

Q 热立克次体中国株的 16S - 23S rDNA 间区序列分析

胡廷徽¹ 温博海¹ 万泽生¹ 俞树荣¹ 张 雪²

(重庆第三军医大学微生物学教研室 重庆 400038)¹

(重庆西南医院检验科 重庆 400038)²

摘要: 用 PCR 扩增了 7 株中国分离株 (七医、新桥、雅安、李、YS-8、YS-9 和 YH-11) 和 2 株国际参考株 (Henzerling 和 Grita) 的 16S-23S rDNA 基因间区, 对扩增产物进行了序列分析。结果发现它们仅在少数几个碱基位上有不同。在第 60 位上 3 个云南分离株 YS-8、YS-9、YH-11 和 Grita 株与 Stein 等报道的序列 (包括九里、其它国际参考株和一些法国临床分离株) 的碱基序列一致, 为 “C”; 其他 5 株为 “A”, 此位点的不同可能与适应不同的地理环境相关。另外, YS-9 株在第 8 和 208 位、新桥株在第 432 位也分别出现缺失, 可能与适应不同的动物宿主或在实验室传代情况不同有关。

关键词: 贝氏柯克斯体, 16S-23S rRNA 基因, 基因间区

中图分类号: R376.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0030-05

ANALYSIS OF THE 16S-23S INTERGENIC SPACER REGION OF THE CHINESE COXIELLA BURNETII ISOLATES

HU Ting-Hui¹ WEN Bo-Hai¹ WAN Ze-Sheng¹ YU Shu-Rong¹ ZHANG Xue²

(Department of Microbiology, The third Military Medical University, Chongqing 400038)¹

(Department of Laboratory diagnosis, Southwest Hospital, Chongqing 400038)²

Abstract: In order to study the heterogeneity of *Coxiella burnetii* (Cb) isolates, the ISR of seven Chinese isolates (Qiyi, Li, Xinqiao, Yaan, YS-8, YS-9, and YS-11) and three international reference isolates (Nine miles, Henzerling, and Grita) were amplified from their genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). The amplimers were directly sequenced by auto-sequencing machine, and only a few sites were detected to be different among the ISR sequences. At the 60th site of the ISR, 3 Yunan isolates (YS-8, YS-9, and YS-11) and Grita, were “C”, identical to that (including Nine miles and some clinic isolates from France) reported by Stein *et al* and the other 5 strains were “A”. The difference of ISR may be related to the different geographic circumstances which these strains inhabited in. Moreover, the ISR of YS-9 was deleted at 8th and 208th, and that of Xinqiao was deleted at 432th. The deletions of the ISR may be reflect to their particular hosts.

Key words: *Coxiella burnetii*, 16S-23S rRNA genes, Intergenic spacer region

伯氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*, Cb) 俗称 Q 热立克次体, 是一种革兰阴性小杆菌。它是人和动物 Q 热的病原体。其疫区除新西兰目前尚未见报道外, 几乎遍及全球各大洲的所有国家。按 Bergey 系统细菌学手册 (1984 年版), Cb 归立克次体科 (Rickettsiaceae)、立克次体族 (Rickettsieae)、柯克斯体属。系统发育分类提示, Cb 与其它立克次体亲缘关系相距甚远, 它属变形菌纲 (Proteobacteria) 的 γ 亚群, 与军团菌属关系密切。人类 Q 热一般分为急性和慢性两种临床类型, 急性 Q 热最常见的为自限性热病,

常伴有肝炎和肺炎;慢性 Q 热常见的为心内膜炎,预后不良。

虽然目前柯克斯体属中只有 Q 热立克次体一个种。但不同分离株在质粒类型、LPS 结构和基因组 DNA 限制酶切图谱上存在不同程度的异质性。这些分子生物学特性的研究提示慢性心内膜炎的分离株与引起急性感染的分离株在遗传学上存在差异。但法国和我国学者的研究则不能证明 Q 热立克次体所带质粒中存在与急性和慢性 Q 热相关的基因^[1]。近期有 *com1* 基因、*icd* 基因和 23S rRNA 基因插入顺序等用于鉴别不同的 Cb 分离株的报道^[2-4]。在 Cb 基因组上寻找一些特殊的基因,能对不同地理环境、不同临床类型及不同动物宿主的分离株进行鉴别,是近十年来 Q 热研究的一个热点,寻找这些基因对不同临床类型的 Q 热的诊断、治疗和流行病学的研究也有着十分重要的意义。

16S-23S rDNA 基因间区(Intergenic spacer region, 简称 ISR)是位于 16S 和 23S rDNA 基因间的 DNA 区域。至 1996 年底,已有包括大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等的 27 个属 44 个种的细菌 ISR 被研究。发现它比 16S 和 23S 基因有更大的变异性。作为对以 16S rRNA 基因为基础的系统发育分类的补充,ISR 在亲缘关系较近的细菌种间、亚种间甚至株间分类的地位已渐渐被肯定。如分枝杆菌属中 *M. Kansasii* 和 *M. Gasti* 的 16SrRNA 基因序列完全相同,但这两种分枝杆菌的 ISR 的同源性仅为 93%。另外,通过 ISR 的序列比较,发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌临床分离株间都可依此进行分类^[5]。而近期报道分离自不同地区并具有不同形态学特征的 6 株 Cb 分离株的 16S rRNA 基因序列高度同源,难以有效进行株间鉴别^[6]。本研究旨在探讨 16S-23S ISR 在 Cb 分离株株间差异分析的适用性。实验采用我室保存的分离自我国不同地区、不同临床类型及不同宿主的 7 株 Cb 菌株和国际参考株,用半套式 PCR 对它们的 ISRDNA 进行扩增,以序列分析的方法证明了此区域在各分离株之间的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株:本次研究共使用 9 株 Cb 分离株。Grita 株 1957 年由军事医学科学院引自前苏联,1961 年引入我室。Henzerling 株购自北京生物制品研究所,七医株 1962 年分离自四川一慢性迁延达 11 个月的 Q 热患者。雅安株 1964 年分离自四川一位 Q 热患者。YH-11 株 1965 年由云南郊区一农民 Q 热病人体内分离。李株 1981 年分离自内蒙古一发热、头痛呈感冒症状的病人。新桥株 1964 年从四川犬体外寄生的铃头血蜱中分离。YS-8 和 YS-9 都分离自从云南的绵羊胎盘。

1.1.2 试剂:组织 DNA 提取试剂盒(QIAamp Tissue Kit)购自 QIAGEN 公司;ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 购自 PE 公司;UNIQ-5 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Cb 菌株的繁殖:菌种均接种鸡胚,在卵黄囊膜中生长繁殖,感染卵黄囊膜涂片后经 Gimenez 染色镜检,选择含立克次体较多(镜下每个视野可见 50-100 个菌体)的卵黄囊膜。

1.2.2 基因组 DNA 的提取与定量:基因组 DNA 的提取按照组织 DNA 提取试剂盒操作说明进行。

1.2.3 16S-23S ISRDNA 的 PCR 扩增:根据 Q 热立克次体 rRNA 操纵元的序列设计二引物 ISR-L: 5'-AGGCTAACCTTCGGGAG-3', 23S-R: 5'-TATGGCTGAACCTTCCA-3', PCR 法扩增 9 株 Q 热立克次体分离株的 ISR。在 0.5mL 反应管内加入 1 μ L 基因组 DNA, 1 μ L 10mmol/L dNTP, 5 μ L PCR 缓冲液(10 $\times$), 10 μ L 15mmol/L MgCl₂ 和 1.25U 的 Taq 酶(Sangon Ltd,

Canada), 补 ddH₂O 至 50 μ L 总容积, PCR 反应条件为 95°C 预变性 7min 后, 再进行 30 个循环, 每个循环为 94°C 1min, 50°C 1min 和 72°C 1min, 循环后 72°C 延伸 10min。取 10 μ L 反应产物在含 0.5 μ g/mL EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察结果。

1.2.4 ISR 的序列测定: 以根据 Q 热立克次体 ISR 序列设计的 ISR-R: 5'-GCGCT-TATTCACCTTGACC-3' 作为测序引物, PCR 产物经 UNIQ-5 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后直接测序, 测序使用 ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 在 ABI PRISM377 DNA 自动测序仪上进行, 采用 Hitachi 公司的 DNASIS 软件进行序列分析。

2 结果

2.1 ISRDNA 的 PCR 扩增

用自行设计的 ISR-L 和 23S-R 引物对 10 株 Q 热立克次体 DNA 进行常规 PCR 扩增后, 可见 10 株 Q 热立克次体均扩增出约 860bp 大小的一个条带, 与设计相吻合 (864bp), 而且, 在 1% 琼脂糖凝胶上未发现各株之间有长度的差异。结果见图 1。

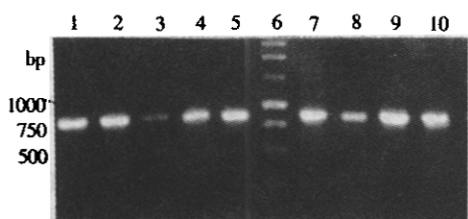


图 1 9 株 Q 热立克次体分离株的 16S-23S ISR 的 PCR 扩增结果

1 七医株, 2 雅安株, 3 新桥株, 4 李株, 5 分子量标记, 6 Grita 株, 7 Henzerling 株, 8 YS-8 株, 9 YS-9 株, 10 YH-11 株

2.2 ISR 的序列

7 个 Q 热立克次体中国分离株和 2 个国际参考株的 ISR 序列均被测定。对上述 9 个 Cb 株序列和 Stein 等报道的序列 (包括九里株 I 相、II 相和一些法国分离株) 进行同源性比较^[7], 同源性大于 99%。但我们获得的 9 株 Q 热立克次体株序列与 Stein 等报道的序列相比, 分别在第 18、29 位增加了一个 C, 在第 199、352 位增加了一个 G; 在 9 株中七医、雅安、Henzerling 和李株的序列完全相同, 新桥株与它们相比在第 432 位出现缺失

突变, 上述 5 株与法国分离株的序列相比, 在第 8、60 位存在 A 与 C 的置换。Grita、YS-8 和 YH-11 的 ISR 序列也完全相同, YS-9 与这 3 株相比, 在第 8 和 208 位分别出现缺失。在已测定的序列中, 第 60 位为 “A” 和 “C” 两种类型, Grita、YS-8、YS-9、YH-11 和法国分离株相同, 为 “A”, 七医、雅安、新桥、Henzerling 和李株相同, 为 “C”, 结果见图 2。

3 讨论

绝大多数细菌中 rRNA 基因都是以 16S-23S-5S 的顺序形成操纵元。每个操纵元共转录出一个多顺反子的 RNA, 再逐步演变成成熟的核糖体。16S-23S ISR 位于 16S 和 23S 基因之间, 包括 rRNA 基因和一些特定二级结构的区域。目前此区域的功能不清, 推测与 rRNA 基因的成熟相关。这使得 ISR 与 16S 和 23S 基因相比, 受到的进化选择压力要小, 从而导致 ISR 比 16S 和 23S 基因存在着相对高的序列变异, 甚至一些影响结构和功能, 包括 rRNA 基因的一些片段的插入或缺失也在不同种、不同株甚至同一细菌的不同 rRNA 操纵元中发现^[8]。PCR 技术的应用使得快速分析 ISR 成为可能。至 1996 年底已对 27 个属 44 个种的细菌 ISR 进行了研究。其中超过半数的细菌在种的水平存在着 ISR 长度的差异, 有的长度差异甚至存在于同一种的不同株间。在另外一些细菌中, 株间的差异用 RFLP 或 PCR-SSCP 得到了快速的鉴定。分枝杆菌属中的 *M. Kansalii* 和 *M. Gasti* 用常规的生化方法甚至 16S rRNA 序列分析都不能区分, 但根据 ISR 的序列得到了很好的鉴别。另外, 基于 ISR 的分型还在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分离株的分析中

	10	20	30	60
法国	AGTCGTAACA	AGGTAGC-GT	AGGGGAAC-T	CTTTTAGTGA
YS-9	-..	C..	C.	
雅安	C..	C..	C.	C
七医	C..	C..	C.	C
YH-11	C..	C..	C.	
Henzerling	C..	C..	C.	C
Grita	C..	C..	C.	
YS-8	C..	C..	C.	
新桥		C..	C.	C
李	C..	C..	C.	C
	200	210	360	440
法国	TGATAAGG-T	GAGGTCGGAA	G-CATCAACA	TGAAATGTAA
YS-9	G.	-..	.G.....	
雅安	G.		.G.....	
七医	G.		.G.....	
YH-11	G.		.G.....	
Henzerling	G.		.G.....	
Grita	G.		.G.....	
YS-8	G.		.G.....	
新桥	G.		.G.....	
李	G.		.G.....	

图 2 10 株 Q 热立克次体分离株 16S-23S ISR 的序列比较
“-”代表相同的碱基，“.”代表碱基缺失

得到了很好的应用^[5]。

Cb 分布相当广泛。由世界各地分离到的菌株，其致病特点不尽相同。不同来源的新分离到的菌株，对实验动物的毒力也多有差异。造成这些差别的遗传学因素，目前尚未阐明。我国 1962 年到 1983 年分离到的 17 株 **Cb** 中，它们的宿主类型、致病性和分离地点都各不相同。**Cb** 基因组中仅有一个 **rRNA** 操纵元存在，不可能进行胞内 **rRNA** 基因重组，使得 Q 热立克次体的 **ISR** 的变异不似具有多拷贝的 **rRNA** 操纵元的细菌（如 *E. Coli* 基因组中存在 7 个 **rRNA** 拷贝）丰富。另外，严格的胞内寄生也限制了外界因素对其基因组的影响。我们从实验中获知，9 株来自不同地区和不同宿主的 **Cb** 分离株以及 Stein 等报道的法国分离株的 **ISR** 序列都高度保守，提示它们均属于同一个种。根据测得的 **ISR** 序列，我们发现第 60 位有“A”和“C”两种形式。根据此位点，具有“A”的 3 个云南分离株 YS-8、YS-9、YH-11 和 Grita 株为一类，而具有“C”的其它 5 个分离株七医、新桥、雅安、Henzerling 和李株为另一类。其它报道的国外株在此位点上也为“A”和“C”。本室其它实验也发现 3 个云南分离株与其它株之间的差异较大。如用 Q 热立克次体 I 相单克隆抗体作免疫印迹时发现在重庆分离的七医和新桥株以及四川分离的雅安株抗原成份非常相近，但与 YS-8 株有明显差异，YS-8 株缺少 67kD 以下条带^[1]。另外，用 Q 热立克次体全 DNA 限制性酶切片段分析、全 DNA 探针杂交及 23S **rRNA** 插入顺序序列分析也证实了 3 个云南分离株与其它地区分离株之间的差异^[3,9]。上述分析提示第 60 位的序列改变似与适应不同的地理环境等自然条件有关。与本研究测定的序列相比，Stein 等报道的序列在第 18、29、199、352 位出现缺失突变，其中第 199 位缺失出现在高度保守的 **tRNA^{leu}** 基因中，具体机理还待进一步研究。YS-9 株在第 8 和 208 位的缺失突变，新桥株在第 432 位的缺失突变，可能与这两个分离株适应不同的

动物宿主(绵羊和铃头血蜱)或在实验室传代情况不同相关。

几十年来, Q 热研究者一直致力于从分离株的病原学特征与其引起的疾病临床类型相联系, 包括 LPS、质粒、基因组 DNA 的 RFLP 分析都曾作为区分急、慢性 Q 热立克次体分离株的分子指标。其中, Samuel 等提出的急、慢性 Q 热分别由含不同质粒的急、慢性 Cb 分离株所引起。急性 Cb 分离株含 36kb 的 QpH1 质粒; 慢性 Cb 分离株含 39kb 的 QpRS 质粒或基因组 DNA 中存在 QpRS 样序列。此观点也得到日本学者的认同。近期日本学者还报道用 *com1* 和 *ICD* 基因即可对引起急、慢性 Q 热的 Cb 分离株进行鉴别^[2,3]。但其他国家学者的报道多为急性和慢性 Q 热的分离株不能用含某一类型质粒或特定基因进行区分。Stein 和 Raoult 分析了 7 个 Q 热立克次体参考株及 30 个新分离自法国的菌株质粒类型, 其中 2 株由山羊胎盘分离, 21 株为慢性 Q 热病人分离株。结果在 7 株急性病人分离株中只有 2 株含 QpH1 质粒, 而 21 株慢性病人分离株中有 7 株含 QpH1 质粒。1995 年 Valkova 和 Kazár 分离到了 QpDV 质粒。此质粒可存在于急性和慢性病人分离株中。我室的研究也发现中国 Q 热立克次体分离株所含质粒类型并不完全与其临床类型相吻合。另外, 一些动物实验的结果也证实慢性心内膜炎的产生与其 Cb 菌株所带的质粒类型无关^[10]。我们对 9 株 Q 热立克次体分离株 16S-23S ISR 的序列进行了比较, 发现分离自慢性 Q 热病人的七医株和由急性 Q 热病人分离的雅安株、李株、Henzerling 株间序列完全一致, 而同属急性株的 Grita 和 YH-11 却与上面的 4 个急性株存在着序列差异。提示 ISR 的差异似与 Q 热临床类型的不同无关。当然, ISR 可编码异亮氨酸-tRNA (tRNA^{Ile}) 和丙氨酸-tRNA (tRNA^{Ala}), 并不表达蛋白产物, 把它应用于不同临床类型的 Cb 分离株分析并非十分理想。本研究结果也提示, 关于 Q 热立克次体分离株是否存在与临床类型相关的病原学特征, 依赖现有的资料很难作出结论。尚需进一步研究加以阐明。比如大规模的分离株比较或进行 Q 热立克次体全基因组测序及比较, 以发现新基因和找出 Q 热立克次体的“毒力岛”才能解决这些问题。

参 考 文 献

- [1] 俞树荣编著. Q 热的病原与防治. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1990, 18~24.
- [2] Zhang G Q, Ho To, Yamaguchi T, *et al.* Microbiol. Immunol, 1997, 41 (11): 871~877.
- [3] Nguyen S V, Hirai K. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180: 249~254.
- [4] 陈 荣, 温博海, 张 雪, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19 (2): 125~128.
- [5] Gürtler V, Stanisich V A. Microbiology, 1996, 142: 3~16.
- [6] Stein A, Saunders N A, Taylor A G, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1993, 113: 339~344.
- [7] Stein A, Kruszezwska D, Gouvenet J, *et al.* Eur J Epidemiol, 1997, 13: 471~475.
- [8] Gürtler V. Gene, 1999, 238: 241~252.
- [9] 余 全, 俞树荣. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14 (5): 349~351.
- [10] 俞树荣, 陈香蕊. 立克次体与立克次体病. 北京: 军事医学科学出版社, 1999, 136.