

甘肃省鼠疫菌株多位点可变数目串联重复序列分析及流行病学特征分析

郭丽民 席进孝 张宏 苗克军 吴斌 葛亚俊 徐大琴 周晓艳

【关键词】 鼠疫菌; 多位点可变数目串联重复序列分析

Genotyping of *Yersinia pestis* by multiple-locus variable number tandem repeat analysis and its epidemiological characteristics in Gansu province Guo Limin, Xi Jinxiao, Zhang Hong, Miao Kejun, Wu Bin, Ge Yajun, Xu Daqin, Zhou Xiaoyan. Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Guo Limin, Email: guolmguolm@126.com

This work was supported by a grant from the National Health Industry Research Projects (No. 201202012).

【Key words】 *Yersinia pestis*; Multiple-locus variable number tandem repeat analysis

本研究利用中国疾病预防控制中心传染病预防控制所鼠疫室选出的 15 对多位点可变数量串联重复序列分析 (MLVA) 引物应用于甘肃省鼠疫菌株的分析。

1. 材料与方法:

(1) 材料: 202 株鼠疫菌均分离于 1962—2009 年甘肃省鼠疫疫源地境内, 保存于甘肃省疾病预防控制中心鼠疫菌库。

(2) MLVA 位点选取和 PCR 引物设计: 将鼠疫菌染色体分成 68 个共线性区段 (板块), 板块之间可以互相移动, 但板块内部稳定 (内部不会发生位置和方向的改变)。将每个板块序列与目前已完成全基因组测序的 9 株鼠疫菌染色体序列进行 BLAST 比对 (除 CO92 外)。根据比对结果, 结合 TRF (tandem repeat finder) 软件, 寻找每个板块内可以用于分型的 MLVA 位点, 然后以完成全基因组测序的首株鼠疫菌株 CO92 (美国) 为模板, 比较重复基序拷贝数有无差别, 选出差异位点 15 个。MLVA 位点确定后, 在其两侧的适当部位设计引物, 序列见表 1。

(3) 方法: 根据苯酚-氯仿法提取鼠疫菌 DNA 并进行 PCR 反应。引物 MLV1、MLV2、MLV3、MLV4 的 PCR 产物使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 其余 11 对引物的 PCR 产物使用 3% 琼脂糖凝胶电泳。对可疑 PCR 结果采取多次重复实验确定。对扩增条带大小相同的菌株, 每对引物随机挑选 2~3 株 PCR 产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。测序结果同 CO92 菌株的相应序列进行比对, 最后确定

表 1 鼠疫菌 MLVA 引物序列

引物名称	序列 (5' ~ 3')	产物长度 (bp)
MLV1		1 367
FP	CCAAGGCCCGTTTCCGGGTG	
RP	CCAACCAACTGCGCCTCT	
MLV2		877
FP	CCTGCGTCTGGGCAAATGGC	
RP	TCGCCGTAAGGCCCATCAACCT	
MLV3		1 200
FP	TCGCCCTGTGCAGTTGCTCG	
RP	GGCAGTGAAGCGGCGACTGT	
MLV4		760
FP	TCCCGGAGAAGGGGAACAGCG	
RP	GGCTGACACCAGAGCAACAACA	
MLV5		251
FP	AGCATCCATCAGGTGAATCCCGC	
RP	GCGGTGAGGATAGGCTGGGGT	
MLV6		240
FP	TCACCTTCACTTATCGACAGCAGCA	
RP	AGCGCCGTTGTTCTGCCAGC	
MLV7		224
FP	AGACACTGACCGCGCCGATG	
RP	TTTGCCTCTTCCCCCTGCC	
MLV8		362
FP	TCTGGCTTTGGCTTCTCTTGCC	
RP	AAGGACGGATCGCCTTACCAG	
MLV9		376
FP	TGGCGGCGGAGTTTTTCGCT	
RP	CCCCGAAAACGTGACTGTCC	
MLV11		449
FP	AGCGTTGACAACCCAATATGTGGAA	
RP	AGGGCAGTCGGGTGGATGCA	
MLV12		334
FP	TGCAGGAAGGCGGCAACTGAG	
RP	GTGACTGCTGCTAATTCGGGCCA	
MLV14		444
FP	CCCCTCACCGACTGGGAATGC	
RP	CGCAAATCATGTCGGCCGCG	
M52		202
FP	GTGGCCTAACCCGTTTTTACCGGTGTAGC	
RP	GAGTCCTGATTCTGTATTGACAAAACCGC	
M59		296
FP	GATAATGGCGGTAGCCGGAATCTGATAATCATC	
RP	GCCAACTCACCTTTTCTGGCGGCTAAGC	
M61		356
FP	GCGCCACAATTAGGGCAACTGC	
RP	GTCATTTACAAAACCATTAAGCGGC	

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.03.023

基金项目: 国家卫生行业科研专项 (201202012)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃省疾病预防控制中心

通信作者: 郭丽民, Email: guolmguolm@126.com

每个实验菌株的重复数。通过BioNumerics 5.0软件对数据进行聚类分析,绘制聚类图。

2. 结果与分析:聚类分析显示,甘肃省202株鼠疫菌分成两群,菌株198272单独成为一个群,其他201株菌(9株甘宁黄鼠型、18株阿尔金山型、47株祁连山型和127株青藏高原型鼠疫菌)聚集成另一群,菌株未呈现地点和年代聚集性等特征。菌株198272生态型为祁连山型,与其他祁连山型的47株鼠疫菌相比独立成为一个群,它们同为旱獭鼠疫源地且亲缘关系较近,但是基因型之间存在较大差异。本研究选择的15个位点未能将古典型和中世纪型、不同生化型的鼠疫菌区分开。MLVA分析位点选择对实验结果影响甚远,Pourcel等^[1]选用25个位点将180株鼠疫菌分成61个基因组型,而且3个生物型分别位于3个主要分支上,并发现中世纪型菌株存在多态性。Klevytska等^[2]采用46个位点,利用毛细管电泳方法成功将94株鼠疫菌进行分型,正确反映了古典型、中世纪型、东方型和田鼠型菌株之间的进化关系。Li等^[3]从88个MLVA位点筛选出“14+12”位点用于鼠疫菌

快速溯源,这些位点互为补充,提高了综合分型的分辨率,区分了近缘菌株,降低了MLVA位点突变造成异源相似的影响,缩短了检测时间和成本。本研究所用MLVA位点未能对甘肃省鼠疫菌进行分型,有必要借鉴上述研究者所选位点进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, et al. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*[J]. BMC Microbiol, 2004, 4: 22.
- [2] Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3179-3185.
- [3] Li Y, Cui Y, Cui B, et al. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66567.

(收稿日期:2014-08-12)

(本文编辑:王玉立)

读者·作者·编者

投稿指南

一、来稿要求

1. 文稿:应具有创新性、科学性、导向性、实用性,论点明确,资料可靠,文字精练,结构严谨,重点突出,数据准确,统计学方法使用恰当。论著类稿件一般不超过6 000字(包括摘要及图、表和参考文献),并附相应的中、英文摘要(包括英文题名、工作单位和汉语拼音书写的作者姓名),英文摘要可略详,摘要包含主要研究的具体数据或阳性发现;讲座、综述、会议纪要、临床病理(例)讨论类文稿字数可视情况而定。

2. 投稿方式:本刊采用中华医学会杂志社信息管理平台在线投、审、修改稿件。请登录本刊网站(<http://chinaepi.icdc.cn>),点击“在线投稿”或“作者登录”,链接至中华医学会远程稿件管理系统(<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>)投稿。注册为作者后选择中华流行病学杂志,下载并填写《中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书》,并签章寄编辑部。来稿需经作者单位主管学术机构审核。投稿清单:①投稿函(授权书);②医学伦理知情同意书;③基金资助项目复印件。其他要求详见本刊稿约。

二、审稿及有关事项

1. 本刊实行以同行审稿为基础的三审制。根据《中华人民共和国著作权法》,并结合本刊实际情况,凡接到收稿回执后3个月内未接到稿件处理情况通知者,则稿件仍在审阅中。作者如欲投他刊,务必事先与本刊编辑部联系,否则将视为一稿多投,作退稿处理。发现一稿两用,本刊将刊登该文系重复发表的声明,在中华医学会系列杂志上通报,并在2年内拒绝以该文第一作者为作者的任何来稿。来稿一律文责自负。

2. 作者对来稿的真实性及科学性负责。依照《中华人民共和国著作权法》有关规定,本刊可对来稿做文字修改、删节。凡有涉及原意的修改,则提请作者考虑。修改稿逾期2个月未寄回者,视作自动撤稿。

3. 来稿一经接受,全体作者亲笔签署《中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书》后,论文的专有使用权即归中华医学会所有;中华医学会有权以电子期刊、光盘版、APP终端、微信等其他方式出版刊登论文,未经中华医学会同意,该论文的任何部分不得转载他处。

4. 普通来稿不收取审稿费,稿件确认刊载后需按通知数额付版面费。刊印彩图者需另付彩图印制工本费。版面费和彩图印制工本费可由作者单位从课题基金、科研经费或其他费用中支付。稿件刊登后酌致稿酬(已含光盘版、网络版稿酬),论著类文章赠当期杂志2本;论著摘要类文章恕不付稿酬,但赠送当期8本杂志。

5. 联系方式:北京市昌平区昌百路155号中国疾病预防控制中心传染病所B115室 中华流行病学杂志编辑部,邮政编码:102206,电话:010-58900730, Email:zhlx1981@sina.com。