

中国钩端螺旋体 rRNA 基因多态性分析

冯晓峰¹ 秦进才² 梁中兴¹ 时曼华¹ 王岳竹² 聂一新¹

(¹ 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206)

(² 中国药品生物制品检定所 北京 100050)

提 要 以 Dig-dUTP 标记的 16S rRNA 及 23S rRNA 基因为探针, 分析了八个血清群 54 个血清型 64 株国内外致病性钩端螺旋体参考株和 27 株野生株染色体经限制性内切酶 EcoR I 消化后的 rRNA 基因限制性图谱。结果发现, 91 株菌中共有 56 个核糖核酸型(Ribotype, 简称 RT), 除部分血清群中少数不同的血清型有相同的 RT 型外, 大部分血清型都有独特的 RT 型, 同一血清群往往拥有共同的核心片段; 除黄疸出血群的黄疸出血型外, 同一血清型的国内和国际参考株的 RT 型不相同; 大多数野生株的 RT 和相应血清型国内参考株相同, 差异也只表现为谱形上个别带型的缺少和增加, 所研究的波摩那型野生株的 RT 型和国际参考株相同而和国内参考株不同。

关键词 钩端螺旋体, rRNA 基因多态性, 血清型

分类号 R377 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)-03-0241-46

血清学分类是目前主要的钩端螺旋体(简称钩体)分类方法, 在临床诊断及流行病学调查等方面发挥着重要作用, 但该方法操作烦琐、费时费力。为了探索新的快速简便和准确的钩体分类方法, 我们实验室已对国内 11 个血清群钩体的 rRNA 基因 RFLP 分类作了初步研究^[1]。本研究通过对我国其余血清群钩体的 rRNA 基因多态性研究, 建立了较完整的中国钩端螺旋体 rRNA 基因 RFLP 分类系统, 同时比较国际参考株及国内野生株, 对中国钩体菌株的遗传背景作了初步了解。

1 材料和方法

1.1 菌株

实验所用 64 株国内、国际参考株由中国药品生产制品检定所提供。27 株野生钩体株由云南、贵州、四川、河南、安徽、湖南和北京等疫区分离(表 1、2)。

1.2 钩体株的培养、收集和 DNA 的提取、纯化

按已报道的方法^[2]操作。

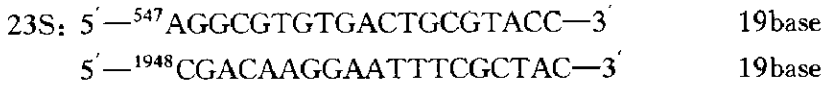
1.3 16S、23SrRNA 基因探针

通过对 16S rRNA、23S rRNA 基因序列^[3,4]的分析比较, 选择它们的保守区, 设计两对引物, prime 1

16S: 5'—¹⁸CCTGGCTCAGAACTAACG—3' 18base
5'—¹²⁸¹AGACTCCAATCCGTAAGTGGG—3' 21base

扩增片段的长度为 1263bp, T_m = 83.4

prime 2



扩增片段的长度为 1401bp, $T_m = 83.6$

引物由中国科学院微生物研究所基因工程材料和技术研究中心合成。然后对犬型钩体 Multon 株的 16S rRNA 和 23S rRNA 基因的 PCR 扩增产物进行 Dig 标记。

1.4 染色体 DNA 酶切和 Southern 转印

采用限制性内切酶 EcoRI 对染色体 DNA 进行消化, 琼脂糖凝胶电泳分离, 按常规方法进行 Southern 转膜和杂交。

1.5 杂交条带的分子量测算及数值分类

根据同一杂交膜上的标准分子量准确计算每个钩体株的杂交图谱中的各杂交片段大小, 把每一实验菌株所出现的杂交片段分别由小到大排列, 逐个分析杂交结果。如果杂交图谱中存在某个杂交片段则计为 1, 反之空格或 0。这样每个菌株都有一组 0、1 数值排列, 即核糖核酸型(Ribotype, RT), 然后将每个 RT 型作在半对数坐标纸上。

2 结果

2.1 钩体菌株 RT 型分布

91 株钩体共有 56 个 RT 型, 其中参考株占 54(54/64), 其余 2 个 RT 型存在于野生株中, 条带数在 3~7 之间。大部分钩体株均有 1.5(1.6)和 1.1(0.9)kb 的核心片段(表 1、2 及图 1)。

表 1 参考株的 rRNA 基因 RFLP 型

Table 1 RFLPs of rRNA gene of reference strains of *Leptospira*

血清型 Serovar	菌株 Strain	RFLP	血清型 Serovar	菌株 Strain	RFLP
Butembo	Butembo	1	Lai	Lai	30
Autumnalis ¹	Akiyami A	2	Copenhageni ¹	M20	30
Rachmati ¹	Rachmat	3	Ictero -	RGA	30
Bangkinang ¹	Babgkinang I	3	Haemorrhagiae ¹		
Morris ¹	Moore	4	Nanm ²	1690	30
Forbragg ¹	Fort bragg	5	Ictero -	70124	30
Rinaceaauriti	Erinaceus	6	Haemorrhagiae ²		
	Auritus 670		Copenhageni ²	M37	31
Bulgarica	Nicolaev	7	Nanxi	HK6	32
Carlos	C3	8	Honghe	H2	33
Lambwe	Lambwe	9	Mankarso	Mankarso	36
Tarassovi	65 - 52	10	Naam ¹	Naam	35
Guidae	710011	11	Birkini	Birkini	36
Banna	A31	12	Smithi	Smith	37
Gengma	M48	13	Ndambari	Ndambari	38
Yunxian	L100	13	Mwogolo	Mwogolo	39
Moldviae	Dong27	11	Ndahambukuje	Ndahambukuje	40
Ningxia	81005	14	Gem	Simon	41
Mengpeng	A82	15	bogvere	LT60~69	42

续表 1

血清型 Serovar	菌株 Strain	RFLP	血清型 Serovar	菌株 Strain	RFLP
Sarmin	Sarmin	16	Tonkini	LT96-68	43
Rio	Rr5	17	Nanla	A6	45
Washurin	LT63-68	17	Autumnalis ²	Lin4	46
Weaveri ¹	CZ390	18	Fort-bragg ²	GH284	47
Weaveri ²	S98	19	Mooris ²	L174	48
Abrami	71022	20	Rachmati ²	Tia1	49
Menglian	S621	21	Sumatrana	L56	50
Zanoni	61A	22	Bangclinang ²	L69	51
Pyrogenes	4	23	Cingshui	L105	52
Proechimys	1161U	24	Lushui	L70	52
Tropica	CA299	25	Manhao	L60	53
Mozdok	5621	26	Lincang	L14	54
Kunming	K5	27	Lichuan	Lichuan130	55
Pomona	Pomona	28	Sichuan	80412	56
Pomona ²	Luo	29			

注:同一血清型国际参考株上标为 1,国内参考株上标为 2。

Note: International and domestic reference strains of the same serovar were marked respective by superscript 1 and 2.

2.2 RT 型和血清群的关系(表 1 及图 1)

检测了 8 个血清群的问号钩体, 结果发现, 不同血清群 RT 型不同, 血清群间 RT 型不发生交叉。相同血清群往往拥有相同的核心片段; 如秋季群参考株的核心片段为 1.6kb 和 1.1kb, 秋季群国内参考株的核心片段为 3.7kb、1.5kb 和 1.0kb。黄疸出血群国内参考株的核心片段为 1.5kb 和 1.0kb; 黄疸出血群国际参考株的核心片段为 1.0kb; 萨明群为 0.9kb。根据这些核心片段可以初步区分不同的血清群。

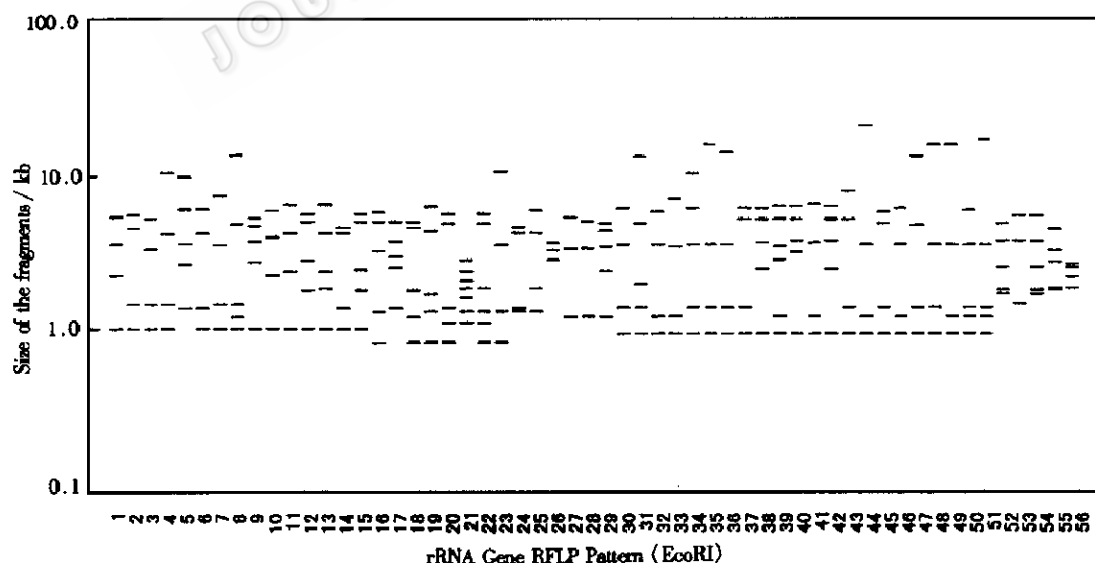


图 1 钩端螺旋体不同 RTs 标化图

Fig. 1 The Normalized graph of RTs

2.3 RT 与血清型的关系(表 1 及图 2)

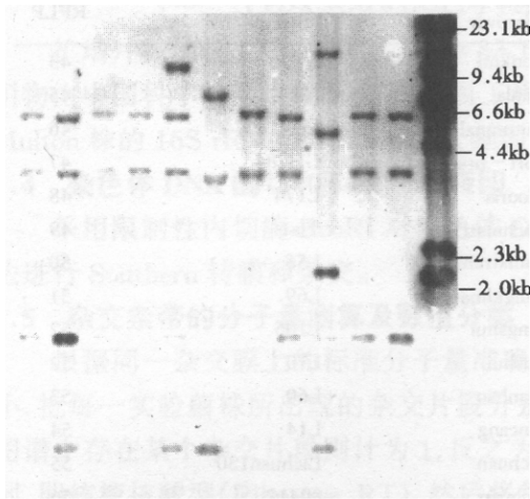


图 2 黄疸出血群国内参考株及野生株 DNA EcoRI 酶切 rRNA 基因 RFLP

Fig. 2 RFLPs of rRNA gene of reference and field stains belonging to Icterohaemorrhagiae serogroup

From the left to the right: λ DNA/Hind III, Lai, 70124,

M37, 1690, HK6, H2, 1-1-1, long, sheng, yan, XH1

不同血清型钩体其 RT 型基本不同, 个别也呈现相同的 RT 型。如秋季群斑金南型和拉赫马特型国际参考株 RT 型相同; 黄疸出血群中的赖型和哥本哈根型、黄疸出血型国内参考株相同, 曼卡索型和比尔金型国际参考株相同; 波摩那群的昆明型和波摩那型国际参考株相同。同一血清型国内和国际参考株中, 只有黄疸出血群的黄疸出血型表现出了相同的 RT 型。

值得注意的是新近被列入国际参考株的致热群孟连型的 RT 型与所检测的其它钩体株不同, 杂交片段最多, 达 7 条, 但全集中在 1.2~3.0kb 之间; 未被采纳为国际参考株的曼耗型不具有曼耗群其他血清型所共有的 1.9kb 片段; 我国所特有的四川型也表现出与其他血清型不同的 RT 型, 它的 4 条片段集中在 2.0kb~2.8kb 之间, 未发现大于 3.0kb 和小于 2.0kb 的杂交片段。

2.4 野生株 RT 分布以及和参考株 RT 的比较

27 株野生株中存在 6 个 RT 型, 其中 2 个 RT 型只存在于野生株中。野生株的 RT

表 2 野生株 rRNA 基因 RFLP 型

Table 2 RFLPs types of rRNA gene of field strains of *Leptospira*

菌株 Strain	血清型 Serovar	REL P	地区 Area	宿主 Host	时间 Time
7-R, 4-L	赖 型	30	北京顺义	黑线姬鼠	1994.8
1-1-1	赖 型	34	河南原阳	人	1994
H1, H2, H3	赖 型	30	河南原阳	黑线姬鼠	1995.10
H1, H2, H3	纳姆型	30	河南信阳	褐家属	1995.10
9-2	赖 型	30	河南原阳	黑线姬鼠	1993
3-2	赖 型	30	湖南	牛	1994
95-24	赖 型	30	四川	黑线姬鼠	1995
96-5	赖 型	30	四川	黑线姬鼠	1996
M11, M15, M31, M78	赖 型	30	贵州麻江	黑线姬鼠	1959.10
M40	赖 型	44	贵州麻江	黄毛鼠	1995.10
M66	赖 型	30	贵州麻江	小家鼠	1995.10
Shegn, Hong, yan	赖 型	30	贵州天柱	人	1991.9
L238	致 热	23	云南耿马	黑线姬鼠	1994.9
L249	斑金南	46	云南耿马	黑线姬鼠	1949.9
L267	波摩那	28	云南耿马	猪	1994.9
H26, H110	波摩那	28	安徽	猪	1996

型的特征如下:同一宿主不同地点、不同时间分离的同一血清型的野生株 RT 型基本相同;部分野生株中存在新的 RT 型,其 RT 型与参考株有共同的核心片段。如黄疸出血群赖型野生株中源于黑线姬鼠的不同时间地域分离的野生株 RT 均与参考株相同,源于黄胸鼠及一株源于河南的病人的野生株的 RT 型与参考株不同(表 2、图 2)。值得注意的是波摩那群的野生株 RT 型与波摩那型国际参考株和昆明型相同,与波摩那型国内参考株不同。

3 讨论

所研究的国际参考株和国内相应参考株的 RT 型除黄疸出血型一致外,其余均不相同。我们的结果和国外相同菌株的研究结果大部分相同,但也有差异,如在 Perolat^[5] 研究中存在于秋季型、黄疸出血型、赖型、纳姆型的 0.8kb 片段,而我们的结果中表现为 1.1 或 1.0kb,他的研究中福特布拉格型的 RT 型片段为 10.0、6.3、3.7、2.8 和 1.4kb,而在我们的研究中为 13.7、5.0、1.6、1.3 和 1.1kb。原因可能是(1)检测所用的探针不同;(2)我们所研究的国内菌株中 *L. borgpetersenii* 基因种是根据同一血清型国外参考株的结果而定,它们本身可能就有差异。

野生株基本和相应国内参考株 RT 型相同,说明 rRNA 基因 RFLP 分类可应用于实践。个别野生株的 RT 型有变异,但也只表现为个别条带上的增加或缺失。我们初步认为这些变异反映了它们的遗传背景不同,可能是钩体菌株适应不同地理环境及宿主体内环境而产生的。要收集更多的野生株,结合临床和流行病学资料深入研究这种遗传学上的差异和钩体菌株与宿主之间的相互作用关系,这对追踪传染源有比较重要的意义。

传统的血清学分类方法反映的是菌株的表型变化。钩体菌株,即使是在实验室传代的参考株,受生存的自然和宿主环境的变化压力,也容易发生抗原变异^[6]。这样会不断有新的血清群、型出现,给菌株鉴定带来更大的困难。在实际应用中,血清学分类操作繁琐,费时费力。rRNA 基因 RLFP 分类反映的是钩体基因组成的变化,而基因,尤其是 rRNA 基因,要比血清学表型稳定;在实际操作中,较血清学分类快速、简便,结果判断易于标化。

参 考 文 献

- [1] 李春好,秦进才,时曼华等. 中华微生物学和免疫学杂志,1997,17(3):187.
- [2] 梁中兴,时曼华. 中华微生物学和免疫学杂志,1994,14:321.
- [3] Fukunaga M, Horie I, Okuzako N *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1990,18(2):336.
- [4] Fukunaga M, Horie I, Mifuchi I *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1989,17(5):2123.
- [5] Parolat P, Merien F, Ellis WA *et al.* *J Clin Microbiol*, 1994,32(8):1949.
- [6] 秦进才,高吉元,浦 丛. 中国人兽共患病杂志,1997,13(3):44.

ANALYSIS OF rRNA GENE RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM OF *LEPTOSPIRA* IN CHINA

Feng Xiaofeng¹ Qin Jincai² Liang Zhongxing¹ Shi Manhua¹ Wang Yuezhu² Nie Yixin¹

(¹Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206)

(²National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

Abstract Sixty-four *Leptospira* international and domestic reference strains, which belonging to fifty-four serovars, and twenty-seven field strains were examined by using EcoR I restriction endonuclease analysis of genomic DNA and restriction fragments length polymorphism of rRNA gene, fifty-six Leptospiral ribotypes (RTs) were described. Most serovars gave specific patterns. Serovars in the same serogroup possess common core-segments, but we found RTs of reference strains from China and other countries are different. Most field strains have RTs with correspond of reference strains, only a few bands were shown different if RTs were different. A notable result was that the field strains of serovar pomona have the same Rt as the international reference strain but different from the domestic reference strain.

Key words *Leptospria*, rRNA Gene restriction fragments length polymorphism, Serovar

* * * * *

深切怀念李焕娄先生

《微生物学报》编委李焕娄先生因病医治无效,不幸于1999年2月3日逝世,享年72岁。

李焕娄先生是我国著名微生物药学专家,在任《微生物学报》编委期间审阅了大量稿件,他知识渊博,学风正派,深受广大科研工作者的尊敬和爱戴,我们永远怀念李焕娄先生。

本刊编辑部