DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.012
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
404 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0404-03

贝氏柯克斯体中国分离株 *com*1 基因的序列分析

余 全[1],张国全[2], Fukushi Hideto, Yamaguchi Tsuyoshi, Hirai Katsuya[2] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038;[2]日本岐阜大学联合兽医学部微生物学教研室,岐阜 501-1193)

提 要:目的 通过 *com*1 基因序列比较,了解贝氏柯克斯体中国分离株的一些遗传特征。方法 对贝氏柯克斯体中国分离株的 *com*1 基因进行扩增、测序和分析,将我们的结果与国外研究结果进行比较。结果 在7个中国分离株中,可检测到3种不同的 *com*1 基因序列。除质粒型相同的分离株表现出类似的 *com*1 基因序列外,质粒型为 QpRS 的中国分离株可被单独划分成一个新的基因组。结论 本研究结果显示,根据 *com*1 基因序列进行的贝氏柯克斯体株基因分组与分离株所含质粒型有很大的相关性,而与以前报道的疾病形式和分离株的地理分布无关。

关键词:贝氏柯克斯体; *com*1 基因; DNA 序列
中图法分类号:R376; R394.3 文献标识码:A

Sequence analysis of *com*1 gene of *Coxiella burnetii* Chinese isolates

YU Quan, ZHANG Guo-quan, FUKUSHI Hideto, YAMAGUCHI Tsuyoshi, HIRAI TO Ho, HIRAI Katsuya (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the genetic characteristics of Chinese isolates of *Coxiella burnetii* by comparing their *com*1 gene sequences with those from other isolates. **Methods** The *com*1 gene of *Coxiella burnetii* Chinese isolates were amplified, sequenced and analyzed. The results were compared with the sequence analyses of isolates from other places. **Results** Three different *com*1 sequence groups were identified in 7 Chinese isolates. Sequence comparison indicated that the isolates harboring the QpRS plasmid were defined as a new group and, in addition, the isolates carrying the same plasmid type showed similar *com*1 gene sequence. **Conclusion** The study suggests that the classification of the group based on the *com*1 gene sequence is highly associated with the plasmid type of the isolates, however, has little relation with the disease forms and geographical origins of isolates.

Key words: *Coxiella burnetii*; *com*1 gene; sequence analysis

Q 热是由专性细胞内寄生菌贝氏柯克斯体引起的一种人兽共患病。人类是感染后能发展成疾病的唯一宿主。根据临床表现,贝氏柯克斯体的感染可分为急性和慢性两种类型[1]。在立克次体属中,贝氏柯克斯体是目前已知唯一含有质粒的病原菌,现已发现四种质粒型和一个无质粒型。贝氏柯克斯体曾被有些学者分为与该病急、慢性临床表现一致的含 QpH1 和 QpRS 质粒的急、慢性分离株。然而,如今的观点认为该病的急、慢性和感染的病原特征无关,急、慢性 Q 热的发展主要取决于病人的身体条件和免疫状况[2,3]。

最近,贝氏柯克斯体的一些基因已被测序。*com*1 基因由于编码与外膜相关的 27×10^3 免疫反应蛋白[4],因此首先被用来对贝氏柯克斯体分离株进行遗传特征分析。张氏等[5]曾测序包括 *com*1 ORF 在内的 1061bp 片段,提出可根据 *com*1 基因序列区分急、慢性贝氏柯克斯体株。Sekeyova 等[6]最近根据 715bp *com*1 ORF 序列将 37 株贝氏柯克斯体分成 5 组,认为 *com*1 基因序列与分离株的地理分布和疾病形式无关。由于两个作者测序的 *com*1 基因长度和所用的分离株不同,因此得出了不同的分组。

在中国,目前已对分离自不同来源和地理分布的贝氏柯克斯体中国株进行了一些分子生物学方面的研究[7,8]。以前有关 *com*1 基因序列分析及病原体所含质粒型与临床类型之间关系的研究所用贝氏柯克斯体株主要分离自美国,欧洲和日本。其中仅少数分离株带有 QpRS 质粒。带 QpRS 质粒分离株已证实在脂多糖和染色体 DNA 酶切图谱上区分于含 QpH1 的分离株[9,10]。现已有 5 个中国分离株被证实含有 QpRS 质粒,而且,以往研究发现质粒型与该病急、慢性临床表现间无一致关系[7]。为了解中国分离株尤其是含 QpRS 质粒的分离株的遗传特性,我们对 7 株中国分离株的 *com*1 基因进行了测序分析,并将我们的结果与张氏等的数据进行了比较。

1 材料与方法

1.1 贝氏柯克斯体株

本实验使用了 7 株中国分离株包括 3 株来自于人(七医、李株和 YH-11)、3 株来自于绵羊(YS-6、YS-8 和 YS-9)、一株来自蜱(新桥)的分离株和九里标准株[7],见表 1。七医株 1962 年分离自四川一慢性迁延达 11 个月的 Q 热患者;李株 1981 年分离自内蒙一急性 Q 热病人;YH-11 株 1965 年自云南郊区一农民急

基金项目:日本文部省(10460114, 11556060)和日本健康福利省在新兴和再新兴感染疾病 H10-Emerg.-7 资助项目
作者简介:余 全(1964-),女,四川省成都市人,硕士,副教授,主要从事立克次体分子生物学方面的研究工作,发表论文 10 篇。电话:(023)68752239
收稿日期:2002-01-15;修回日期:2002-03-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性 Q 热病人体内分离。YS-6、YS-8 和 YS-9 株分离自云南的绵羊胎盘和脏器。新桥株 1964 年从四川犬体外寄生的铃头血蜱中分离。所有分离株都在鸡胚卵黄囊中培养然后用泛影葡胺密度梯度离心法进行纯化[11]。

表 1　贝氏柯克斯体中国分离株

Tab 1　Chinese isolates of *Coxiella burnetii*

Isolates	Geographical source	Disease	Origin	Plasmid	GenBank Accession number
Qi Yi	Sichuan, China	Chronic	Human, blood and bone marrow	QpH1	AF317646
Xin Qiao	Sichuan, China	—	Tick	QpH1	AF317647
Li strain	Inner Mongolia China	Acute	Human, blood	QpRS	AF318145
YH-11	Yunnan, China	Acute	Human, blood	QpRS	AF318146
YS-9	Yunnan, China	—	Sheep, placenta	QpRS	AF318147
YS-8	Yunnan, China	—	Sheep, placenta	QpRS	AF318149
YS-6	Yunnan, China	—	Sheep, organs	QpRS	AF318149

1.2　PCR

根据文献[10]的方法制备贝氏柯克斯体分离株的全 DNA。根据 GenBank 中已知的 *com*1 基因序列设计引物, 扩增包括 *com*1 ORF 在内的 1062bp DNA 片段(碱基位置在 39～1 054 bp)。测序前, PCR 产物用外切酶Ⅰ和虾碱性磷酸酶(Amersham Pharmacia Biotech., Inc., USA)处理。

1.3　测序

核苷酸序列用 Amersham 的热测序酶 cy5.5 终止子循环测序试剂盒和 SEQ4×4 个人测序系统。1 062 bp DNA 片段内的另外三对引物被设计来测序包括 ORF 在内 932 bp *com*1 基因片段(碱基位置在 92～1 024 bp)。测序反应分别用 3 次 PCR 产物, 从正反两个方向进行 3 次以确保测序的准确性。九里标准株 DNA 作为阳性对照。序列数据用 GENETYX-MAC 分析系统(Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan)进行分析。

1.4　注册号

所测核苷酸序列在 GenBank 的注册号, 见表 1。

2　结果

中国分离株和张等报告分离株的 *com*1 基因序列, 见表 2。所有被检分离株都显示出了 99%以上的序列一致性。然而, 在中国分离株 103, 186, 365 和 449 核苷酸位置上仍能发现 4 个核苷酸点突变。其中在位置 103 和 186 上的两个突变位于 ORF 的外侧, 365 和 449 上的突变在 ORF 内并引起两个编码氨基酸的改变: 一个在氨基酸位置 26, 丙氨酸取代了以前的苯丙氨酸; 另一个在氨基酸位置 54, 由丝氨酸变成缬氨酸。根据这 4 个碱基的突变, 在贝氏柯克斯体七医、新桥和 5 株含 QpRS 质粒分离株中, 分别可识别 3 种不同的 *com*1 基因序列。

表 2　贝氏柯克斯体 *com*1 基因上的核苷酸突变

Tab 2　Nucleotide mutations in *com*1 sequence of *Coxiella burnetii*

Group	Isolate	Position in the gene														Reference
		103	186	273	306	333	365	428	449	465	472	559	652	700	995	997	
Ⅰ	Nine Mile	A	G	C	T	C	T	A	C	A	A	G	A	G	G	G	[5]
	11 strain *	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[5]
	Qi Yi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	This study
Ⅱ	ME	C	—	—	C	—	C	—	—	—	G	T	—	—	—	—	[5]
	MAN	C	—	—	C	—	C	—	—	—	—	T	—	—	—	—	[5]
Ⅲ	SQ217	C	—	G	—	T	C	G	—	—	—	—	—	A	—	A	[5]
	KoQ29	C	—	G	—	T	C	G	—	—	—	—	C	—	—	—	[5]
	GQ212	C	—	G	—	T	C	G	—	—	—	—	—	—	—	—	[5]
Ⅳ	Priscilla	—	T	—	—	—	—	—	—	G	—	—	G	—	A	—	[5]
	Henzerling	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	A	—	[5]
	Xin Qiao	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	This study
Ⅴ	Li strain	C	—	—	—	—	C	—	T	—	—	—	—	—	—	—	This study
	YH-11	C	—	—	—	—	C	—	T	—	—	—	—	—	—	—	This study
	YS-9	C	—	—	—	—	C	—	T	—	—	—	—	—	—	—	This study
	YS-8	C	—	—	—	—	C	—	T	—	—	—	—	—	—	—	This study
	YS-6	C	—	—	—	—	C	—	T	—	—	—	—	—	—	—	This study

*: Including California 76, Bangui, Ohio314 and Japanese isolates: 1M, 27M, 60M, 50F, 57T, 58T, 59T and 605[5]

3　讨论

贝氏柯克斯体分离自包括人在内的各种标本。以前的研究显示, 其分离株可根据质粒型[1]、脂多糖(LPS)型[9]和限制性内切酶片段(RFLP)型[10]进行分组。在日本、欧洲和美国的贝氏柯克斯体株间的 16S rRNA 的序列同源性大于 99%[12], 因此, 贝氏柯克斯体是非常的相似。然而, 一些基因的序列分析提出了不同 DNA 序列的存在。根据不同基因序列和所用的不同分离株, 得出了不同的基因分组。两个研究者对 *com*1 基因研究的分歧使我们产生了分析中国贝氏柯克斯体株的动机。

与文献[5]的贝氏柯克斯体分离株的 *com*1 基因序列比较, 含 QpH1 质粒的七医株, 尽管在临床上表现为慢性 Q 热症状, 但在 *com*1 基因序列上却与含 QpH1 质粒的Ⅰ组中的分离株序列完全一致。新桥株仅有 186

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

位置的一个核苷酸突变，这个位置的突变曾被报道在Ⅳ组的 Priscilla 和 Henzerling 株，然而，在 Priscilla 和 Henzerling 株的其它核苷酸突变未在新桥株发现。位置 103、365 和 449 的核苷酸突变发现在 5 株含 QpRS 质粒分离株中。两个 ORF 内的核苷酸突变引起了两个氨基酸的改变。103 和 365 位置的核苷酸突变曾被发现在Ⅱ和Ⅲ组的分离株序列中。然而，449 位置的核苷酸突变仅出现在含 QpRS 质粒中国分离株的 *com*1 基因序列上。在张氏等的研究中，含 QpRS 质粒的标准慢性株 Priscilla 有完全不同于含 QpRS 质粒中国分离株的四个位置（186，465，652 和 995）的核苷酸突变。在含 QpRS 质粒的中国分离株中，*com*1 基因序列更接近于那些含 QpDV 质粒和质粒序列插入染色体 DNA 的分离株。由于目前很难找到更多的有关 QpRS 质粒分离株的 *com*1 基因序列数据，因此，目前尚不能肯定 449 位置的核苷酸变异仅存在于含 QpRS 质粒的中国分离株中。根据目前的数据（表 2），综合张和 Sekeyova 等[6] 的研究，我们认为含 QpRS 质粒的中国分离株可被划分作为一个新的基因分组（第Ⅴ组）。

如表 2 所示，Ⅰ组里的贝氏柯克斯体株分离自不同来源如急、慢性病人，牛乳和蜱，包括来自美国、日本、意大利和中国的分离株。这些株都有一个共同的特点：含 QpH1 质粒。组Ⅱ和Ⅲ的分离株来自于法国和美国的慢性 Q 热病人，分别含 QpDV 质粒和无质粒但质粒序列已插入染色体 DNA。比较结果显示出，根据 *com*1 基因序列进行的分组与贝氏柯克斯体的质粒型高度相关，而与疾病型和分离株的地理起源无关。这与 Sekeyova 等人的观点非常吻合。另外，从表 2 还可以观察到一个有趣的现象，所有含 QpRS 质粒（除外 Priscilla 株）和 QpDV 质粒或质粒序列插入染色体 DNA 的分离株都有核苷酸位置 103 和 365 的碱基突变，这明显区分于含 QpH1 质粒的分离株。类似现象也在 *icd* 和 *suc*B 基因[13,14] 序列中被观察。已经证实，QpDV 质粒和质粒序列插入染色体 DNA 的分离株与含 QpH1 质粒的分离株比较，与含 QpRS 质粒的分离株有更接近的关系[15,16]。尽管 QpH1[17] 和 QpRS 质粒[18] 的序列目前已全部测序，但贝氏柯克斯体质粒的生物学意义至今仍不清楚。此现象是否与 QpRS 质粒、QpDV 质粒和质粒序列插入染色体 DNA 的共同特异性序列有关，尚待证明。

贝氏柯克斯体的 *com*1 基因是一个高度保守的基因。然而，在中国分离株中仍然可识别三个不同的核苷酸序列并且区分于文献上报道的贝氏柯克斯体株。根据目前的研究，我们提出了一个新的基因分组，同时该组与分离株所含的质粒型高度相关。尽管我们目前的知识还不能解释这些染色体上的基因与质粒间的关系，但我们深信，随着知识的月新日益，谜底不久将会出现。希望我们的结果能为更广泛的理解该微生物的一些遗传变异提供一些新的分析数据。

参考文献：

[1] Samuel J E, Frazer M E, Mallavia L P. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*[J]. Infect Immun, 1985, 49(3): 775－779.

[2] Thiele D, Willems H. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in "acute" and "chronic" isolates still valid[J]? Eur J Epidemiol, 1994, 10(4): 427－444.

[3] Yu X, Raoult D. Serotyping *Coxiella burnetii* isolates from acute and chronic Q fever patients by using monoclonal antibodies[J]. FEMS Microbiol Lett, 1994, 117(1): 15－19.

[4] Hendrix L R, Mallavia L P, Samuel J E. Clonging and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein *com*1[J]. Infect Immun, 1993, 61(2): 470－477.

[5] Zhang G Q, To H, Yamaguchi T, *et al*. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com*1) encoding a 27-kDa outer membrane protein[J]. Microbiol Immunol, 1997, 41(11): 871－877.

[6] Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* asrevealed by *com*1 and mucZ sequence comparison[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180(1): 61－67.

[7] Wen B H, Yu S R, Yu G Q, *et al*. Analysis of proteins and lipopolysaccharies from Chinese isolates of *Coxiella burnetii* with monoclonal antibodies[J]. Acta Virol, 1991, 35(6): 538－544.

[8] Ning Z, Yu S R, Yu G Q, *et al*. Molecular characterization of cloned variants of Coxiella burentii isolated in China[J]. Acta Virol, 1992, 6(2): 173－183.

[9] Hackstadt T. Antigenic variation in the phase Ⅰ lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates[J]. Infect Immun, 1986, 52(1): 337－340.

[10] Hendrix L, Samuel J E, Mallavia L. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction endonuclease－digested DNA separated by SDS-PAGE[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137(Pt 2): 269－276.

[11] 余 全，俞树荣. 我国贝氏柯克斯体分离株 cbbE′和 cbhE′基因的扩增[J]. 中国微生物和免疫学杂志，1996，16(3)：216－219.

[12] Masuzawa T, Sawaki K, Nagaoka H, *et al*. Determination of rickettsiae isolated in Japan as *Coxiella burnetii* by 16S rRNA sequencing[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(3): 883－884.

[13] Nguyen S V, Ho T, Yamaguchi H, *et al*. Molecular cloning of an imunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 175(1): 101－106.

[14] 余 全，Ho T，Hirai K. 贝氏柯克斯体分离株 sucB 基因的序列分析[J]. 第三军医大学学报，2002，24(4)：407－409.

[15] Savinelli E A, Mallavia L P. Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate[J]. Ann N Y Acad Sci, 1990, 590: 523－533.

[16] Valkona D, Kazar J. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 125(2－3): 275－280.

[17] Thiele D, Willems H, Haas M, *et al*. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid QpH1 from *Coxiella burnetii*[J]. Eur J Epidemiol, 1994, 10(4): 413－420.

[18] Lautenschlager S, Willems H, Jager C, *et al*. Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*[J]. Plasmid, 2000, 44(1): 85－88.

（编辑 冷怀明）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net