·实验研究·

钩端螺旋体毒力相关基因的分布特点分析

赵莉　蒋秀高　聂一新　肖玉春　徐建国

R51 A

【摘要】 **目的** 探讨钩端螺旋体(钩体)毒力相关基因的分布特点。**方法** 根据钩体赖型赖株全基因组序列的生物信息学分析资料,选择了 12 个可能与钩体毒力相关的基因,采用聚合酶链反应(PCR)方法,对中国问号钩体 38 株参考菌株和 81 株分离的野生菌株,以及 12 株非致病性的双曲钩体共 131 株菌株进行了检测。**结果** 问号钩体中各毒力相关基因分布广泛,双曲钩体中仅检测到个别毒力相关基因。lipL32 基因存在于所有检测的问号钩体,lipL36 基因在问号钩体不同菌株中的变异较大,阳性检测率为0%～90.91%;la1608 基因在问号钩体黄疸出血群菌株中阳性检测率为87.50%,而在其他血清群菌株间阳性检测率为0%～25.00%,sphA 基因仅在问号钩体少数菌株中能检测到,阳性检测率为17.65%,且在中国赛罗群哈焦型参考菌株中未检测到。**结论** 这些基因可能是问号钩体重要的毒力相关基因。其中 lipL32 可能是问号钩体各血清群菌株共同抗原的编码基因;lipL36 基因可能和问号钩体血清群特异性和多样性有关;la1608 基因可能是黄疸出血群菌株特有的基因;哈焦型菌株与问号钩体菌株在基因结构具有较大的差异。

【关键词】 钩端螺旋体; 毒力相关基因; 聚合酶链反应

Distribution of virulence associated genes among strains of *Leptospira*

ZHAO Li, JIANG Xiu-gao, NIE Yi-xin, XIAO Yu-chun, XU Jian-guo. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【**Abstract**】 **Objective** To analyze factors related to the virulence associated genes of *Leptospires*. **Methods** Twelve putative virulence associated genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) method in 38 reference strains, 81 field strains of *Leptospira interrogans* isolated from patients or animals, and 12 avirulent strains of *Leptospira biflexa*. **Results** These putative virulent genes were widely distributed among the strains of *Leptospira interrogans*, but only few of them were detected in *Leptospira biflexa*. Gene lipL32 was detected in all strains of *Leptospira interrogans*. Distribution of gene lipL36 was varied significantly with detected rates from 0 to 90.91%. Gene la1608 had a positive rate of 87.50% for strains of serogroup Icterohaemorrhagiae, but was only detected in few strains of other serogroups with a range from 0 to 25.00%. Rate of detection on gene sphA was 17.65% in *Leptospira interrogans*, and was absent in serovar hardjo reference strain. **Conclusion** Results indicated that these genes might be of importance for the virulence and pathogenicity of *Leptospira interrogans*, while gene lipL32 might be one of the common antigens. Gene lipL36 might be involved in serogroup specificity with genetic diversity, but gene la1608 was as one of the genes with specificity for serogroup Icterohaemorrhagiae. However, serovar hadjo might hold quite different genetic characteristics when compared with the other serovars of *Leptospires*.

【**Key words**】 *Leptospira interrogans*; Virulence associated gene; Polymerase chain reaction

钩端螺旋体(钩体)病是由问号钩体引起的一种分布广泛的自然疫源性疾病,但目前在全球范围内,对钩体的毒力因子、致病机理方面的研究还存在着一定的局限性。本研究利用反向遗传学方法,在问号钩体赖型赖株全基因组序列的基础上,进行生物信息学分析,挑选可能与钩体毒力相关的开放读框,分别编码钩体的结构蛋白、溶血素和其他可能的致病因子,并根据赖株基因序列设计引物,对中国问号钩体 38 株参考菌株和 81 株自不同地区、不同宿主分离的野生菌株以及 12 株双曲钩体采用聚合酶链反应(PCR)方法检测这些毒力相关基因,分析各毒力相关基因在钩体不同菌株中的分布特点,探讨钩体的毒力相关基因。

材料与方法

1. 菌株:问号钩体 38 株参考菌株由中国疾病预

基金项目:日本健康科学基金资助项目

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室

第一作者现工作单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒应急技术中心

防控制中心传染病预防控制所人畜共患病室保存；81 株野生菌株自江西、安徽、广东、四川和湖南等省的钩体患者和带菌动物中分离(其中 41 株分离自钩体患者血液，25 株分离自鼠类动物，11 株分离自牛，3 株分离自猪，1 株分离自蛙)，12 株双曲钩体由中国药品生物制品研究所提供。

2. 主要试剂：dNTP，Taq DNA 多聚酶为华美生物工程公司产品；引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

3. 染色体 DNA 制备，参照 Marshall 等[1]方法，用酚、酚/氯仿、氯仿各抽取 2 遍。

4. PCR 扩增：所要检测的基因及其引物情况见表 1，每个基因的检测结果重复 3 次，每次作空白对照，并以赖型菌株作为阳性对照。

5. PCR 扩增参数：95℃ 预变性5 min；94℃ 变性 1 min，退火1 min(各引物采用其相应退火温度)，72℃ 延伸1.5 min，35 个循环；72℃ 延伸10 min。

结　果

通过 PCR 方法检测了不同类型菌株的 12 个毒力相关基因的分布特点(表 2)，结果表明毒力相关基因在菌株中的分布存在明显差异。在问号钩体中，各毒力相关基因分布广泛，除 lipL36、la1608 和 sphA 基因的阳性率较低，分别为58.82%、28.57% 和17.65%；其余各毒力相关基因的阳性率均很高，分别为74.79%～100.00%。在非致病性的双曲钩体中，仅检测到 ompL1，其阳性率为8.33%，其他毒力相关基因均未检测到。且对问号钩体 15 株代表菌株进行分析，结果表明，在毒力相对较弱的血清群中，毒力相关基因的阳性率较低，如爪哇群、塔拉索夫群、曼耗群和明尼群的代表菌株，毒力相关基因阳性率分别为12.50%～18.75%；而毒力相对较强的血清群的毒力相关基因的阳性率均很高，在 81.25%～93.75%之间。

对问号钩体菌株数较多的部分血清群的各毒力相关基因分布进一步分析，结果表明，lipL32 基因存在于所有检测的问号钩体菌株中；lipL36 基因在不同菌株中的阳性率变化较大，如在黄疸出血群、澳洲群、七日热群和赛罗群中分别为87.50%、81.82%、90.91%和83.33%，而在秋季群、流感伤寒群的阳性率则很低，分别为25.00%、0.00%；la1608 基因在问号钩体黄疸出血群菌株中阳性率为87.50%，在其他血清群菌株的阳性率为0.00%～25.00%；sphA 基因在问号钩体菌株中的阳性率很低，仅为17.65%，

表1　钩体各毒力相关基因及其产物、同源性及其引物

基因	产物名称	同源性(%)	同源的微生物	产物长度(bp)	退火温度(℃)	引物 5'→3'
lipL41	外膜脂蛋白	89.00	*Leptospira interrogans*	650	51	U:GTAACGTAGGTTTGGCTGTTG L:TTCTTTTACTTCTTCGTCCTC
lipL36	外膜脂蛋白	61.00	*Leptospira kirschneri*	558	52	U:CGTTTATGCTTGTTCTTCTG L:GTACGTTTGCCTCAGTTCC
lipL32	外膜脂蛋白	97.00	*Leptospira interrogans*	457	53	U:GCTGAAATGGGAGTTCGTATG L:GGCTCACACCTGGAATACCT
ompL1	外膜蛋白	90.00	*Leptospira interrogans*	525	55	U:TGCCATCAATGCAAGAAGCAC L:CCAACTGCATACGCAGCAGAC
flaB	鞭毛蛋白	98.00	*Leptospira interrogans*	627	55	U:ACGATGAAAGCTCTGTCTTCC L:CTGCATATTTTCATACGCACC
rmlD	鼠李糖合成酶	99.00	*Leptospira interrogans*	669	52	U:TCCGACTCAGAGAACGCTTAC L:CTCTCTCCAATGCGGAACAAC
la1608	脂多糖	30.00	*Neisseria meningitidis*	527	52	U:GGCATGCATTGATACGATTGA L:TTGAGCCCATACCAACGAGAC
invA	侵袭蛋白 A	43.00	*Bartonella clarridgeiae*	437	52	U:GTGGAGAGGTTTTGGTTGGAG L:CGATCTATTTCCGATGTCTTG
mce	Mce 蛋白	23.00	*Mycobacterium tuberculosis*	422	52	U:TGCCTTTTGGTTACGTTTCTG L:TCTTCCTAAACTTCCGTCTCC
sphH	溶血素	100.00	*Leptospira interrogans*	834	51	U:CTTATGAATGGACTCCGCTCT L:TGCGTTTACTTGTAACCAACC
sph	溶血素	62.00	*Leptospira interrogans*	670	51	U:GTTATCGTGTTTGAAGAAGCC L:GTTTAGAAACCGGATCGTAAG
sphA	溶血素	文献[2]	*Leptospira interrogans*	863	53	U:AAGAGCACAACGTATCGTGAG L:CAGTGGCTACAGATACGAAGG

表2　毒力相关基因在钩体各菌株中的分布(%)

基因	问号钩体								双曲钩体 (n=12)
	黄疸出血 (n=24)	秋季 (n=16)	澳洲 (n=11)	流感伤寒 (n=11)	七日热 (n=11)	赛罗 (n=18)	其他 (n=28)	合计 (n=119)	
lipL41	91.67	81.25	90.91	81.82	100.00	94.44	64.29	84.03	0.00
lipL36	87.50	25.00	81.82	0.00	90.91	83.33	39.29	58.82	0.00
lipL32	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
ompL1	100.00	100.00	100.00	90.91	81.82	100.00	57.14	87.39	8.33
flaB	95.83	93.75	100.00	81.82	100.00	100.00	75.00	90.76	0.00
rmlD	91.67	87.50	90.91	72.73	81.82	83.33	39.29	74.79	0.00
la1608	87.50	12.50	0.00	18.18	9.09	5.56	25.00	28.57	0.00
invA	100.00	93.75	100.00	90.91	100.00	100.00	50.00	86.55	0.00
mce	91.67	81.25	90.91	81.82	90.91	94.44	42.86	78.15	0.00
sphH	87.50	81.25	81.82	81.82	100.00	100.00	32.14	75.63	0.00
sph	100.00	93.75	90.91	72.73	100.00	100.00	53.57	84.87	0.00
sphA	4.17	6.25	0.00	9.09	18.18	5.56	53.57	17.65	0.00

注:表中数据为百分率

且在我国赛罗群哈焦型参考菌株中未检测到;其他基因在这几个血清群的菌株中分布广泛,阳性率在72.73%～100.00%。

讨　论

问号钩体和双曲钩体在形态上无法区分,培养方法也相似,但两者在致病性呈现出明显的差异,问号钩体为致病性钩体,而双曲钩体通常对人不致病。问号钩体在中国分布广泛,是世界上问号钩体血清群和血清型最多的国家之一,其中黄疸出血群、爪哇群、犬群、秋季群、澳洲群、波摩那群、流感伤寒群、七日热群是重要的菌群,其中以赖型和波摩那型最常见,是引起钩体病爆发性流行的主要菌群。各血清型菌株的毒力不同,对人群的致病作用不同[3]。本研究检测的问号钩体和双曲钩体共 131 株菌株,各毒力相关基因的分布明显不同,在问号钩体中有广泛的分布,而双曲钩体中仅有个别基因被检测到,且在问号钩体各血清群菌株中的分布也不相同,毒力较弱的血清群如爪哇群、塔拉索夫群、曼耗群和明尼群的代表菌株毒力相关基因的阳性检测率较低,而其他各血清群的毒力相关基因的阳性检测率均很高,说明问号钩体和双曲钩体不仅在表型上存在着明显差别,在基因型上也存在显著的差异;同时说明毒力强度不同的问号钩体菌株的基因结构不同,因而所表现出的致病力不同;并说明这些基因可能在问号钩体致病过程中发挥着重要的作用,是重要的毒力基因。

lipL41、lipL36、lipL32 基因编码的脂蛋白和 ompL1 基因编码的孔蛋白是钩体外膜蛋白的主要成分,rmlD 和 la1608 是脂多糖 rfb 基因簇中的两个基因,rmlD 与鼠李糖合成相关[4],la1608 基因功能尚不清楚。对问号钩体菌株各毒力相关基因分析显示,lipL32 基因存在于所有检测的问号钩体中,可能是问号钩体各血清群菌株的共同抗原;lipL36 基因在菌株中的变异较大,可能在问号钩体血清群特异性和多样性中起着重要的作用;la1608 基因在问号钩体黄疸出血群菌株中阳性检测率非常高,而在其他血清群菌株中阳性检测率很低,可能是黄疸出血群菌株特有的基因,与脂多糖的血清群特异性有关;其他基因 lipL41、ompL1 和 rmlD 在各血清群中都有较高的阳性率,因而这些基因在问号钩体中高度保守,且这些基因编码的蛋白质是问号钩体抗原主要组成部分,在维持钩体形态结构的完整性、功能代谢的稳定性,决定钩体抗原特性以及与宿主相互作用的过程中都发挥着重要的作用,所以它们是问号钩体致病过程中重要的毒力相关基因。目前钩体病预防方面,采用的疫苗虽有一定的效果,但仍存在免疫力低,持久性不强,对其他群型的钩体感染缺乏保护力,需多次接种等局限性[5]。因此,寻找由钩体基因编码的属特异抗原的基因工程疫苗,使之持久地抵抗侵入机体的钩体,已成为钩体病研究的课题。本研究结果提示以上钩体的结构蛋白,尤其是 lipL32 基因编码的脂蛋白可用于疫苗和诊断试剂方面的研究。

flaB 基因编码的鞭毛蛋白是钩体鞭毛的核心蛋白,在维持钩体螺旋形态和运动方面起着重要作用,该基因突变后菌体比较僵直且末端无钩,运动减弱[6]。invA[7]、mce[8]基因都是根据与其他生物基因

序列进行同源性比较，挑选的可能与问号钩体粘附和侵袭功能相关的基因。本研究结果表明，flaB、invA 和 mce 基因在问号钩体中有广泛的分布，且在毒力较强的血清群菌株中都有很高的阳性检测率，而毒力较弱的菌株中检测不到或阳性检测率很低，且双曲钩体中未检测到这几个基因，这与问号钩体可迅速通过皮肤黏膜屏障进入血液，并在血液和组织内生长繁殖造成机体损伤，且对细胞有粘附和侵袭作用一致，毒力强的菌株可以大量地粘附到细胞表面，并侵入细胞内，使细胞器受到不同程度的损害；而经长期试管传代毒力丧失的菌株和不致病的双曲钩体对细胞无粘附作用，不侵入细胞内，也不致细胞病变[3,9]。因而这几个基因可能是钩体重要的毒力基因，在钩体致病过程中发挥着重要的作用。

sphA 和 sphH 基因分别是从钩体哈焦型菌株和赖型菌株克隆到的溶血素基因，两者具有高度的同源性，但两者的作用机制不同。sphA 编码的溶血素具有鞘磷脂酶 C 活性，而 sphH 基因编码的溶血素是孔形成毒素，具有细胞毒素作用，可以破坏许多表皮细胞[2,10]。sph 基因是根据同源性分析从赖株基因组中挑选的溶血素，与 sphA 和 sphH 基因的同源性分别为 62.00% 和 51.00%。本研究结果显示 sphH、sph 基因在问号钩体中都有较高的阳性检出率，且在部分血清群菌株中阳性率为 100%，因而这两个溶血素基因在我国问号钩体中广泛存在，在钩体致病过程起重要作用。而 sphA 基因仅在少数菌株中能检测到，阳性检测率为17.65%，且在我国哈焦型参考菌株中未检测到，说明文献中的哈焦型菌株可能与我国问号钩体菌株的基因结构具有较大的差异。

参 考 文 献

1 Marshall RB, Wilton BE, Robinson AJ. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. Med Microbiol, 1981, 14: 163-166.

2 Segers R, van der Drift A, De Nijs A, et al. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Infect Immun, 1990, 58: 2177-2185.

3 于恩庶，罗海波，鲍行豪，等主编. 钩端螺旋体病学，第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1992. 13-88.

4 Mitchison M, Bulach DM, Vinh T, et al. Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related rfb locus in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Bacteriology, 1997, 179: 1262-1267.

5 谢广中，张锦麟，秦进才，等. 多价钩端螺旋体外膜疫苗的安全性及免疫效果研究. 中国人兽共患病杂志，2000, 16: 38-40.

6 Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira spp*. inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol Microbiol, 2001, 40: 189-199.

7 Mitchell SJ, Minnick MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythricytes. Infect Immun, 1995, 63: 1552-1562.

8 Haile Y, Caugant DA, Bjune G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (mce) homologs in mycobacterium other than tuberculosis (MOTT). FEMS Immunol Med Microbiol, 2002, 33: 125-132.

9 Merien F, Baranton G, Perolat P, Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. Infect Immun, 1997, 65: 729-738.

10 Lee SH, Kim S, Park SC, et al. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. Infect Immun, 2002, 70: 315-322.

（收稿日期：2002-12-25）

（本文编辑：尹廉）

·读者·作者·编者·

本刊对统计学符号及统计学方法的要求

按 GB 3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写，常用如下：(1)样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$（中位数仍用 M）；(2)标准差用英文小写 s；(3)标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$；(4)t 检验用英文小写 t；(5)F 检验用英文大写 F；(6)卡方检验用希文小写 χ^2；(7)相关系数用英文小写 r；(8)自由度用希文小写 υ；(9)概率用英文大写 P（P 值前应给出具体检验值，如 t 值、χ^2 值、q 值等），P 值应给出实际数值，不宜用大于或小于表示，小数点后保留 3 位。以上符号均用斜体。关于资料的统计学分析：对于定量资料，应根据实验或调查设计类型和资料的条件选用合适的统计学分析方法，不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析；对于定性资料，应根据实验或调查设计类型、列联表中定性变量的性质和分析目的选用合适的统计学分析方法，不能盲目套用 χ^2 检验；对于回归分析，应结合专业知识和散布图选用合适的回归类型，不能盲目套用简单直线回归分析。

本刊编辑部