

· 实验研究 ·

贵州省莱姆病螺旋体的核糖体基因分型研究

王定明 郝琴 蔡星和 万康林 王昭孝 陈建

RS1 A

【摘要】 目的 对从贵州省农耕地鼠类动物分离到的 21 株莱姆病螺旋体菌株进行分子流行病学研究。方法 应用聚合酶链反应(PCR)从 21 株莱姆病螺旋体分离株的全基因组 DNA 扩增 5S~23S rRNA 基因间隔区,扩增产物用限制性片段长度多态性分析(RFLP)和核酸序列分析。结果 贵州省 21 株莱姆病螺旋体菌株可分为两个基因型:*Borrelia valaisiana* (*B. valaisiana*) 20 株, *Borrelia* sp 1 株。结论 贵州省农耕地以 *B. valaisiana* 基因型为主,目前 *B. valaisiana* 对人的致病性已经得到证实。

【关键词】 莱姆病螺旋体;核糖体基因分型;流行病学,分子

Study on ribotyping of Lyme borreliosis spirochete in Guizhou province WANG Ding-ming*, HAO Qin, CAI Xing-he, WAN Kang-lin, WANG Zhao-xiao, CHEN Jian. *Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China

【Abstract】 Objective To define the main genotypes in Guizhou agricultural areas by molecular epidemiologic investigation of 21 *Borrelia burgdorferi* sensu lato of Lyme disease spirochetes and to provide the scientific bases for formulating a preventive policy. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the 23S(rl)-5S(rrf) intergenic spacer, and amplified products were analyzed by restriction fragment length polymorphism(RFLP) and nucleotide sequencing. **Results** There were two genotypes in the strains: 20 strains belong to *Borrelia valaisiana*, 1 strain is *Borelia* sp. **Conclusion** *Borrelia valaisiana* was the main genotype in Guizhou agricultural areas. The harmness of *B. valaisiana* to human being has been confirmed. In order to efficiently prevent the harmness of agent to the people in Guizhou agriculture areas, we should study the risk further.

【Key words】 Lyme borreliosis, spirochete; Ribotyping; Epidemiology, molecular

莱姆病是一种新发现的经蜱传播的、累及多器官的自然疫源性疾病。血清流行病学调查证实中国 22 个省(区)的人群有莱姆病的感染,17 个省(区)存在莱姆病疫源地^[1]。贵州省 21 县(市)的血清流行病学调查证实人群莱姆病抗体 IgG 阳性率较高,并且从 8 个县耕作区的粒形硬蜱和黑线姬鼠等 5 种鼠类分离多株莱姆病螺旋体。目前的研究表明莱姆病螺旋体——伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) 具有高度遗传异质性,至少有 10 个基因型,基因型同临床表现存在密切关系。我们采用聚合酶链反应(PCR)技术对 5S~23S rRNA 基因间隔区进行扩增,对扩增子进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析^[2],并对不同于国内外 13 个酶切带型的菌株进行测序,对贵州分离的 21 株菌进行核糖体

基因分型研究,以明确贵州农耕地的主要基因型。

材料与方 法

1. 莱姆病螺旋体菌株来源: 试验所用菌株 26 株,国际和国内参考株 5 株,贵州省菌株 21 株(表 1)。所有菌株用 BSK II 培养基在 33℃ 培养 5~7 天,离心收集菌体,保存于 -20℃ 备用。

2 试剂: 蛋白酶 K、Taq 酶、dNTP、限制性内切酶 Mse I、PBR322/Hae III Marker、琼脂糖、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺均购于华美生物工程公司。全细胞 DNA 的提取参照文献[3]进行。

3. 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析^[4]:

(1) 对所有菌株进行 PCR 扩增: 根据 rrf3' 和 rrl5' 端高度保守区设计引物,以 Oligo 5.0 软件评价,其序列为: Primer1: 5'-GCG GGA GAG TAG GTT ATT-3' 和 Primer2: 5'-CTA GGC ATT CAC CAT AGA CT-3'。PCR 反应条件为: 变性、退火、延伸温度分别为 94℃、54℃、72℃,时间为每步 45 s,共

作者单位: 550004 贵阳,贵州省疾病预防控制中心(王定明、蔡星和、王昭孝); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(郝琴、万康林、陈建)

进行 34 个循环。

表1 贵州莱姆病螺旋体菌株的一般情况和分类结果

基因型	菌株	来源	国家或地区	rrf-rrl 带型
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	CS4	Kidney of rabbit	湖南	A
<i>B. garinii</i>	20047	<i>I. ricinus</i>	法国	B
	PL91	Blood of patient	内蒙古	C
<i>B. afzelii</i>	VS461	<i>I. ricinus</i>	瑞士	D
	FP1	Blood of patient	四川	D
<i>B. valaisiana</i>	GC4	<i>R. losea</i>	贵州	非典型 D
	GK1	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GK2	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GK7	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GM1	<i>I. ricinus</i>	贵州	N
	GM2	<i>R. nitidus</i>	贵州	N
	GM4	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GC1	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GC3	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GC3-3	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GC1-3	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GS1	<i>I. ricinus</i>	贵州	N
	GS2	<i>I. ricinus</i>	贵州	N
	GS3	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GS5	<i>A. agramus</i>	贵州	N
	GXB12	<i>M. musculus</i>	贵州	N
	GXL2	<i>R. losea</i>	贵州	N
	GXL18	<i>R. norvegicus</i>	贵州	N
	GXT11	<i>R. confucianus</i>	贵州	N
GZH32	<i>A. agramus</i>	贵州	N	
<i>B. sp</i>	GCG4	<i>A. agramus</i>	贵州	N

(2) 产物用限制性内切酶 Mse I 37℃ 酶切, -20℃ 保存备用。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE): 酶切产物采用 18% PAGE(丙烯酰胺: 双丙烯酰胺为 20:1)、恒压 100 V、8 h 电泳。相对分子量(Mr)Marker 为 PBR322/Hae III。

(4) 硝酸银染色: 电泳结束后, 将胶转入固定液 100 ml 中固定 45 min; 200 ml 硝酸银染色液染色 2 h; 三蒸水清洗 2 次; 加入还原液作用到酶切片段显色清晰为止; 加入终止液, 将结果拍照。

4. 结果判断: 根据 Mse I 酶切产物模式图(图 1)中不同基因型的酶切图谱进行分析判断。目前国外菌株至少有 13 个酶切带型, 分别为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M。其带型和基因型的对应关系分别为: A 为 *B. burgdorferi sensu stricto*; B、C 为 *B. garinii*; D 为 *B. afzelii*; E 为 *B. japonica*; F 为 *B. valaisiana*; G、H 为 *B. lusitanae*; I、J、K 为 GroupDN127; L、M 为 Group21123。

5. 测序: 选取 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP

分析中酶切图谱不同带型的菌株, 将其 PCR 产物送博雅公司测序。

A B C D E F G H I J K L M N

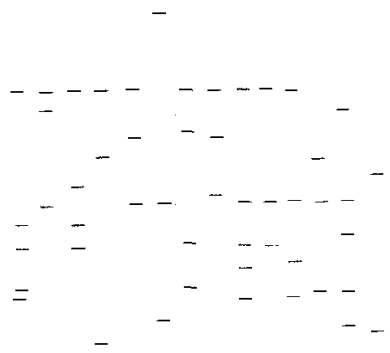


图1 莱姆病螺旋体 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析

结 果

1. 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析: 贵州 21 株菌酶切结果见图 2 和图 3; 有 D、N 两种带型, N 带型为中国菌株特有。其中 7 号为非典型 D 带型; 其余为 N 带型。

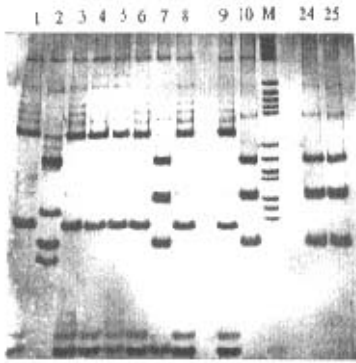
2. 菌株基因测序结果: 经 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析, 7 号菌株的酶切图谱带型为非典型 D 带型, 将其测序, 结果为: *B. valaisiana*; 在 N 带型中: 1、3、4、5、6、8、9、14、15、16、17、20、21、22 号的带型完全一致, 将 1 号测序; 11 和 18 的带型一致, 将 11 号测序; 12、13、19、23 号的带型稍有不同, 分别测序; 结果证明, 12 号菌株为 *B. sp*, 其余均为 *B. valaisiana*。测序结果如下:

```

1 TTGACTCAAACCTAAATTAATTTTATGTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
11 ..... AAACCTAAAGTATTTTTTATGTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
13 ..TGACTTAAACCTAAAGTATTTTTTATGTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
7 ..... TAAACCTAAAGTATTTTTTATGTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
12 ..... ACTTAAACCTTAAATTTATTTTTATATTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
19 ..... CCTTAAATTTATTTTTTATGTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTAA
23 ...GACCTTAAACCTTAAATTTATTTTTATATTTTTTAAADATCAAGTTTTGAAGATTTG
1 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
11 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
13 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
7 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
12 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
19 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
23 TTCAAATAATGTAAAAATAAACAGATTTGACATGGATGCAACAAGATATATATTTT
1 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
11 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
13 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
7 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
12 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
19 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
23 TTATGTTGATATAAACAATTTGGCAAATAGAGATGGAAGATAAAAATATGTTCAAAGTAA
1 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
11 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
13 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
7 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
12 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
19 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
23 TAAGACTCTATGCTGATGCTGATAGA
    
```

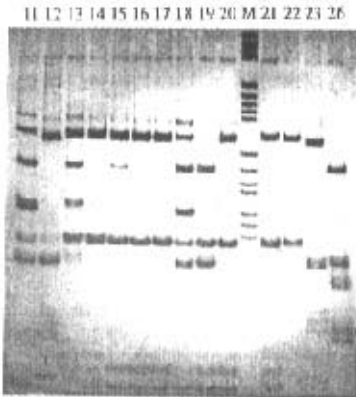
3. 21 株贵州菌株基因分型结果: 经 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析及序列分析, 21 株贵

菌株可分为两个基因型: *B. valaisiana* 20 株, *B. sp* 1 株(表 1)。



1: GK1; 2: PJ91; 3: GM4; 4: GS5; 5: GM1; 6: GC3; 7: GC4; 8: GS3; 9: GK2; 10: CS461; M: Marker; 24: 20047; 25: FP1

图2 贵州莱姆病螺旋体菌株 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析



11: GXT11; 12: GCG4; 13: GCI-3; 14: GCI; 15: GSI; 16: GXB12; 17: GS2; 18: GXL18; 19: GC3-3; 20: GXL2; M: Marker; 21: GK7; 22: GM2; 23: GZH32; 26: CS4

图3 贵州莱姆病螺旋体菌株 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析

讨 论

莱姆病在世界五大洲广泛存在,随着对莱姆病螺旋体的深入研究,发现不同地区存在的基因型有所差别。目前至少可分为 10 个基因型,其中 4 个基因型从患者体内培养分离出^[5]。中国菌株具有一定的遗传异质性,据报道至少有 3 个基因型^[6]。本次研究对贵州 21 株莱姆病螺旋体,用 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 进行分型,并对部分菌株进行测序,表明贵州农耕地存在 *B. valaisiana* 和 *B. sp* 基因型,以 *B. valaisiana* 为主。这就证实莱姆病螺旋

体在中国除了已发现的 3 种基因型以外,还存在另外两种基因型。这对研究中国莱姆病螺旋体的分子流行病学提供了重要的理论和实践意义。

基因型与临床表现存在密切关系^[7-9],其中 *B. burgdorferi sensu stricto* 主要引起关节炎, *B. garinii*、*B. afzelii* 分别与螺旋体神经炎和萎缩性皮炎有关,这三种基因型均可引起游走性红斑。目前已有文献报道 *B. valaisiana* 对人类致病,因此,有必要研究该菌对贵州农耕地人群健康的危害程度、致病特点,为制定防治对策提供科学依据。

本实验所采用的 5S~23S rRNA 基因间隔区 RFLP 分析是中国莱姆病菌株鉴定的常规方法^[6],其具有快速、简便和成本低的优点,但不能鉴定某些带型与已知 13 种带型不同的菌株,所以 DNA 序列同源性测定和分析是这种方法的补充和最终的确

参 考 文 献

- 1 张哲夫,万康林,张金声. 我国莱姆病的流行病学和病原学研究. 中华流行病学杂志, 1997, 18: 8-11.
- 2 Postic D, Assous MV, Grimont PAD, et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism analysis of *rrf* (5s)-*rrl* (23s) intergenic spacer amplicons. Intern J system Bacterol, 1994, 44: 743-752.
- 3 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 科学技术出版社, 1989. 52-54.
- 4 Baranton G, Postic D, Girons IS. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Intern J system Bacterol, 1992, 42: 378-383.
- 5 Marconi RT. Identification of novel insertion elements restriction fragment length polymorphism patters and discontinuous 23s rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia Japonic* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol, 1995, 142: 77-83.
- 6 史翠霞,万康林,马凤琴,等. 中国莱姆病螺旋体的核糖体基因分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 21: 298-301.
- 7 Balmeilii T. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Res Microbiol, 1995, 146: 6329-6340.
- 8 Van Dam AP, Kuiper H, Vos K. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme disease. Clin Infect Dis, 1993, 17: 708-717.
- 9 Busch U, Hizo-Teufel C, Bohmer R, et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains isolated from cutaneous Lyme borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. Scand J Infect Dis, 1996, 28: 586-589.

(收稿日期: 2002-09-29)

(本文编辑: 尹廉)