、*ureB*基因进行特异性引物设计,获得这3个基因序列后导入Primer Premier 6.0软件中设计特异性引物,并在NCBI上对引物进行BLAST,验证序列的特异性。经过验证以后,得到*cgt*、16S rRNA、*ureB*基因的引物序列。*cgt*: F: 5'-GGGC CTGATGAGAAAAAATC-3', R: 5'-GTCGCGCTTA AAGGGCTATT-3'; 16S rRNA: F: 5'-GTGTGGGAGAGG TAGGTGGA-3', R: 5'-TGCGTTAGCTGCATTACTGG-3'; *ureB*: F: 5'-CAATGTGAGCGGTAGTGT-3', R: 5'-GCGAGTATGTAGGTTCTGTA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.3.2 RT-qPCR反应条件

参照文献方法^[15-16],采用RT-qPCR法检测*H. pylori*关键基因的mRNA、rRNA的表达量,步骤如下:①按

FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2试剂盒的说明书提取*H. pylori*的总RNA; ②去除DNA后的反应液16 μL 、5 \times HiScript III qRT SuperMix 4 μL ; 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 逆转录得到cDNA; ③以cDNA为模板, 选取*cgt*、16S rRNA、*ureB* 3个基因为靶点设计的引物进行扩增, qPCR反应程序: 预变性95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 变性95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 退火60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸60 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 共35个循环。

1.3 菌落数和mRNA表达量的比较分析

将RT-qPCR法检测获得 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL浓度*H. pylori*的Ct值与培养法得到的菌落lg值输入Graph Pad Prism 10进行回归分析, 获得回归方程及其决定系数(R^2), 并以Ct值为x坐标, 以菌落数的lg值为y坐标, 建立标准曲线。比较分析回归方程的 R^2 , 确定菌落lg值和Ct值的等量关系。

1.3.1 RT-qPCR法测定*cgt* mRNA的线性范围

将 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL共8个浓度的菌液提取RNA并逆转录成cDNA, 用RT-qPCR法检测*H. pylori*的*cgt*、16S rRNA、*ureB*基因表达量, 与菌落计数法进行比较分析, 得到线性测定范围。

1.3.2 RT-qPCR法测定*cgt* mRNA的灵敏度

通过定量检测*H. pylori*关键基因的表达量, 以最低菌落数测定的关键基因最低表达量作为该方法的灵敏度。

1.3.3 RT-qPCR法测定*cgt* mRNA的特异性

用大肠杆菌、沙门氏菌、宋内志贺菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、流感嗜血杆菌、乙型链球菌、甲型链球菌、乳酸菌、化脓链球菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌13种细菌的标准品(10^5 CFU/mL)作为干扰细菌, 提取总RNA、逆转录得到cDNA, 与*H. pylori*同时进行检测, 然后通过RT-qPCR法检测得到扩增曲线, 验证本方法的特异性。

1.4 用RT-qPCR法测定克拉霉素耐药性的可行性

根据第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告^[17], 将克拉霉素用DMSO配制成0、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并作用*H. pylori*菌液(10^3 CFU/mL) 12 h, 用平板涂布法计算*H. pylori*菌落, 用RT-qPCR法测定*H. pylori*关键基因的表达量, 将Ct值代入上述建立的回归方程, 得到活菌Ct值后与培养基的菌落数进行差异分析。初步验证该方法在耐药性实验中测算的可行性。

1.5 统计学方法

用RT-qPCR法检测梯度稀释后的*H. pylori*标准品中的关键基因的表达量, 将Ct值与菌落lg值输入Graph Pad Prism 10进行回归分析, 获得回归方程及其 R^2 。定量数据

用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对实际菌落数lg值与回归方程计算所得lg值进行分析。两组间比较采用两样本t检验, 并通过bonferroni法对P值进行校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori* 菌落数对应的RT-qPCR法引物筛选

通过培养法获得 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL的*H. pylori*标准品的活菌数并计算lg值; 用 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL浓度*H. pylori*标准品提取的cDNA为模板, 用*cgt*、16S rRNA、*ureB*为引物进行RT-qPCR扩增, 得出3种引物的测定范围(表1); 以*H. pylori*的菌落数的lg值为x坐标, Ct值为y坐标, 得到3个回归方程。结果显示, *cgt*引物检测的 R^2 的相较于16S rRNA、*ureB*更接近1.0, 代表回归模型与实际数据的拟合程度高(表2, 图1A); 对 10^8 、 10^5 、 10^2 CFU/mL浓度*H. pylori*的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析发现(图1B), *cgt*基因的引物的灵敏度最高, 可以扩增 10^2 CFU/mL浓度的PCR产物, 16S rRNA、*ureB*仅能扩增 10^8 、 10^5 CFU/mL浓度的PCR产物。以上结果表明, *cgt*基因引物为最佳的引物序列。

表 1 *H. pylori*的*cgt*、16S rRNA、*ureB*基因Ct值
Table 1 Ct values of *cgt*, 16S rRNA, and *ureB* genes in *H. pylori*

<i>H. pylori</i> concentration/ (CFU/mL)	Ct value		
	<i>cgt</i>	16S rRNA	<i>ureB</i>
10^8	11.38 \pm 0.39	11.77 \pm 0.37	17.46 \pm 0.17
10^7	14.12 \pm 0.12	14.86 \pm 0.21	20.42 \pm 0.23
10^6	17.65 \pm 0.37	19.3 \pm 0.25	23.39 \pm 0.19
10^5	20.44 \pm 0.18	24.12 \pm 0.27	27.96 \pm 0.22
10^4	23.37 \pm 0.36	27.49 \pm 0.24	31.52 \pm 0.17
10^3	26.42 \pm 0.15	31.51 \pm 0.27	0
10^2	29.67 \pm 0.14	33.62 \pm 0.35	0
10^1	32.69 \pm 0.12	0	0

表 2 *cgt*、16S rRNA、*ureB*基因测定*H. pylori*的回归模型
Table 2 Regression model for measuring *H. pylori* using *cgt*, 16S rRNA, and *ureB* genes

<i>H. pylori</i> gene	Regression equation	Determined coefficient (R^2)
<i>cgt</i>	$y = -2.862x + 35.68$	0.9984
<i>ureB</i>	$y = -3.557x + 42.14$	0.9897
16S rRNA	$y = -3.336x + 45.47$	0.9894

2.2 RT-qPCR法检测*cgt*引物的线性范围与灵敏度

用*cgt*引物扩增*H. pylori*标准菌液中cDNA的含量, 以此反映活菌量。结果显示, 检测范围在 $10^1 \sim 10^8$ CFU/mL时, Ct值与平板涂布的菌落数呈线性关系, 灵敏度为

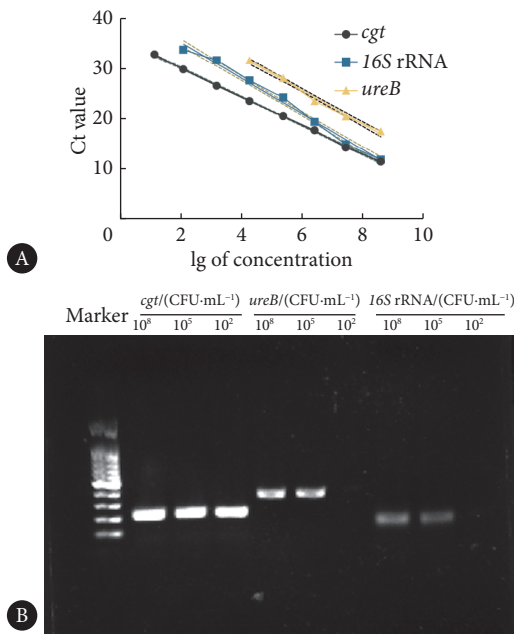


图 1 *H. pylori* 的 *cgt*、16S rRNA 和 *ureB* 基因引物筛选

Fig 1 Screening of *cgt*, 16S rRNA, and *ureB* primers for *H. pylori*

A, Regression model. B, Agarose gel electrophoresis band.

10^1 CFU/mL; 以 Ct 值为 x 坐标, 以菌落数的 lg 值为 y 坐标, 获得回归方程 $y = -0.350 1x + 12.49$, $R^2 = 0.999 2$ (图 2)。

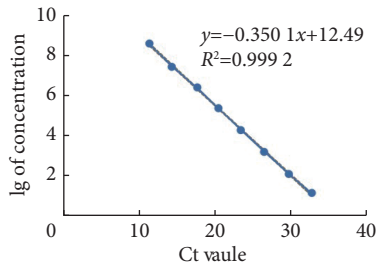


图 2 *H. pylori* 菌落数和 Ct 值标准曲线

Fig 2 Standard curve of the Ct value for *H. pylori* colony count

2.3 RT-qPCR 法检测 *cgt* 引物的特异性

测定 *H. pylori* 与大肠杆菌、沙门氏菌、宋内志贺菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、流感嗜血杆菌、乙型链球菌、甲型链球菌、乳酸菌、化脓链球菌、脑膜炎奈瑟菌和铜绿假单胞菌 13 种干扰细菌的标准品 (10^5 CFU/mL) 的 *cgt* 表达情况, 验证方法的特异性。结果发现, *cgt* 引物对 *H. pylori* 具有较强的特异性 (图 3)。

2.4 RT-qPCR 法测定幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药性

RT-qPCR 法检测得到 Ct 值如表 3 所示, 将 Ct 值代入回归模型中计算活菌 lg 值, 将实际计数得到的 lg 值与公式得到的 lg 值进行差异统计分析。两两比较相同浓度的克拉霉素作用后的活菌数与代入公式计算的活菌 lg 值, A 组为实际菌落 lg 值, B 组为模型所得 lg 值, A、B 两组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

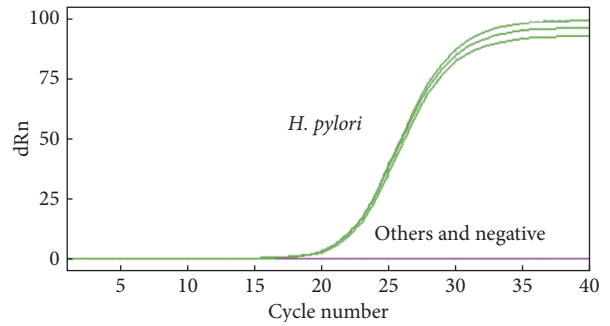


图 3 *H. pylori* 的 *cgt* 引物特异性验证

Fig 3 Verification of *cgt* primer specificity for *H. pylori*

表 3 克拉霉素处理后 *H. pylori* 菌落数 lg 值、Ct 值以及回归模型 lg 值

Table 3 The lg value, Ct value, and regression model lg value of *H. pylori* colony count after clarithromycin treatment

Drug concentration/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	lg of concentration	Ct value	lg of the regression model
0	2.57 ± 0.02	27.76 ± 0.09	2.73 ± 0.03
5	2.45 ± 0.01	28.37 ± 0.24	2.52 ± 0.08
10	2.19 ± 0.02	29.51 ± 0.14	2.11 ± 0.05
20	1.91 ± 0.07	30.11 ± 0.12	1.89 ± 0.02
40	1.33 ± 0.05	31.66 ± 0.11	1.33 ± 0.04

3 讨论

H. pylori 培养耗时长 (3 ~ 5 d), 对环境要求极其严苛, 成本较高。而且耐药菌株的培养更加复杂, 这在临床中常常会延误最佳的诊断和治疗时机。培养法对优势菌群的检出较为容易, 但在检测非优势菌群时则存在很大难度。虽然基因芯片技术可以检出多种菌群结构, 但由于检测周期长、成本高, 且结果无法反映活菌量, 导致其在临床应用中受到限制^[18]。为了解决这些问题, 本研究开发了一种快速、便捷且成本低的 RT-qPCR 活菌检测方法。该方法的灵敏度可达到 10^1 CFU/mL, 检测速度快, 可在 2 h 内完成样本处理、检测、结果分析及出具报告, 从而大幅节省检测时间并提高了检测效率。

本研究利用 *H. pylori* 的 *cgt* 基因表达量来反映活菌量。首先用 *H. pylori* 标准菌液建立 Ct 值和培养法得到的活菌 lg 值之间的标准曲线, 明确了 Ct 值与活菌数之间的线性关系。随后用经克拉霉素处理过的 *H. pylori* 样本来验证检测方法的可行性, 经统计分析后发现, 实际得到的菌落数与标准曲线方程所得的菌落数之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 证明通过检测关键基因的表达量来测定活菌数目与培养法检测活菌数目之间具有互补性和可替代性。因此, RT-qPCR 法在一定程度上可以替代培养法, 对于临床耐药检测具有重要意义。与培养法比较, 该方

法具有快速检测、高灵敏度的优势、同时与其他13种细菌反应时无特异性扩增,特异性良好,这可有效避免样本中因细菌种类复杂、优势菌群占据主导地位而导致目标细菌无法检出的情况。

本研究对检测体系进行了优化,采用*H. pylori*的cDNA为模板,设计了针对*cgt*、16S rRNA、*ureB3*个靶点的引物进行扩增,并对扩增效率进行同步比较分析。结果显示,这3个基因表达量均与活菌计数高度相关。其中,*cgt*引物检测灵敏度最高、特异性强且保守性好,检测结果稳定。因此本方法选择*cgt*基因作为靶点以实现对*H. pylori*活菌检测^[9]。

目前,临床上治疗*H. pylori*感染多依赖经验,常常在不明感染原因的情况下随意使用抗生素,这导致*H. pylori*耐药率逐年上升,面临严重的耐药问题。这种情况增加了治疗失败、慢性胃病恶化以及耐药菌株的传播风险^[20-21]。本方法为临床*H. pylori*感染的诊断和耐药测定提供一种新的探索思路,也为*H. pylori*的临床研究和治疗提供新方法。通过测定*cgt*基因表达量来评估*H. pylori*活菌数量,尽管在实验室中利用标准菌株建立了菌落数与*cgt*基因表达量之间关系,并开展了克拉霉素耐药*H. pylori*活菌的检测,但该方法在科研和临床中的实际应用仍需进一步验证和优化。

* * *

作者贡献声明 唐智慧负责论文构思、正式分析、研究方法、软件、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,符立发和张焱负责调查研究和研究项目管理,周博彦负责验证和可视化,冯天勤负责正式分析和调查研究,杨文娟负责数据审编和监督指导,梁鸽立负责研究方法,严茜雅和郑臻璠负责数据审编,别明江和王保宁负责正式分析、研究方法、经费获取和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution Statement TANG Zhihui is responsible for the conceptualization, formal analysis, methodology, software, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. FU Lifa and ZHANG Yanrong are responsible for investigation and project administration. ZHOU Boyan is responsible for verification and visualization. FENG Tianqin is responsible for formal analysis and investigation. YANG Wenjuan is responsible for data curation and supervision. LIANG Geli is responsible for methodology. YAN Qianya and ZHENG Canlin are responsible for data curation. BIE Mingjiang and WANG Baoning are responsible for formal analysis, methodology, funding acquisition, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 贵州医科大学基础医学院陈峥宏教授赠送了*H. pylori*标准菌株。本文作者别明江是本刊编委会编委。该文在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有

作者声明不存在利益冲突。

Declaration of conflicting interests Professor CHEN Zhenghong from School of Basic Medicine of Guizhou Medical University donated the *H. pylori* standard strain. BIE Mingjiang is a member of the Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the author. Other than this, all authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] NDIP R N, MACKAY W G, FARTHING M J, *et al.* Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003, 36(5): 616-622. doi: 10.1097/00005176-200305000-00005.
- [2] PENG C, HU Y, GE Z M, *et al.* Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infections in children and elderly populations. *Chronic Dis Transl Med*, 2020, 5(4): 243-251. doi: 10.1016/j.cdtm.2019.12.003.
- [3] WANG Y K, KUO F C, LIU C J, *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(40): 11221-11235. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11221.
- [4] GUARNER J, KALACH N, ELITSUR Y, *et al.* *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr*, 2010, 169(1): 15-25. doi: 10.1007/s00431-009-1033-x.
- [5] GONG Y N, LI Y M, YANG N M, *et al.* Centralized isolation of *Helicobacter pylori* from multiple centers and transport condition influences. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3): 944-952. doi: 10.3748/wjg.v21.i3.944.
- [6] ARCHER M, XU J. Current practices for reference gene selection in RT-qPCR of aspergillus: outlook and recommendations for the future. *Genes (Basel)*, 2021, 12(7): 960. doi: 10.3390/genes12070960.
- [7] QARIA M A, QUMAR S, SEPE L P, *et al.* Cholesterol glucosylation-based survival strategy in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2021, 26(2): e12777. doi: 10.1111/hel.12777.
- [8] SZYMCZAK A, FERENC S, MAJEWSKA J, *et al.* Application of 16S rRNA gene sequencing in *Helicobacter pylori* detection. *PeerJ*, 2020, 13(8): e9099. doi: 10.7717/peerj.9099.
- [9] 王鑫莹, 孙丽媛, 杨志平, 等. 多重PCR检测唾液标本中的幽门螺杆菌 16S rRNA及*cagA*基因. *南方医科大学学报*, 2021, 41(12): 1816-1821. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.12.09.
- WANG X Y, SUN L Y, YANG Z P, *et al.* Combined detection of *Helicobacter pylori* 16S rRNA and *cagA* gene in saliva specimens using multiplex PCR. *J South Med Univ*, 2021, 41(12): 1816-1821. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.12.09.
- [10] MOBLEY H L. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996, 10 Suppl 1(1): 57-64. doi:10.1046/j.1365-2036.1996.22164006.x.
- [11] ZHANG H, LIU M, LI Y, *et al.* Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif*, 2010, 69(2): 127-131. doi:10.1016/j.pep.2009.07.016.

- [12] XU J, CZINN S J, BLANCHARD T G. Maintenance of *Helicobacter pylori* cultures in agar slabs. *Helicobacter*, 2010, 15(5): 477-480. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00769.x.
- [13] 樊玉娟, 李福兴, 王黎, 等. 幽门螺杆菌悉尼标准菌株传代培养方法研究. 大理大学学报, 2022, 7(8): 37-40. doi: 10.3969/j.issn.2096-2266. FAN Y J, LI F X, WANG L I, et al. Study on the passage culture method of *Helicobacter pylori* sydney standard strain. *J Dali Univ*, 2022, 7(8): 37-40. doi: 10.3969/j.issn.2096-2266.
- [14] 陈彬, 詹学. 幽门螺杆菌体外培养技术的研究进展. 中国医药科学, 2018, 8(8): 21-23. doi: 10.3969/j.issn.2095-0616.2018.08.006. ChEN B, ZHAN X. Research progress on *in vitro* culture technology of *Helicobacter pylori*. *China Med Pharm*, 2018, 8(8): 21-23. doi: 10.3969/j.issn.2095-0616.2018.08.006.
- [15] ROCHA D J, SANTOS C S, PACHECO L G. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(3): 685-693. doi: 10.1007/s10482-015-0524-1.
- [16] BECKER C, HAMMERLE-FICKINGER A, RIEDMAIER I, et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 2010, 50(4): 237-243. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.010.
- [17] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌和消化性溃疡学组, 全国幽门螺杆菌研究协作组, 刘文忠, 等. 第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告. 胃肠病学, 2017, 22(6): 346-360. doi: 10.3969/j.issn.1008-7125.2017.06.006. Chinese Medical Association Gastroenterology Branch *Helicobacter pylori* and peptic ulcer study group, National *Helicobacter pylori* research collaboration group, LIU W Z, et al. The fifth national consensus report on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Chin J Gastroenter*, 2017, 22 (6): 346-360. doi: 10.3969/j.issn.1008-7125.2017.06.006.
- [18] YIN G, BIE S, GU H, et al. Application of gene chip technology in the diagnostic and drug resistance detection of *Helicobacter pylori* in children. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(8): 1331-1339. doi: 10.1111/jgh.14980.
- [19] QARIA M A, KUMAR N, HUSSAIN A, et al. Roles of Cholesteryl- α -Glucoside transferase and cholesteryl glucosides in maintenance of *Helicobacter pylori* morphology, cell wall integrity, and resistance to antibiotics. *mBio*, 2018, 9(6): e01523-18. doi: 10.1128/mBio.01523-18.
- [20] THUNG I, ARAMIN H, VAVINSKAYA V, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(4): 514-533. doi: 10.1111/apt.13497.
- [21] LIN Y, SHAO Y, YAN J, et al. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: from potential biomolecular mechanisms to clinical practice. *J Clin Lab Anal*, 2023, 37(7): e24885. doi: 10.1002/jcla.24885.

(2024-07-22收稿, 2024-08-26修回)

编辑 何学令



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*