

斑点热群立克次体中国分离株 rOmpA 基因片段的 克隆和序列分析

陈 敏 范明远 毕德增 张健之

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206)

陈 香 蕊

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 用 Rr 190.70p-602n 引物扩增了斑点热群立克次体 (spotted fever group rickettsiae, SFGR) 中国分离株 (BJ-90 株、Ha-91 株和 HLJ-054 株) 及 SFGR 国际标准株西伯利亚立克次体 (*Rickettsia sibirica*) 246 株和派克立克次体 (*R. parkeri*) 的 rOmpA 基因片段, 将 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体中, 用双脱氧法进行序列测定, 并与 SFGR 的 rOmpA 基因已知序列进行了比较。结果表明, SFGR 国际标准株间 rOmpA 基因片段的核苷酸同源性和推定氨基酸的同源性分别为 90.06%~96.62% 和 83.05%~94.35%, 中国分离株与国际标准株及参考株 rOmpA 基因片段比较的结果发现: BJ-90 株及 Ha-91 株与西伯利亚立克次体标准株的核苷酸同源性和推定氨基酸的同源性分别为 99.06% 和 98.31%, 推定氨基酸的同源性则为 98.87% 和 96.61%, HL-93 株和 HLJ-054 株与日本立克次体 (*R. japonica*) 核苷酸同源性和推定氨基酸的同源性分别为 96.62% 和 95.68%, 推定氨基酸的同源性分别为 92.09% 和 89.27%, 在中国分离株内, BJ-90 株和 Ha-91 株的核苷酸同源性和推定氨基酸的同源性高达 99.20%, 推定氨基酸的同源性为 97.74%, HLJ-054 株和 HL-93 株 rOmpA 基因片段的核苷酸及推定氨基酸的同源性分别为 98.12%, 94.92%。因此认为在中国广阔的地域内, 除 HLJ-054 株和 HL-93 株可能为 SFGR 的新成员外, 众多不同来源的 SFGR 可能均为西伯利亚立克次体或者与其亲缘关系相近。

关键词 斑点热群立克次体, rOmpA 基因片段, 克隆, 序列分析

分类号 Q939.3

我国斑点热的研究历时近 40 年, 除已证明在北方广大地区存在北亚蜱传斑点热 (North Asia Tick-Borne Spotted Fever, 简称北亚热) 的自然疫源地^[1]及在北纬 26° 以南地区发现北亚热的病原学证据^[2]以外, 在黑龙江省虎林地区的嗜群血蜱 (*Haemaphysalis concinna*)^[3]、森林革蜱 (*Dermacentor silvarum*)^[4]、内蒙古阿盟地区的亚东璃眼蜱 (*Hyalomma asiaticum*)^[5]及北京地区的中华革蜱 (*D. sinicus*)^[6]中还分离出多株在蛋白和基因上与已知 SFGR 完全不同或不全相同的新种或亚种, 引起国内外学者们的关注。为明确

这些新分离株的分类学地位,我们用 Rr 190.70p-602n引物扩增了 SFGR 中具有分类学意义的 rOmpA 基因片段,进行克隆和序列分析,以阐明 SFGR 中国分离株与国际标准和参考株的亲缘关系,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株和克隆载体

斑点热群立克次体国际标准株西伯利亚立克次体 (*R. sibirica*) 246 株获自军事医学科学院,派克立克次体 (*R. parkeri*) 获自美国哥伦布市公共卫生实验室。

斑点热群立克次体中国分离株 BJ-90株由我室于 1990 年自北京昌平县的中华革蜱中分离, Ha-91 株由内蒙古卫生防疫站于 1991 年自内蒙古阿盟地区的亚东璃眼蜱中分离, HLJ-054 株系沈阳军事医学研究所 1982 年自黑龙江省虎林县的森林革蜱中分离,由军事医学科学院惠赠。

大肠杆菌 JM109 由中国预防医学科学院病毒学研究所惠赠,克隆载体 pGEM-T System 购自美国 Promega 公司。

1.2 试剂

TaqDNA 聚合酶、dNTPs、低熔点琼脂糖、RNA 酶、X-gal 等购自华美生物工程公司,限制性内切酶 Sal I、Nco I、Bstz I 购自 Promega 公司, IPTG 购自上海生工生物工程公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 立克次体 DNA 提取

参照 Regnery^[7]的方法。

1.4 实验用引物

根据立氏立克次体 190×10^3 蛋白 (rOmpA) 基因设计引物 Rr 190.70p-602n^[7], Rr 190.70p 5' -ATGGCGAATATTTCTCCAAA-3', Rr 190.602n 5' -AGTGCAGCA-TTGGCTCCCCCT-3'。

1.5 PCR

在灭菌的一次性使用的 0.5ml Eppendorf 管中依次加入 $10 \times$ PCR 缓冲液 10 μ l, dNTP 4 μ l, 引物 2 μ l (50ng/ μ l), TaqDNA 聚合酶 1 μ l (3u/ μ l), 立克次体 DNA 1 μ l, 三蒸水补至 100 μ l, 石蜡油 50 μ l, 94 $^{\circ}$ C 预变性 10min, 进入热循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 48 $^{\circ}$ C 复性 40s, 66 $^{\circ}$ C 延伸 1min30s, 共 30 个循环, 最后一个循环于 66 $^{\circ}$ C 延伸 5min。取 10 μ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖-溴化乙锭 (0.5 μ g/ml) 凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物的纯化

低熔点琼脂糖凝胶挖块法^[8]回收。

1.7 PCR 产物的克隆

1.7.1 连接反应: 总反应体积为 10 μ l, 载体与外源 DNA 的摩尔比为 1:3。在一新的灭菌的 0.5ml Eppendorf 管中依次加入 T₄ DNA 连接酶 $10 \times$ Buffer 1 μ l, pGEM-T 载体 1 μ l (50ng), PCR 产物 2 μ l (约 25ng), T₄ DNA 连接酶 (3u/ μ l) 1 μ l, 去离子水 5 μ l, 12 $^{\circ}$ C 过夜连接。

1.7.2 感受态细胞的制备: 取 -70 $^{\circ}$ C 贮存的 30% 甘油保存菌 JM109 0.1ml, 接种于 5ml LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 取 0.1ml 接种于 5ml LB 肉汤中继续培养 2~3h, 离心收

集菌体,用 1ml 预冷的 0.1mol/L CaCl_2 悬浮沉淀,冰上 20min,再次离心,沉淀溶于预冷的 0.1mol/L CaCl_2 中,保存于 4℃,12~24h 内使用。

1.7.3 转化: 制备选择培养基:先制备氨苄青霉素琼脂平板(氨苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,1.5% 琼脂),临用前,每个平皿均匀涂布 40 μl X-gal(20mg/ml)和 4 μl IPTG(20mg/ml),置 37℃,3h 以上以使二甲基亚酰胺挥发。取 4℃ 保存的感受态细胞 0.2ml,加入 PCR 连接产物 10 μl ,冰上 30min,42℃ 热休克 90s,再置冰上 1~2min,加入 0.8ml SOC 培养基,37℃ 振荡培养 1h (< 150r/min),使细胞恢复抗药性。将转化的细胞涂布于制备好的选择平板上(100~200 $\mu\text{l}/$ 每皿),待液体吸收后,倒置平皿,37℃ 培养过夜。白色菌落可能含有 PCR 产物,蓝色菌落可能是载体自连的结果。

1.8 重组质粒的鉴定

1.8.1 质粒的提取: 在转化平皿上挑取白色单菌落接种于 5ml 含氨苄青霉素的 LB 肉汤中,37℃ 振荡培养,按碱裂解法提取质粒^[8]。

1.8.2 PCR 初步鉴定: 将重组质粒 DNA,原始菌 DNA,宿主菌 JM109 染色体作为模板,用引物 Rr 190.70p-602n 进行扩增,PCR 条件及程序同前。

1.8.3 限制性酶切分析: 取重组质粒 DNA 8 μl ,加 2 μl 10 \times 限制酶缓冲液及限制性内切酶 Bstz I 或 Nco I + Sal I(3~5u),20 μl 反应体积,混匀后置 50℃ (Bstz I) 和 37℃ (Nco I + Sal I) 保温 3h。取 2 μl 酶切产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并进行银染分析,结果照相。

1.9 双链测序模板的制备

将已鉴定的阳性克隆单菌落接种于 5ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 12~16h,按碱法提取质粒 DNA,加入 RNase 使终浓度至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,37℃ 1h 去除 RNA,用等体积氯仿抽提两次,加等体积异丙醇室温沉淀,晾干,溶于 32 μl 去离子水,加入 8 μl 4mol/L NaCl 及 40 μl 13% PEG8000,冰浴 20min,4℃ 12 000g 离心 10min,沉淀用 75% 乙醇洗两次,无水乙醇洗一次,晾干,溶于 20 μl 去离子水中。电泳或用紫外分光光度计测模板的纯度及浓度,若纯度不够,重复 PEG 沉淀过程,直到符合要求。用双脱氧测序法测序。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

2.1.1 PCR 鉴定: 用重组质粒,受体菌 JM109 DNA 及载体质粒作模板,用 Rr 190.70p-602n 进行 PCR 扩增,结果发现挑选的重组质粒 DNA 均扩增出 533bp 大小的 DNA 片段,载体质粒 DNA 和受体菌 JM109 DNA 扩增阴性,阳性对照西伯利亚立克次体扩增阳性(图 1)。

2.1.2 酶切鉴定: 用 DNA 限制性内切酶 Bstz I 和 Nco I + Sal I 对初步鉴定阳性的克隆子进行酶切分析,结果发现经初步鉴定阳性的克隆子产生了约 560bp 左右的 DNA 片段(图 2)。

2.2 SFGR 各株 rOmpA 基因片段核苷酸及推定氨基酸的同源性比较

结果见表 1、表 2。

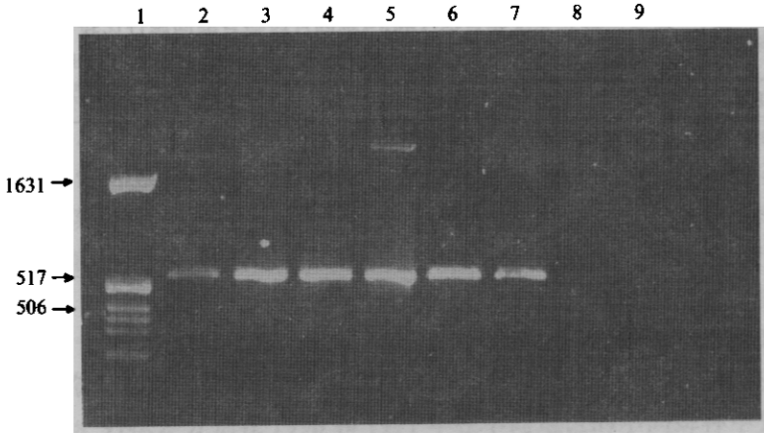


图 1 重组质粒的 PCR 鉴定

1. pBR322/Hinf I 分子量标准; 2. 西伯利亚立克次体 (246 株); 3. B₁; 4. H₁; 5. J₁; 6. P₅; 7. S₁₁; 8. 大肠杆菌 JM109 DNA; 9. 空白对照。(B₁, H₁, J₁, P₅, S₁₁ 分别代表 BJ-90, Ha-91, HLJ-054, 派克立克次体和西伯利亚立克次体 246 株 PCR 产物的重组子)

Fig. 1 PCR identification of recombinant plasmid with Rr 190.70p-602n primer

1. pBR322/Hinf I Markers; 2. *R. sibirica* (246 strain); 3. B₁; 4. H₁; 5. J₁; 6. P₅; 7. S₁₁; 8. *E. coli* JM109 DNA; 9. Control without template. (B₁, H₁, J₁, P₅, S₁₁ represented the recombinant of BJ-90, Ha-91, HLJ-054, *R. parkeri* and *R. sibirica* 246 strain PCR products respectively)

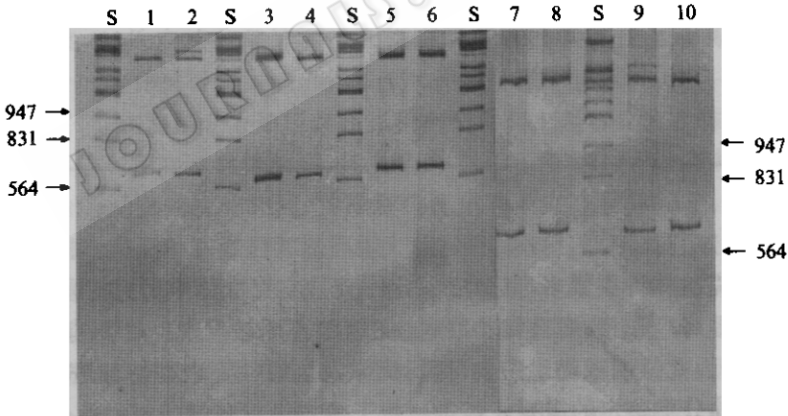


图 2 限制性内切酶消化重组质粒的 8% PAGE 银染分析结果

1, 2. B₁; 3, 4. H₁; 5, 6. J₁; 7, 8. P₅; 9, 10. S₁₁.

1, 3, 5, 7, 9. 为 BstZ I 酶切, 2, 4, 6, 8, 10. 为 Sal I+Nco I 酶切.

S. lambda DNA/HidIII+EcoR I 分子量标准.

Fig. 2 Silver-stained of 8% PAGE of recombinant plasmid DNA digested by BstZ I and Sal I+Nco I

1, 3, 5, 7, 9 digested by BstZ I and 2, 4, 6, 8, 10 digested by Sal I+Nco I.

S. lambda DNA/HidIII+EcoR I Markers

表1 斑点热群立克次体各株rOmpA基因片段核苷酸同源性比较(%)

Table 1 Homologous comparison of rOmpA gene fragment of SFGR

	Rr	Rs	Rc	Rp	Rj	HL-93	HLJ-054	BJ-90	Ha-91
Rr	100	95.68	90.99	96.06	92.87	94.18	93.99	96.62	96.62
Rs		100	90.06	96.62	92.30	93.62	93.99	99.06	98.31
Rc			100	90.24	89.49	90.24	90.06	90.99	89.12
Rp				100	92.68	93.62	94.37	97.56	98.12
Rj					100	95.68	96.62	93.25	93.06
HL-93						100	98.12	94.56	94.56
HLJ-054							100	94.75	94.75
BJ-90								100	99.25
Ha-91									100

注: *R. rickettsii* (R strain) = R.r; *R. sibirica* (246 strain) = R.b; *R. conorii* (Malish 7 strain) = R.c; *R. parkeri* = R.p; *R. japonica* (YH strain) = R.j.

表2 根据斑点热群立克次体各株rOmpA基因序列推定的氨基酸同源性比较(%)

Table 2 Homologous comparison of the putative amino acid according to rOmpA gene fragment of SFGR

	Rr	Rs	Rc	Rp	Rj	HL-93	HLJ-054	BJ-90	Ha-91
Rr	100	92.09	85.31	90.06	84.75	87.57	87.57	93.22	92.66
Rs		100	83.05	94.35	84.75	87.57	88.70	98.87	96.61
Rc			100	83.62	79.10	80.79	81.92	84.18	83.62
Rp				100	85.88	88.14	90.40	95.48	94.92
Rj					100	89.27	92.09	85.88	85.88
HL-93						100	94.92	88.70	88.70
HLJ-054							100	89.83	89.83
BJ-90								100	97.74
Ha-91									100

3 讨论

斑点热群立克次体种类繁多,其分类鉴定一直是立克次体学研究的焦点。近年,随着分离检测技术的提高,新的致病性和非致病性 SFGR 不断被发现。由于其群内种间抗原成分高度同源交叉,因此早期根据生态学、流行病学及抗原性等表型特征进行分类鉴定的方法已难以满足当前分类鉴定的需要。

核酸是决定生物表型的遗传物质,它的结构特征决定了生物在自然界中的分类学地位。然而 SFGR 专性细胞内寄生的特性及基因交换系统的缺乏极大地限制了对其基因的进一步研究。迄今在 SFGR 中尚未见有质粒存在的报告,也未见有接合、转导或转化现象的发生^[10]。在研究较多的基因中除柠檬酸合成酶基因外,大多是 SFGR 的外膜蛋白基因,其中 rOmpA 蛋白基因在 SFGR 种间变异最大,由于其编码的蛋白可能参与斑点热的免疫和致病过程而引起人们的兴趣。目前,立氏立克次体 R 株和康氏立克次体 Malish7 株 rOmpA 基因的全序列已经清楚^[10,11],一方面在 SFGR 开放读码框架内包含一个长的重复序列,这一重复序列由二种类型的重复单位组成,而在 SFGR 不同种间重复单位的种类,

数量及排列方式均不相同,另一方面,该基因开放读码框架起始部位在 SFGR 的分类鉴定中具有重要意义,根据立氏立克次体设计的引物而进行的 PCR/RFLP及序列测定已开始用于 SFGR 的分类鉴定^[12,13]。

在本实验中,用 Rr 190.70p-602n 引物扩增 SFGR 国际标准株西伯利亚立克次体 246 株和派克立克次体标准株及中国分离株 BJ-90、HLJ-054、Ha-91 rOmpA 基因片段,用 pGEM-T 载体对该片段进行了克隆及序列测定,并与国际标准株及参考株的已知序列进行了比较,结果表明所有实验用 SFGR 各株间 rOmpA 基因片段核苷酸的同源性为 89.12%~99.06%,推定氨基酸的同源性为 79.10%~98.87%。其中标准株间核苷酸及推定氨基酸的同源性分别为 90.06%~96.62%和 83.05%~94.35%。这与 Regnery 根据 PCR/RFLP 估计的 SFGR 内 rOmpA 抗原基因的差异性 <3.2% 的结果略有差异^[7]。

BJ-90株和 Ha-91株是分别在 1990 和 1991 年在不同地区的不同蝉种中分离到的两株 SFGR,经 PCR/RFLP,SDS-PAGE及 Western blot 鉴定分别是西伯利亚立克次体的亚种和新种,本研究中序列测定的结果表明:BJ-90株和 Ha-91株与西伯利亚立克次体标准株的核苷酸同源性分别为 99.06%和 98.31%,推定氨基酸的同源性则为 98.87%和 96.61%,有趣的是在中国分离株内这两株立克次体的核苷酸同源性高达 99.20%,它们与 HLJ-054 株和 HL-93 株的核苷酸同源性及推定氨基酸的同源性完全相同,核苷酸同源性分别为 94.75%,94.56%,推定氨基酸的同源性分别为 89.83%和 88.7%。因此我们认为 BJ-90株和 Ha-91株不仅与西伯利亚立克次体标准株相近,而且两者彼此也很相近。

HLJ-054株^[4]和 HL-93株^[3]是来自同一地区不同蝉种的分离株,被认为是 SFGR 的新成员,我们对 HLJ-054株 rOmpA 基因片段的序列分析和比较发现,在所有的 SFGR 中 HLJ-054株与 HL-93株在核苷酸同源性及推定氨基酸的同源性上最高,分别为 98.12%,94.92%。这二个分离株是否为同一个种 SFGR 尚有待进一步证实。

文献曾报道^[14],在我国北方地区存在三种类型的斑点热群立克次体:第一种在抗原和基因型上均与西伯利亚立克次体相同,代表株为 TO-85株(内蒙草原革蜱卵株),第二种在基因型与西伯利亚立克次体相同,抗原型与西伯利亚立克次体相关,但蛋白图谱不同,代表株为 BJ-90株,第三种在蛋白和基因型上均与已知 SFGR 不同,代表株为 Ha-91株。此次根据 SFGR rOmpA 基因片段的序列分析的结果,我们认为:在中国广阔的地域内,除 HLJ-054株和 HL-93株可能为 SFGR 的新成员外,众多不同来源的 SFGR 可能均为西伯利亚立克次体或者与其亲缘关系相近。由于本次研究选择的基因较短,因此这些不同来源分离株最终分类学地位的确定尚有赖于进一步做 rOmpA 的全基因序列分析。

参 考 文 献

- [1] 范明远,于学杰,毕德增等. 中国公共卫生学报, 1992, 11(2):67~72.
- [2] 毕德增,陈振光,陈 敏等. 疾病监测, 1996, 11(1):10~13.
- [3] 张健之,范明远,毕德增等. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(5):2~8.
- [4] 娄 丹,吴益民,王 冰等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985, 5:250~253.
- [5] 金 焱,于学杰,特 孟等. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9(2):23~25.
- [6] 于学杰,范明远,徐国明等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(5):305.
- [7] Regnery R L, Spruill C L, Plikaytis B D. *J Bacteriol*, 1991, 173(5):1576~1589.

- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 6.30~6.31; 1.25~1.28.
- [9] Mallavia L P. *Eur J Epidemiol*, 1991, 7(3):213~221.
- [10] Anderson B E, McDonld G A, Jones D C *et al*. *Infect Immun*, 1990, 58(9):2760~2769.
- [11] Crocquet-Valdes P A, Weiss K, Walker D H. *Gene*, 1994, 140:115~119.
- [12] Yan Y S, Uchiyama T, Uchida T. *Microbiol Immunol*, 1994, 38(11):865~869.
- [13] Zhang J Z, Fan M Y, Bi D Z. *Acta Virologica*, 1997, 41:41~45.
- [14] Yu X J, Jin Y, Fan M Y *et al*. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(1):83~88.

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF rOmpA GENE FRAGMENT OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAE ISOLATED IN CHINA

Chen Min Fan Mingyuan Bi Dezeng Zhang Jianzhi

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206*)

Chen Xiangrui

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071*)

Abstract Rr 190.70p-602n primers were used to amplify the rOmpA gene fragment of prototype strains (*Rickettsia sibirica* 246 strain and *R. parkeri*) and Chinese strains (BJ-90, Ha-91 and HLJ-054) of spotted fever group rickettsiae (SFGR). The PCR products were cloned into pGEM-T vector respectively and sequenced by Sanger's dideoxy method. The sequences of the tested strains were compared with the corresponding regions of prototype and reference strains of SFGR. The results showed that the homology of rOmpA gene fragments of prototype strains varied from 90.06%~96.62% in nucleotide and 83.05%~94.35% in putative amino acid respectively. Compared Chinese strains with prototype and reference strains of SFGR, it was found that the homology of BJ-90 strain and Ha-91 strain with *R. sibirica* 246 strain was the highest in nucleotide (99.06% and 98.31%, respectively) and in putative amino acid (98.87% and 96.61%, respectively), whereas HL-93 strain and HLJ-054 strain showed higher homology with *R. japonica* (96.62% and 95.68% in nucleotide, respectively) than others. Among all the Chinese strains, the homology between BJ-90 strain and Ha-91 strain was the highest, 99.25% in nucleotide and 97.74% in putative amino acid. The homology of nucleotide and putative amino acid between HL-93 strain and HLJ-054 strain was 98.12% and 94.92% respectively. The above results indicated that all SFGR so far isolated from different sources seem to be identical or closely related to *R. sibirica*, except for HL-93 and HLJ-054 strains, which could be considered as new members of SFGR.

Key words Spotted fever group rickettsiae, rOmpA gene, Cloning, Sequence analysis