

中国鼠疫自然疫源地分型研究

Ⅲ. 鼠疫耶尔森菌 DFR/MLVA 主要基因组型生物学特征

方喜业 周冬生 崔玉军 李艳君 刘起勇 许磊 杨瑞馥

【关键词】 鼠疫耶尔森菌；差异区段/多位点串联重复序列基因组型

Eco-geographic landscapes of natural plague foci in China Ⅲ. Biological characteristics of major DFR/MLVA-based genotypes of *Yersinia pestis*, China FANG Xi-ye¹, ZHOU Dong-sheng², CUI Yu-jun², LI Yan-jun², LIU Qi-yong³, XU Lei⁴, YANG Rui-fu². 1 Institute of Laboratory Animal Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences, Compared Medical Research Center of Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences; 3 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences
Corresponding authors: FANG Xi-ye, Email: xiye.fang@hotmail.com; YANG Rui-fu, Email: yangrf@nic.bmi.ac.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Mega Projects of China (No. 2008ZX10004-010).

【Key words】 *Yersinia pestis*; Different region (DFR)/Multi-locus VNTR analysis (MLVA) -based genotypes

鼠疫菌基因组型与鼠疫生态地理景观型及其主要宿主、媒介密切相关，自然组合形成鼠疫生物群落，互相依赖，互相制约，相互适应，同步进化，维持鼠疫自然疫源性和生物群落的延续。鼠疫菌差异区段/多位点串联重复序列(DFR/MLVA)基因组型反映了鼠疫自然疫源地生物学特征。其型别对认识鼠疫菌自然疫源地生物学具有重要意义。通过对鼠疫菌基因组型的鉴定，可实现对鼠疫菌的追踪溯源，追溯出所代表的鼠疫主要宿主、主要媒介及其生态地理景观型的生物学特征。因此，鉴定鼠疫菌基因组型、主要基因组型对中国鼠疫预防控制、应急反恐、生物安全、监测预报及软件技术平台体系建设具有实践和理论指导意义。

本文探讨中国鼠疫菌 DFR/MLVA 基因组型的生物学特征与中国鼠疫自然疫源地生物学的基本规律。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.05.021

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10004-010)

作者单位: 100021 北京, 中国医学科学院协和医学院比较医学研究中心(方喜业); 军事医学科学院微生物流行病学研究所(周冬生、崔玉军、李艳君、杨瑞馥); 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(刘起勇); 中国科学院动物研究所(许磊)

通信作者: 方喜业, Email: xiye.fang@hotmail.com; 杨瑞馥, Email: yangrf@nic.bmi.ac.cn

1. 中国鼠疫菌 DFR/MLVA 基因组型种群组成^[1-3]:

(1) 鼠疫菌 DFR 基因组型种群组成: 中国鼠疫菌 DFR 基因组型经 DNA 芯片比较基因组杂交和抑制消减杂交方法, 在基因组上推定出 22 个基因簇。用 DFR 分型法对中国各鼠疫自然疫源地分离的 260 株鼠疫菌鉴定结果, 发现存在 14 个 DFR 主要基因组型; 当鼠疫菌增加至 909 株时, 则扩增至 36 个 DFR 主要基因组型。

(2) 鼠疫菌 MLVA 基因组型种群组成: 对全国 12 个鼠疫自然疫源地抽取的 1100 余株鼠疫菌进行鉴定表明, 中国鼠疫自然疫源地存在 114 个 MLVA 基因组型。

2. 中国鼠疫自然疫源地鼠疫菌 DFR/MLVA 主要基因组型的分布及生物学特征^[4-10]:

(1) A 天山森林草原灰旱獭长尾黄鼠疫源地型: 该疫源地型有 3 个疫源地亚型(图 1)。

A1 西段森林草原灰旱獭长尾黄鼠疫源地型 1a 型疫源地亚型。包括 2 个鼠疫菌 DFR 基因组型(温泉 1a、2a 型, 其中 1a 型是主要基因组型)和 2 个 MLVA 基因组型(12、13 型, 其中 12 型是主要基因组型)。主要宿主是灰旱獭(*Marmota baibacina*, Brunalt, 1843)、长尾黄鼠(*Spermophilus undulatus*, Pallas, 1778)及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于温泉、伊宁、尼勒克等地区。



图1 中国鼠疫自然疫源地鼠疫菌DFR/MLVA主要基因组分布

A2 中段森林草原灰旱獭长尾黄鼠精河3型疫源地亚型。包括3个鼠疫菌DFR基因组(精河1~3型,其中3型是主要基因组)和4个MLVA基因组(14~17型,其中14型是主要基因组)。主要宿主为灰旱獭、长尾黄鼠及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于精河、乌苏等地区。

A3 东段森林草原灰旱獭长尾黄鼠玛纳斯2a型疫源地亚型。包括7个鼠疫菌DFR基因组(1a、玛纳斯2a、2b、15、16、21、29型,其中玛纳斯2a型是主要基因组)和7个MLVA基因组(1~7型,其中3型是主要基因组)。主要宿主是灰旱獭、长尾黄鼠及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于玛纳斯、乌鲁木齐、呼图壁、昌吉、乌苏、若羌、沙湾等地区。

(2)B 帕米尔高原南天山高寒草原长尾旱獭灰旱獭疫源地型:该疫源地型只有1个疫源地亚型(图1)。

B1 帕米尔高原(南天山)高寒草原长尾旱獭灰旱獭乌恰4a型疫源地亚型。包括6个鼠疫菌DFR基因组(2a、1b、2b、乌恰4a、16、26型,其中乌恰4a型为主要基因组)和4个MLVA基因组(8~11型,其中10型是主要基因组)。主要宿主是长尾旱獭(*Marmota caudate*, Jaguemont, 1844)、灰旱獭及

其主要寄生蚤。该疫源地型分布于乌恰、阿克陶、阿合奇等地区。

(3)C 青藏高原高寒草甸草原高寒草原喜马拉雅旱獭疫源地型:该疫源地型有5个疫源地亚型(图1)。

C1 巴颜喀拉山高寒草甸草原喜马拉雅旱獭扎多5型疫源地亚型。包括9个鼠疫菌DFR基因组(1a、扎多5、7、10、16、17、19、23、24型,其中扎多5型是主要基因组)和13个MLVA基因组(35~47型,其中44、45是主要基因组)。主要宿主是喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*, Hodgson, 1841)及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于扎多、治多、当雄、昌吉、丁青、玉树、昌都、察雅、格尔木、共和、冷湖、阿克赛等地区。

C2 念唐古拉山高寒草甸草原喜马拉雅旱獭那曲6型疫源地亚型。包括3个鼠疫菌DFR基因组(5、那曲6、10型,其中那曲6型是主要基因组)和5个MLVA基因组(30~34型,其中34型为主要基因组)。主要宿主是喜马拉雅旱獭及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于那曲、比如、聂荣等地区。

C3 祁连山高寒草甸草原喜马拉雅旱獭祁连8型疫源地亚型。包括7个鼠疫菌DFR基因组(1b、5、7、祁连8、13、24、25型,其中祁连8型是主要基因组)和14个MLVA基因组(1、2、18~29型,其中26型是主要基因组)。主要宿主是喜马拉雅旱獭及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于共和、湟源、海晏、茫崖、甘南、门源、德令哈、祁连、肃南、肃北、夏河、贵德、天祝等地区。

C4 中昆仑山高寒草原喜马拉雅旱獭和田11型疫源地亚型。包括3个鼠疫菌DFR基因组(和田11、16、30型,其中和田11型是主要基因组)和4个MLVA基因组(106、108~110型,其中106型是主要基因组)。主要宿主是喜马拉雅旱獭及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于和田、洛浦等地区。

C5 冈底斯山唐古拉山高寒草原喜马拉雅旱獭仲巴10型疫源地亚型。包括6个鼠疫菌DFR基因组(5、仲巴10、17、19、23、16型,其中仲巴10型是主要基因组)和5个MLVA基因组(71~75型,其中75型是主要基因组)。主要宿主是喜马拉雅旱獭及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于格尔木、仲巴、堆龙德庆、错那、达孜、葛尔、拉萨、墨竹工卡、乃东等地区。

(4)D 蒙古高原典型草原西伯利亚旱獭达乌尔黄鼠疫源地型:该疫源地只有1个疫源地亚型(图1)。

D1 呼伦贝尔典型草原西伯利亚旱獭达乌尔黄鼠满洲里 10¹ 型疫源地亚型。该疫源地亚型无原始鼠疫菌株。鼠疫菌 DFR 主要基因组型暂时预测为满洲里 10¹ 型;鼠疫菌 MLVA 基因组型待定。主要宿主是西伯利亚旱獭 (*Marmota sibirica*, Radde, 1862)、达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*, Brundt, 1843) 及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于满洲里、陈巴尔虎、喜桂图等地区。

(5) E 察哈尔丘陵松辽平原典型草原达乌尔黄鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

E1 察哈尔丘陵(松辽平原)典型草原达乌尔黄鼠通辽 10² 型疫源地亚型。包括 5 个鼠疫菌 DFR 基因组型(7、通辽 10²、18、19、28 型,其中通辽 10² 型是主要基因组型)和 14 个 MLVA 基因组型(76~89 型,其中 81 型是主要基因组型)。主要宿主是达乌尔黄鼠及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于内蒙古、吉林、辽宁、黑龙江省的正白旗、正蓝旗、苏尼特旗、长岭、白城等地区。

(6) F 甘宁黄土高原荒漠草原阿拉善黄鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

F1 甘宁黄土高原半荒漠草原阿拉善黄鼠海原 13 型疫源地亚型。包括 3 个鼠疫菌 DFR 基因组型(7、海原 13、17 型,其中海原 13 型是主要基因组型)和 4 个 MLVA 基因组型(107、112~114 型,其中 114 型是主要基因组型)。主要宿主为阿拉善黄鼠 (*Spermophilus alashanicus*, Buchner, 1888) 及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于固源、会宁、灵武、靖远、海原等地区。

(7) G 蒙古高原荒漠草原长爪沙鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

G1 鄂尔多斯荒漠草原长爪沙鼠二连 11¹ 型疫源地亚型。包括 5 个鼠疫菌 DFR 基因组型(二连 11¹、12、17、19、20 型,其中二连 11¹ 型为主要基因组型)和 16 个 MLVA 基因组型(90~105 型,其中 102 型是主要基因组型)。主要宿主是长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*, Milne-Edwards, 1867) 及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于二连、西苏尼、四子王、盐池、多伦、宝昌、鄂托克、银川、定边、化德、康宝、黄旗等地区。近年来随着疫源地生态地理景观荒漠化扩大,该亚型地区随之扩大。

(8) H 准噶尔盆地荒漠大沙鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

H1 阿拉山口荒漠大沙鼠阿拉山口 15 型疫源地亚型。鼠疫菌 DFR 基因组型只有 1 个(阿拉山口 15

型);鼠疫菌 MLVA 基因组型待定。主要宿主为大沙鼠 (*Rhombomys opimus*, Lichtenstein, 1823) 及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于克拉玛依、阿拉山口等地区。

(9) I 青藏高原高寒草甸草原青海田鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

I1 石渠高寒草甸草原青海田鼠石渠 14¹ 型疫源地亚型。包括 2 个鼠疫菌 DFR 基因组型(石渠 14¹、22 型,其中石渠 14¹ 型是主要基因组型)和 3 个 MLVA 基因组型(65~67 型,其中 67 型是主要基因组型)。主要宿主为青海田鼠 (*Lasiopodomys fuscus*, Buchner, 1889) 及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于青藏高原石渠、称多,是四川省惟一伸入青藏高原的疫源地。

(10) J 蒙古高原荒漠草原布氏田鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

J1 锡林郭勒荒漠草原布氏田鼠阿巴嘎 14² 型疫源地亚型。包括 2 个鼠疫菌 DFR 基因组型(阿巴嘎 14²、31 型,其中阿巴嘎 14² 型是主要基因组型)和 3 个 MLVA 基因组型(68~70,其中 68、70 型是主要基因组型)。主要宿主为布氏田鼠 (*Lasiopodomys brandtii*, Radde, 1861) 及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于内蒙古北部阿巴哈纳尔、阿巴嘎旗等地区。

(11) K 滇西南横断山三江并流纵谷玉龙绒鼠高山姬鼠疫源地型:该疫源地型有 2 个疫源地亚型(图 1)。

K1 横断山三江并流纵谷剑川玉龙绒鼠高山姬鼠剑川 7 型疫源地亚型。包括 2 个鼠疫菌 DFR 基因组型(剑川 7、9 型,其中剑川 7 型是主要基因组型)和 3 个 MLVA 基因组型(48~50 型,其中 48 型是主要基因组型)。主要宿主是玉龙绒鼠 (*Eotuenomys proditor*, Hinton, 1923)、高山姬鼠 (*Apodemus chevrieri*, Milne-Edwards, 1868) 及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于剑川地区。

K2 横断山三江并流纵谷丽江玉龙绒鼠高山姬鼠(基因组型待定)疫源地亚型。该鼠疫菌基因组型等待定,主要宿主是玉龙绒鼠和高山姬鼠及其主要寄生蚤。该疫源地型分布于丽江地区。

(12) L 滇闽粤川平原居民区农田黄胸鼠疫源地型:该疫源地型只有 1 个疫源地亚型(图 1)。

L1 滇闽粤川平原(居民区农田)黄胸鼠弥渡 9 型疫源地亚型。包括 6 个鼠疫菌 DFR 基因组型(7、8、弥渡 9、18、26、27 型,其中弥渡 9 型是主要基因组型)

和14个MLVA基因组型(51~64型,其中59型是主要基因组型)。主要宿主是黄胸鼠(*Rattus tanezumi*, Temminck, 1844)及其主要寄生蚤。该疫源地型主要分布于云南、广东、广西、贵州、福建等省区,国外亦有广泛分布。

3. 中国鼠疫菌DFR/MLVA主要基因组型的生物学和生态学意义:目前学术界对鼠疫菌基因组型多态性及其生物学特征进行了广泛研究。根据鼠疫菌对磷酸盐还原、阿拉伯糖代谢的差异、主要宿主的差异,将鼠疫菌分成4个生物型。根据鼠疫菌糖酵解能力、形成亚硝酸的能力、对氨基酸的需求、对鼠疫菌素的产生及其敏感性、色素沉着特征稳定性、内毒素含量、电泳型、营养型等多项指标,将我国鼠疫菌分成(A, B, C, D, E)5群17个生态型。但是随着分子生物学技术的发展,采用表型特征进行分型的方法逐渐显露弊端。由于表型特征分型法分辨率低、稳定性不足很难区分鼠疫菌,即不同的鼠疫菌基因变异,可能导致出现同样表型特征,而表型一致的鼠疫菌却不能完全反映鼠疫菌遗传基因的一致性;且在分型理念上未能区分主次基因组型,导致出现一型在多疫源地、多型在同一疫源地出现的假象。这些传统的表型特征分型法和分型理念,很难确切反映出鼠疫菌真实遗传基因间的差异,致使多年来在鼠疫菌基础研究上无重大突破性进展。

应用分子生物学技术(鼠疫菌全基因组测序、DNA芯片技术、抑制制减杂交技术、基因组比较研究等)深化了对鼠疫菌基因组学应用研究,推动鼠疫自然疫源地生物学研究的进展^[1,5-11]。本文是在比较了传统表型分型法和分子生物学基因组分型法的基础上,确定了鼠疫菌DFR/MLVA基因组分型法作为鼠疫自然疫源地分型研究的最佳方法^[1-3]。DFR基因组分型法和MLVA基因组分型法相结合(DFR/MLVA),用于鼠疫自然疫源地分型研究,恰在很大程度上解决了传统表型分型法分辨率低、不够稳定的难题^[9,10]。本文研究了鼠疫菌DFR/MLVA基因组型与鼠疫自然疫源地进化适应性的关系,揭示了鼠疫菌进化遗传及自然疫源地结构的内在联系,基本上掌握了中国鼠疫自然疫源地、鼠疫生态地理景观型、鼠疫菌主要基因组型、主要宿主、主要媒介的相互关系及生物学特征。中国鼠疫菌DFR/MLVA基因组型多态性是鼠疫菌、鼠疫自然疫源地起源进化、生物地理群落即鼠疫自然疫源地生物学的基础。鼠疫自然疫源地鼠疫菌基因组型、主要基因组型、次要基因组型客观真实反映了鼠疫自然疫源地原生态生

物学特征。

鼠疫菌主要基因组型经历了自然选择,是基因组中稳定遗传下来的优势种群,是维持鼠疫自然疫源性、延续生物群落发挥主要作用的基因组型。而那些在生物进化中对生存环境不适应,可能被淘汰的生物群落,自然降为次要基因组型。鼠疫菌基因组型的划分,对中国鼠疫自然疫源地地区划及自然疫源地生物学规律的认识均具有理论与现实的重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zhou D, Han Y, Song Y, et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: Insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J Bacteriol*, 2004, 186:5138-5146.
- [2] Cui Y, Li Y, Gorge O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2652.
- [3] Cui YJ. Development of genomic polymorphism database and source-tracking system for *Yersinia pestis*. Beijing: Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, 2008. (in Chinese)
崔玉军. 鼠疫耶尔森氏菌基因组多态性数据库及鉴定溯源系统的研究. 北京:军事医学科学院微生物流行病研究所, 2008.
- [4] Li Y, Dai E, Cui Y, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One*, 2008, 3(5):e2166.
- [5] Song Y, Tong Z, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res*, 2004, 11(3):179-197.
- [6] Zhou D, Han Y, Dai E, et al. Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(4):263-269.
- [7] Zhou D, Tong Z, Song Y, et al. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, *microtus*. *J Bacteriol*, 2004, 186(15):5147-5152.
- [8] Wang X, Zhou D, Qin L, et al. Genomic comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by combination of suppression subtractive hybridization and DNA microarray. *Arch Microbiol*, 2006, 186(2):151-159.
- [9] Wang X, Han Y, Li Y, et al. *Yersinia* genome diversity disclosed by *Yersinia pestis* genome-wide DNA microarray. *Can J Microbiol*, 2007, 53(11):1211-1221.
- [10] Li Y, Cui Y, Hauck Y, et al. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of central Asia plague foci. *PLoS One*, 2009, 4(6):e6000.
- [11] Yang RF, Huang PT. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. *Med J Chin PLA*, 2004, 29(3):189-191.

(收稿日期:2012-02-18)

(本文编辑:张林东)