DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.06.013

Q热立克次体DNA酶切片段的电泳分析

万泽生 张邦燮 张 雪（微生物学教研室）

提 要 本文采用限制性核酸内切酶技术，对本室分离的Q热立克次体七医株，进行了DNA酶切片段的电泳分析，并以国外标准株（Grita株）作为参照。Q热立克次体经泛影葡胺密度梯度离心法进行分离纯化。提纯的立克次体DNA，用限制性核酸内切酶（HaeⅢ和BglI）分别消解后，再经琼脂糖凝胶电泳法分析。本文结果证实，七医株和Grita株的酶切电泳图谱存在差异。这种差异在HaeⅢ酶谱上尤为明显。不仅两株立克次体DNA的绝大多数酶切片段的迁移距离不同，而且Grita株明显比七医株缺少包括4.3kb在内的几个HaeⅢ片段。

关键词 脱氧核糖核酸；柯克斯氏体属；核酸内切酶类；脱氧核糖核酸限制酶类

Q热是一种人兽共患疾病，遍及世界大部份地区，在我国分布也十分广泛。Q热的病原体为Q热立克次体(Coxiella burnetii)[1]。

近年来，DNA限制性片段的电泳分析，已较广泛地应用于微生物的核酸研究中。它在DNA的结构分析，探讨基因与表达的关系，以及微生物的分类工作中都已显示出优越性。但在国内，目前尚未见有关Q热立克次体这方面工作的报道。为此，我们对本室分离的Q热立克次体七医株进行了DNA酶切片段的电泳分析，并以国外标准株作为参照，为今后开展Q热立克次体分子遗传学的研究打下基础。

材料与方法

菌种

七医株：为我室1962年由四川一慢性Q热病人分离[2]，传代情况为：EP20/MP3/EP1/MP49。经单克隆抗体证实为Ⅰ相。

Grita株：1957年由军科院引自苏联，1961年引进我室。原始传代情况不明，在我室连续EP84。经单克隆抗体证实为Ⅰ相。

立克次体及其DNA的提纯

Q热立克次体的分离纯化参照张邦燮泛影葡胺密度梯度沉降法[3]进行。立克次体DNA的提取基本参照Maniatis的方法[4]。

立克次体DNA的酶切电泳

实验中使用的限制性核酸内切酶（HaeⅢ、BglI），DNA分子量标准品（λDNA/Hind Ⅲ、λDNA/ECoRI+Hind Ⅲ消解物）为华美生物工程公司产品。

整个消解过程按厂方说明书进行，DNA的酶切片段经琼脂糖凝胶电泳法分析。

结果

立克次体在泛影葡胺中的浮力密度

经泛影葡胺密度梯度离心后，发现Q热立克次体七医株位于浮力密度1.190g/ml处，Q热Grita株主要位于浮力密度1.190g/ml处，但在1.172g/ml处也查见与少量的卵黄囊组织碎片混在一起的立克次体存在（图1）。分别吸取位于浮力密度1.190g/ml处的七医株和Grita株Q热立克次体，进行DNA的抽提。

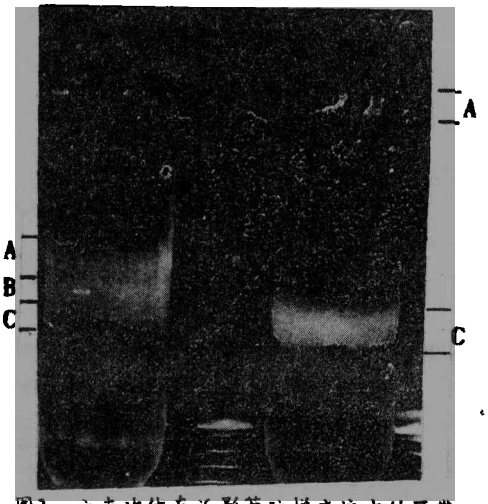


图1 立克次体在泛影葡胺梯度液中的区带（A）鸡胚卵黄囊组织；（B）立克次体，浮力密度为1.172g/ml；（C）立克次体，浮力密度为1.190g/ml

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

立克次体DNA的纯度

提取的Q热立克次体DNA，经紫外分光光度计的测量，最高吸收峰在260nm，OD260/OD280的比值介于1.8～2.0之间，同于天然DNA的比值。此提取物经0.7%琼脂糖凝胶电游分离后，未见除染色体DNA以外的区带出现。

限制性核酸内切酶酶切电泳结果

当用识别四个碱基对(GG↓CC)的Hae Ⅲ酶消解后，发现七医株和Grita株的DNA，均被特异性切割成许多密集的片段，分子量均低于4.4kb。在1%琼脂糖凝胶上，经过4v/cm电压，11h的电泳后，得出4.4kb～2.3kb之间较为清晰的酶切电泳图谱（图2）。它表明：（1）在这一区间内，七医株可较清晰地分出10条区带，根据制出的λDNA/Hind Ⅲ酶解物分子量的标准曲线，测出这些酶切片段的分子量在4.3kb～2.5kb之间，Grita株为4条区带，分子量在3.6kb～2.5kb之间。（2）此区间内，七医株绝大多数酶切片段的电泳迁移距离，均不同于Grita株，表现出彼此间的酶切电泳图谱差别甚大。此外，七医株的一些酶切片段也为Grita株所缺少，其中明显可见的是片段1和片段2。

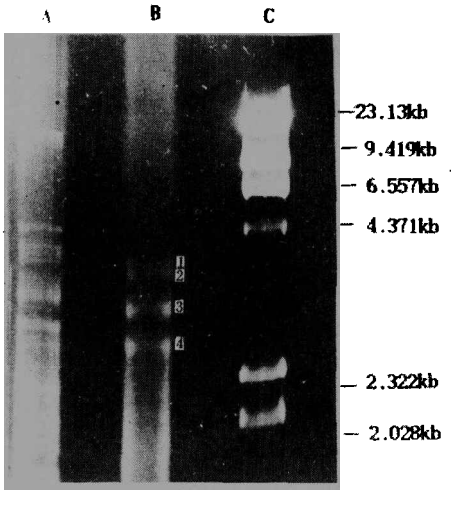


图2 立克次体DNA Hae Ⅲ酶解物的电泳图谱（A）七医株；（B）Grita株；（C）分子量标准品，λDNA/Hind Ⅲ

七医株和Grita株的BglⅡ酶切电泳图谱，则存在较为细微的差异。用识别六个碱基对（GCCNNNN↓NGGC）的BglⅡ酶，对七医株和Grita株的DNA分别进行酶切及电泳后，发现在21.7kb至5.15kb之间，这两株立克次体DNA的酶切电泳图谱较为清晰。在这一区间内，两株Q热立克次体的绝大多数BglⅡ酶切DNA片段的电泳图谱比较相似。但存在于七医株中的片段，却为Grita株所缺少（图3）。

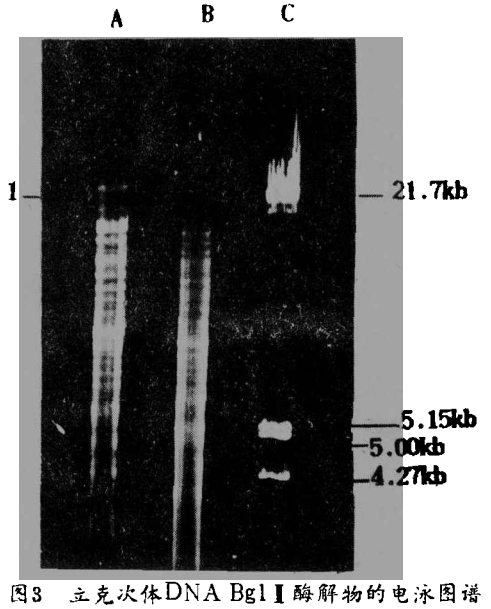


图3 立克次体DNA BglⅡ酶解物的电泳图谱（A）七医株；（B）Grita株；（C）分子量标准品，λDNA/EcoR Ⅰ + Hind Ⅲ

讨　论

限制性核酸内切酶与DNA的反应具有位点特异性，因此在DNA分子上产生的切口的位置是高度专一的，酶切片段的大小和数目都是固定的[6]。我们采用限制性核酸内切酶技术，对本室分离的Q热立克次体株（七医株）和国外标准株（Grita株），进行了DNA酶切片段的电泳分析。在我们所进行的多次重复性实验中，没有发现同一株立克次体DNA的同种酶切电泳图谱有何改变，说明Q热立克次体DNA的限制性核酸内切酶实验，具有很好的重现性。由于它能够直接进行DNA的比较，因而可以为进一步揭示Q热立克次体间的某些表型差异的本质提供方便。

本实验结果表明，Q热立克次体七医株

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和Grita株的DNA酶切电泳图谱不一致。这种差别在HaeⅢ酶谱上尤为明显。据此实验结果我们认为，七医株和Grita株的DNA结构可能存在差别。因为只有DNA一级结构的不同，才会造成在相同实验条件下，出现的这一酶切电泳图谱的差异。这种结构的改变，或许是由于组成DNA大分子的碱基排列顺序发生变化，或许是由于染色体DNA发生了部份缺失。

本实验采用的本室分离株（七医株）和国外标准株（Grita株），存在着相别的不同。经单克隆抗体证实七医株为Ⅰ相，Grita株为Ⅱ相。在随后的泛影葡胺密度梯度离心实验中，也观察到七医株表现为Ⅰ相性状，Grita株表现为Ⅱ相性状。为此，本实验的结果是否与这两株Q热立克次体的相位改变有关，值得考虑。O′rourke[6]，Vodkin[7]都曾先后报道，经90代鸡胚传代后空斑挑选的九里Ⅱ相株（CB9MⅡC4），比与它具同源基因对（isogenic pair）的九里Ⅰ相株（CB9MⅠC7），至少缺少4.4kb左右的-HaeⅢ片段。同时Vodkin[7]在与九里株不同地区来源的Ⅰ相株（CBPAVI）中，也发现缺少4.4kb左右的HaeⅢ片段。但以后Williams[8]又在另一同九里Ⅰ相株（CB9MⅠC7）具同源基因对的Ⅰ相株（CB9MⅠ514）中，又发现存在同样的酶切片段的丢失。CB9MⅠ514株虽仍保留Ⅰ相血清学特性，但其LPS的化学结构却已介于Ⅰ相菌和Ⅱ相菌之间。这些不同株的Ⅰ相菌中发生的DNA结构的改变，可能为一种潜在性的相变异机制。即可能存在着遗传与表达之间的时相问题，以致这些菌株虽有DNA的改变，但性状上尚未有明显表达而仍表现为Ⅰ相。至于本文两株立克次体存在着的DNA酶切图谱的差异，究竟是由于不同地区来源的株间差异造成，还是由于相位的改变引起，值得进一步研究。同时采用同源基因对的Ⅰ相株及Ⅱ相株试验，可能有利于此问题的进一步明确。

参考文献

1. 魏曦，等。医用立克次体学。上海科学技术出版社1983：323～324
2. 俞树荣，等。四川地区Q热立克次体的分离与鉴定。第七军医大学论文汇集 1964，(26)：7
3. 张邦燮，等。国产泛影葡胺密度梯度沉降法纯化Q热立克次体。中国人兽共患病杂志 1986；2(4)：23
4. Maniatics T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory 1982
5. 侯云德，等。病毒基因工程的原理与方法。人民卫生出版社1985：95
6. O′rouke AT, et al. Genomic analysis of phase I and II Coxiella burnetii with restriction endonuclease. J Gen Microbiol 1985; 131:1543
7. Vodkin MH, et al. Genetic heterogeneity among isolates of Coxiella burnetii. J Gen Microbiol 1986; 132:455
8. Williams JC, et al. Notice of intramural research project. Oct. 1, 1985 to Sept. 30, 1986:2

（收稿：1989.3.30；修回：1989.8.28）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Electrophoretic Analysis of DNA Restriction Fragments from Coxiella burnetii

Wan Zesheng, et al. (Department of Microbiology, Third Military Medical College)

The preparation of DNA from Qiyi strain is analysed by using restriction endonuclease technique. Another foreign standard strain (Grita strain) is used as the contrast. Coxiella burnetii are purified via the diatrizoate meglumine density gradient precipitating procedure. The neat DNA are digested with HaeIII or BglI individually, following with an analysis with agarose gel electrophoresis. This study shows that the restriction patterns of Qiyi and Grita strains are different. The difference is quite distinct on HaeIII electrophoretogram. Not only do distances migrated by most restriction fragments from Qiyi and Grita strains be distinct, but also some HaeIII fragments involving 4.3 Kb are absent in Grita strain.

Key words: DNA; Coxiella; Endonucleases; Electrophoresis; DNA restriction enzymes

---

个案与短篇

肺炎引起特殊心电图表现的心肌炎1例报告

李 凯* 李隆贵（新桥医院心内科）

心肌炎患者心电图ST、T改变虽无特异性，但出现广泛急性心肌损伤者究属少见。现将所遇的1例报道于下。

患者男性，27岁，因受凉后突感畏寒、发热伴咳嗽1天入院。入院前曾咳出铁锈色痰数口。体检：T38.5℃，P120/min，BP96/50。急性病容，神志清。无发绀，皮肤无出血点及黄疸，颈静脉不怒张。胸廓无畸形，右前胸第4肋以下语颤增强，叩浊音。心界不扩大，心率120次/min，律齐，心音尚有力，未闻及摩擦音或杂音。肝、脾未触及，下肢不肿。X线胸片示双肺纹理增重，右肺中叶可见大片状三角形密度增高阴影，尖端向外，上缘边界清晰，规整；下缘模糊。心影未见异常。血常规WBC14400/mm，N76%。心电图正常。予青、链霉素治疗。入院第3日下午患者突感胸闷、心慌、气短，无胸痛。心界稍向左下扩大，心率81次/min，律齐，未闻及心包摩擦音，亦无奇脉。X线检查左心缘稍饱满，心尖圆钝，搏动正常。心电图示窦性心律，左室高电压，各导联（除aVR、V_{1-2}外）ST段均呈弓背向下型抬高1～6 mm。M型超声心动图未见心包积液。血清GOT133u，CPK90μ，血沉、血钾均正常。加用肾上腺皮质激素及心肌营养药物，胸闷、心慌逐渐缓解，2周后X线、心电图及心肌酶谱均恢复正常。 （下转472页）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net