

## · 实验室研究 ·

## 中国炭疽芽胞杆菌荚膜质粒基因单核苷酸多态性研究

张慧娟 张恩民 张建华 魏建春

**【摘要】目的** 研究中国炭疽芽胞杆菌(炭疽杆菌)荚膜质粒基因单核苷酸多态性(SNP)特征。**方法** 选择中国不同分离年代、地点和来源的 95 株炭疽杆菌,采用 PCR 方法扩增荚膜质粒基因上的 23 个 SNP 位点,然后进行测序并进行聚类分析。**结果** 通过聚类分析,95 株炭疽杆菌可分为 5 个群,23 个 SNP 位点中 17 个位点相同,6 个位点存在多态性,其中 17.89%(17/95)的菌株与参考菌株 Pastuer 同源,38.95%(37/95)的菌株与参考菌株 Ames Ancestor 同源,其余菌株则不同于目前已知的全基因组测序菌株;3 株菌在 PS-34 位点扩增基因片段中缺失长度约 80 bp 的序列,待测的 SNP 位点包括在该缺失片段中;9 株菌株在所有 SNP 位点扩增阴性,经炭疽杆菌荚膜质粒基因特异引物扩增证实这些菌株缺失荚膜质粒基因。**结论** 中国炭疽杆菌荚膜质粒 SNP 位点具有遗传稳定性和自身的特异性,6 个 SNP 位点可作为基因分型的指标。

**【关键词】** 炭疽芽胞杆菌;单核苷酸多态性;基因分型

**Study on the single nucleotide polymorphism in capsule plasmid gene of *Bacillus anthracis* in the China isolates** ZHANG Hui-juan, ZHANG En-min, ZHANG Jian-hua, WEI Jian-chun. State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China  
Corresponding author: WEI Jian-chun, Email: weijianchun@icdc.cn  
This work was supported by a grant from the Major Project from Department of Science and Technology of China (No. 2008ZX10004-008).

**【Abstract】Objective** To study the characteristic of single nucleotide polymorphism (SNP) in capsule plasmid gene of *Bacillus anthracis* isolated from China. **Methods** 95 *Bacillus anthracis* isolates from different sources were selected. 23 SNP sites were amplified by PCR method, sequenced and analyzed by clustering analysis. **Results** 95 *Bacillus anthracis* isolates were divided into 5 groups by cluster analysis. The identified isolates had the same sequence features in 17 sites and different nucleotide sequence in the other 6 sites of the 23 SNP sites. 17.89% (17/95) of the isolates had homologous locus sequences compared with the reference strain Pastuer. 38.95% (37/95) of the isolates had the homologous locus sequences compared with the reference strain Ames Ancestor. The remaining strains were different from those completed sequenced strains. 3 strains missed length of about 80 bp sequence in the PS-34 loci amplified gene fragment in which the tested SNP loci were included. 9 strains were amplified negative at all SNP loci and *Bacillus anthracis* capsule plasmid genes were missing which was confirmed by capsule plasmid gene-specific primers. **Conclusion** Results through analysis showed that single nucleotide genetic stability and specificity for capsule plasmid gene of *Bacillus anthracis* did exist in the Chinese isolates. The 6 discriminating SNP sites could be used as indicators in genotyping the *Bacillus anthracis*.

**【Key words】** *Bacillus anthracis*; Single nucleotide polymorphism; Genotyping

炭疽芽胞杆菌(炭疽杆菌)是一种高度保守的革兰阳性细菌,不同菌株间基因同源性在 99% 以上。现有基因分型方法仅少数适用于该菌株的基因分型

研究,如多位点可变数串联重复序列分析(MLVA)和单核苷酸多态性(SNP)分析等<sup>[1-4]</sup>。2002 年,Read 等<sup>[5]</sup>对美国生物恐怖袭击事件中分离到的 1 株炭疽杆菌进行全基因组测序,并与已测序的参考菌株进行基因比对分析,发现 60 个新的基因遗传标记,包括 SNP、插入序列或缺失序列等,其中位于荚膜质粒基因上的 SNP 位点有 23 个。为了解中国炭疽杆菌荚膜质粒基因 SNP 特征,本研究选择其中的一些位

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.06.011

基金项目:国家科技重大专项(2008ZX10004-008)

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,传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:魏建春, Email: weijianchun@icdc.cn

点进行分析。

### 材料与方法

1. 菌株来源: 分离自中国不同年代、地点、来源的 95 株炭疽杆菌(1953—2006 年), 地点包括四川、辽宁、新疆等 15 个省(自治区), 来源包括患者、牛、羊、犬皮、骡、动物皮毛、土壤和水等。

2. 引物设计: 选择位于炭疽杆菌荚膜质粒基因 PXO2 上的 23 个 SNP 位点, 根据文献提供的 SNP 突变序列片段, 自行设计引物, 序列见表 1, 引物由北京擎科生物技术有限公司合成。

3. PCR 扩增及测序: PCR 反应总体系为 25 μl, 包括 2 × EasyTaq™ PCR SuperMix (购自北京全式金生物技术有限公司) 12.5 μl, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μl, DNA 模板(100 ng/μl) 1 μl, 加无菌超纯水至 25 μl。PCR 反应: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将符合目的片段大小的 PCR 产物进行测序, 测序由北京擎科生物技术有限公司完成。

4. 序列分析: 测序结果采用序列分析软件 DNASTar 的 MegAlign 模块进行比对, 同时与参考菌株序列 Ames Ancestor 株和 Pastuer 株进行比对; 差异

位点数据采用 BioNumerics 软件进行聚类分析(UPGMA), 生成聚类图。

### 结 果

1. 菌株 SNP: 比对结果显示, 所有菌株在 23 个 SNP 位点中 17 个位点呈现 SNP 序列单一性, 其中 16 个位点序列与 Ames Ancestor 同源, 另外 1 个位点序列与 Pastuer 同源。其余 6 个 SNP 位点在不同来源的菌株间表现出多态性, 将这些差异位点进行聚类分析, 可分为 5 个群。不同地区菌株 SNP 具有一定的规律性: 80.65% (25/31) 的新疆菌株属于群 I 和群 II, 77.78% (7/9) 的内蒙古菌株属于群 IV, 而广西菌株分散在各群中。不同年代的菌株也有一定的聚集性。1953—1978 年的菌株主要位于群 IV 中 (6/10), 大部分 1981—1990 年的菌株 (15/20) 属于群 I 和群 II, 1998—2006 年的所有菌株属于群 IV, 而 1991—1997 年的菌株分散于各群中。不同宿主来源的菌株没有明显的聚集性。群 III 仅包括 3 株菌, 单独聚为一类, 差异体现在 PS-34 位点测序结果与群 IV 不同, 该突变位点经 PCR 扩增显示该片段长度比其他菌株短, 经重复扩增、测序、比对后发现这 3 株菌的该段序列同源, 但与参考菌株比较, 中间缺失 80 bp 碱基序列, 待测的 SNP 位点位于这段序列

中, 因而未检测到。群 V 的 11 株菌单独聚为一类, 其中包含已知荚膜质粒缺失的 A16R 和 Sterne 疫苗株, 其他 9 株菌经采用炭疽荚膜特异基因引物扩增验证, 显示扩增阴性, 提示这些菌株缺失荚膜质粒基因(图 1)。

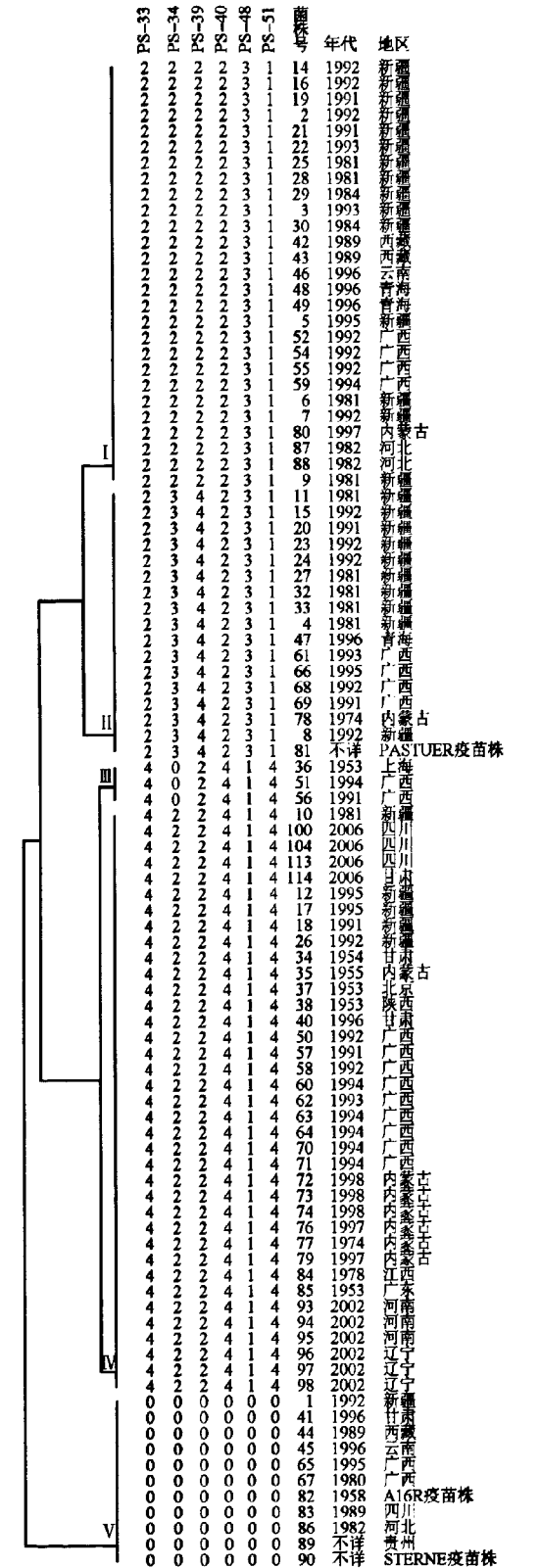
2. 6 个 SNP 位点聚类情况: 对实验菌株与参考菌株差异位点进行比较, 表 2 显示, 群 II 所有位点序列与参考菌株 Pastuer 同源, 该群菌株占全部实验菌株的 17.89% (17/95); 群 IV 所有位点序列与参考菌株 Ames Ancestor 同源, 该群菌株占全部实验菌株的 38.95% (37/95); 其他菌株的 SNP 位点差异与参考菌株不一致, 这部分菌株占实验菌株的 43.16% (41/95)。

### 讨 论

常见的分子分型方法如脉冲场凝胶电泳(PFGE)、限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、多位点序列分型技术(MLST)等

表 1 炭疽杆菌 23 个 SNP 位点引物序列

位点	上游引物(5' - 3')	下游引物(5' - 3')	产物大小 (bp)
PI-1	CTTGTAATCCAGCCAATC	CAAACGCTCTTAACTTCT	419
PI-2	AGGGTACTCAGCTACAGG	GGTTATTGACGGGTCTTC	432
PS-33	TCACTACTACCTCGAACG	GTGGGACAGGAACAATCA	499
PS-34	GTTCTGTCCACCTGTGA	AATCGTCCGAATGTAGCT	395
PS-35	TACATTGGCTGTGGTGGT	TGGTAAATGCTCGTCAGG	478
PS-36	TTAACATTAGCCCTACAAAC	CTGAAATGACGGATAAGC	411
PS-37	GATGCGTTTGAITTCITG	GGCGAGCTGTTATTGTGA	391
PS-38	GAAATCTTTGATGGAAC	GTATGTCTTTTCTGTGGG	447
PS-39	ATACGGAAGGCAACTCAT	CACCAGCTTCTCGACTG	424
PS-40	CCAACGCAGTTTGAAGAC	ATGGCTGATGGTATGTAATG	220
PS-41	TATCCAGAAGCGTCACAT	CAITGAACCCATTAGCAT	436
PS-42	TTTGACAACCTCCTGATA	TTACGGTAATTGTGGAAC	439
PS-43	CGCCAGGTAAATAGATAG	TTTGTCTTAGTGCCATC	421
PS-44	CAAGGACTGCGGGAGATA	TTCCAGCTAAGCAAGAACTA	451
PS-45	AGAITCAGCAGTGTTTCC	CCTTCTTTTCTGTTCCT	452
PS-47	TTACCACCTGGTGACCCA	CTTTCCGGAAGCAGAGCAT	263
PS-48	TATCACTTTTACCCAGATC	TAATTTCAGGCAACTAAC	476
PS-49	TCACTCCTCTCTGGGTA	GAAATGGGTCTTGATAG	498
PS-50	AGTGATGGAATCTTGGAG	GCATAGAGTATGCTTTGTC	443
PS-51	CGAITCAGTGTCTGTTC	AGGCTATCCCTCAAGTCT	351
PS-52	ATTGCAGCAGATTATGTTAG	ACGAATTTAGCTGGTGAT	457
PS-53	ACGGCTGTAAACCTCATT	TGATCTGTTCGGTAGGA	309
PS-54	ATTCTCAACGCTTCTTGT	GGTCTGAAGGCTTGGTTA	278



注:图中1、2、3、4分别代表所测差异碱基A、T、G、C,0表示该位点扩增阴性

图1 中国炭疽杆菌荚膜质粒基因6个SNP聚类分析

表2 中国炭疽杆菌荚膜质粒基因6个SNP位点聚类情况及其与参考菌株差异位点比较

SNP 位点	群 I (n=27)	群 II (n=17)	群 III (n=3)	群 IV (n=37)	群 V (n=11)	Ames Ancestor	Pastuer
PS-33	T	T	C	C	N	C	T
PS-34	T	G	N	T	N	T	G
PS-39	T	C	T	T	N	T	C
PS-40	T	T	C	C	N	C	T
PS-48	G	G	A	A	N	A	G
PS-51	A	A	C	C	N	C	A

注:N为该位点扩增阴性

仅能鉴别芽胞杆菌不同种属间的差异。近年来发现 MLVA 和 SNP 可用于炭疽杆菌的分型<sup>[1-4]</sup>。SNP 位点分析是基因分型中最直观的方法,通过直接比较不同菌株基因组序列,寻找单核苷酸差异,实验方法简便易行,是一种较理想的炭疽杆菌基因分型研究方法<sup>[6]</sup>。2004年 Pearson 等<sup>[7]</sup>将 SNP 方法应用于炭疽杆菌基因的研究,进行基因进化分析,选择有代表性的 SNP 位点形成炭疽杆菌遗传种系发生模型。Van Ert 等<sup>[8]</sup>结合 MLVA 方法,确定名为 canonical SNP 的炭疽基因多态性遗传标记,有效地将 42 个国家的 1033 株炭疽杆菌分成 A、B、C 群。Simonson 等<sup>[9]</sup>研究炭疽杆菌分离株的地理分布,发现中国、欧洲和中东地区具有共同的优势亚群。Kuroda 等<sup>[10]</sup>比较 19 株炭疽杆菌全基因组,最终确定 80 个 SNP 位点,可用于快速调查和追溯疫情。

本研究针对 2001 年美国炭疽袭击事件中分离到的炭疽杆菌全基因组比对中发现的 SNP 位点对中国菌株进行实验研究,从序列比对结果看,中国的菌株在 23 个 SNP 位点中有 17 个位点 SNP 序列表现为单一性,且除 1 个位点外均与参考菌株 Ames Ancestor 同源,说明炭疽杆菌基因的高度保守性。另外 6 个 SNP 位点存在株间差异,即为有意义的 SNP 位点,这些差异位点类型与国外的研究报道相符合<sup>[3]</sup>,可应用于炭疽疫情的流行病学追溯。差异位点的聚类结果显示 95 株菌株仅分为 5 个群,不同地区和年代的菌株有一定的聚集性,不同来源的菌株无明显聚集性,提示炭疽杆菌的遗传进化速度较慢,这可能与炭疽杆菌在环境中主要以芽胞的休眠形式存在,限制它的基因进化过程,导致炭疽杆菌基因缺乏分子多样性,这种特殊性提示炭疽杆菌基因的研究需要更大数量的菌株和适宜的遗传多态性标记才能得到更丰富和更科学的信息。本研究显示,中国炭疽杆菌的荚膜质粒基因 SNP 具有自身的独特性,在检测的 6 个多态性位点中,17.89% 的菌株与已测序菌株 Pastuer 同源,38.95% 的菌株与参考菌株

Ames Ancestor 同源, 其余菌株均与参考株不同, 这些位点组合是中国炭疽杆菌的基因特征。同时还发现 1 个 SNP 位点的扩增序列中缺失一段序列, 有 3 株菌属于这种情况, 因而单独聚为一类, 作为中国炭疽杆菌的 1 个基因特征, 尚未见相关研究报道。另外, 本研究中首次发现从选取的自然分离菌株中存在的 9 株荚膜质粒基因缺失的炭疽杆菌, 但需要更多的实验研究加以证实。

参 考 文 献

[1] Keim P, Price LB, Klevytska AM, et al. Multiple locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2000, 182(10): 2928-2936.  
 [2] Szymajda U, Bartoszcz M. Application of the multiplex PCR and PCR-RFLP method in the identification of the *Bacillus anthracis*. *Med Dosw Mikrobiol*, 2005, 57: 277-285.  
 [3] Shangkuan YH, Chang YH, Yang JF, et al. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32: 139-145.  
 [4] Kim K, Cheon E, Wheeler KE, et al. Determination of the most closely related bacillus isolates to *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing. *Yale J Biol Med*, 2005, 78: 1-14.

[5] Read TD, Salzberg SL, Pop M, et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science*, 2002, 296(5575): 2028-2033.  
 [6] Zuo TT, Duan Q. Application of MLVA and SNP in genotyping of *Bacillus anthracis*. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2010, 34(3): 290-292. (in Chinese)  
 左庭婷, 端青. MLVA 和 SNP 分析在炭疽芽孢杆菌基因分型中的应用. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(3): 290-292.  
 [7] Pearson T, Busch JD, Ravel J, et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single nucleotide polymorphism from whole genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13536-13541.  
 [8] Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*, 2007, 2(5): e461.  
 [9] Simonson TS, Okinaka RT, Wang B, et al. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 71.  
 [10] Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 2821-2829.

(收稿日期: 2012-02-10)

(本文编辑: 王玉立)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- |                     |                   |                        |
|---------------------|-------------------|------------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心)    | 赛丰满(成都市疾病预防控制中心)  | 高 婷(北京市疾病预防控制中心)       |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院)     | 李 杰(北京大学医学部)      | 李十月(武汉大学公共卫生学院)        |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院)  | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心)   |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心)    | 刘爱志(中南大学公共卫生学院)   | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心)       |
| 刘 静(北京安贞医院)         | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心)  | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病学研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部)        | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心)  | 彭晓雯(北京市疾病预防控制中心)       |
| 邱洪斌(佳木斯大学)          | 赛晓勇(解放军总医院)       | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院)      |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院)   | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 蓓(东南大学公共卫生学院)        |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院)   | 王志萍(山东大学公共卫生学院)   | 谢 娟(天津医科大学公共卫生学院)      |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心)    | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心)  | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院)      |
| 阎丽静(中国乔治中心)         | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院)     |
| 曾哲淳(北京安贞医院)         | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅)   | 张宏伟(第二军医大学)            |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院)   | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院)     |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心)    | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心)  |                        |