DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.029
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1312 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1312-03

PCR-SSCP分析Q热立克次体中国分离株16S-23S rDNA基因间区

胡廷徽,温博海,万泽生,俞树荣 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立快速分析Q热立克次体分离株16S-23S rDNA基因间区株间差异的PCR-SSCP方法。方法 用半套式PCR扩增7株中国分离株(七医、新桥、雅安、李、YS-8、YS-9和YH-11)和3株国际参考株(九里、Henzerling和Grita)的16S-23S rDNA基因间区,对扩增产物进行PCR-SSCP分析。结果 3株云南分离株(YS-8,YS-9和YH-11)与其它7株之间的差异较大。与此区域的序列分析结果一致。结论 Q热立克次体分离株的16S-23S rRNA基因间区由于适应不同的地理环境可发生变异,PCR-SSCP是快速分析这些变异的有效方法。

关键词:贝氏柯克斯体;16S-23S rDNA基因间区;PCR-SSCP
中图法分类号:R376.4;R394-33;R446.6 文献标识码:A

Analysis of the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of *Coxiella burnetii* Chinese isolates with PCR-SSCP

HU Ting-hui, WEN Bo-hai, WAN Ze-sheng, YU Shu-rong (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the PCR-SSCP method for rapid analysis of the differences among the 16S-23S ISRs of the *Coxiella burnetii* Chinese isolates. Methods The 16S-23S ISRs of 7 Chinese isolates (Qiyi, Xinqiao, Yaan, Li, YS-8, YS-9, and YH-11) and 3 international reference strains (Nine miles, Henzerling and Grita) had been amplified by semi-nest PCR. The differences among their products were analyzed by PCR-SSCP. Results The 3 Yunnan isolates could be distinguished from the other 7 isolates. This result was in accordance with their sequences' analyses. Conclusion The 16S-23S ISRs of *Coxiella burnetii* isolates might be varied due to surviving in different geographic circumstances. PCR-SSCP is the rapid and efficient method to investigate these differences.

Key words: Coxiella burnetii; 16S-23S intergenic spacer region; PCR-SSCP

贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)俗称Q热立克次体,是一种广泛分布在自然界,引起人类和动物感染的人兽共患病原体。自1962年首次分离到七医株以来,我国已经分别从病人、羊及蜱体内分离到17株Q热立克次体中国分离株。这些来源不同的分离株,由于所处的生态或地理环境的不同,所致的疾病也各不相同[1]。建立快速分析株间差异的方法对研究Q热立克次体致病机制和快速诊断都有着十分重要的意义。近年来,16S-23S rDNA基因间区(Intergenic spacer region,简称ISR)在细菌株间差异分析中的应用越来越多[2]。本实验采用我室保存的分离自我国不同地区、不同临床类型和不同宿主的7株Q热立克次体中国分离株和3株国际参考株,半套式PCR对它们的ISRDNA进行扩增,PCR-SSCP分析此区域在各分离株之间的差异性,发现3株云南分离株(YS-8、YS-9和YH-11)与其他7株之间的存在差异。PCR-SSCP(Single strand conformation polymorphism)是快速分析这些差异的有效方法。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39740008)
作者简介:胡廷徽(1973—),男,浙江省慈溪市人,硕士,助教,主要从事Q热立克次体的研究。电话:(023)68752239。
收稿日期:2001-06-28 回收日期:2001-09-25

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 本次研究共使用10株Q热立克次体分离株。Grita株1957年由军事医学科学院引自前苏联。1961年引入我室。原始传代情况不明。九里株和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年分离自雅安一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 引物 ISR-L:5'-AGGCTAACCTTCGGGAG-3'
23S-R:5'-TATGGCTGAACTTTCCA-3'
ISR-R:5'-GCGCTTATTCACTTGACC-3'

1.1.3 试剂 Taq酶购自上海生工公司;dNTP购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 Q热立克次体菌株的繁殖 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 16S-23S ISRDNA的半套式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和23S-R,PCR法扩

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

增 10 株 Q 热立克次体分离株的 ISR。在 0.5 mL 反应管内加入 1 μl 基因组 DNA, 1 μl 10 mmol/L dNTP, 5 μl PCR 缓冲液(10×), 10 μl 15mmol/L $MgCl_2$和 1.25U 的 Taq 酶, 补 ddH_2O 至 50 μl 总容积, PCR 反应条件为 95 ℃预变性 7 min 后, 再行 30 个循环, 每个循环为 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min, 循环后 72 ℃延伸 10 min。取 1 μl 反应产物作模板, 以 ISR-L 和 ISR-R 为引物进行 2 次扩增, 再在反应管内加入 1 μl 10 mmol/L dNTP, 5 μl PCR 缓冲液(10×), 10 μl 15 mmol/L $MgCl_2$和 1.25U 的 Taq 酶, 补 ddH_2O 至 50μl 总容积, 扩增条件同首次扩增, 共 35 个循环; 取 10μl 反应产物在含 0.5 μg/ml EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察结果。

1.2.3　PCR-SSCP　在 Bio-Rad 垂直电泳装置中配制 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液使用 1× TBE, 放入冰箱过夜, 使体系温度降至 4~6 ℃; 取 10 株 Q 热立克次体分离株半套式 PCR 产物各 8 μl, 分别加入 12 μl 载样缓冲液(甲酰氨 9.5 ml、溴酚蓝 10 mg、0.5mol/L EDTA(pH 8.0) 0.2 ml、加 ddH_2O 至 10 ml), 再加入灭菌石蜡油 20 μl, 100 ℃煮沸变性 10 min, 立即插入冰水浴中冷却, 点入加样孔中; 恒压 100 V 电泳 5 h, 体系在冰箱保持温度为 4~6 ℃; 银染: ①固定: 取下凝胶置 10%乙酸固定液中, 于室温平稳摇动, 固定 15~30 min; ② 漂洗: 弃固定液, 加蒸馏水, 于室温中平稳摇动, 漂洗 3~5 min, 重复 2~3 次; ③染色: 加入新鲜配制的染色液(0.12% ~0.15% 硝酸银、0.015% 的 37% 甲醛), 于室温平稳摇动 30 min; ④漂洗: 弃染色液, 加蒸馏水, 于室温中平稳摇动, 漂洗约 10 s; ⑤显色: 加入新鲜配制的显色液(3% Na_2CO_3、0.015% 的 37% 甲醛、400 ng/ml 硫代硫酸钠) 于室温中平缓摇动, 显色至条带清楚而背景不过高为止; ⑥终止: 加入与显色液等体积的固定液终止显色反应, 用蒸馏水漂洗 5 min, 观察结果。

2　结果

2.1　半套式 PCR 扩增结果

以 ISR-L 和 23S-R 为首次扩增引物, ISR-L 和 ISR-R 为 2 次扩增引物, 半套式 PCR 对 10 株 Q 热立克次体 DNA 进行扩增, 10 株 Q 热立克次体均扩增出约 570 bp 大小的一个条带, 与设计相符, 且 10 株分离株的扩增产物之间无长度差异, 见图 1。

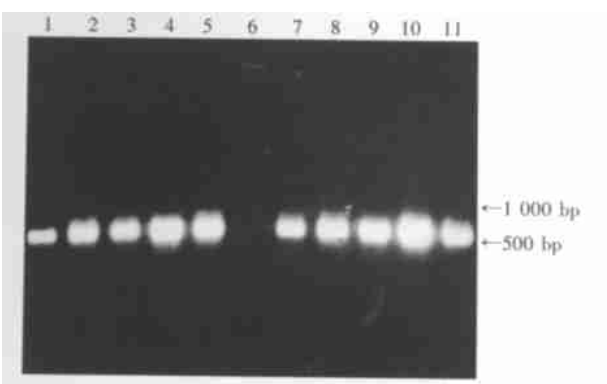


图 1　10 株 Q 热立克次体分离株的半套式 PCR 结果

Fig 1　ISRs of 10 *Coxiella burnetii* isolates amplified by semi-nested PCR

1: Nine miles; 2: Qiyi; 3: Xinqiao; 4: Yaan; 5: Li; 6: Marker; 7: Grite; 8: Henzerling; 9: YS-8; 10: YS-9; 11: YH-11

2.2　PCR-SSCP 分析

实验结果表明, 在 6%聚丙烯酰胺凝胶上电泳约 5 h 后, 10 株 Q 热立克次体的 ISR 单链 DNA 的迁移率各不相同, 其中 3 株云南分离株(YS-8、YS-9 和 YH-11)与其它 7 个株之间的差异较大, 见图 2。该实验结果在测序结果中也得到了证实。3 个云南分离株在第 60 位碱基上存在"C"→"A"的突变。

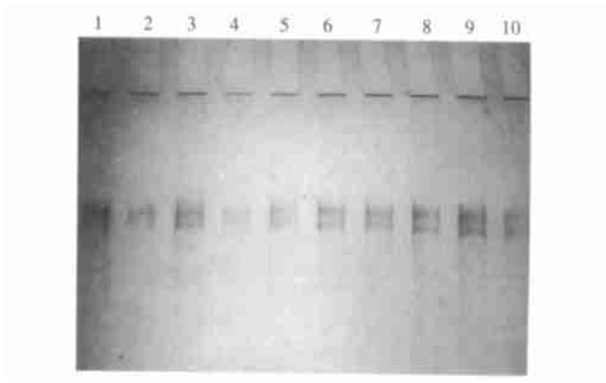


图 2　10 株 Q 热立克次体分离株的半套式 PCR 结果

Fig 1　ISRs of 10 *Coxiella burnetii* isolates amplified by semi-nested PCR

1: Nine miles; 2: Qiyi; 3: Xinqiao; 4: Yaan; 5: Li; 6: Marker; 7: Grite; 8: Henzerling; 9: YS-8; 10: YS-9; 11: YH-11

3　讨论

Q 热立克次体分布相当广泛。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各有差异。造成这些差别的遗传学因素, 目前尚未阐明。我国 1962－1983 年分离到的 17 株 Q 热立克次体中, 它们的宿主类型、致病性和分离地点都各不相同。目前已发现在 DNA 限制性片段分析和 23S DNA 插入序列分析中, 云南株与其它株的差异较大[3,4]。但这二种方法, 一种需要大量的 Q 热立克次体 DNA, 一种需要较高的实验条件, 不易推广。因此, 建立快速分析株间差异的方法对研究 Q 热立克次体致病机制和快速诊断都有着十分重要的意义。

16S-23S rDNA 基因间区分析是目前细菌株间差异分析的常用方法。我们用半套式 PCR 扩增了 10 株来自不同地区和不同宿主的 Q 热立克次体分离株的 16S-23S ISR, 但未发现各株扩增产物之间有明显的长度差异。这可能与 Q 热立克次体基因组中仅有一个 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)丰富有关。另外, 严格的胞内寄生也可能限制了外界因素对其基因组的影响。

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

为了研究不同 Q 热立克次体分离株 16S-23S ISR 中是否存在基因突变，我们选用 PCR-SSCP 这种快速分析突变的方法。结果表明，3 株云南分离株（YS-8，YS-9 和 YH-11）与其它 7 个株之间的差异较大。该实验结果在我们的测序结果中也得到了证实。序列分析结果发现它们仅在少数几个碱基位上有不同，其中以第 60 位碱基改变最为明显。根据此改变，可把 10 株 Q 热立克次体分离株分为两类，3 个云南分离株（YS-8，YS-9 和 YH-11）为一类，为“A”，而其它 7 株（九里、七医、新桥、雅安、李、Grita 和 Henzerling）则为“C”，这些改变可能与适应特殊的地理环境有关。

单链构象多态性（SSCP）的形成与诸多因素有关：如聚丙烯酰胺凝胶的浓度和交联度；电泳时凝胶的温度；凝胶和电泳缓冲液的离子强度和载样液中变性剂的种类等。特别是温度对结果的影响最为明显，温度过高可能破坏某些 DNA 单链的不稳定构象[5]。我们固定了聚丙烯酰胺凝胶的浓度和交联度、凝胶和电泳缓冲液的离子强度和载样液中变性剂的种类，对不同温度影响 PCR-SSCP 结果的程度进行了分析，发现体系温度维持在 4～6 ℃所得的 PCR-SSCP 结果最好。另外，鉴于 16S-23S ISR 在 Q 热立克次体各分离株中的高度保守性，我们建立了基于此区域的半套式 PCR 法和 DNA 斑点杂交法，这两种方法都有较高的特异性和灵敏度，有望用于 Q 热立克次体的快速诊断[6]。

参考文献：

[1] 俞树荣，编著. Q 热的病原与防治[M]. 重庆：科学技术文献出版社重庆分社，1990. 18－24.
[2] Gürtler V，Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region[J]. Microbiology，1996，142：3－168.
[3] 杨春木，张　雪，等. Q 热立克次体不同分离株 DNA 限制性片段电泳分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1989，9(6)：383－385.
[4] 陈　荣，温博海，张　雪，等. 我国 Q 热立克次体菌株 23S rRNA 基因插入顺序的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1999，19(2)：125－128.
[5] Hayashi K，Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP[J]. Hum Mutat，1993，2(5)：338－346.
[6] 胡廷徽，温博海，万泽生，等. 半套式 PCR 和 DNA 探针技术检测 Q 热立克次体[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1 104－1 106.

（编辑　陈聪连）

消息

人民军医出版社最新书目

ID	书号	书名	译著者	开本	装式	定价(元)	出书时间	ID	书号	书名	译著者	开本	装式	定价(元)	出书时间
1	C7199-1	神经系统遗传性疾病	梁秀龄	大 16	精装	60	01-7-1	12	B7264-5	小儿哮喘方法选萃	万　芳	大 32	压膜	20	01-7-1
2	C7282-3	晕眩症的诊断与治疗	孙素珍	大 32	压膜	22	01-7-1	13	D7297-1	网络药学	张　宜	16	精装	39	01-7-1
3	C7297-3	实用超声心动图手册	饶　莉	32	精装	14	01-7-1	14	D7246-7	老药新用途（第二版）	李世文	大 32	压膜	29	01-7-1
4	C7269-6	实用新药研究手册	王顺年	32	精装	32	01-7-1	15	C7307-2	医生的思维与工作技巧	张志寿	32	压膜	16	01-7-1
5	A7253-X	现代纵膈外科学	段德溥	16	精装	48	01-7-1	16	E7251-3	中医自学指南	卢国勋	大 32	压膜	33	01-7-1
6	A7242-4	现代颈椎病学	赵定麟	16	精装	59	01-7-1	17	E7146-0	中医汤剂临床新用途	刘兰芳	大 32	压膜	37	01-7-1
7	B7108-2	内分泌代谢疾病药物治疗学	胡绍文	16	精装	68	01-7-1	18	E7218-1	皮下针疗法治百病	温木生	大 32	压膜	19.5	01-7-1
8	B7289-0	现代肾脏病药物治疗学	袁伟杰	16	精装	55	01-7-1	19	G7280-7	现代创伤显微外科护理学	吕　青	16	压膜	39	01-7-1
9	B7240-8	现代肾病学	蒋季杰	16	精装	98	01-7-1	20	B7221-1	肾功能衰竭诊断治疗学	孙世澜	16	精装	65	01-7-1
10	B7290-4	现代医学技术学	孙大成	16	压膜	29	01-7-1	21	A7176-2	现代耳鼻咽喉科学	王正敏	16	精装	138	01-10-1
11	B7283-1	八种重要传染病的防治	吴光华	大 32	压膜	48	01-7-1								

全价收款、不收邮费、款到书发

邮购地址：北京市复兴路 22 号甲三号　人民军医出版社
邮政编码：100842

E-mail：wangkuohai@pmmp.com.cn
Tel：（010）66844249；Fax：（010）68222916

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