

随机扩增多态性 DNA 在淋球菌基因分型中的应用

张铁军 任燕华 张颖华 周晓明 俞顺章 姜庆五

【摘要】 目的 建立随机扩增多态性 DNA (RAPD) 对淋球菌进行基因分型的方法。方法 用 4 种不同的预处理方法提取淋球菌基因组 DNA, 对其优劣进行比较, 并运用 RAPD 对淋球菌菌株进行区分及对经性伴传播的淋病病例进行 RAPD 指纹图谱比较。结果 运用经典的十六烷基三乙基溴化铵法可以抽提较完整的基因组 DNA, 获得良好的 RAPD 指纹图谱, 各菌株的 RAPD 指纹图谱间有明显不同 DNA 多态性, 性伴传播的病例中获得了非常相似的 RAPD 指纹。结论 选择最佳的 DNA 抽提技术, 运用 RAPD 可以对淋球菌进行有效基因分型, 并可用于分子流行病学对传染源的追踪。

【关键词】 随机扩增多态性 DNA; 淋病奈瑟菌; 分型; 流行病学; 分子

Application of random amplified polymorphic DNA in the genotyping of *Neisseria gonorrhoeae*
ZHANG Tie-jun*, REN Yan-hua, ZHANG Ying-hua, ZHOU Xiao-ming, YU Shun-zhang, JIANG Qing-wu. *School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: JIANG Qing-wu, ZHOU Xiao-ming

【Abstract】 Objective To set up random amplified polymorphic DNAs (RAPD) method in genotyping *Neisseria gonorrhoeae* on DNA level, and to explore its use to trace the source of infection. **Methods** Four different pretreatments were used to extract the *Neisseria gonorrhoeae* genomic DNA with its advantages and disadvantages compared. Arbitrary sequence was then used to amplify the genomic DNA of *Neisseria gonorrhoeae* and RAPD fingerprint maps was applied to distinct the *Neisseria gonorrhoeae* strains. Finally, RAPD fingerprint of *Neisseria gonorrhoeae* strain between patient and his/her sexual partner was compared. **Results** Cetyltrimethylammonium bromide method was classical in extracting genomic DNA, and could get integrated genomic DNA and good fingerprint maps, since main segments were common to all the *Neisseria gonorrhoeae* but some were different among strains so that the fingerprint of different *Neisseria gonorrhoeae* were distinctive. However, fingerprint maps of *Neisseria gonorrhoeae* collected from sex partners were quite similar. **Conclusion** Based on genomic levels, effective fingerprint maps could be identified and to classify the *Neisseria gonorrhoeae* into different genotypes. RAPD fingerprint maps could be used to trace the source of infection.

【Key words】 Random amplified polymorphic DNA; *Neisseria gonorrhoeae*; Genotype; Epidemiology, molecular

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是一种分子生物学方法^[1,2], 它是建立在聚合酶链反应 (PCR) 技术之上的一种分子标记方法, 该方法操作较简便, 其指纹图谱能够提供充分的基因组信息, 目前 RAPD 技术已被广泛用于生物学物种鉴定和基因分型研究。本项研究运用 RAPD 技术对淋球菌进行基因分型, 并进一步研究 RAPD 用于分子流行病学传染源追踪的

行性, 现将结果报道如下。

材料与方法

一、材料

1. 标准菌株: 淋球菌标准菌株 WHO-A、B、C、D 由中国药品生物制品鉴定所提供。产青霉素酶的淋球菌 (PPNG)、耐四环素的淋球菌 (TRNG) 标准菌株由上海市皮肤性病医院检验科惠赠。样本菌株由上海市浦东新区疾病预防控制中心提供。

2. 仪器: PCR 扩增仪为德国 Biometra 产品; 一次性成像系统系 Pharmacia biotech 产品。

3. 试剂: RAPD 任意引物、dNTP、Taq DNA 聚

作者单位 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 (张铁军、周晓明、俞顺章、姜庆五); 上海市浦东新区疾病预防控制中心 (任燕华、张颖华)

通讯作者 姜庆五, 周晓明

合酶、MgCl₂、10× PCR buffer(Sangon 公司产品)、DNA Marker(上海申能博彩生物工程公司产品)。

二、方法

1. 细菌接种与培养 :GC 培养基(Oxoid 英国)+ 10% 无菌脱纤维羊血配制成改良 Thayer-Martin 培养基,在 5% CO₂ ,37℃ 培养 24~48 h,菌株经染色、菌落形态观察和氧化酶试验鉴定确定为淋球菌后,在淋球菌营养培养基中纯培养。

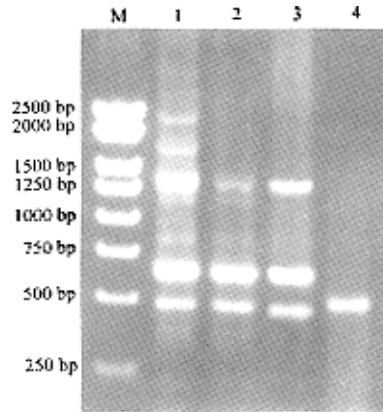
2. 基因组 DNA 制备(预处理):方法一,热裂解在无菌条件下,取 1.5 ml eppendorf 管,加入 ddH₂O;用接种环挑取淋球菌菌落(5% CO₂、37℃ 培养 24~36 h),放入管中充分混匀,于 100℃ 热裂解 5 min,冰浴中冷却 5 min,重复操作一次后,离心^[3];方法二,蛋白酶 K 裂解,取 1.5 ml eppendorf 管加入裂解液(NP-40、Tween-20) EDTA,挑取单克隆淋球菌落,混匀,加入 SDS 至 1%、蛋白酶 K 至 20 μg/ml,50℃ 1 h,离心,在上清中加入等体积的酚氯仿,混匀,高速离心取上清,并 2.5 倍乙醇沉淀,沉淀用 TE 溶解,于 -20℃ 保存^[4];方法三,用万用裂解液裂解细菌,取单克隆淋球菌菌落,于 1.5 ml 的 eppendorf 管中,加入 10~20 倍的万用裂解液(宁波新芝公司产品),混匀,60℃ 保温 1~2 h,每隔 20 min 混匀一次,直到用移液枪吸取时基本不拉丝为止,吸取 3~5 μl 做 PCR 模板;方法四,CTAB 法取 1.5 ml eppendorf 管加入 TE 缓冲液,挑取单克隆淋球菌落,混匀,加入 10% 的 SDS 及 20 mg/ml 的蛋白酶 K 于 37℃ 温育 1 h。加入 5 mol/L NaCl 和 CTAB/NaCl 溶液,混匀,于 65℃ 温育 10 min。标准酚-氯仿抽提,将上清液转入新管中,加入 0.6 体积异丙醇沉淀 DNA,离心,70% 乙醇洗涤沉淀,TE 溶解 -20℃ 保存^[5]。

3. PCR 扩增反应体系 :总体积为 25 μl,加入 ddH₂O、RAPD 引物(5 μmol/L)、10× PCR buffer、dNTP 0.2 mmol/L、Taq 酶 1 U、模板 DNA 2 μl。扩增反应程序为 92℃ 2 min 预变性,92℃ 1 min、37℃ 1 min、72℃ 1 min 40 个循环,4℃ 保存反应产物。

4. 制胶与电泳 :使用 1% 琼脂糖 TAE(电泳缓冲液)电泳体系、0.5 μg/ml EB、6× loading buffer : 30% Glycerol、5 mmol/L EDTA、0.5% 溴酚蓝,取 10 μl PCR 产物加入上样缓冲液 2.5 μl,在 1~10 V/cm 凝胶的电压降下进行电泳,约 50~60 min,当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段的距离时,于紫外灯下观察成像。

结 果

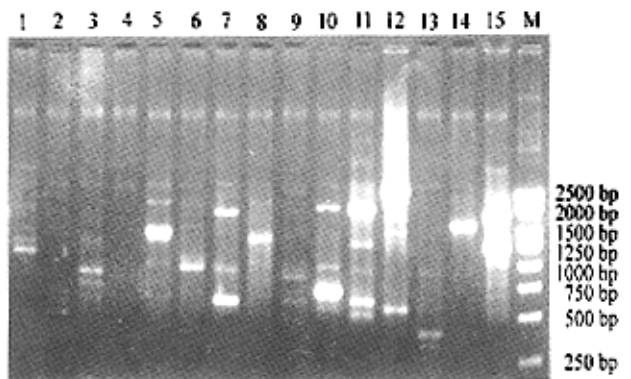
1. 4 种不同预处理方法抽提基因 DNA 的比较 图 1 用 4 种方法提取的模板基因组 DNA 的 RAPD 指纹图谱,比较其中方法 2 与方法 3 较为相近,但方法 1 所得图谱中条带多于方法 2、3;在本次研究中方法 4 并未能有效扩增出 RAPD 指纹图谱,只扩增出一条约 500 bp 片段,不能完整反映出整个淋球菌基因组 DNA 图谱。



M :Marker ; 1 :CTAB 法 ; 2 :蛋白酶 K 裂解法 ; 3 :万用裂解液法 ; 4 :热裂解法

图1 不同预处理方法所抽提基因组 DNA 的 RAPD 图谱

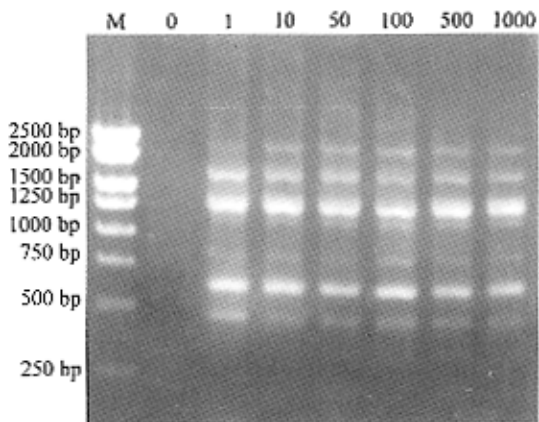
2. RAPD 引物筛选 :本次共筛选 50 条任意引物 s1~s50 s16~s50 的结果未在本图中显示。以标准菌株 A(WHO-A)为模板,用 CTAB 法抽提淋球菌基因组 DNA,对 50 条任意引物(s1~s50)进行筛选,通过试验从中筛选出 10 : 5'-CTGCTGGGAC-3', 11 : 5'-GTAGACCCGT-3', 12 : 5'-CCTTGACGCA-3', 17 : 5'-AGGGAACGAG-3', 24 : 5'-AATCGGGCTG-3', 29 : 5'-GGGTAACGCC-3', 38 : 5'-AGGTGACCGT-3', 45 : 5'-TGAGCGGACA-3' 号引物其扩增效果好、多态性强。



M :Marker ; 1~15 :s1~s15 号任意引物所产生的指纹图谱

图2 适用 RAPD 引物的筛选结果

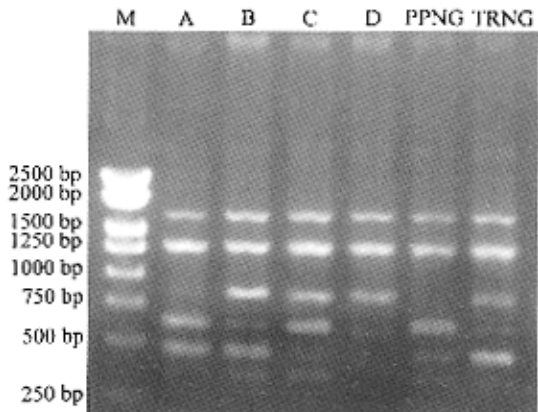
3. 底物浓度对条带的影响 :图 3 是以 s38(5'-AGGTGACCGT-3')号引物。对标准菌株 A(WHO-A)进行扩增,将基因组模板 DNA 作倍比稀释(1、10、50、100、500、1000);模板基因组 DNA 用量在一定的范围内变动没有显示出对图谱的影响,但 1000×与 1×相比 500 bp 片段已有逐渐消失的趋势。



M:Marker; 0:空白;其他分别为稀释 1~10³ 倍后所产生的指纹图谱

图3 淋球菌模板作倍比稀释后的 RAPD 指纹图谱

4. RAPD 对不同菌株进行扩增的图谱比较 :用 s38(5'-AGGTGACCGT-3')号引物 RAPD。对标准菌株 WHO-A、B、C、D 和 PPNG、TRNG 进行扩增,从图 4 中可知,6 种不同的菌株都有 2 条共同的主条带,一条分子量为 2000~2500 bp,另一条分子量约为 1250 bp,其 PCR 产物的条带数在 3~5 条之间,其指纹图谱可以进行不同菌株区分。



M:Marker; ABCD 标准菌株 WHO-A、B、C、D 的指纹图谱

图4 淋球菌不同标准菌株的 RAPD 指纹图谱

5. 有相同条带(流行病学资料显示为性伴治疗) 2 株淋球菌菌株条带相同。图 5 为用 RAPD 对临床淋病病例所采集的标本进行扩增, s1 和 s2 的 RAPD 图谱显示出非常相近条带,流行病学资料显示此 2

株样本菌来自直接性接触而传播的病例。

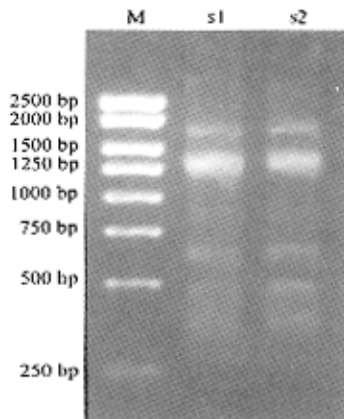


图5 经性伴传播的 2 株样本菌的 RAPD 指纹图谱

讨 论

RAPD 指纹图谱以其简便、易于操作,已被广泛应用在多种生物物种的分型研究。依据 RAPD 指纹图谱的细微差别,可对细菌菌种,特别是不同菌株进行有效的快速鉴别。目前,淋球菌常常用营养学分型和血清学分型^[6],但是从基因水平对淋球菌进行分型,会更深入地提示淋球菌不同的基因型别与不同的表型之间的关系(如不同耐药菌株间 RAPD 图谱的差别)。

本研究显示不同的常规预处理方法提取淋球菌基因组 DNA,对 RAPD 扩增有重要的影响,CTAB 法的指纹图谱较好地反映淋球菌基因组 DNA 多态性,热裂解法虽然因其简易常用于 PCR 测定基因工作中,但不推荐用于 RAPD 研究。研究中从 50 条 RAPD 引物中进行了筛选,筛选出 8 条多态性高、重复性较好的引物,适用于淋球菌的基因分型,用多条引物进行 RAPD 组合图谱与文献报道单条引物的比较可提高 RAPD 的分型能力。该引物组合可以作为淋球菌分型的适宜引物。经半定量试验发现基因组 DNA 浓度在一定范围内不会对 RAPD 结果构成影响,幅度至少在 3 个数量级以上,可应用于临床常规不同浓度的模板。

从本次研究中 RAPD 对不同种菌株的区分情况来看,菌株有着相同的主条带,但指纹图谱有着明显的区别,鉴于此结果,可以从基因水平上对淋球菌的流行株进行区分;基因组的某些区域发生 DNA 的片段的插入或者缺失,或者碱基突变,可以造成特定的结合位点发生变化,而使 PCR 的产物增加或者减少,发生分子量的变化,通过任意引物对淋球菌进

行扩增,就可以发现不同菌株之间的差别,从而进一步区分型别,这些条带的差别可以用来证明和归类不同菌株,进而与菌株的一些流行病学特征(如感染力、耐药性等)进行联系。

目前,分子流行病学的重要任务之一就是対传染源进行追踪,判定传播关系中所感染疾病病菌的基因型是否一致^[7]。RAPD 技术曾被用于确定其他微生物感染的爆发流行、传染源及其遗传相异性方面^[8]。Scott 等^[9]研究表明,RAPD 多态性产物遵循孟德尔遗传定律,RAPD 同源片段(相同大小)的数目与亲缘关系成正比,相同大小的片段越多,表明亲缘关系越近。本次 RAPD 对 2 株淋球菌样本的扩增结果非常相似,表明其亲缘关系很接近。结合流行病学资料显示,患者与性伴通过性接触而传染淋病,可以加以佐证。通过 RAPD 指纹图谱的构建能够进一步了解 DNA 的同源程度,从而确定亲缘关系,进行传染源的追踪,此方法可在今后淋球菌流行株的分子流行病学调查中使用。

参 考 文 献

1 Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms

amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 25:6531-6535.

2 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 25:7213-7218.

3 Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:666-671.

4 林万明, 主编. PCR 技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社, 1995. 201-203.

5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 著. 颜子颖, 王海林, 金冬雁, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社, 1998. 39-40.

6 郑和平, 潘慧清, 黄进梅, 等. 广州地区淋球菌血清学和营养分型研究. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33:160-161.

7 徐德忠, 主编. 分子流行病学. 第 1 版. 北京:人民军医出版社, 1998. 8-9.

8 Elaichouni D, Russell ED, Tymms M, et al. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1995, 33:713-717.

9 Scott MP, Hatmes KM, Williams SM. Parentage analysis using RAPD-PCR. *Nucleic Acids Res*, 1992, 25:5493.

(收稿日期:2003-08-11)
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

肺炎支原体感染与川崎病病因关系探讨

吉大章 马廷和 宋玫

対近 5 年来广东省珠海市妇幼保健院收治的 7794 例患儿进行了川崎病(KD)与肺炎支原体(Mp)感染关系的探讨。

1. 资料与方法 ①收集 1999 年 1 月至 2003 年 11 月住院患儿 7794 例为研究对象,年龄为出生后 29 天至 14 岁,其中男 5107 例,女 2687 例;②诊断方法:Mp 感染均采用日本明胶颗粒凝集法测定血 Mp-IgM 滴度(日本瑞必欧式会社提供试剂盒,阳性标准 $\geq 1:40$)。本组患者检测抗体时间为病后 5~11 天,血中 Mp-IgM 阳性滴度范围(1:40~1:320)。KD 病例均符合 1984 年日本川崎病研究委员会修订诊断标准。③统计学 χ^2 检验,对列研究进行联系强度的计算:相对危险度 $(RR) = I_c/I_0$, 归因危险度 $(AR) = I_c - I_0$, $I_c = a/n_1$, $I_0 = c/n_0$ 。

2. 结果与分析:研究表明,7794 例中,Mp 感染 799 例,KD 47 例,Mp 感染且为 KD 者 13 例,其中男 8 例,女 5 例,年龄 7 月龄~8.5 岁。Mp 感染者中 KD 发病率为 1.63%,非

Mp 感染者 KD 发病率为 0.44%,两组差异有显著统计学意义($\chi^2 = 13.7, P < 0.01$),利用流行病学对列研究,计算 RR 为 3.69,AR 为 1.19。查 RR 与关联强度参考标准得关联强度为强^[1]。KD 自我国 1978 年出现病例报告至今,该病发病呈逐年增加趋势,已取代风湿热成为我国小儿后天性心脏病的主要病因之一。该病治疗渐趋完善但病因尚未明确。推测与多种病原感染有关^[2]。研究表明,珠海市近 5 年住院患儿 7794 例中 Mp 感染与 KD 发生有统计学联系,建议进行多中心前瞻性的研究。

参 考 文 献

1 耿贯一, 主编. 流行病学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1995. 198.

2 胡亚美, 江载芳, 主编. 实用儿科学. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2002. 698-704.

(收稿日期:2003-12-25)
(本文编辑:尹廉)