

立克次体(除战壕热外)是专性细胞内寄生的微生物,具有自身的酶系统和一定的合成生物大分子的能力,但不能在人工培养基上生长。随着分子遗传学技术的发展和运用,近几年来有关立克次体的遗传变异本质的研究有了明显进展,本文就该领域的研究现状作一介绍。

(一)对立克次体质粒的研究

在Q热立克次体内已发现质粒,为了研究立克次体相变异的机制及探讨毒力改变与质粒的关系,Samual等从Q热立克次体九里株I相中分离出一种中等大小质粒QpH1^[1],在氯化铯-溴化乙锭梯度上,大约 1.615 g/cm^3 处形成一条独特的带,Southern印迹法证实它来自立克次体。质粒约有36 kb,分子量为 2.4×10^7 道尔顿,质粒DNA相当于Q热立克次体染色体DNA的6.7%,估计每个立克次体内只有3个拷贝数。用识别4或6个核苷酸序列的20种不同的限制性内切酶处理,酶切片段经琼脂糖凝胶电泳分离,分别出现2—15个酶切片段。用Sall、KpnI、PstI和XbaI四种酶,双酶消化得到的QpH1酶切图谱如下:

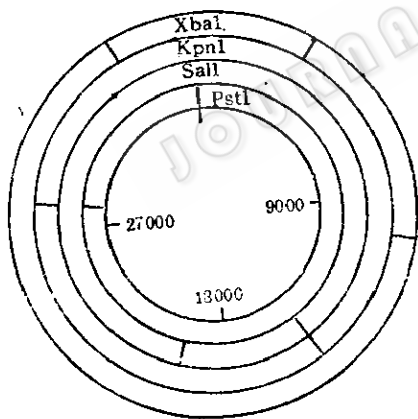


图1 质粒QpH1限制性内切酶图谱^[1]

(QpH1大小约36 kb,选择PstI位点作为第一个碱基对位置)

采用Southern印迹法已确定了QpH1 DNA的所有酶切片段,在九里株I相和II相中都存在。电泳上比较它们的酶切结果未发现差别。计算机提示II相的拷贝数和I相的相同,约每细胞3个拷贝。因此,九里株I相到II相的变异不是由于丢失质粒QpH1引起,不是由于质粒DNA发生明显的改变、缺失或插入序列引起,也不是由于质粒拷贝数的不同所引起。

为了排除相变异是由于质粒极细微的变化所引起,如点突变、小段序列的插入或是有一个转座因子等,这些变化可能改变立克次体基因的转录。用体外反应系统分析了Q热立克次体的RNA转录物。以³²P标记的Q热立克次体RNA为探针,Southern印迹法检测Q热立克次体九里株I相和II相的质粒和染色体,都得到RNA-DNA杂交子,说明质粒和染色体都发生了转录^[2]。

以³²P标记的QpH1为探针,Southern印迹法检测不同来源的Q热立克次体的DNA,结果都含有与QpH1同源的质粒序列,其中从山羊分离的样品虽有同源序列但其带型不同。从众多的样品分析观察中,可以看到,质粒序列具有保守性是肯定的,可能该序列参与立克次体的代谢过程^[3]。

(二)立克次体基因限制性内切酶图谱分析

限制性内切酶分析技术可用于Q热立克次体株的分群,用不同的限制性内切酶消化Q热立克次体的DNA,经琼脂糖凝胶电泳,根据其图谱将15株立克次体分为五群。其中从人急性感染病例分离的Q热立克次体,与从牛、节肢动物和持续感染的豚鼠胎盘分离的Q热立克次体的DNA酶切图谱是相同的。这提示引起人的急性感染的Q热立克次体可能广泛分布在各地区的牛和节肢动物中,而且具有长期稳定性。但是,由两只流产山羊胎盘及一组心内膜炎病人分离出的Q热立克次体所含质粒Qprs,从酶切图及杂交印迹比较,又均与QpH1不完全一致。因此,人及家畜各种类型感染所分离的Q热立克次体株,各自的毒力特征和质粒的关系,有待进一步阐明^[3]。

Regnery等将一些地区、生态环境和时间背景不同的普氏立克次体DNA,用SacI消化,琼脂糖凝胶电泳,同时把莫氏立克次体也一并进行比较,结果普氏立克次体和莫氏立克次体的带型明显不同,而所有普氏立克次体的带型却都相似,这说明普氏立克次体DNA的结构是相当稳定的^[4]。

从人血凝块分离的普氏立克次体Addis Ababa株和从牛脾分离的普氏立克次体ZRS株,它们的DNA SacI酶切分析显示相当密切相关性^[5]。因此人类流行性斑疹伤寒是否存在非人宿主的问题还需进一步研

本文由范明远教授审校,特此致谢。

究。

Regnery 就普氏立克次体毒性与其基因结构的关系进行了研究。普氏立克次体有毒株 Madrid-2、普氏立克次体减毒株 Madrid-1 及 Madrid-E 的 *SacI* 酶切图谱发现有细微差别；而 *Bam*HI、*Bgl*II 和 *Pvu*II 的酶切图谱则相似。由于有一段普氏立克次体 Madrid-E 的 *SacI* 酶切片段大于 Madrid-2 的相应片段，提示在这段 DNA 区域内可能额外插入了一段序列。因为从理论上讲，替换单个核苷酸就能改变基因的产物，引起毒力的变化。这样一个小的突变，如果不是发生在限制性内切酶的识别序列上，则酶切片段的分析也不能将其发现^[5]。

(三) 立克次体基因克隆及其表达

Mallavia 等已将 Q 热立克次体九里株 I 相 QpH 1 质粒克隆到大肠杆菌中。限制性内切酶 *Pst*I 消化的 QpH 1 质粒片段，用 pACYC 177 为载体，克隆到大肠杆菌 RR 1 中^[6]。pACYC 是 p15A 的非感染性衍生物，它含有氨苄青霉素、卡那霉素和四环素抗性，在氨苄青霉素区内有一个 *Pst*I 位点，其插入失活可作为重组成功的选择标记。另外它不含有作 QpH 1 酶切图谱时用的 *Kpn*I、*Sal*I 和 *Xba*I 的酶切位点^[7]。

完整的质粒已克隆到两个不同的杂交质粒中，一个是 pJSP3，含有小的 (8.5 kb) *Pst*I 酶切片段，另一个是 pJSP1，含有大的 (27 kb) *Pst*I 酶切片段^[6]。

普氏立克次体柠檬酸合成酶基因已成功地在大肠杆菌中克隆和表达^[8]。用限制性内切酶 *Sau*3A 不完全消化普氏立克次体 DNA 片段，将其和经 *Bam*HI 消化、碱性磷酸酶处理的 pBR 322 DNA 相连接，将杂交质粒转化大肠杆菌柠檬酸合成酶缺失突变株，在不含葡萄糖的培养基上选择出该酶的阳性株^[9]。其中分离到一个克隆 (MOB 155) 含有一个约 9.6 kb 的质粒 pMW 150。纯化的 pMW 150 质粒 DNA 转化大肠杆菌 *gltA* 菌株时，转化体同时获得氨苄青霉素抗性和在不含葡萄糖的基础培养基上生长的能力。Southern 印迹法证明了插入的 DNA 来自立克次体。表明克隆成功。亚克隆实验已确定柠檬酸合成酶基因为一个 3 kb 的 *Hind*III 酶切片段。含有这个插入 pBR 322 *Hind*III 位点的 *Hind*III 酶切片段的质粒称 pMW 151。MOB 155 提取物中柠檬酸合成酶活性测定，表现为该酶受 ATP 强烈抑制， α -KG 对其无作用，即该酶为立克次体基因所编码^[10]。凝胶过滤法确定了具有催化活性的柠檬酸合成酶的分子量大约是 62000 道尔顿^[11]，比革兰氏阳性菌真菌中 (100000 道尔顿) 和大肠杆菌中 (230000 道尔顿) 相应的酶小些。

由于柠檬酸合成酶基因表达不依赖载体启动子，推测该基因有自己的启动子。在大肠杆菌微细胞中，发现克隆的 *Eco*RV 片段编码合成一种蛋白质，其分子量和重组质粒 pMW 155 编码的蛋白质相同。把该

*Eco*RV 片段克隆到启动子探针载体 pKO-1 中，证实有启动子活性的序列存在，该区段约 90 碱基对^[12]。

采用 λ 噬菌体 gt 11 作为表达载体，在大肠杆菌中已建立了普氏立克次体和莫氏立克次体编码的血清型蛋白抗原 (SPA) 的部分基因克隆^[13]。用鼠单克隆抗体空斑挑选，分离了克隆产生的 SPA。11 个重组噬菌体已进行空斑纯化和作进一步研究。限制性内切酶消化分析克隆的 DNA 片段，在琼脂糖凝胶上出现从 400 bp 到 3900 bp 大小不等的插入片段。再用 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析这些重组体的蛋白产物，可见重组体可明显分为两类。鼠单克隆抗体能识别变性 SPA 抗原的两种不同类型：A 和 B。A 型的一个单克隆能识别 5 个普氏立克次体克隆，他们的大小是 20—35 K，并发现他们与大肠杆菌的胞膜有关，不是与 β -半乳糖酶融合蛋白，推测可能是立克次体启动子的产物，它大概反映了 SPA 氨基末端的不同长度。B 型的一个单克隆可识别 4 个普氏立克次体和 2 个莫氏立克次体克隆，他们也与大肠杆菌胞膜有联系，但它是与 100 K 的 β -半乳糖酶相融合的，他们含有 5—40 K 的 SPA，大概反映了 SPA 羧基末端的不同长度。目前正将这些 DNA 片段进一步亚克隆到合适的载体，并在不含大的 β -半乳糖酶片段的情况下让其表达，再分析 DNA 序列，同时也正进行鉴定编码全 SPA 蛋白重组体的工作。由于这些克隆产生了大量抗原，所以这些重组体作为抗原的来源，在体液免疫和细胞免疫的诊断试验中将是有益的。

(四) 立克次体基因库的建立

Krause 等采用粘性质粒 pHG 79 为载体，在大肠杆菌 K₁₂ 菌株 HB 101 或 X 2687 T 中建立了 *Eco*RI、*Hind*III 和 *Sau*3A 酶切的普氏立克次体染色体的基因库^[14]。建立在 X 2687 T 的基因库特别适合于抗原表达，因为这个菌株含有一个热敏感的 λ Clt857 原噬菌体，能使细胞产生热溶解，这样细胞产生的但不能通过大肠杆菌胞膜分泌的立克次体表面蛋白，可以很容易检出。微细胞分析已经证明含重组质粒的大肠杆菌能产生由立克次体基因编码的 55 K 蛋白和 15 K 蛋白，由此有可能找到一条能得到大量抗原的途径。

从 2700 多个以 *Sau*3A 酶切和粒性质粒 pHG 79 为载体的基因库克隆中，找出了一个能表达立克次体 ADP/ATP 移位酶的克隆——MOB 286。这个克隆带有一个含 9000 碱基对立克次体 DNA 插入序列。用同位素标记法测定转化后的大肠杆菌，发现它具有与立克次体相同的 ADP/ATP 移位酶的特性，证明该酶是来源于立克次体。这项工作将促进对立克次体专性细胞内寄生的生物能学和代谢规律的研究^[15]。

运用 λ gt 11 表达载体系统，Weiss 等建立了康氏立克次体 (第七株) 的基因库^[16]。纯化的立克次体 DNA 经 *Sau*3A、*Hpa*I、*Hin*II 和 *Ana*II 部分酶解，然

后通过 *EcoRI* 连接子连接到 λ gt11 载体上。包装后接种大肠杆菌 Y1090。用 Western 印迹法分析,显示出所识别的特异性康氏立克次体抗原。

Q 热立克次体的染色体 DNA 亦已克隆在粘性质粒载体 pHC79 中^[17]。采用从一个慢性 Q 热病人获得的多克隆血清和二 29.5 K 多肽的单克隆抗体,筛选出 200 个阳性克隆。其中 pJB196 对两种抗血清起强反应。用慢性 Q 热病人血清,进行 Western 印迹试验,在重组体中找到一种 52 K 的多肽,它与 I 相 Q 热立克次体溶菌物中的一种主要抗原具有相同的电泳迁移率。在一个长度是 1.7 kb 的次级克隆中,两种抗原活性相同。在体外转录和翻译试验中,证明 pJB196 有许多产物,其中一个 52 K 和一个 2—5 K 多肽已被次级克隆,较小的那段多肽可能是一段 29.5 K 多肽截短了的部分。这两个抗原可能是紧密地连接于 Q 热立克次体染色体 DNA 上的。

McDonald 等建立了立氏立克次体 R 株染色体基因库,并鉴定了一种由大肠杆菌转化表达的立氏立克次体 155 K 的主要保护性抗原^[18]。一个 3.7 kb 的 *PstI* 片段包含编码抗原的基因,已次级克隆到 puc8 乳糖启动子下游,使之成为 pGAM22。带有 pGAM22 大肠杆菌的超声波裂解产物,免疫小鼠,可以抵抗活立克次体的致死性实验攻击;接种豚鼠,可以保护由立氏立克次体引起的实验性致死性洛矶山斑点热。

(五) 立克次体基因探针

Regnery 等采用了二种 DNA 探针:一是普氏立克次体的 *BamHI* 酶切克隆的 DNA 片段,另一是完整的普氏立克次体柠檬酸合成酶基因的克隆 DNA。用以研究立克次体基因变化和表型的关系。

普氏立克次体 Madrid-E 的 *BamHI* 酶切片段,在电泳上显示有一额外的片段。该片段在普氏立克次体 Breinl 株中未见^[19]。可能这个额外 DNA 片段含有普氏立克次体 Breinl 株所没有的遗传信息,有可能成为有效的诊断探针。但是用 *BamHI* 克隆探针比较上述两者的 *RsaI* 和 *Sau3A* 酶切片段时,没有发现差别^[20]。

用普氏立克次体 Breinl 株柠檬酸合成酶基因的克隆 DNA,探测 *RsaI* 或 *Sau3A* 酶切的许多普氏立克次体株的 DNA,也明显地显示出种内的相似性^[20],提示了普氏立克次体种内有相当大的同源性。

Fuerst 等将三个立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*) 的随机分子探针,检测 5 种 [立氏立克次体 (*R. rickettsii*)、扇头蜱立克次体 (*R. rhipicephali*)、蒙他拿立克次体 (*R. montana*)、贝利立克次体 (*R. bellii*)、小蛛立克次体 (*R. akari*)] 和 10 个地区分离的病原体, Southern 印迹法显示,对每个探针来说,五种斑点热立克次体都各具特性,10 个地区的病原体分别可归入上述五种斑点热立克次体的一种。因此分子探针

可用于斑点热群立克次体的分类^[21]。

以立氏立克次体的基因组和五日热沙利马体 16 S rRNA 基因克隆的限制性片段为探针, Ralph 等对立克次体属内 11 个代表种用 Southern 印迹法分析,限制性片段长度多态性分析 (RFLP's) 显示被检的种都具有特异性,可以用此技术将它们清楚地分开。RFLP's 的进一步分析将能预测出被试的 11 个立克次体种的遗传和进化的关系。已发现洛矶山斑点热群的大部分成员互相密切相关 (<7% 离散度),立氏立克次体和小蛛立克次体是洛矶山斑点热群中趋异性最大的成员 (8+13% 离散度),其它被检的 3 个种:贝利立克次体 (*R. bellii*)、加拿大立克次体 (*R. canada*) 和鼠型斑疹伤寒立克次体 (*R. typhi*) 与洛矶山斑点热群无密切关系,它们互相之间也无密切关系^[22]。

Regnery 等也在斑点热群立克次体的研究工作中运用了探针技术,他们用克隆于细菌质粒 pUC19 的立氏立克次体片段作为探针,区分斑点热群立克次体的多个分离物。实验过程包括:将许多类似的立克次体分离株感染的细胞培养的胞浆提取物进行限制性内切酶消化 DNA 电泳 Southern 法印迹于硝酸纤维素膜,接着使用带标记的克隆的立克次体 DNA。用 DNA 探针较易区别斑点热立克次体各不同的种。由于该技术快速简便,将使人们更好地认识立克次体生物型和非病原性立克次体,对于立克次体流行病学和生态学之间的关系^[23]。

Quinn 等运用重组 DNA 技术在感染组织中计数鼠型斑疹伤寒立克次体^[24]。一个 2.1 kb 的 *PstI* 限制性内切酶片段是从斑疹伤寒莫氏立克次体 (*Rickettsia mooseri*) 基因组中分离出来的,该片段能与立克次体 DNA 中一个特异性片段杂交,而不能和大肠杆菌或哺乳动物 DNA 杂交,根据这样的结果,放射性标记片段已经用于测定 *PstI* 消化后鼠 DNA 中是否存在立克次体 DNA。据 Quinn 现有资料表明,能够从 10 μ g 的鼠 DNA 中检测出小至 10 pg 的立克次体 DNA。已有报道指出,立克次体基因组的大小是 1.5×10^3 kb,每个宿主细胞含 10—20 个立克次体拷贝,因此 Quinn 使用的这项技术就可能测出每 1×10^4 个宿主细胞中的一个感染细胞。这个方法的优点是能够直接检测轻度感染,方法快速、简便和准确定量。

(六) 立克次体基因组的序列分析

克隆的普氏立克次体 ADP/ATP 移位酶基因,已由 Williamson 确定为立克次体 DNA 上一个 1.3 kb 的 *XbaI*-*HindIII* 片段。采用酶促法进行了序列分析,到目前为止,两条链上已有 600 bp 进行了序列分析,在此区域内有一个 570 bp 的开放读码框架,推测是立克次体 ADP/ATP 移位酶基因的部分编码区^[25]。

普氏立克次体的柠檬酸合成酶在大小和对某些效应物的敏感性方面,更类似于真核细胞和革兰氏阳性

菌的柠檬酸合成酶,而不是与形态学上相似的细菌(大肠杆菌)的酶相似。Wood 等已经将普氏立克次体柠檬酸合成酶基因确定为是一个 1.3 kb 的 DNA 片段,其序列已经确定。它含有一个开放读码框架,编码一个具有与大肠杆菌柠檬酸合成酶蛋白质序列非常同源的蛋白质,与大肠杆菌酶具有氨基酸同源性最多的是在蛋白质的羧基端。尽管在氨基酸序列上的相似性,但普氏立克次体基因密码子的用法有明显的倾向性,并且不同于大肠杆菌。在立克次体密码子的第三个核苷酸, A 和 U 用得更多^[26]。

Anderson 等将克隆在质粒载体 pUC 19 并在大肠杆菌中表达的立克次体编码的 17 K 抗原的基因进行了序列分析,结果发现有一个 477 个核苷酸的开放读码框架,在假定的 AUG 的上游,发现类似于大肠杆菌启动子的-10和-35 保守序列。编码 17 K 抗原基因的下游还有一个 267 bp 的开放读码框架,该读码框架在立克次体中是否有表达还不清楚。这 477 个核苷酸的开放读码框架编码一个 159 个氨基酸组成的分子量大约是 16.840 道尔顿的蛋白质,和立克次体一种蛋白质的分子量非常一致。该分子的 N 端有 3 个疏水性决定簇,而分子的其他部分则为亲水性。17 K 多肽的 N 端有一段序列类似大肠杆菌的信号肽^[27]。

(七) 结语

总之,分子遗传学技术已经运用于立克次体学领域,目前已建立了多株立克次体的基因库,有希望从此找到一条大量生产抗原的途径。普氏立克次体的柠檬酸合成酶基因、ADP/ATP 移位酶基因和 Q 热立克次体九里株 I 相质粒 QpH 1 的基因克隆,为研究立克次体的生理性质和病理作用提供了条件;分子探针和序列分析技术的应用将推动快速诊断、流行病学和基因与结构关系的研究。但目前的研究还比较局限,只在 Q 热立克次体找到质粒,其它立克次体中是否存在质粒还不清楚;Q 热立克次体毒力机制及相变异和基因之间的关系仍未发现;用分子遗传学鉴定新株和 DNA 序列分析工作还刚刚开始,随着分子遗传学技术应用的进一步发展,所有这些方面都将有新的突破。

参 考 文 献

[1] Samuël, J. E. et al. *Infect. and Immun.*, 41(2): 488—493, 1983.
[2] Frazier, M. E. et al.: Abstracts of IIIrd International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases in

Smolenice, Bratislava. p. 21, 1984.
[3] Mallavia, L. P. et al.: Abstracts of 5th National Conference of the American Society, for Rickettsiology and Rickettsial Diseases. p. 13, 1985.
[4] Regnery, R. L. et al.: *Current Microbiology*. 8: 355—358, 1983.
[5] Regnery, R. L. et al.: *Microbiology. American Society for Microbiology Washington D. C.* p. 297—300, 1984.
[6] Mallavia, L. P. et al.: *Microbiology*. p. 293—296, 1984.
[7] Chang, A. C. Y. et al.: *J. Bact* 134: 1141—1156, 1978.
[8] Wood, D. O. et al.: *J. Bact.* 155(1): 412—416, 1983.
[9] Guest, J. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 124: 17—23, 1981.
[10] Weitzman, P. D. J. et al.: *Current Topics in Cellular Regulation*, 10: 161—204, 1976.
[11] Phibbs, P. V. Jr et al.: *J. Bact.* 149: 718—725, 1982.
[12] Williamson, L. R. et al.: Abstracts of 5th National Conference of the American Society for Rickettsiology and Rickettsial Diseases, p. 3, 1985.
[13] Dobson, M. E. et al.: Abstracts of 6th National Conference of the American Society for Rickettsiology, p. 3, 1986.
[14] Krause, D. C. et al.: *Infect. and Immun.* 47(1): 157—165, 1985.
[15] Krause, D. C. et al.: *Proc. National Acad. Sci. USA*. 82(9): 3015—3019, 1985.
[16] Weiss, K. et al.: Abstracts of 6th National Conference of the American Society for Rickettsiology, p. 7, 1986.
[17] Vodkin, M. H. et al.: Abstracts of 6th National Conference of the American Society for Rickettsiology, p. 5, 1986.
[18] McDonald, G. A. et al.: *Science*. 235(1): 83—85, 1987.
[19] Wood, D. O. et al.: *Microbiology*, p. 301—304, 1984.
[20] Regnery, R. L. et al.: Abstracts of IIIrd International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases in Smolenice, Bratislava, p. 62—71, 1984.
[21] Fuerst, P. A. et al.: Abstracts of 5th National Conference of the American Society for Rickettsiology and Rickettsial Diseases, p. 40, 1985.
[22] Ralph, D. et al.: Abstracts of 6th National Conference of the American Society for Rickettsiology, p. 4, 1986.
[23] Regnery, R. L. et al.: *ibid.* p. 6, 1986.
[24] Quinn, P. et al.: *ibid.* p. 10, 1986.
[25] Williamson, L. R. et al.: *ibid.* p. 1, 1986.
[26] Wood, D. O. et al.: *ibid.* p. 2, 1986.
[27] Anderson, B. E. et al.: *ibid.* p. 8, 1986.