

青藏高原鼠疫耶尔森菌基因型分布

李敏 戴二黑 戴瑞霞 周冬生 杨晓艳 崔百忠 金丽霞 赵海红 李存香
祁美英 次仁顿珠 戴翔 唐永娇 杨瑞馥

【摘要】 目的 研究青藏高原鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)基因组型分布特征。方法 对分离到的青藏高原鼠疫菌 297 株,根据已经证实的 22 个差异区段设计引物,每株鼠疫菌的每个基因差异区段都采用 PCR 技术进行验证。结果 在喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地中,鼠疫菌基因组型有 9 种,分别为 1、5、6、7、8、10、11、新基因组型和 Ype-ancestor 型,其中以 5、8 和 10 型为主,3 种基因组型合计所占比例为 80.6% (204/253),而且不同地区鼠疫菌基因组型的分布也不一致。青藏高原青海田鼠鼠疫疫源地鼠疫菌基因组型全部为 14 型。结论 青藏高原鼠疫菌基因组型分布具有明显的地理特征。根据基因组型的分布状况推测出了鼠疫菌在青藏高原的传播路径。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 基因分型; 差异区段; 青藏高原

Study on the genotyping and microevolution of *Yersinia pestis* in the Qinghai-Tibet Plateau LI Min*, DAI Er-hei, DAI Rui-xia, ZHOU Dong-sheng, YANG Xiao-yan, CUI Bai-zhong, JIN Li-xia, ZHAO Hai-hong, LI Cun-xiang, QI Mei-ying, CI REN Dun-zhu, DAI Xiang, TANG Yong-jiao, YANG Rui-fu. *Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 811602, China

【Abstract】 **Objective** To study the distribution of genomovars and microevolution of *Yersinia pestis* in the Qinghai-Tibet Plateau. **Methods** Primer pairs targeting the twenty-two different regions (DFRs) were designed for detecting the presence or deletion of each DFR in 297 strains isolated from the Qinghai-Tibet Plateau. **Results** 9 genomovars, i. e. Genomovar 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, new type and Ype-ancestor were identified in the *Marmota himalayana* plague focus of the Qinghai-Tibet Plateau. Among these genomovars, genomovar 5, 8 and 10 were dominant types. The total rate of the three genomovars was 80.6% (204/253) and the genomovars in different regions were different. All of 44 strains of *Y. pestis* in the *Microtus fuscus* plague focus of the Qinghai-Tibet Plateau belonged to genomovar 14. **Conclusion** The distribution of genomovars of *Y. pestis* in the Qinghai-Tibet plateau had remarkable characteristics geographically. Based on the distribution of genomovars of *Y. pestis*, the routes of transmission and microevolution of *Y. pestis* were proposed.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Genotyping; Different regions; Qinghai-Tibet Plateau

目前已发现青藏高原有两种类型鼠疫自然疫源地,即喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地(1954 年)和青海田鼠鼠疫自然疫源地(1997 年)^[1-3]。喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地几乎占居青藏高原的大部分地区,包括青海、西藏、甘肃、新疆 4 省(区)的 75 个县(市)。青藏高原青海田鼠鼠疫疫源地包括四川省石渠县和青海省称多县。为了研究青藏高原鼠疫自然疫源地鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)基因组型的分布状况,采用 PCR 技术对分离于上述两块疫源地的 297

株鼠疫菌进行了基因组分型研究。

材料与与方法

1. 实验菌株:本研究所采用的 297 株鼠疫菌,分别来自青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地和青海田鼠鼠疫自然疫源地。其中喜马拉雅旱獭鼠疫疫源地的菌株数为 253 株,分离自青海(136 株)、西藏(75 株)、甘肃(22 株)和新疆(20 株)等省(区);青海田鼠鼠疫疫源地的菌株数为 44 株,分离自四川(32 株)和青海(12 株)省。所有菌株均由鼠疫菌专业实验室保存。

2. 鼠疫菌 DNA 的提取:细菌培养于赫氏琼脂茄瓶中,28℃ 培养 36 h, DNA 提取按照经典的苯酚-氯仿混合抽提法进行^[4]。

3. 引物和 PCR 扩增方法:按照参考文献[5]的

作者单位:811602 西宁,青海省地方病预防控制所(李敏、戴瑞霞、杨晓艳、崔百忠、金丽霞、赵海红、李存香、祁美英);军事医学科学院微生物流行病学研究所(戴二黑、周冬生、杨瑞馥);西藏自治区疾病预防控制中心(次仁顿珠);新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(戴翔);甘肃省疾病预防控制中心(唐永娇)

李敏与戴二黑同为第一作者

基因差异区段(different region, DFR)的基因分型技术分型,在 22 个 DFRs 中,有 3 个位于 pMT1 质粒中,19 个位于染色体上。采用 Array Designer 2.0 软件针对每个 DFR 各设计一对引物,为了证实 pMT1 的存在,我们还特异针对 pMT1 质粒设计了一对引物,引物序列见表 1。

PCR 反应体系: 10× buffer 2.5 μl, 10 mmol dNTP 0.25 μl, 5 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, 10 μmol 引物对 0.5 μl, 5 ng/μl 模板 DNA 2 μl, 用去离子水补足至 25 μl。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 3 min, 按 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s 扩增 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。

PCR 产物检测: PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,紫外分析仪下观察结果,在预计分子量大小处存在条带者为阳性。每次 PCR 反应均设阴性对照(用去离子水取代模板)和阳性对照(模板为鼠疫菌菌株 91001 和 82009 DNA 的混合物,包括 22 个 DFRs)。可疑 PCR 结果和阴性 PCR 结果至少重复一次。

结 果

1. 青藏高原鼠疫菌基因组分型: 采用 PCR 技术研究了 22 个 DFRs 在青藏高原两块鼠疫自然源地的 297 株鼠疫菌中的分布,共发现了 10 个基因组型(表 2),其中有 8 个基因组型与周冬生等人发现的 14 个基因组型一致^[5,6],分别为 1、5、6、7、8、10、11、14 型。此外,我们还发现了 2 个新的基因组型,其中一型与周冬生等人推测的古老鼠疫菌的基因组型即 Ype-ancestor 型相同,仅缺失了 DFR13,另一型的 DFR 图谱比较独特,缺失了 DFR4、6、11、13 和 17,在此我们暂且称之为新基因组型。各基因组型所占的比例分别为: 5 型为 25.3%、8 型 24.9%、10 型 18.5%、14 型 14.8%、7 型 4.4%、11 型 4.0%、6 型 3.4%、1 型 3.4%、新基因组型 1.0%、Ype-ancestor 型 0.3%。

2. 鼠疫菌基因组型在青藏高原的分布特征: 青藏高原存在两块鼠疫疫源地,即喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地和青海田鼠鼠疫疫源地,各疫源地鼠疫菌的基因组型见表 3,各地区鼠疫菌的基因组型分布状况见表 4。在喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地中,鼠疫菌基因组型有 9 种,分别为 1、5、6、7、8、10、11、新基因组型和 Ype-ancestor 型,其中以 5、8 和 10 型为主,3 种基因组型合计所占比例为 80.6% (204/

253)。虽然喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地内主要宿主相同,由于宿主所栖息的自然环境差异较大,因此鼠疫菌其基因组型也最多。青海省鼠疫菌的基因组型比较复杂,以 5 型和 8 型为主。西藏自治区的藏南地区鼠疫菌的基因组型全部为 10 型,而藏北高原存在 5 型和 6 型,其中 6 型鼠疫菌共有 10 株,除 1 株来自比如外,其他 9 株均分离于那曲。甘肃省鼠疫菌基因组型主要为 8 型,但是,在甘肃甘南与青海的交界处,是 8 型和 7 型的混交区。在新疆自治区境内存在的昆仑山鼠疫疫源地又分为中昆仑山疫源地和东昆仑山疫源地,两块疫源地鼠疫菌的生物型分别为中世纪型和古典型。中昆仑山疫源地鼠疫菌的基因组型主要为 11 型,而东昆仑山疫源地鼠疫菌基因组型主要为 5 型。

讨 论

鼠疫菌在自然界中长期生存不可避免地要与动物宿主和跳蚤媒介发生相互作用。在自然疫源地中,鼠疫菌、宿主和媒介三者之间存在着相对平衡。然而,在一个限定的地理区域(一块疫源地或一块疫源地的一部分)中,特定的自然环境将最终决定鼠疫菌、宿主和媒介三者之间以食物链为基础的相互依存关系。特定的自然环境以及鼠疫菌、宿主和媒介三者之间相互依存关系不但决定了鼠疫菌的存在,同时也决定着鼠疫菌基因组的进化及其基因组型。因此,鼠疫菌基因组型的微进化与疫源地的扩张是完全一致的。每一个基因组型均局限在特定的地理区域,即具有独特自然环境、宿主和媒介的疫源地或某一疫源地的一部分。很多具有不同主要宿主的地理区域有其独特的基因组型。有时在一个只有一个主要宿主的疫源地中存在不只一个基因组型,但每一个基因组型都与一个独特的自然环境或主要媒介相对应。每个疫源地的鼠疫菌有其独特的基因组型的特点可以避免鼠疫菌在同一疫源地能量利用的重叠。

青藏高原青海田鼠鼠疫疫源地是 1997 年新发现的一块疫源地^[2,3],分布于青海省称多县珍秦乡与四川省石渠县俄多马乡,两地鼠疫菌基因组型完全一致,全部为 14 型。

前面我们以省级行政区划描述了鼠疫菌的分布状态,行政区划是为了便于行政管理进行的人为划分,并不能完全反映地理特征。通过仔细分析鼠疫菌基因组型与地理之间的关系,发现青藏高原鼠疫菌基因组型具有一定的地理分布特征。5 型多分布

表1 研究所用引物一览表

DFR 及引物	位置	片段 (bp)
DFR01		
AP-pMT046F	5'AGAGAGTTTCATCTATCAGACCATG 3'	813~838
AP-pMT046R	5'ATACCAGTGGATCGTCTTTGATTC 3'	1012~987
DFR02		
AP-pMT090F	5'CATCCGTTCTACATCATCCATAGC 3'	883~907
AP-pMT090R	5'CCAGATCTCATCCAGGTACTTATG 3'	1182~1158
DFR03		
AP-YPMT1.06cF	5'AGCACAAGCAGATGGTCAATAATG 3'	3107~3131
AP-YPMT1.06cR	5'TGTGCCTTCAGTTGGGTAATTTG 3'	3506~3483
DFR04		
AP-YPO976F	5'GTGGAGTACCTCTTATCTGGATG 3'	582~605
AP-YPO976R	5'CAAATATTTACCCGCGTTAAACC 3'	1081~1058
DFR05		
AP-YPO0624F	5'TAATATACCTCTCGCAGAAAGCAG 3'	678~702
AP-YPO0624R	5'GCCAATAGCAATACACCATCTG 3'	1077~1054
DFR06		
AP-YPO0739F	5'GAAAATCATCGAGCGCTACTGG 3'	566~587
AP-YPO0739R	5'GGAATGTGGCTTCTGCCTTG 3'	883~864
DFR07		
AP-YPO0743F	5'TGTGTCAACCAATGGCACTTAAAC 3'	324~347
AP-YPO0743R	5'GGCTATCTATCTGCACCTGACTC 3'	523~500
DFR08		
AP-YPO0988F	5'ACCGTTTACGCCTCAATATGTTG 3'	647~670
AP-YPO0988R	5'GATAGAATAATACCAGCGGTTGAAC 3'	946~921
DFR09		
AP-YPO1002F	5'TATGTCCGTCATCTATCAAGTC 3'	168~191
AP-YPO1002R	5'TTTAACTAAATCATCCACCTCACAG 3'	567~542
DFR10		
AP-YPO1168F	5'GTTACCGTTCAGTTTGTGATTTTC 3'	1425~1450
AP-YPO1168R	5'TCTGTCTTTGCTGTAGTCCATC 3'	1924~1901
DFR11		
AP-YPO1987F	5'CTGGAAAATGCCOCTACCG 3'	71~88
AP-YPO1987R	5'TCGGTTCGGCTTTATGCC 3'	1623~1608
DFR12		
AP-YPO2110F	5'TTGAAGTTGATGGCAAGAAAACC 3'	455~478
AP-YPO2110R	5'CAITGATTGGATATGAGCGGAAG 3'	754~731
DFR13		
AP-YPO2277F	5'GTTCTCCAGTTGTAGGTG 3'	560~577
AP-YPO2277R	5'ATTCGTCACAGTGCCTTC 3'	750~733
DFR14		
AP-YPO2286F	5'CCGATCTTAATCAGGCTTTCAG 3'	545~568
AP-YPO2286R	5'CTTGGGAGGTAATTTGGTTCTTG 3'	844~821
DFR15		
AP-YPO2315F	5'GATTTTGAATGGTTCITTCACATTTG 3'	163~188
AP-YPO2315R	5'CTTCTACTGACAGGATCAATTCG 3'	562~539
DFR16		
AP-YPO2375F	5'CTCATCTGCATACCGACTATCTG 3'	344~367
AP-YPO2375R	5'GGTCATGGTCCAGAAAGTGATG 3'	843~820
DFR17		
AP-YPO2380F	5'ATGGCAATGTTATCAGCATGGAG 3'	1799~1822
AP-YPO2380R	5'GTATAAATACCCGCTTCCCTTACG 3'	2198~2174
DFR18		
AP-YPO2469F	5'AAGTGGAAATGGCTATTCG 3'	74~90
AP-YPO2469R	5'GACTGGCGAACAATGTC 3'	340~324
DFR19		
AP-YPO2489F	5'GTTTGAATTAAGTGGGC 3'	51~68
AP-YPO2489R	5'AATAAGTTTGGCAGTTTC 3'	472~457
DFR20		
AP-YPO3047F	5'GAGACATTCCTGCCTGAGTTATG 3'	490~514
AP-YPO3047R	5'GATAGCCTCATCGGTAAGTTGATC 3'	789~765
DFR21		
AP-YPO3674F	5'ACGATGCACTGTATCAGCTTATC 3'	1259~1282
AP-YPO3674R	5'AGATAACTTTCGCTGTACTGATG 3'	1658~1634
DFR22		
AP-YPO4017F	5'TGATGAATAACCTCGATCTGACG 3'	101~125
AP-YPO4017R	5'TTGTGGCAATCGAATGTCAGAG 3'	600~577
pMT1		
AP-YPMT1.44F	5'AACACTATCTCATTCGCGAGTAAAG 3'	460~485
AP-YPMT1.44R	5'AGTGGATGATGAAGTAGACCGAG 3'	859~836

在西藏的藏北高原、青海的青南高原和海西西部地区以及新疆东昆仑山喜马拉雅旱獭鼠疫源地的若羌和且末,而藏北高原唯独那曲的菌株是 6 型,该县也是 6 型的惟一分布区。8 型菌株的分布区为甘肃省的河西走廊、祁连山南北麓、青海湖环湖地区及青海南山和宗务隆山等地区。8 型和 5 型的交汇处常同时有 2~3 种基因组型的流行,在甘肃省甘南与青海省的交界处,是 8 型和 7 型的混交区。10 型主要分布在藏南地区,从噶尔、普兰和仲巴开始,沿着喜马拉雅山北麓和冈底斯山山地一直沿伸到拉萨周围,形成了 10 型的一个单一分布带(表 4),但是在 2004 年青海省囊谦县肺鼠疫暴发时所分离的 8 株菌株其基因组型全部为 10 型。11 型仅分布在新疆地区中昆仑山喜马拉雅旱獭鼠疫源地的和田与洛浦。由于青藏高原地形复杂,自然景观垂直成带十分明显,景观特征的多样性使得地区间生态系差异较大,草甸草原几乎占据整个青海及西藏地区东北的高原山地;森林草甸草原出现于祁连山东部、甘南山地与玉树东南部;高原草原在冈底斯山地较为突出;昆仑山—阿尔金山山地以干旱的高山草原为主。鼠疫菌为了适应不同的自然景观,基因组型发生变化也就不可避免。

周冬生等^[5]根据鼠疫菌基因组型的进化特征推定了鼠疫菌在中国传播与演化的规律。中国鼠疫菌由国外传入——中亚和苏联远东地区的古典型鼠疫菌,分别传入至中国新疆、西藏和东北地区,进一步形成三大演化分支。第一支由天山山地开始,经帕米尔高原、青甘藏高原,到滇西北山地,直至东南沿海;其间在滇闽粤居民区黄胸鼠鼠疫源地,由古典型菌株进化成东方型。在昆仑山喜马拉雅旱獭鼠疫源地,除了古典型菌株,尚存在中世纪型菌株,后者由前者进化而来。田鼠型鼠疫菌分支较为独特,包括两个疫源地:锡林格勒高原布氏田鼠鼠疫源地和青藏高原青海田鼠鼠疫源地。在这一框架的基础上结合青藏高原鼠疫菌基因组型分布的研究结

表2 青藏高原鼠疫菌 22 个 DFRs 分布状态

基因组型	菌株数	DFR01	DFR02	DFR03	DFR04	DFR05	DFR06	DFR07	DFR08	DFR09	DFR10	DFR11	DFR12	DFR13	DFR14	DFR15	DFR16	DFR17	DFR18	DFR19	DFR20	DFR21	DFR22	pMT1
		01	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
05	75	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06	10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
07	13	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08	74	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	55	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
11	12	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
14	44	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
新型	3	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Ype-ancestor	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”：检测出，“-”：未检测出

表3 鼠疫菌基因组型在青藏高原鼠疫源地的分布状况

鼠疫源地	地区	菌株数	基 因 组 型										
			1	5	6	7	8	10	11	14	新型	Ype-ancestor	
Focus C	青海	136	8	47	0	9	60	8	0	0	0	3	1
	西藏	75	0	18	10	0	0	47	0	0	0	0	0
	甘肃	22	1	3	0	4	14	0	0	0	0	0	0
	新疆	20	1	7	0	0	0	0	12	0	0	0	0
Focus M	青海	12	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0
	四川	32	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0

注: Focus C: 青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫源地; Focus M: 云南、广东、福建等省青海田鼠鼠疫源地

表4 青藏高原鼠疫菌基因组型在不同地区的分布

基因组型别	菌株数	构成比(%)	地 区	
			地区	分布
5	75	25.3	青海	格尔木、玉树、曲麻莱、治多、称多、杂多、囊谦、玛多、门源、祁连、共和、兴海、贵德、贵南、同仁、茫崖、冷湖、都兰、河南; 西藏: 安多、聂荣、当雄、比如、巴青、丁青、昌都、察雅、那曲; 新疆: 若羌、且末; 甘肃: 阿克塞
8	74	24.9	青海	祁连、门源、刚察、海晏、共和、兴海、同德、贵德、贵南、茫崖、德令哈、乌兰、都兰、天峻、玛沁、泽库、湟源; 甘肃: 阿克塞、肃南、肃北、玉门、夏河、甘南
10	55	18.5	西藏	噶尔、普兰、仲巴、南木林、曲水、拉萨、达孜、墨竹工卡、浪卡子、乃东、错那、朗县、林周、堆龙德庆、加查、隆子、尼木、曲松、仁布、桑日、比如; 青海: 囊谦
6	10	3.4	西藏	那曲、比如
7	13	4.4	青海	循化、同仁、泽库、德令哈、囊谦、湟源; 甘肃: 夏河、甘南
11	12	4.0	新疆	和田、洛浦、且末
14	44	14.8	青海	称多; 四川: 石渠
1	10	3.4	青海、新疆、甘肃	均有零星分布
新型	3	1.0	青海	称多、祁连、曲麻莱
Ype-ancestor	1	0.3	青海	兴海

果, 本文对鼠疫菌在青藏高原中的进化与传播又做了更加深入的探讨。

中亚地区鼠疫菌从新疆北天山西段传入我国境内(1型), 环绕塔克拉玛干沙漠进行传播, 一部分经北天山东段(3型)南下进入东昆仑山若羌(5型), 由若羌传入青海茫崖, 分两支在青藏高原传播, 一支由茫崖、冷湖沿阿尔金山、祁连山和河西走廊传入青海、甘肃(8型), 再由甘肃甘南与青海的7型分布区传入云南剑川(7型)。另一支由唐古拉山传入藏北高原和青南高原(5型)至云南剑川(7型)。另一部分经南天山向南传入帕米尔高原, 从帕米尔高原向东传入藏南地区(10型), 藏南地区的菌株向北传入

中昆仑山进化成中世纪型(11型)。

参 考 文 献

- 1 方喜业. 中国鼠疫自然疫源地. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- 2 刘振才, 海荣, 李富忠, 等. 青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地的发现与研究. 中国地方病防治杂志, 2001, 16: 321-327.
- 3 王祖那, 罗松达卫, 于晓涛, 等. 青海省青海田鼠鼠疫自然疫源地的发现与研究. 中国地方病防治杂志, 2004, 23: 69-72.
- 4 Adair DM, Worsham PL, Hill KK, et al. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1516-1519.
- 5 周冬生, 韩延平, 宋亚军, 等. 鼠疫耶尔森菌基因组进化与生态位适应研究. 解放军医学杂志, 2004, 29: 204-210.
- 6 周冬生, 韩延平, 戴二黑, 等. 鼠疫耶尔森菌基因组 DNA 芯片的研制及用于比较基因组学分析. 解放军医学杂志, 2004, 29: 200-203.

(收稿日期: 2005-08-25)

(本文编辑: 尹廉)