

恙虫病立克次体特异性基因序列的扩增与鉴定

张海红 黎家灿 郑小英 奚志勇

(中山医科大学寄生虫学教研室; 广州, 510089)

摘要 目的:明确广东地区恙虫病立克次体(Rt)的流行株型别。**方法:**以 Rt 主要外膜蛋白 56 kDa 型特异抗原基因(tsa⁵⁶Kda)为靶基因设计并合成群、型特异引物,采用 NPCR 法对广东地区的标本进行株型鉴定。**结果:**广东顺德、南海等地恙螨、野鼠及患者所携带 Rt 为 Karp 株。**结论:**顺德、南海等地流行优势株为 Karp 株,且媒介恙螨、鼠宿主及患者所携带的 Rt 为同一型别。

主题词 立克次体, 恙虫病/遗传学; 基因扩增/方法; 序列分析/方法

中图分类号 R 376.2; 384.4

Amplification and Identification of the Gene Encoding the Typespecific Antigen from *Rickettsia Tsutsugamushi*

Zhang Haihong Li Jiacan Zheng Xiaoying Xi Zhiyong

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To define the type of Rt in endemic areas of tsutsugamushi disease of Guangdong. **Methods:** The group and types primers were derived from 56 kDa protein of Rt. Nested polymerase chain reaction (NPCR) method was used for detecting and typing *Rickettsia tsutsugamushi* (Rt). Then the strain-specific gene sequence of local epidemic strains were cloned. **Results:** The type of Rt in specimens from Shunde and Nanhai were Karp strain and the positive recombinant pUC18-RK was conducted. **Conclusions:** The main epidemic strain in Shunde and Nanhai is Karp strain and the vector chigger mites, wild rats and patients carry the same type of Rt.

Subject headings *Rickettsia tsutsugamushi* /genetics; gene amplification/methods; sequence analysis/methods

恙虫病(tsutsugamushi disease)是由媒介恙螨叮咬传入恙虫病立克次体(*Rickettsia tsutsugamushi*, Rt)的急性传染病。虽然媒介恙螨、鼠类宿主和病人携带的 Rt 只有一个种,但不同分离株之间在抗原性及致病性等方面均有差异^[1],从而各分离株引起的临床表现也不尽相同,给临床明确诊治带来了一定的困难。以往对恙虫病立克次体的株型鉴定均采用传统的血清学方法。1990年 Spruill^[2]首先尝试用 PCR/RFLP(聚合酶链反应/限制性内切酶片段长度多态分析)技术从分子水平证实了恙虫病立克次体不同分离株之间存在的

差异,为恙虫病立克次体的基因分型奠定了基础。本文采用 NPCR 技术对广东地区的恙螨、野鼠及患者标本进行株型鉴定,并将在此基础上分别对流行株特异性基因序列进行 DNA 重组技术,以进一步完善 Rt 的株型鉴定方法,并为多价疫苗的研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 检测标本

广东顺德、南海等地收集的野鼠血及恙螨标

本,由广州军事医学研究所黄佳亮医师提供;恙虫病患者血标本由广东佛山市第一人民医院传染科罗红涛医师提供。

1.2 菌种与载体

1.2.1 恙虫病立克次体 Karp 株 由福建省卫生防疫站于恩庶教授提供;Gilliam、Kato、Kawasaki 和 kuroki 株均由南京军区军事医学研究所郭恒彬研究员惠赠。莫氏立克次体、普氏立克次体为本室保存。

1.2.2 大肠杆菌 TG1、质粒 pUC18 均为本室保存。

1.3 试剂及仪器

限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Bam* H I 为华美公司产品, T4 连接酶为美国 Promega 公司产品, PCR 试剂盒为加拿大真达公司产品,其他试剂及仪器见文献[3]。

1.4 引物的设计合成

根据 Rt 主要表面蛋白 Sta56 基因编码区序列合成群、型引物,由上海生工公司合成。引物序列见文献[3]。

1.5 DNA 模板提取

参考 Furuya 法^[4]。取患者血或野鼠血 100 μ L,加入 100 μ L pH 8.0, 1 \times TE 液,混匀后加入 1/10 体积的十二烷基硫酸钠(SDS) 20 μ L 至终浓度为 1%, 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入 10 g/L 溶菌酶 44 μ L 至终浓度为 2 g/L,冰浴 30 min,加入 20 g/L 蛋白酶 K 2.64 μ L 至终浓度为 0.2 g/L, 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提两次,氯仿:异戊醇 1 次,10 000 r/min 5 min 后抽出水相层,加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 混匀后,加入 2 倍体积的预冷无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜, 15 000 r/min 10 min,去上清,加入 70%乙醇洗涤 1 次, 15 000 r/min 10 min,加 1 \times TE 20 μ L 溶解沉淀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。鼠脾加蔗糖缓冲液 1 mL 制成悬液,取 200 μ L 依上法提取。恙螨加 TE 研磨后依上法提取。

1.6 NPCR 检测恙虫病立克次体^[4]

第 1 次 PCR:反应体系如下: 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTP (2 mol/L) 5 μ L, primer Rt34 1 μ L, primer Rt35 1 μ L, *Taq* 酶 0.8 U, Rt-DNA 5 μ L, ddH₂O 32.2 μ L, 石蜡油 50 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 2 min, 70 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环,最后 70 $^{\circ}$ C 保温 5 min。取第 1 次 PCR 产物 5 μ L 作为第 2 次 PCR 的模板,引物改为内引物 Rt 10 和 Rt 11,其余条件不变。琼脂糖凝胶电泳观察目的条带。

1.7 NPCR 鉴定 Rt 株型

取上述第 1 次 PCR 产物 5 μ L 做模板,分别加

入 Karp、Gilliam、Kato、Kuroki、Kawasaki 5 对 Rt 的型特异引物,其余条件不变做第 2 次 PCR。同上电泳观察目的条带。

2 结果

2.1 引物特异性检测

群引物 Rt 34 和 Rt 55 及 Rt 10 和 Rt 11 对恙虫病立克次体的所有 5 个株均可进行扩增,在约 507 bp 处出现单一清晰条带,而对普氏立克次体 (*R. prowazackii*)、莫氏立克次体 (*R. typhi*) 等则未见阳性扩增带。Karp 株、Gilliam 株、Kato 株、Kuroki 株和 Kawasaki 株特异性的引物对则仅扩增各相应的分离株,株特异性引物对其他株则无扩增,可见,所设计的引物具有很好的群、型特异性。

2.2 流行区恙虫病立克次体阳性标本的选出

用群引物经 NPCR 后,结果显示 32 例患者血标本中 28 例阳性,50 例野鼠血标本中 12 例阳性,42 例恙螨标本中 7 例阳性(图 1)。

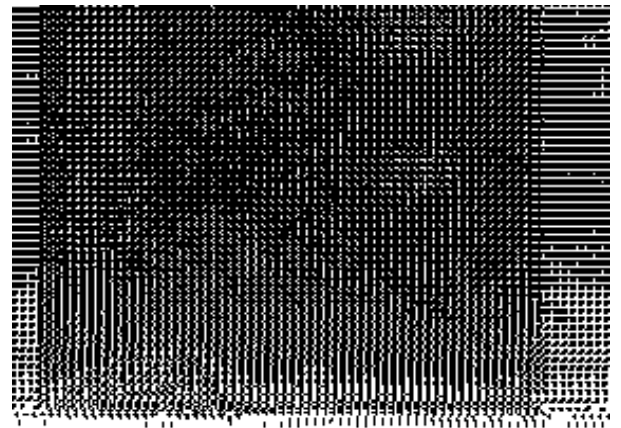


图 1 广东佛山、南海等地区标本的恙虫病立克次体(Rt)的 NPCR 检测

Fig. 1 Rt in samples from Foshan and Nanhai were detected by NPCR

1:PCR markers; 2:patients blood; 3:wild rats blood; 4:chigger mites; 5:positive control of mice; 6:positive control of chigger mites; 7:normal man blood; 8:normal mice blood; 9:normal chigger mites

2.3 恙虫病立克次体流行株型鉴定

将上述群引物对扩增结果证实为阳性的患者血、鼠血及恙螨标本分别用 Karp、Gilliam、Kato、Kuroki 及 Kawasaki 5 株的特异性引物对扩增后,结果显示仅在 230 bp 多核苷酸处出现一阳性扩增带,与阳性对照组人工腹腔接种恙虫病立克次体 Karp 株的小鼠及恙螨标本扩增结果一致(图 2)。说明广东顺德、南海及白云山等地媒介恙螨、野鼠

宿主及患者所携带 Rt 为 Karp 株。

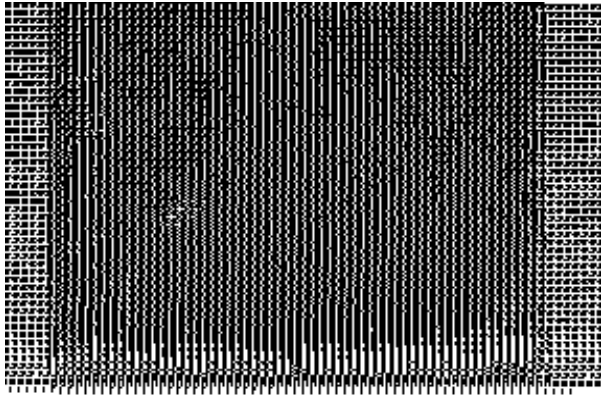


图 2 恙虫病立克次体 (Rt) 阳性标本的 NPCR 分型鉴定

Fig. 2 Rt in samples were typed by NPCR

1: PCR marker; 2: blood samples typed by Karp-specific primers; 3: chigger mites typed by Karp-specific primers; 4: positive control of mice; 5: positive control of chigger mites; 6~9: Rt in samples typed by Gilliam, Kato, Kuroki and Kawasaki strain-specific primers respectively

3 讨论

基因分型技术是从分子水平揭示株与株之间的差异, 实验显示具有很好的特异性, 更易发现新株型和变异株。其中 PCR 更是以其简便、快速、特异性高的特点而广泛地应用于病原体的分型。本研究选择 Sta 56 基因序列作为 Rt 检测分型的靶序列, 因 Sta56 与 Rt 的致病性和毒力有关^[7], 含有组和株抗原决定簇^[8], 因而最能反映 5 型 Rt 的本质差异, 设计的引物具有很好的特异性, 无非特异和交叉扩增, 可用于临床和流行病学标本的检测和分型。

广东省为我国恙虫病的老流行区, 尤其近年恙虫病病例逐年有增多趋势, 且较集中, 本文标本的选出除白云山所捕获的恙螨外, 其余均来自顺德、南海等地有恙虫病 48 例发生的地区, 共检出恙虫病立克次体阳性标本 47 例, 这样恙虫病的高发区, 在预防上应给予高度重视。株型鉴定结果显示顺德、南海等地区的流行优势株为 Karp 株, 且媒介恙螨、野鼠宿主及患者所携带的恙虫病立克次体为同一型别, 即 Karp 株。Karp 株为强毒株, 其致病力较强, 易引起各种严重并发症, 其传播媒介及储存宿主主要为地里纤恙螨, 其所引起的恙虫病一般好发于夏季。而广东佛山地区去年 48 例恙虫病发生于 6~7 月份, 恙虫病临床表现多为重症型病例, 多数合并内脏器官受损和中枢系统症状, 且流行地区检获的恙螨经分类证实为地里纤恙螨, 进一步证实了广东地区恙虫病立克次体流行优势株为 Karp 株, 因此如来自

流行区的患者以心肌炎或头痛、呕吐等脑膜炎表现, 在排除其他常见病因的同时, 应考虑 Karp 型恙虫病立克次体所引起的恙虫病可能, 早期应用抗恙虫病立克次体药物如氯霉素等, 可以有效地避免病情进一步恶化, 降低严重并发症及死亡病例的发生。因此, 如果我们明确了某地恙虫病立克次体的型别, 结合各型别的毒力及致病力、流行地区、流行季节、传播媒介等方面资料, 就可以早期快速地明确诊断, 减少临床误诊及漏诊, 可见, 快速鉴别某流行区的恙虫病立克次体的型别亦具有极其重要的临床意义。

在我国某些地区存在由恙虫病立克次体混合感染的情况, 即在同一宿主体内存在由 2 个甚至 2 个以上的分离株, 虽然本研究未发现此情况, 但因标本量不多, 标本来源相对较集中, 故不能排除广东地区亦存在此种混合株感染的可能, 因此进一步的研究可以探讨在同一反应体系中同时检测 2 个或甚至更多个分离株的方法, 这样更加节省时间和经费, 更适于临床和流行病学调查的应用。

参 考 文 献

- 1 魏 曦主编. 医用立克次体学. 上海: 上海科学技术出版社, 1984. 281~283
- 2 Spruill C L, Regnery R L. Analysis of *Rickettsia tsutsugamushi* amplified DNA that encodes an antigen gene product. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 590: 483
- 3 张海红, 黎家灿. 分子技术鉴定恙螨鼠宿主和患者恙虫病立克次体流行株型的实验研究. *广东寄生虫学会年报*, 1997, 19: 20
- 4 Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(6): 1637
- 5 Sugita Y, Yamakawa Y, Takahashi K, et al. A polymerase chain reaction system for rapid diagnosis of scrub typhus within six hours. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 49(5): 636
- 6 Kelly Y, Dasch G A, Chan T C, et al. Detection and characterization of *Rickettsia tsutsugamushi* in infected *Leptotrombidium fletcheri* chiggers with the polymerase chain reaction. *J Med Entomol*, 1994, 31(5): 691
- 7 Pang H L, Feng H M, N G M H, et al. Antigen of virulent and attenuated *Rickettsia tsutsugamush*. *Clin Exper Immunol*, 1986, 66: 279
- 8 Ohashi N, Tamura A, Ohta M, et al. Purification and partial characterization of a typespecific antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immunol*, 1989, 57(5): 1427

(1998-07-09 收稿 1998-09-12 修回)