

随机扩增多态性 DNA 技术用于鼠疫耶尔森氏菌基因分型的研究

黄芳 俞东征 海荣 蔡虹

【摘要】 目的 对来自全国不同疫源地、不同生态型的 103 株鼠疫耶尔森氏菌进行基因分型研究。方法 用随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)。结果 将鼠疫耶尔森氏菌分成两种基因型别:全国大部分菌株为 RAPD-1 型,青海省境内的大部分菌株为 RAPD-2 型。结论 不同生态型的鼠疫耶尔森氏菌基因结构存在差异,为鼠疫耶尔森氏菌的基础研究和防治提供依据。

【关键词】 鼠疫耶尔森氏菌;随机扩增多态性 DNA 技术

Study on the application of random amplified polymorphic DNA in *Yersinia pestis* genotyping HUANG Fang, YU Dongzheng, HAI Rong, et al. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To study the type of 103 *Y. pestis* strains that isolated from different plague foci and different ecological types. **Method** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used. **Results** *Y. pestis* were divided into two RAPD types: most strains that isolated from elsewhere in the country belonged to RAPD-1 type, while most strains that isolated from Qinghai province were RAPD-2 type. **Conclusion** The genome structures of different ecotype *Y. pestis* were different providing the foundation of further research and prevention of plague.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Random amplified polymorphic DNA

鼠疫,是一种曾给人类带来巨大灾难的烈性传染性疾病。历史上的三次世界性大流行,造成约两亿人口的死亡。鼠疫的流行表现为时起时伏,进入 90 年代以来,鼠疫发病率呈上升趋势^[1]。为准确鉴别不同地区、不同时代、不同流行过程中的鼠疫耶尔森氏菌(鼠疫菌),彻底弄清鼠疫菌侵袭人类的规律,鼠疫自然疫源地存在与活动的规律,需要对鼠疫菌进行基因分型。目前,我国鼠疫菌采用的生态型分型方法属于表型分型方法,用于分型的表型特征都依赖于特定基因在体外表达的稳定性^[2],不能从根本上揭示各菌株之间的亲缘关系,而基因分型则从遗传物质的结构特征着手,根据核苷酸水平的多态性来区分不同的菌株。本研究采用的随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)是 90 年代初发展起来的新的基因分型方法^[3,4],它是利用单一的任意序列的引物,随机地与靶序列完全或部分配对,以扩增出特异的 DNA 产物,然后进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,根据电泳条带的不同直接对细菌进行分

型。它最显著的优点是:事先不需要知道目的基因组的任何序列信息,便可直接用一任意序列的引物对整个基因组进行分析,简单、快速、分辨率高^[5-8]。用此方法,我们对来自全国不同疫源地、不同生态型的 103 株鼠疫菌进行研究,旨在探索一种新的鼠疫菌基因分型方法。

材料与方法

一、材料

1. 菌株来源:试验所用 103 株鼠疫菌由青海鼠疫菌菌株保存中心提供。其中包括全国 8 个省 9 种自然疫源地、17 个生态型的菌株。17 个生态型 103 株菌中,青藏高原生态型 10 株(青海境内 5 株,甘肃、西藏两地境内 5 株),祁连山生态型 10 株(青海境内 5 株,甘肃、西藏两地境内 5 株),滇闽生态型 15 株,昆仑山 B 型 3 株菌,其余 13 个生态型均为 5 株菌。

2. 主要设备:PCR 扩增仪(中国科学院遗传所 TC-96AE 型水浴式温度循环仪),高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),水平电泳仪(北京东方仪器

作者单位:102206 北京,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所鼠疫研究室

厂)紫外检测仪(永嘉上塘教学仪器厂)。

3. 主要试剂 :Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司,分子量标准 λDNA/Hind III + EcoR I 购自华美生物工程公司。阳性对照菌株 *E. coli* BL21 DNA 由美国疾病控制中心(CDC)提供。

二、方法

1. 引物设计 :根据 Pharmacia Biotech 的 RAPD 试剂盒(RAPD Analysis Beads)中的引物 2 的序列,设计、合成一条 10 个碱基的引物,引物的序列:5'-GTTTCGCTCC-3'。

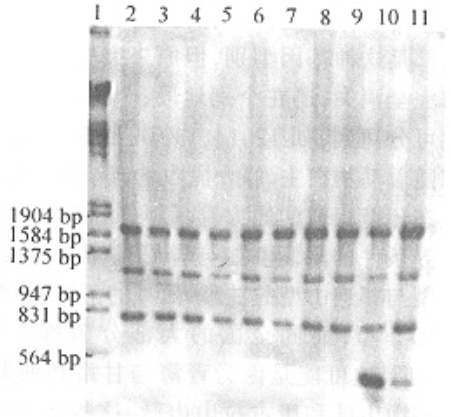
2. RAPD 分析 :RAPD PCR 反应体系为 25 μl,包括 模板 DNA(25 ng/μl):2.0 μl;引物(25 μmol/L):2.0 μl; dNTP(10 mmol/L):2.0 μl;10 × PCR Buffer(free MgCl₂):2.5 μl;MgCl₂(25 mmol/L):3.0 μl;Taq DNA 聚合酶(4 U/μl):0.25 μl;三蒸水:13.25 μl。充分混匀后,加 25 μl 石蜡覆盖。PCR 循环条件:变性:95℃,1 min(首轮循环 5 min);复性:36℃,1 min;延伸:72℃,2 min,45 个循环。

结 果

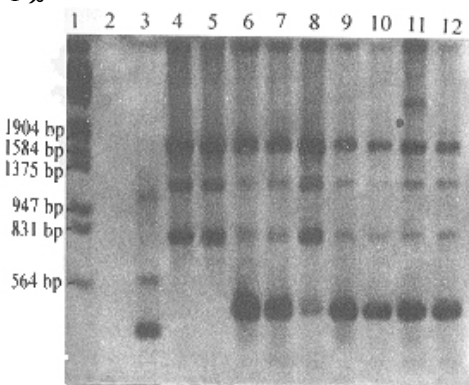
103 株鼠疫菌被分成两种 RAPD 型别:RAPD-1 型、RAPD-2 型。其中 RAPD-1 型占 93%,包括全国大部分菌株;RAPD-2 型占 7%,主要包括青海境内的大部分青藏高原型、祁连山型两种生态型的菌株(图 1)。

型(图 2),甘肃、西藏两地境内的两种生态型的 10 株菌都为 RAPD-1(参见图 1 中的 6~12 泳道)。

为保证每次结果的重复性、可比性,每次 RAPD 分析都加了标准菌株 *E. coli* BL21 作阳性对照,如图 1 中的泳道 3。



1: 分子量标准;2~11: 2006, 12007, 02043, 12029, 01073, 01074, 13011, 13012, 13014, 12014
图2 青海省的青藏高原型、祁连山型菌株的 RAPD 分型结果



1: 分子量标准;2: 空白对照;3: BL21 阳性对照;
4~12: 01073, 02043, A4001, A7011, 50038, 83010, 84014, 91001, 97001

图1 中国鼠疫耶尔森氏菌的 RAPD 分型结果

同属于青藏高原生态型、祁连山生态型的青海、西藏、甘肃 3 省的菌株呈现不同的 RAPD 型别。青海境内的两种生态型的 10 株菌中的 8 株为 RAPD-2

讨 论

鼠疫是一种自然疫源性疾病。不同地理条件、生物群落组成形成不同的菌株。80 年代初,我国鼠疫专家纪树立等人根据生化指标、F1 抗原含量、内毒素含量、Pgm⁺ 细胞突变为 Pgm⁻ 的速率等 14 个指标将我国的鼠疫菌分成 17 个生态型。不同的生态型对人的侵袭力、致病力均不同。通过对鼠疫菌在离体人血清中的生长速率、F1 抗原含量、内毒素含量的分析,推测青藏高原型、祁连山型的鼠疫菌致病性最强。流行病学资料也表明,不同生态型所在地的鼠疫的发病率、病死率有很大差异,其中青藏高原型、祁连山型所在地的疫情不断,病情重,病死率高,且减毒疫苗预防效果差。除其他的流行病学因素外,这些差异最根本的原因是其基因的不同。本次 RAPD 分型结果表明,一部分的青藏高原型、祁连山型的菌株不同于全国其他大部分地区的菌株,而独成 RAPD-2 型。这些菌株很可能是造成该生态型致病力强,该地流行情况严重的根本原因,从而一定程度上揭示了流行病学资料和生态型的遗传学基础。

另一方面,同一生态型的鼠疫菌则可能受当地地理环境、动物宿主、媒介昆虫等生态组成成分变化

的影响,而发生遗传变异,这些变异经过长期自然选择而保存下来,从而形成不同于原来菌株的新的基因型。如青海的大部分菌独为 RAPD-2 型,很可能就是这些基因突变的结果。这些突变株在本地区的鼠疫流行中占据选择优势,因而所分离的大部分鼠疫菌都是这种基因型别,但原来突变以前的菌型并没有完全消失,还在个别地段、个别宿主中存在,偶尔也可分离到,如 12014、13014 菌株。基因突变株可以随着动物宿主、媒介昆虫的流动而传播,在另一些生态环境相似的地方存活下来,但这种传播受一些外界条件的限制。如与青海毗邻的、同属于青藏高原型与祁连山型的甘肃、西藏的菌株,却没有发现 RAPD-2 型,而同全国的大部分菌株一样,为 RAPD-1 型,这可能是因为青海与甘肃和西藏分别隔着祁连山山脉和唐古拉山脉,这些山脉海拔多在 5 500 m 以上,山顶为裸岩地带,无植被,且终年积雪,形成一道地理屏障,而使青海成为一个独立自然疫源地,这里发生的基因突变很难翻越这样的大山脉而传播过去,只得局限于山的一侧,于是,分居于山脉两侧的同一种生态型而呈不同的 RAPD 基因型。将基因分型与生态分型结合起来分析,将对鼠疫的基础研究和防治工作起重要的指导作用。

RAPD 方法灵敏度高,很多因素如酶、氯化镁、模板、循环条件、PCR 仪等都影响其结果的重复性^[9-12]。因此,要想得到稳定可靠的结果,除严格按照 PCR 控制污染的操作规范外,可每次设一个标准菌株作阳性对照,如本实验的 BL21。如条件许可,最好是除模板、水以外的所有的 RAPD 反应组分

做成试剂盒,这样操作更简便,重复性更强。

参 考 文 献

- 1 李书宝. 中国鼠疫监测现状及疫情态势分析. 中国地方病防治杂志, 1999, 14: 278-280.
- 2 Maslow JN, Mulligan ME, Arbert RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis, 1993, 17: 153-164.
- 3 Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- 4 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7213-7218.
- 5 Damiani G. Comparison of a improved RAPD fingerprinting with different typing methods for discriminating clinical isolates of *staphylococcus spp.* Eur J Epidemiol, 1997, 12: 163-169.
- 6 Micheli MR, Bova R, Pascale E, et al. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 1921-1922.
- 7 Makino S, Okada Y, Maruyama T, et al. PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. J Clin Microbiol, 1994, 32: 65-69.
- 8 Rasmussen HN, Olsen JE, Rasmussen OF. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. Lett Appl Microbiol, 1994, 19: 359-362.
- 9 Tyler KD, Wang G, Tyler SD, et al. Factor affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J Clin Microbiol, 1997, 35: 339-346.
- 10 Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques, 1993, 14: 362-364.
- 11 Park YH, Kohel RJ. Effect of concentration of MgCl₂ on random amplified DNA polymorphism. Biotechniques, 1994, 16: 652-654.
- 12 Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 4647-4648.

(收稿日期 2000-06-12)