

• 综 述 •

百日咳杆菌分子分型方法研究进展*

徐颖华, 张华捷 综述, 侯启明[△] 审校

(中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

关键词: 百日咳杆菌; 分子分型; 诊断; 流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)21-2621-03

百日咳是由百日咳杆菌引起的一种急性呼吸道传染病, 人群普遍易感, 其中尤以婴幼儿多见。百日咳疫苗是预防百日咳最有效也是最经济的手段, 然而, 尽管世界上大多数国家自上世纪五十年代起就开始实施百日咳疫苗的免疫接种, 使百日咳感染率和病死率大大下降, 但据 WHO 统计报道, 2008 年全世界仍有高达 19.5 万的儿童死于百日咳及其并发症, 且 90% 的病例来自不发达国家和发展中国家。即便是发达欧美国家或百日咳疫苗接种率很高的国家, 百日咳发病率也有上升的趋势, 即所谓的“百日咳再现”^[1]。2010 年, 美国加利福尼亚州爆发 60 年来最严重的百日咳疫情, 据报道有 8 383 多人染病, 其中有 10 名婴幼儿死亡^[2]。值得特别注意的是, 已接种疫苗的青少年和成人患百日咳的人数逐渐增多, 但他们的临床症状并不典型, 临床上极易误诊, 而且研究表明这些人往往是婴幼儿百日咳的重要传染源^[3-4]。因此百日咳越来越引起人们的重视。为了追寻百日咳新流行趋势的起因, 近年来各国学者对百日咳进行了广泛的研究, 并以此提出多种可能引起百日咳流行病学改变的因素, 其中最引人注意的是致病菌的适应性进化现象, 即致病菌发生适应性进化从而逃避疫苗免疫保护作用等^[5-7]。

近些年随着分子生物技术的发展, 传统的生化分型和血清学分型技术由于其分辨力较低, 且需要活菌样品等多方面的局限性, 已不能满足疾病诊断和流行病学调查的需要。为了监控细菌群体的分子变化, 很多分子分型方法不断被发展和应用于百日咳杆菌的基因多态性分析和进化研究中。本文就近年来国内外在百日咳杆菌分子分型技术研究进展进行综述, 旨在为国内百日咳杆菌的相关研究提供参考。

1 限制片段长度多态性(RFLP)分析

该技术是利用限制性内切酶能识别 DNA 分子的特异序列, 并在特定序列处切开 DNA 分子, 即产生限制性片段的特性, 对于不同种群的生物个体而言, 他们的 DNA 序列存在差别。如果这种差别刚好发生在内切酶的酶切位点, 并使内切酶识别序列变成了不能识别序列或是这种差别使本来不是内切酶识别位点的 DNA 序列变成了内切酶识别位点。这样就导致了用限制性内切酶酶切该 DNA 序列时, 就会少一个或多个酶切位点, 结果产生少一个或多个的酶切片段。这样就形成了用同一种限制性内切酶切割不同物种 DNA 序列时, 产生不同长度大小、不同数量的限制性酶切片段。后将这些片段电泳、转膜、变性, 与标记过的探针进行杂交、洗膜, 即可分析其多态性结果。

在百日咳杆菌基因中 RFLP 是由 IS 序列插入 DNA 序列

而导致出现多态性。在已测序的 Tohama I 菌株基因组中存在三种的 IS 序列及 IS481、IS1002 和 IS1663, 拷贝数分别为 238、6 和 17。其中仅有 IS1002 为基础的 RFLP 被报道用于百日咳杆菌的细菌分型研究中^[8]。但由于到目前为止仅有鉴定出 4 个拷贝, 所以该方法的区分能力不如 PFGE 和 MLVA 等方法。

2 脉冲场凝胶电泳法(PFGE)

PFGE 作为一种 DNA 指纹技术, 广泛用于各种病原体的分子流行病学研究。其原理为: 通过电场的不断改变, 使包埋在琼脂糖凝胶中的 DNA 分子的泳动方向做相应的改变, 小的 DNA 分子变化较快因此移动较快, 从而在凝胶上按染色体大小呈现出电泳带型。其步骤包括包埋 DNA、胶块中蛋白酶解、DNA 酶切、电泳和结果处理等。PFGE 所采用的内切酶常为寡切点酶, 经这种酶切后的 DNA 片段少而大, 适合于 PFGE 电泳分析^[8-9]。

目前 PFGE 已被世界很多国家应用于百日咳流行病学监控和菌株分子进化研究^[8-9]。欧洲百日咳协作小组提供了关于百日咳菌株 PFGE 分析的标准操作规程, 推荐使用 Xba I 内切酶用于处理 DNA, 由于该酶识别位点多, 可切割形成足够多的片段供分析用, 高效且有高区分能力^[8,10]。PFGE 方法准确、稳定、可重复性好。但其操作步骤繁琐、周期长, 要求细菌进行传代培养, 并具有一定的活菌数目; 此外, 结果通用性较差, 不同实验室间获得结果不便比较。

3 多位点序列分型(MLST)

MLST 是基于 MLEE 多位点酶电泳方法发展起来的一种分子流行病学的分型方法, MLEE 方法依据同工酶多态性进行分型, 不同的遗传座位编码或同一座位不同基因编码的酶或蛋白具有不同的电荷性质, 从而在电泳支持物介质中被分开, 是蛋白水平的分型方法。MLST 直接对相应管家基因位点进行测序, 比较不同样本等位基因的多态性, 并将不同等位基因的排列组合定为不同的基因型。MLST 方法, 准确、快速、通用性强, 便于在实验室间进行比对分析, 有助于全球范围内传染病分子流行病学的研究^[11]。

研究人员通过分析百日咳杆菌 7 个管家基因序列, 建立了 MLST 分型方法。应用建立的 MLST 方法对鲍特氏种属内不同细菌之间进化关系分析, 具有很大可行性^[11]; 然而由于百日咳杆菌为高度保守的单形性细菌, 在不同菌株之间 7 个管家基因缺乏多态性, 使该方法的实用性大大降低^[11-12]。

4 基因分型

又称基因测序法, 被广泛应用于鉴定百日咳杆菌毒力相关

* 基金项目: 国家高技术研究发展(“863”计划)资助项目(2012AA02A402); 国家自然科学基金资助项目(NO. 81201249)。 [△] 通讯作者, E-mail: houqiming@sina.com。

基因的不同等位基因多态性分析。已被研究的 17 个基因中, 12 个发现基因多态性, 如前所述其中的 7 个基因用于基因分型研究, 分别是百日咳毒素 A 亚基(*ptxA*)、菌毛蛋白(*Fim*)2、*Fim*3、百日咳粘附素(*Prn*)、支气管粘附因子(*tcfA*)和百日咳毒素启动子区域(*ptxP*)。此外, 由于 MLST 方法在百日咳杆菌分析的不适用性, 当在重组中分析多位点序列类型时, 基因分型的灵敏度增加^[13-16]。

5 多位点串联重复序列数变化分析 (MLVA)

可变数目串联重复序列(VNTR)也被称为微卫星 DNA, 广泛存在于原核、真核生物基因组中, 核心序列为 2~7 bp 的高度串联重复序列, 重复次数从几次到数十次不等。由于核心单位数目的变化, 使 VNTR 长度在基因组中变异较大, 构成了 VNTR 的遗传多态性。已经广泛应用于遗传制图、基因定位、法医学鉴定、人类学以及遗传病的诊断等许多领域的研究, 是目前应用比较广泛的遗传标记。在细菌全基因组完成测序后, VNTR 多态性分析在原核生物中被加以推广, 目前已经用于对流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌和鼠疫耶尔森氏菌等菌株的基因分型和微进化的研究^[17-18]。

2004 年荷兰 Schouls 等^[19]应用串联重复序列搜索程序(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)分析已测序的 Tohama I 菌株全基因序列, 共鉴定出 13 个 VNTR, 而其中 6 个对于流行病学分型有意义。此外, 2010 年 Kurniawan 等也还验证其他 2 个 VNTR 位点的多态性, 结果显示这个两个位点的多态性较少^[20]。以 PCR 为基础的 VNTR 分型技术其优势在于 PCR 的高效率扩增加上 VNTR 位点高度多态性, 使 DNA 分型更加灵敏, 操作技术简化, 更接近实际检测的需要; 另外一个优势在于经过煮沸处理过的细菌上清中有充足的 DNA 模板, 这使得该项技术更加快速和简单地用于分析, VNTR 分析具有更高的分辨率, 具有较好的重复性, 最重要的是其数据结果处理方便, 易于标准化, 基于网络的 VNTR 数据库的建立便于不同国家实验室之间的数据交流汇总 (<http://www.mlva.net/bpertussis/default.asp>), 综合分析, 尤其对于致病性微生物的研究, 不需要进行菌株及 DNA 的交换就可以实现数据资源的共享, 从而在世界范围内对致病菌进行流行病学调查研究^[19-21]。

6 微阵列比较基因组杂交 (Microarray-CGH) 技术

Microarray-CGH 与 CGH 相似, 但它是用 DNA 克隆或 cDNAs 微阵列代替中期染色体铺片作为杂交靶, 即将等量的不同荧光标记的待测和参照 DNA 同时杂交到由 DNA 克隆或 cDNAs 组成的微阵列上。用微阵列每个靶点上的两种信号的荧光比例反映待测基因组 DNA 在相应的序列或基因上的拷贝数变化。根据微阵列上所固化的核苷酸的性质, Microarray-CGH 可分为 cDNA 和 DNA Microarray-CGH 两种类型。前者以常规的 cDNA 微阵列为平台, 基因芯片表面固定的探针来自待测种属的 cDNA 文库。cDNA Microarray-CGH 技术使得大规模、高通量研究基因的改变成为现实。DNA Array-CGH 技术是将基因组 DNA 片段固定于芯片表面, 因此靶序列上不但有基因编码区, 还包含了内含子、重复序列、其他调控序列等非翻译区, 增加了实验结果的信息量。同时由于基因组 DNA 片段长于 cDNA 片段, 因而 DNA Microarray-CGH 的杂交信号强于 cDNA Microarray-CGH, 提高了实验的敏感度。但 cDNA Microarray-CGH 芯片制备相对容易, 而 DNA Microarray-CGH 芯片上广泛分布的表达序列标签也有助于所得序列进一步纯化和点阵。因此这两种 Array-CGH 技术各有所长, 在实际工作中可根据具体情况和实验要求作出选

择^[22-24]。

有芬兰的实验室选择不同的 PFGE 图谱分离于芬兰百日咳菌株进行 Microarray-CGH 分析^[22], 使用芯片含有 3 582 个寡核苷酸(oligonucleotides), 覆盖已测序菌株 Tohama I 基因组中 ORF 的 94%。芯片扫描结果显示, 与参考 Tohama I 基因组相比较, 芬兰分离菌株基因组在进化过程中丢失或减少 7 (8.6 kb)~49(55.3 kb)个基因, 这些基因位于 4 种不同基因座中, 随着菌株分离时间的增加, 菌株丢失的基因越多。三分之一的丢失基因与细菌的无机离子转运、代谢、能源产生和转换功能相关。本方法的区分能力取决于探针的数量与设计。Microarray-CGH 技术具有具有高通量、简便、准确的特点, 但其花费昂贵, 一个最简单的配置应包括微阵列制作系统、信号收集系统、计算机和软件, 普通实验室难以承担^[23-24]。此外, 目前国内外还没有商业化百日咳杆菌基因芯片, 均需定制, 费用较高, 普通实验室难以承担。

7 全基因组测序技术

毋庸置疑, 细菌全基因组测序分析的区分能力最高, 可用于分析菌株所有基因的缺失或多态性。随着 DNA 测序技术的发展以及广泛应用于生物学研究的各个领域, 很多生物学问题都可以借助高通量 DNA 测序技术予以解决。DNA 测序技术已广泛应用于生物学研究的各个领域, 很多生物学问题都可以借助高通量 DNA 测序技术予以解决。过去三年, 大规模平行测序平台已经发展为主流的测序技术, 这项测序技术的出现不仅令 DNA 测序费用降到了以前的百分之一, 还让基因组测序这项以前专属于大型测序中心的“特权”能够被众多研究人员分享。

2010 年荷兰 Mooi 教授实验室应用罗氏 454GS-FLX 技术对 6 荷兰分离菌株进行重测序分析^[25], 共获得 407 个 SNPs, 从全基因组水平证实了含有 *ptxP3* 的百日咳杆菌为近代从含有 *ptxP1* 菌株进化而来。此外, 英国剑桥大学的 Sanger 中心也启动了测定全球范围内百日咳杆菌流行菌株全基因 SNPs 研究项目, 并在此基础上分析该细菌的全球分子进化。

8 展 望

自上世纪 90 年代末起, 很多发达国家开始使用无细胞百日咳疫苗代替全细胞百日咳疫苗进行免疫接种, 除丝状血凝素(FHA)外, 其他成分包括百日咳毒素、*Prn*、*Fim*2 和 *Fim*3 疫苗成分在疫苗株和分离流行菌株之间出现抗原基因多态性, 百日咳杆菌群体发生了显著变化。然而, 在疫苗接种覆盖低的地区或国家分离的菌株和引入疫苗前流行菌株相似。因此, 对流行菌株的分子监控就显得尤为重要, 通过应用通用的细菌分型方法(例如 MLVA 方法), 将来自不同国家或地区百日咳流行菌株的信息补充道已建成数据库中, 供全球公共卫生部门和研究人員共享, 从而为百日咳防控、致病菌溯源以及新疫苗研制奠定基础。

参考文献

- [1] World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring: Pertussis[EB/OL]. http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis/en/index.html, 2012-09-27.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis (Whooping Cough)[EB/OL]. <http://www.cdc.gov/pertussis/outbreaks.html>, 2012-05-07.

- [3] Cornia PB, Hersh AL, Lipsky BA, et al. Does this coughing adolescent or adult patient have pertussis[J]. JAMA, 2010, 304(8): 890-896.
- [4] Paisley RD, Blaylock J, Hartzell JD. Whooping cough in adults: an update on a reemerging infection[J]. Am J Med, 2012, 125(2): 141-143.
- [5] Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(8): 1206-1213.
- [6] van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, et al. Small Mutations in Bordetella pertussis Are Associated with Selective Sweeps[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46407.
- [7] He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence[J]. Future Microbiol, 2008, 3(3): 329-339.
- [8] van Loo IH, van der Heide HG, Nagelkerke NJ, et al. Temporal trends in the population structure of Bordetella pertussis during 1949-1996 in a highly vaccinated population[J]. J Infect Dis, 1999, 179(4): 915-923.
- [9] Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Population dynamics of Bordetella pertussis in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories[J]. Vaccine, 2007, 25(5): 918-926.
- [10] Kallonen T, He Q. Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination[J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(7): 863-875.
- [11] Van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, et al. Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 1994-2001.
- [12] Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, et al. Analysis of Swedish Bordetella pertussis isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage[J]. J Microbiol Methods, 2009, 78(3): 297-301.
- [13] Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from the UK[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(5): 355-365.
- [14] Van Gent M, de Greeff SC, van der Heide HG, et al. An investigation into the cause of the 1983 whooping cough epidemic in the Netherlands[J]. Vaccine, 2009, 27(13): 1898-1903.
- [15] Njamkepo E, Cantinelli T, Guigon G, et al. Genomic analysis and comparison of Bordetella pertussis isolates circulating in low and high vaccine coverage areas[J]. Microbes Infect, 2008, 10(14-15): 1582-1586.
- [16] Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, et al. First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing pertussis toxin or pertactin[J]. Vaccine, 2009, 27(43): 6034-6041.
- [17] Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats[J]. Microbiology, 1998, 144(Pt 5): 1189-1196.
- [18] Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis[J]. BMC Microbiol, 2001, 1: 2.
- [19] Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch Bordetella pertussis strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s[J]. J Bacteriol, 2004, 186(16): 5496-5505.
- [20] Kurniawan J, Maharjan RP, Chan WF, et al. Bordetella pertussis clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 297-300.
- [21] Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 680-688.
- [22] Heikkinen E, Kallonen T, Saarinen L, et al. Comparative genomics of Bordetella pertussis reveals progressive gene loss in Finnish strains[J]. PLoS One, 2007, 2(9): e904.
- [23] Bouchez V, Caro V, Levillain E, et al. Genomic content of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2437.
- [24] Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, et al. Insight into evolution of Bordetella pertussis from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(1): 707-715.
- [25] Bart MJ, van Gent M, van der Heide HG, et al. Comparative genomics of prevaccination and modern Bordetella pertussis strains[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 627.

(收稿日期: 2012-09-30)

• 综 述 •

抑癌基因在卵巢癌中的研究进展

侯振江¹, 侯建章 综述, 刘汝海² 审校

(1. 沧州医学高等专科学校, 河北沧州 061001; 2. 沧州市中心医院, 河北沧州 061001)

关键词: 卵巢肿瘤; 抑癌基因; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 21. 029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)21-2623-04

卵巢癌(OC)是女性生殖器 3 大恶性肿瘤之一, 其中, 卵巢上皮性癌(以下称卵巢癌)的恶性类型占卵巢恶性肿瘤的 85%~90%, 病死率已超过其他恶性肿瘤, 高居榜首^[1]。由于早期缺乏明显的症状、体征和一些可以信赖的筛查方法, 使得大多数妇女(60%~65%)诊断卵巢癌时已属晚期, 而这时癌症多已发生了腹腔种植和远处转移。病死率极高, 其远期生存率仅 30%~40%, 早、晚期肿瘤的预后差异显著。I、II 期 5 年

存活率分别为 90%和 70%, 晚期 5 年存活率仅维持在 15%~20%, 严重危害妇女的生命健康。随着分子生物学技术的迅速发展, 肿瘤标志物在 OC 中的应用日趋广泛, 本文就抑癌基因在 OC 研究中的进展概述如下。

1 nm23 基因

nm23 基因是目前比较公认的 1 种肿瘤转移抑制基因。其编码的 nm23 蛋白与核苷二磷酸激酶(NDPK)的 A、B 亚基的