

云南省鼠疫耶尔森菌规律成簇间隔短回文重复序列分型

杨光璨 石丽媛 郭英 张蓉 董珊珊 崔志刚 李伟 王鹏

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 规律成簇间隔短回文重复序列
Genotyping on *Yersinia pestis* isolated from Yunnan province by clustered-regularly-interspaced-short palindromic-repeats Yang Guangcan^{1, 2}, Shi Liyuan¹, Guo Ying¹, Zhang Rong¹, Dong Shanshan¹, Cui Zhigang³, Li Wei³, Wang Peng¹. 1 Yunnan Key Laboratory for Plague Control and Prevention, Yunnan Institute for Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China; 2 Public Health School, Dali University; 3 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Wang Peng, Email: wp030801@126.com
 This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81160354), Industry Fund from the Ministry of Health (No. 201202021) and Basic Research for Application of Yunnan Province (No. 2011FB134).

【Key words】 *Yersinia pestis*; Clustered-regularly-interspaced-short-palindromic-repeats

鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)基因组中包含 3 个规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)位点(YPa, YPb 和 YPc)。本研究对云南省不同生态型鼠疫菌株的 CRISPR 序列进行分析,了解不同鼠疫源地及鼠疫菌株间的相互联系。

1. 材料与方法:

(1)菌株来源及 DNA 制备:选取云南省 171 株鼠疫菌,其中剑川县野鼠菌株 16 株、玉龙县玉龙菌株 7 株、家鼠菌株 148 株。菌株保存于云南省地方病防治所。采用德国 Qiagen 公司的 DNA 提取试剂盒提取鼠疫菌株 DNA,置 -20 °C 保存。

(2)CRISPR 位点 PCR 扩增及测序:3 个 CRISPR 位点引物设计参照文献[1]。PCR 反应体系:Premix Ex Taq 15 μl, 10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl, 去离子水 13 μl, 模板 DNA 1 μl。PCR 扩增:95 °C 5 min; 95 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C

40 s, 30 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物由北京睿博生物技术有限公司进行序列测定。

(3)序列分析:通过 CRISPR 网络服务器(<http://crispr.u-psud.fr/>)中的“CRISPRs Finder”工具获得菌株间区序列信息。运用 Cui 等^[2]提出的命名方法及序列资料命名,确定菌株的基因簇与基因型。

2. 结果:

(1)CRISPR 的间区序列种类:171 株鼠疫菌中 3 个 CRISPR 位点共有间区序列 18 种。YPa 位点包括 a1、a2、a3、a4、a5、a6、a7、a8、a52 及 a73; YPb 位点包括 b1、b2、b3、b4 及 b5; YPc 包括 c1、c2 及 c3。

(2)CRISPR 基因分型:171 株鼠疫菌分为 3 个基因簇(Ca52、Ca8 及 Ca7)和 4 个基因型(35、30、33 及 22 型)。其中 16 株剑川野鼠型鼠疫菌均为基因簇 Ca52, 基因型 35; 7 株玉龙鼠疫菌株为基因簇 Ca7, 基因型 22; 148 株家鼠型鼠疫菌均为基因簇 Ca8, 其中 144 株为基因型 30, 另外 4 株(分离自盈江县)为基因型 33。

3. 讨论:参考 Cui 等^[2]提出的鼠疫菌 CRISPR 可能的进化模式,根据 CRISPR 位点进化规律,推测云南省目前所知的 3 个鼠疫源地的菌株可能由相同的祖先菌进化而来。其中玉龙鼠疫菌株(Ca7)最为古老,处于云南省鼠疫菌株 CRISPR 序列进化的上游。可能的进化过程为:在 Ca7 间区序列组合的基础上, Ca52 在 YPa 位点上随机丢失间区序列 a4 并极性插入新的间区序列 a52, 形成野鼠型菌株间区序列组合;在 Ca7 间区序列组合的基础上, Ca8 在 YPa 位点上极性插入 a8, 在 YPb 位点上极性插入 b5, 即形成基因型 30, 之后在 YPa 位点上再次极性插入 a73, 形成基因型 33, 即家鼠型菌株两种基因型的间区序列组合。

参 考 文 献

- [1] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology*, 2005, 151 (Pt 3): 653-663.
- [2] Cui YJ, Li YJ, Gorge O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2652.

(收稿日期:2014-01-18)

(本文编辑:万玉立)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.08.022

基金项目:国家自然科学基金(81160354); 卫生部行业基金(201202021); 云南省应用基础研究(2011FB134)

作者单位:671000 大理,云南省地方病防治所云南省鼠疫防控技术重点实验室(杨光璨、石丽媛、郭英、张蓉、董珊珊、王鹏); 大理学院公共卫生学院(杨光璨); 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(崔志刚、李伟)

通信作者:王鹏, Email: wp030801@126.com