

中国炭疽芽胞杆菌致死因子基因中单核苷酸多态性位点分析

魏建春 张恩民 马凤琴 张建中

【摘要】 目的 分析中国炭疽芽胞杆菌致死因子基因中的单核苷酸多态性(SNP)位点特征。**方法** 选择 18 株炭疽芽胞杆菌,采用 PCR 方法扩增炭疽芽胞杆菌致死因子基因、测序,并进行 SNP 位点分析。**结果** 实验中所用中国炭疽芽胞杆菌致死因子基因中第 895 位核苷酸均为 G,与国外菌株不同。中国不同地区(包括新疆、广西、北京、内蒙古等地区)、不同年代和不同来源(包括土壤、牛、羊、骡、狗、患者等)分离的菌株,具有相同的 SNP 位点特征。**结论** 致死因子基因中第 895 位核苷酸均为 G 的 SNP 位点特征很可能是中国炭疽芽胞杆菌的共同特征。

【关键词】 炭疽芽胞杆菌;单核苷酸多态性;致死因子

Analysis on single nucleotide polymorphism site in *lef* gene of *Bacillus anthracis* in the China isolates
WEI Jian-chun, ZHANG En-min, MA Feng-qin, ZHANG Jian-zhong. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: ZHANG Jian-zhong, Email: Zhangjz@chinacdc.cn

【Abstract】 Objective To analyze the characters of a single nucleotide polymorphism(SNP) site in the lethal factor gene(*lef*) of *Bacillus anthracis* isolated from China. **Methods** 18 *Bacillus anthracis* isolates were selected and the *lef* genes were amplified by PCR method, then the PCR products were sequenced and the analysis of SNP site of the *lef* genes was performed. **Results** The 895th nucleotide of *lef* gene of all tested Chinese isolates appeared to be G but T was found in some overseas strains. The characteristic of SNP site was identical in all strains isolated from different regions (included Xinjiang, Guangxi, Beijing, Inner Mongolia) at different times or sources (included soil, cow, goat, mule, dog, patient, etc) in China. **Conclusion** The 895th SNP site of *lef* gene might have shared the same characters of Chinese *Bacillus anthracis* strains.

【Key words】 *Bacillus anthracis*; Single nucleotide polymorphism; Lethal factor

炭疽芽胞杆菌是引起人及动物炭疽的病原体,是一种高度保守的细菌。不同分离株的基因组具有高于 99% 的核苷酸序列相似性^[1]。实验证明许多分子生物学分型方法均不能对其进行分型研究。单核苷酸多态性(SNP)在生物基因组中广泛存在,SNP 具备多态信息量大、密度更高、遗传稳定、易于检测和统计分析等优点,成为继 RFLP 和微卫星多态性的第三代遗传标志。已经证明,炭疽芽胞杆菌基因组中也存在为数众多的单核苷酸多态性位点,并且有研究把这项技术应用于炭疽芽胞杆菌的溯源工作,但针对中国炭疽芽胞杆菌尚无相关的 SNP 分

析资料。本研究拟对中国炭疽芽胞杆菌致死因子基因中的 SNP 位点进行分析。

材料与方 法

1. 菌株:由本实验室保存,见表 1。

2. 菌株培养及质粒提取:炭疽芽胞杆菌接种于普通琼脂斜面,37℃ 培养 16 h 左右,收菌提取质粒 DNA,具体操作按试剂盒(赛百盛生物工程公司)说明书进行。

3. 引物序列:P1 5'-TGG ATG GTG ATA TTA CAA AAC A-3', P3 5'-TCA ACT AAA TCC GCA CCT-3',引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

4. PCR 反应体系及条件:PCR 反应体系 50 μl, 10× 扩增缓冲液 5 μl, 4 种 dNTP 混合物各 200 μmol/L,引物 12.5 pmol,模板 2 μl, Taq DNA 聚

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

通讯作者:张建中,Email:Zhangjz@chinacdc.cn

合酶 2.5 U, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 双蒸水补足 50 μl。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 5 min。电泳:1%琼脂糖凝胶,GoldView DNA 染料,上样 5 μl,100 V,1 h。

表1 中国炭疽芽胞杆菌实验菌株基本情况

菌株编号	年份	地点	来源	第 895 位点核苷酸
001	1992	新疆	土壤	G
002	1992	新疆	死羊	G
003	1993	新疆	患者	G
005	1995	新疆	土壤	G
006	1981	新疆	患者	G
007	1992	新疆	患者	G
008	1992	新疆	剖牛处土壤	G
009	1981	新疆	死羊圈土壤	G
013	1992	新疆	土壤	G
011	1981	新疆	狗皮	G
016	1992	新疆	病羊圈土壤	G
022	1993	新疆	患者	G
037	1953	北京	骡	G
051	1994	广西	剖牛处土壤	G
057	1991	广西	剖牛处土壤	G
063	1994	广西	土壤	G
077	1974	内蒙古	牛	G
082*	1958			G

* A16R 疫苗株

5. PCR 产物测序:由宝生物工程(大连)有限公司完成。

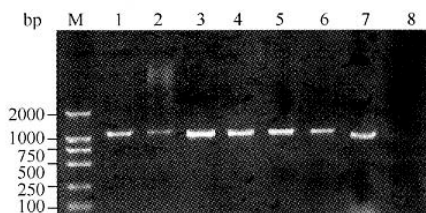
6. 序列比对:将 A16R 致死因子的部分序列提交到网上,使用 NCBI 的 blast 功能进行比对。测序结果使用序列分析软件 DNASTAR 的 MegAlign 功能进行比对。

结 果

1. 序列比对:对致死因子基因已发表序列进行

blast 比较,结果发现,致死因子基因第 895 位核苷酸存在两态性,该对应位点分别是 T 和 G,引起一个氨基酸的改变,由丝氨酸 S 变为丙氨酸 A。两类菌株分别以 Sterne 和 Ames 为代表。比较还发现,意大利使用的疫苗株 Carbosap 在致死因子基因的第 795 位有一个不同于其他所有测序菌株的点突变(T→C)。

2. 中国菌株的 PCR 扩增:共 18 个样品,001,002,003,005,006,007,008,009,013,016,020,022,037,051,057,063,077,A16R。所有样品均可扩出长约 1000 bp 左右的片段(图 1)。



M:DNA 分子量标准 DL2000; 1~7:003,005,013,022,051,077,A16R; 8:空白对照

图1 中国炭疽芽胞杆菌 PCR 扩增产物电泳图

3. 测序:发现全部被测菌株的第 895 位均为 G,而第 795 位均没有意大利疫苗株的点突变。同源性比较部分结果见图 2。

讨 论

炭疽芽胞杆菌是菌株间变异很小的一种细菌。可能是由于炭疽杆菌与其他大多数细菌和病原体相比,遇到的繁殖机会要少的多。炭疽病原体主要以芽孢的形式存在于土壤中,繁殖几乎完全依赖在宿

```

AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTG.CAAGA Consensus #1
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA Majority
      850      860      870      880      890      900
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA sterne (lef)
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 001
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 002
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 003
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 005
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 006
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 007
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 008
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 009
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 011
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 013
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 016
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 022
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 037
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 051
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 057
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 063
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA 077
AACGAACAAGAAATAAATCTATCCTTGGGAAGAAGCTTAAAGATCAACGGATGCTGGCAAGA A16R
    
```

图2 中国炭疽芽胞杆菌测序结果及 Sterne 菌株的同源性比较

主体内的感染,因此在传播到下一个宿主时会经历一个相当长的时间间隔。以往的研究表明,无论是哪种来源或者哪个地区分离的菌株,其表现型和基因型都几乎完全相同。在分子水平上,尝试过许多分型方法,结果证明基因组差别很难检测到。直到串联重复序列以及 SNP 的发现和应^[2-4],这一状况才得以改变;但传染源分析(特别是生物恐怖事件相关传染源分析)需要具有更多的菌株基因特征,各国在了解世界各地菌株特征的同时,也十分关注本国菌株所具有的基因识别特征。

2000 年 Keim 等^[5]利用 8 个遗传标记的 VNTR 分析法(MLVA),将收集到的世界范围内的 426 株炭疽芽胞杆菌,分为 89 个 MLVA 基因型,聚类分析分为 6 个主要基因群。到目前为止, VNTR 分析方法还是最准确的炭疽芽胞杆菌分型方法。目前在一些国家也陆续开展了这项工作。但研究表明该方法似乎不适用于对中国菌株的分型研究^[6]。SNP 就成为了最值得一试的方法。

本文研究所发现的实验中所用中国炭疽芽胞杆菌致死因子基因中第 895 位核苷酸均为 G 的 SNP 位点特征,包括新疆、广西、北京、内蒙古等地的不同地区菌株特征相同;不同年代分离的菌株特征相同;包括土壤、牛、羊、骡、狗、患者等不同来源分离的菌株,特征相同。虽尚需扩大菌株数量加以证实,但该 SNP 位点很可能是中国炭疽芽胞杆菌的共同 SNP 特征。

已经有越来越多的人认识到 SNP 是一种重要的遗传标记,对于检出和鉴别炭疽芽胞杆菌具有相当重要的意义。如 Easterday 等^[7]在炭疽芽胞杆菌 *plcR* 基因的一个 SNP 位点周围设计了一种 TaqMan 错配扩增突变方法,能够检测出环境标本中低至 25 fg DNA 的具有特异 SNP 的炭疽芽胞杆菌。这种选择性低拷贝扩增的能力在生物防御和微生物溯源领域是一种有用的工具。而把 VNTR 和

SNP 结合起来使用,将大大改善流行病学分析能力。Read 等^[8]利用三种类型的遗传标记: VNTR, SNP, 插入和删除序列,分析了 2001 年美国生物恐怖袭击中分离到的炭疽芽胞杆菌,推测出了其来源,该研究发现了 pXO1 中的 15 个 SNP,但并不包括本文中的 SNP 位点。

中国是一个炭疽菌株资源丰富的国家,但对于菌株的遗传特征均未进行过详细检测,对此类遗传特征的了解对于建立检测方法,诊断技术,更好的预防和控制炭疽的发生和流行很有必要,而丰富 SNP 数据库应成为建立炭疽防控策略的重要部分。

参 考 文 献

- 1 Price LB, Hugh-Jones M, Jackson PJ, et al. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. J Bacteriol, 1999, 181: 2358-2362.
- 2 Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS, et al. Characterisation of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1400-1405.
- 3 Keim P, Kalif A, Schupp J, et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J Bacteriol, 1997, 179: 818-824.
- 4 Pearson T, Busch JD, Ravel J, et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. PNAS, 2004, 101: 13536-13541.
- 5 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: 2928-2936.
- 6 王秉翔, Smith KL, Keys C, 等. 中国的炭疽杆菌 DNA 分型及其地理分布. 微生物学免疫学进展, 2002, 30: 14-17.
- 7 Easterday WR, Van Ert MN, Zanecki S, et al. Specific detection of bacillus anthracis using a TaqMan mismatch amplification mutation assay. Biotechniques, 2005, 38: 731-735.
- 8 Read TD, Salzberg SL, Pop M, et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. Science, 2002, 296: 2028-2033.

(收稿日期: 2006-03-22)

(本文编辑: 张林东)