

粒细胞埃立克体 444-Epank 基因的检测与序列分析

赵秋敏 曹务春 李建民 张泮河 陈山虎 曹克新 高东旗 杨红 张习坦

【摘要】 目的 进一步证实中国大陆粒细胞埃立克体感染的病原学证据。方法 从粒细胞埃立克体结构蛋白基因序列高变区构建特异引物,对蜱标本、动物标本、人血标本进行聚合酶链反应(PCR)检测,收集全沟硬蜱特异 PCR 产物,进行克隆和序列测定,与 GenBank 中注册的序列进行同源性比较。结果 从黑龙江省采集的全沟硬蜱(62 组,310 只)2 组中扩增出 444 bp 的特异 DNA 片段,而从内蒙古的动物脏器标本(8 份)没有扩增出该片段,从内蒙古林业局人员血标本(129 份)中扩增出 1 份该片段。对该片段的克隆和序列测定结果显示其 DNA 序列与美国人粒细胞埃立克体分离株(AF047897)对应位置相差 23 个核苷酸,同源性为 94.9%,推测的氨基酸同源性为 88.44%。结论 通过粒细胞埃立克体 444-Epank 基因的检测与分析进一步证实中国大陆存在粒细胞埃立克体的感染。

【关键词】 粒细胞埃立克体;Epank 基因;序列分析

Detection and sequencial analysis of Granulocytic ehrlichia 444-Epank gene ZHAO Qiumin*, CAO Wuchun, LI Jianmin, ZHANG Panhe, CHEN Shanhu, CAO Kexin, GAO Dongqi, YANG Hong, ZHANG Xitan. *Department of Epidemiology, Institute of Microbiology and Epidemiology of Acadmy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

【Abstract】 Objective To provide further pathogenic evidence of *Granulocytic ehrlichia* infection in China. **Methods** Specific primers derived from 444-Epank gene were used to amplify *Granulocytic ehrlichia* DNA from specimens of ticks, animals and human blood. PCR products of ticks were cloned and sequenced. **Results** 444 bp specific DNA fragementes were amplified from 2 of 62 pools of *Ixodes persulcatus* collected from Heilongjiang province and 1 of 129 blood specimens from forest workers in Inner Mongolia. Eight animal specimens were negative. PCR products from ticks were then cloned and squenced. It differed at 23 positions in comparison to American strain (AF047897) with 94.9% homology. The homology of deduced ammonia was 88.44%. **Conclusion** Our findings further confirmed that *Granulocytic ehrlichia* infection did exist in China.

【Key words】 *Granulocytic ehrlichia*; Epank gene; Sequence determination

不断出现的新传染病是当前医学界面临的新问题。人粒细胞埃立克体(Human *Granulocytic ehrlichia*, HGE)引起的人粒细胞埃立克体病,自 1994 年发现以来^[1],发病区域和发病率不断扩大和上升,由于该病起病急,病死率高,在美国掀起研究热潮,同时亦引起其他国家的普遍关注。人粒细胞埃立克体病主要发生在美国东北部地区、中西部和加利福尼亚地区,欧洲的英国、比利时、瑞士、斯洛文

尼亚、德国和瑞典亦有 HGE 或类似感染的流行^[2],肩突硬蜱(*I. scapularis*) (美国)和篦子硬蜱(*I. ricinus*) (欧洲)为传播媒介^[3]。我们已从我国全沟硬蜱标本中检测到 16s 核糖体(16s rRNA)基因片段,并进行了 16s rRNA 全基因序列测定,与美国株(GenBank 注册号 U02501)相比,相差 7 个碱基,同源性 99.5% 以上^[4]。为了进一步证实埃立克体感染的存在,我们尝试从结构蛋白基因检测病原体,结果与 16s rRNA 检测一致。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39970655)

材料与方法

作者单位 :100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所 流行病学研究室(赵秋敏、曹务春、李建民、张泮河、高东旗、杨红、张习坦);内蒙古大兴安岭林业中心卫生防疫站(陈山虎、曹克新)

一、标本来源

1. 蜱标本 :1997 年 5~10 月用标准布旗法在黑龙江省林区针阔混交林和灌木林间小径两侧植被上采蜱,将蜱放入通气的昆虫瓶中保存,带回实验室分

类鉴定。在在林间山坡上放牧的牛、羊体表以及经常随主人到山林劳动的家犬体表收集宿主蜱。另外,在野外作业的林场工人及其家属收工时,检查他们的身体和衣服上有无蜱类爬动或侵寄,如发现蜱,当即取下放入保存瓶中。

2. 血标本:1999年5~7月间在内蒙古乌尔其汗煤田林场和莫尔道嘎林场从干部、工人、家属等人员中采集的血标本。

3. 动物标本来源:在内蒙古现场采集的鼠标本。

二、材料

1. 聚合酶链反应(PCR)引物:根据参考文献^[5,6]合成一对Epank基因特异引物LA6、LA1,可引导扩增444 bp的DNA片段,引物的位置(根据AF047897)及核苷酸序列如下:LA6:5'-GAGAGATGCTTATGCTAAGAC-3'^{2260~2280};LA1:5'-CGTTCAGCCATCATTGTGAC-3'^{2684~2703}。引物由军事医学科学院生物工程研究所合成,经OPC柱纯化。

2. 克隆载体及宿主菌:PCR产物直接克隆载体PBluescript II.KS(+)(T-载体)和宿主菌*E. coli* XL1-Blue分别为美国Stratagene和Ivitogen公司产品。

3. 工具酶及试剂:耐热脱氧核糖核酸(聚合酶-Taq DNA聚合酶)、脱氧核苷三磷酸(-dNTPs)、T4 DNA连接酶购自华美生物工程公司。异丙基硫代-β-D-半乳糖苷-IPTG、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷-X-gal为美国Promega公司产品。双链DNA提取试剂盒系德国Qiagen公司生产。其他试剂均购自北方同正生物技术发展公司。DL-2000购自大连宝生物公司。

三、方法

1. DNA模板的提取:①蜱标本:方法参照文献^[4]。②人血块、动物血块标本:冻存的血块融化后,各吸取100 ml于消毒的离心管中,加蛋白酶K消化液300 ml(100 mg/ml),55℃水浴3 h,用等体积酚、酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,2倍体积无水乙醇沉淀过夜,70%酒精洗涤,沉淀干燥后,加50 ml TE溶解,-20℃保存备用。③动物脏器标本:野鼠脏器标本中DNA模板的提取,无菌操作取野鼠脾脏3 mm见方小块,用研磨器研碎,加蛋白酶K等后续步骤同血标本。

2. PCR扩增:取上述DNA模板3 μl,10×PCR缓冲液3 μl,引物浓度为0.8 mmol/L,dNTPs 100 mmol/

L,总反应体积为30 μl。扩增条件:94℃预变性120 s,94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增2个循环,再依次退火温度60℃、58℃、56℃各2个循环,余不变;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,28个循环,最后72℃延伸7 min。取上述PCR产物10 μl,用1.4%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。为避免标本污染引起的假阳性反应,标本处理区、反应液制备和PCR扩增区,以及产物分析区在不同的房间进行,加样移液器分开专用,对实验室定期紫外线照射。同时,每次试验都设立空白(水)对照,在任何阳性对照标本都未观察到假阳性反应。

3. PCR产物的克隆与DNA序列测定:用低熔点琼脂糖凝胶电泳法收集PCR扩增产物,经纯化,连接到T载体上,将重组质粒转化感受态*E. coli* XL1-Blue宿主菌。转化子在含IPTG和X-gal的平板上以蓝、白斑法筛选,挑取蓝色菌落;用LA6,LA1引物进行PCR快速鉴定,取阳性克隆,液体培养增菌;用试剂盒提取双链重组质粒DNA,用373A自动测序仪测序。

4. DNA序列同源性比较与聚类分析:通过Internet网进入美国国家生物技术信息中心(NCBI)站点后,利用“BLAST Sequence Similarity Searching”工具,与GenBank中注册的核苷酸序列进行同源性比较。将产生的序列,删除无定位碱基,留下具有相等数量定位碱基的核苷酸序列用Clustal W(1.74)软件做聚类分析,得出序列间差异矩阵表,用“Tree-View”程序构建遗传发育树图。

结 果

1. 蜱标本检测结果:对不同来源的蜱标本先分批进行检测,然后统一进行试验,重复检测的结果与分批检测的结果的一致性良好。对个别结果有差异的标本,再进行第三次试验,依最后一次结果为准。从黑龙江采集的全沟硬蜱标本中扩增出444 bp的特异DNA片段。共检测310只(每组5只),有2组阳性。从内蒙古的乌尔其汗、莫尔道嘎的129份人血标本中检测HGE的Epank基因,1份阳性,动物脏器8份均阴性。

2. 序列分析结果:选择全沟硬蜱阳性标本1份,经PCR扩增后,对特异DNA片段进行克隆和序列测定。序列已经在GenBank上注册(注册号:AY032656)。将测定的DNA序列输入BLAST分析程序,在GenBank中搜索,进行最大同源性比较。结果

发现与美国 HGE 分离株基因对应片段相差 23 个核苷酸, 同源率为 94.9% (美国分离株 GenBank 注册号 AF047897)。与另一美国分离株 (GenBank 注册号 AF020521) 同源率为 93.8%。应用 Sequence 2.1 分析软件分析该序列同美国分离株 (AF047897) 的氨基酸同源率为 88.44%。

3. 遗传发育分析结果: 用 Clustal W (1.74) 软件对 444-Epank 基因序列进行同源位排列, 做聚类分析, 应用 'Tree-View' 程序得出聚类树图, 见图 1。

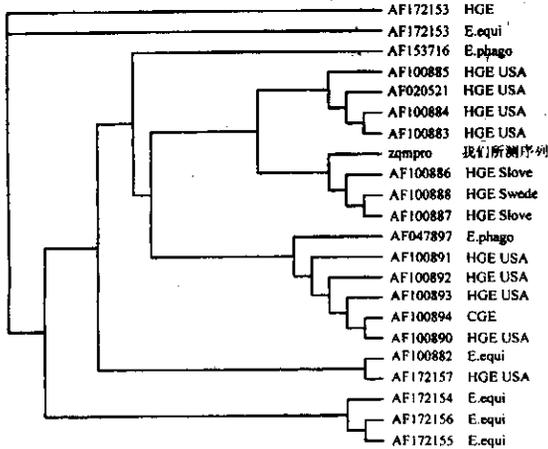


图1 用 444-Epank 基因进行粒细胞埃立克体聚类分析的结果

讨 论

我们过去的研究用 16s rRNA 基因构建的引物, 从黑龙江全沟硬蜱标本中检测到 16s rRNA 基因片段, 并对检测阳性标本进行了 16s rRNA 全基因序列测定, 与国外 U02501 相比相差 7 个碱基, 同源性 99.5% 以上^[4]。由于 16s rRNA 过于保守, 我们尝试从结构蛋白基因检测病原体, 本次研究用 Epank 基因构建的引物, 成功检测到粒细胞埃立克体的病原体基因片段, 与 16s rRNA 基因片段检测一致性良好。这一结果的取得为我国深入进行病原学研究提供了更确切的依据, 从人血标本中检测到 444 bp 的特异片段, 进一步证实了我国存在埃立克体的感染, 为进行人群、易感动物的血清学调查从病原学上提供指导作用。

全沟硬蜱是我国北方的优势蜱种, 是北方地区莱姆病的主要传播媒介, 从全沟硬蜱中检测到粒细胞埃立克体的 Epank 结构蛋白基因, 其同时携带和

传播粒细胞埃立克体的作用值得进一步深入研究。

将我们扩增到的基因片段克隆和序列测定与美国的人粒细胞埃立克体及马埃立克体、吞噬细胞埃立克体进行了同源性比较, 所测的序列是埃立克体的序列, 结果显示其分群与美国株相距较远, 与马埃立克体和吞噬细胞埃立克体的分群也相距较远, 而与瑞典、斯洛文尼亚的人粒细胞埃立克体同属一群。这一结果可能由于我国与欧亚大陆相连接的地理位置有关。

国外仅将 444-Epank 用于血液标本^[6], 没有用于蜱和动物内脏标本的检测, 我们根据实验室条件进行了一些必要的改进, 结果表明我们的方法可用于蜱和动物标本的检测。这为流行病学调查提供了一种可靠的试验检测方法。

由于 444-Epank 基因编码的是外膜蛋白, 序列相对来讲不保守, 没有太大的选择压力, 生物进化过程中随机突变较多, 每个随机的碱基突变都可能产生氨基酸的变异, 因而其核苷酸序列的同源性大于氨基酸的同源性, 这与一般的在进化上保守的蛋白核苷酸序列的同源性将小于氨基酸的同源性有所不同。

参 考 文 献

- 1 Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a Granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol, 1994, 32: 589-595.
- 2 曹务春. 人埃立克体病的发现与研究进展. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13: 57-59.
- 3 Dumler JS, Bakken JS. Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. Annu Rev Med, 1998, 49: 201-213.
- 4 赵秋敏, 曹务春, 张习坦, 等. 黑龙江全沟硬蜱中检测出类似人粒细胞埃立克体的病原体 DNA. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17: 28-30.
- 5 Walls JJ, Caturegli P, Bakken JS, et al. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of Human Granulocytic ehrlichiosis Using epank 1 genes of ehrlichia phagocytophila-group ehrlichiae. J Clin Microbiol, 2000, 38: 354-356.
- 6 Chae JS, Foley JE, Dumler JS, et al. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444-Epank and groESL heat shock operon genes in naturally occurring Ehrlichia equi and Human Granulocytic ehrlichiosis agent isolates from northern California. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1364-1369.

(收稿日期 2001-08-20)

(本文编辑: 尹廉)