DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.013
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0407-03

论著

贝氏柯克斯体 *sucB* 基因的序列分析

余 全[1], To Ho[2], 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 *sucB* 基因序列比较,了解贝氏柯克斯体分离株的一些遗传特征。方法 对16株贝氏柯克斯体分离株的 *sucB* 基因进行扩增、测序和分析。结果 *sucB* 基因1137bp序列中,仅发现3个位置的碱基突变,引起3个氨基酸的改变。从3个碱基突变可大致将这些分离株分为两大群。结论 *sucB* 基因在贝氏柯克斯体是一个很保守的酶基因。群的划分似与分离株的质粒型有很大的相关性,而与疾病形式和分离株的地理分布相关性较少。

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

Sequence comparison of *sucB* gene encoding an immunogenic dihydrolipoamide succinyl transferase of *Coxiella burnetii* isolates

YU Quan, TO Ho, HIRAI Katsuya (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the characters of different isolates of *Coxiella burnetii* by comparing their *sucB* gene sequences. Methods The *sucB* genes of 16 different *Coxiella burnetii* isolates were amplified, sequenced and analyzed. Results Only 3 nucleotide mutations were observed in the 1 137 bp DNA sequence of the *sucB* gene, which leading to 3 differentiations of amino acids. Conclusion The results show that the *sucB* is a conserved enzyme gene in *Coxiella burnetii*. Three genomic groups roughly defined by the 3 nucleotide mutations are related to the plasmid types of *Coxiella burnetii* and has little association with disease forms (acute/chronic) and geographical sources of the isolates.

Key words: *Coxiella burnetii*; DNA sequence; *sucB* gene

Q热是由专性细胞内寄生菌贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)引起的一种人兽共患病。人类是感染后发展成疾病唯一宿主。根据临床表现,感染可分为急性和慢性两种类型。急性Q热为流感样的发热性自限性疾病,而慢性Q热常表现为慢性心内膜炎或肝炎,常需长期抗生素治疗并且易引起死亡[1]。

贝氏柯克斯体是立克次体属中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。有些学者曾将其分离株分为与该病急、慢性临床表现一致的含OpH1和OpRS质粒的急、慢性分离株[2]。QpDV质粒在急、慢性病人分离株中的发现以及OpH1质粒特异性片段在Q热慢性心内膜炎病人分离株中存在说明[3],贝氏柯克斯体可能无急、慢性株之分。如今的观点认为该病的急、慢性感染与病原特征无关,而主要取决于病人的身体条件和免疫状况[4]。

以前的研究显示,贝氏柯克斯体分离株可根据质粒型、脂多糖(LPS)型和限制性内切酶片段(RFLP)型进行分组[3,5,6]。最近,贝氏柯克斯体的许多基因已被测序。许多基因的DNA序列,如27×10[3]外膜蛋白基因(*com*1)、异柠檬酸脱氢酶基因(*icd*)、荚膜合成基因(*mucZ*)和传感器样基因(*qrsA*)基因等,已被用来从分子水平分析贝氏柯克斯体各株间的遗传相关特性。张等[7]提出可根据 *com*1 序列区分贝氏柯克斯体的急、慢性分离株。但Sekeyova等[8]根据 *com*1 和 *mucZ* 序列分析认为分离株与其疾病形式和地理分布无关。Nguyen等[9]提出根据 *icd* 序列中的两个碱基突变可区分来自急、慢性Q热的分离株。

sucB 基因编码贝氏柯克斯体三羧酸循环中的双氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶外膜(E2o),该酶具免疫反应性,可与感染动物和Q热病人血清反应[10]。通过测序分析,我们发现该基因在贝氏柯克斯体基因组的进化中很保守,三个位置的碱基突变似与分离株所含质粒型有一定的关系,而与分离株的来源、地理分布和疾病的急、慢性无关。

1 材料与方法

1.1 贝氏柯克斯体株

本实验使用了16株包括来自于中国、日本、美国、非洲、法国和意大利的贝氏柯克斯体分离株,见表1。所有分离株都在BGM细胞或鸡胚卵黄囊中培养,然后用泛影葡胺密度梯度离心法进行纯化[11]。

基金项目:日本文部省(10460014, 11556060)和日本健康福利省在新兴和再新兴感染疾病H10-Emeg.-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:2002-03-10

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

表 1 贝氏柯克斯体分离株

Tab 1 Different isolates of *Coxiella burnetii*

Group	Isoate	Geographical source	Disease	Origin	Plasmid
Ⅰ	Nine Mile	Montana, USA	—	Tick	QpH1
	Henzerling	Northern Italy	Acute	Human, blood	QpH1
	Bangui	Central America	Acute	Human, blood	QpH1
	Priscilla	Montana, USA	—	Goat, placenta	QpRS
	Xin Qiao	Sichuan, China	—	Tick	QpH1
	Qi Yi	Sichuan, China	Chronic	Human, blood and bone marrow	QpH1
	50F	Mie, Japan	—	Cow, fetus	QpH1
	57T	Gifu, Japan	—	Tick	QpH1
	605	Shizuoka, Japan	Acute	Human, blood	QpH1
Ⅱ	Li strain	Morgolia, China	Acute	Human, blood	QpRS
	YH-11	Yunnan, China	Acute	Human, blood	QpRS
	YS-6	Yunnan, China	—	Sheep, organs	QpRS
	YS-8	Yunnan, China	—	Sheep, placenta	QpRS
	YS-9	Yunnan, China	—	Sheep, placenta	QpRS
	ME	Marseille, France	Chronic	Human, heart value	QpDV
	SQ217	Montana, USA	Chronic	Human, liver biopsy	NP *

*: NP: Nonplasmid

1.2 PCR 检测

根据文献[6]中的方法制备贝氏柯克斯体分离株的全 DNA。根据 GenBank 中已知的 *suc*B 基因序列设计引物 PF 和 PR(见表 2), 扩增包括 ORF 在内的 1 333 bp DNA 片段(碱基位置在 45～1 377 bp)。测序前, PCR 产物用外切酶Ⅰ和虾碱性磷酸酶(美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品)处理。

1.3 DNA 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。1 333 bp 片段内的另外 3 对引物(SF1 和 SR1, SF2 和 SR2, SF3 和 SR3)被设计来测序包括 ORF 在内 1 181 bp *suc*B 基因片段(碱基位置在 141～1 321 bp), 见表 2。测序反应分别用 3 次 PCR 产物, 从正反两个方向进行 3 次以保证测序的准确性。九里标准株 DNA 作为阳性对照。序列数据用 GENETYX-MAC 分析系统(日本 Software Development 公司产品)进行分析。

表 2 寡核苷酸引物和 PCR 条件

Tab 2 Oligonucleotide primers and PCR conditions

Primers	Nucleotide sequence(5′→3′)	Position(nt)	Product(bp)	Condition(40cycles)		
				Denaturation	Annealing	Extention
PF	CGCGGCTCGTTATTCGGGACTT	45～66				
PR	AGCAGAGCCGGGCGTTTGAGTC	1 377～1 356	1 333	94 ℃1′	56 ℃1′	72 ℃120″
SF1	AGTACCTACGTTGCCTGAATTG	141～162		95 ℃30″	58 ℃15″	72 ℃60″
SR1	GTAATCCGCCCTCCTTTTCCAC	566～545		95 ℃30″	60 ℃15″	72 ℃60″
SF2	GACGTTGATGTCGAGGAAATTG	517～538		95 ℃30″	59 ℃15″	72 ℃60″
SR2	AGTGCCAATAGCAATACCGATG	948～927		95 ℃30″	58 ℃15″	72 ℃60″
SF3	AACGCCTCGATGGATGGTAGTG	880～901		95 ℃30″	60 ℃15″	72 ℃60″
SR3	GAGCTGGATCTTCCAAAGCTC	1 321～1 300		95 ℃30″	60 ℃20″	72 ℃60″

2 结果

所有被检分离株都显示出了 99.6%～100%的序列一致性。Henzerling、Bangui、Priscilla、七医、新桥、50F、57T 和 605 与参考株九里株的序列完全一致; 李、YH-11、YS-6、YS-8、YS-9 和 ME 株与九里株的序列一致性为 99.7%, 仅有 686 和 759 位的碱基分别由 G→A 和 T→C; SQ217 株的序列一致性为 99.6%, 除 686 和 759 位的碱基突变外, 还有 736 位的碱基突变, 见表 3。

表 3 贝氏柯克斯体 *suc*B 基因序列的核苷酸变异

Tab 3 Nucleotide variations in *suc*B sequence of *Coxiella burnetii* isolates

Isolate	Position in the gene(nt) *		
	686	736	759
Nine Mile	G	G	T
Henzerling	°	°	°
Bangui	°	°	°
50F	°	°	°
57T	°	°	°
605	°	°	°
Priscilla	°	°	°
Qi Yi	°	°	°
Xin Qiao	°	°	°
Li strain	A	°	C
YH-11	A	°	C
YS-6	A	°	C
YS-8	A	°	C
YS-9	A	°	C
ME	A	°	C
SQ217	A	A	C

*: Positions according to the *suc*B gene nt sequence of strain Nine Mile(GenBank accessionnumber AF070483)

3 讨论

以前曾使用 *com*1 基因的 DNA 序列分析来自不同分离地区或国家、分离自不同标本、含不同质粒型的贝氏柯克斯体株, 发现其基因组间的差异除与疾病的急、慢性和地理分布无关外, 似与各分离株所含质粒型有一定相关系, 即含相同质粒型的分离株在 *com*1 上几乎都有相同位置上的碱基突变[12]。尽管我们目前仍不能圆满地解释这一观察到的现象, 但这一现象促使我们想去了解用其它基因序列分析是否也存在这种相关性。由于 Nguyen 等测序 icd 基因发现可区分来自急、慢性病人的分离株, 因此我们选择了贝氏柯克斯体的另外一个酶基因—*suc*B 进行 DNA 序列分析。

从我们的结果(表 3)来看, 16 株贝氏柯克斯体可被分为两大群。第Ⅰ群的分离株包括来自 5 个国家的急、慢性病人、牛和蜱分离株, 这些分离株与九里标准株有完全一致的 DNA 序列。除 Priscilla 株(含 QpRS 质粒)外, 都有一共同特点, 即含有 QpH1 质粒; 第Ⅱ群包括来自三个国家的急、慢性病人及绵羊分离株, 其特点是都有 686 和 759 两位置的碱基突变, 含有 QpRS、QpDV 和无质粒但质粒序列已插入染色体 DNA。无质粒株还有 736 位置的碱基突变。Priscilla 是一标准含 QpRS 质粒的分离株, 但在许多基因序列分析中, 该株都与含 QpH1 质粒的分离株有更近的核苷酸序列, 如张等的 *com*1 以及 Sekeyova 等的 *com*1 和 *mucZ* 序列分析, 现在还难以解释这种现象。

QpRS、QpDV 和无质粒但质粒序列已插入染色体 DNA 的贝氏柯克斯体分离株, 其 *suc*B 基因序列非常类似。质粒 DNA 序列杂交分析[13]显示, QpRS 同 QpDV 质粒或质粒序列插入染色体 DNA 中的质粒序列间的 DNA 同源性大于同 QpH1 质粒间的同源性, 前三者间共有的一段 DNA 序列在 QpH1 质粒缺失。QpH1 和 QpRS 质粒的序列目前已全部测序[14,15], 尽管至今仍不

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

清楚贝氏柯克斯体质粒存在的生物学意义及染色体上基因与质粒型间的关系，但 *suc*B、*icd*、*com*1 和 *mucZ* 基因序列分析的结果似乎提示我们在贝氏柯克斯体的进化过程中，QpRS、QpDV 和质粒序列插入染色体 DNA 三者间共有的特异 DNA 序列的存在，可能参与染色体上某些基因特定位点的碱基突变。无质粒分离株由于质粒序列插入染色体 DNA，导致质粒上某些基因的缺失或一些新基因的出现，可能与这些株在基因分析上有别于含 QpRS 和 QpDV 质粒的分离株有关。

从本研究结果可发现，无论是Ⅰ群还是Ⅱ群，其分离株并无地理分布和疾病形式的区别。如Ⅰ群中的 Bangui 株分离自非洲的急性 Q 热病人而七医株分离自中国一患慢性 Q 热病人；Ⅱ群中，李和 YH-11 株都分离自中国的急性 Q 热病人而 ME 株则来自法国的慢性 Q 热患者。因此我们认为，根据 *suc*B 基因进行的 Q 热分离株群的划分与其分离株所含质粒型有密切关系，而与其地理分布和疾病形式无关。这与我们在分析 *com*1 基因序列时得出的结论一致。

从上可见，*suc*B 基因在贝氏柯克斯体是一高度保守的基因。根据目前对 13 个分离株的研究，可划分两个基因群，同时观察到基因群高度相关于分离株所含的质粒型。尽管我们目前的知识还不能解释这些染色体上基因与质粒间的关系，但人们深信，随着研究的不断深入，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] Levy P Y, Drancourt M, Etienne J, *et al*. Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases og Q fever endocarditis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(3): 533—537.
[2] 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.
[3] 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.
[4] 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.
[5] Hackstadt T. Antigenic variation in the phase Ⅰ lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates[J]. Infect Immun, 1986, 52(1): 337—340.
[6] 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.
[7] 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.
[8] Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com*1 and mucZ sequence comparison[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180(1): 61—67.
[9] Nguyen S V, Hirai K. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180(2): 249—254.
[10] Nguyen S V, To H, Yamaguchi T, *et al*. Characterization of the *Coxiella burnetii suc*B gene encoding an immunogenic dihydrolipoamide succinyltransferase[J]. Microbiol Immunol, 1999, 43(8): 743—749.
[11] Williams J C, Peacock M G, McCaul T F. Immunological and biological characterization of *Coxiella burnetii*, Phases Ⅰ and Ⅱ, separated from host components[J]. Infect Immun, 1981, 32(2): 840—851.
[12] Yu Q, Zhang G Q, Fukushi H, *et al*. Some Characterizations of Chinese Isolates of *Coxiella burnetii* in the *com*1 Gene Sequence[J]. J Med Col PLA, 2002(submitted).
[13] 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.
[14] 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.
[15] 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）

文章编号：1000-5404(2002)04-0409-01

个案与短篇

巨大滑疝 1 例

A case of giant parasaccular hernia

陈 华[1]，靳明林[1]，张 毅[1]，唐茂明[1]，熊恩庆[2]，潘进洪[2]（第三军医大学附属西南医院：[1] 普通外科，[2] 全军泌尿中心，重庆 400038）

患者，男，69 岁，因右腹股沟包块 67 年，腹痛伴呕吐 1 月。于 2002 年 1 月 20 日入院。查体：腹平软，未见肠型，无压痛。右腹股沟至阴囊有一巨大梨形包块，18 cm×12 cm×10 cm，立卧位包块大小无变化，质软，轻压痛，不能还纳腹腔，可闻及肠鸣。实验室检查：血、尿常规，肝肾功能，血糖均正常。立位平片见：中下腹多个液平，小肠管扩张明显，提示小肠不全性肠梗阻。B 型超声示：①右腹股沟斜疝；②阴囊内及腹部肠管扩张。初步诊断：①右腹股沟斜疝；②小肠不全性肠梗阻。

2002 年 1 月 20 日，在全麻下行手术探查，取右腹股沟斜切口，疝囊内容物为末段回肠，肠壁发白增厚粘连于疝囊底，游离肠粘连，见盲肠位于疝囊外侧壁，游离盲肠切除阑尾后还纳腹腔，重造疝囊，切除末段回肠约 100 cm，用吻合器行端侧吻合。游离疝囊前内侧壁见增厚包块突出于腹股沟区，约 5 cm×4 cm，难以还纳腹腔，探入腹腔扪及置入膀胱的尿管气囊，距离该包块尚远，行穿刺未抽出尿液，遂在包块突出部先切开一小口，

（下转 415 页）

作者简介：陈 华(1962—)，男，四川省达州市人，博士研究生，主治医师，主要从事胆管癌方面的研究。电话：(023)68752731

收稿日期：2002-02-05；修回日期：2002-03-17

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