

· 实验研究 ·

鼠疫菌 102 kb 基因座一端 IS100 的缺失与 pgm^+ 稳定性的研究

张恩民 海荣 张志凯 俞东征

【摘要】 目的 了解鼠疫菌 102 kb pgm 基因座一端 IS100 的缺失与 pgm^+ 稳定性的关系。方法 采用聚合酶链式反应(PCR)扩增国内各型鼠疫菌 102 kb pgm 基因座色素沉着这一端 IS100 的片段,并选择克隆测序分析。结果 通过 PCR 扩增,其中只能扩增出约 2560 bp 左右条带的生态型,也就是其 102 kb pgm 基因座色素沉着这一端 IS100 的片段缺失,除锡林郭勒高原布氏田鼠型,还有北天山东段型、北天山西段 A、B 型,其 pgm^+ 表型非常稳定,而有一部分菌株的扩增结果为阴性,另一部分菌株扩增出 4492 bp 条带的生态型,扩增出 4492 bp 条带的菌株 102 kb pgm 基因座色素沉着这一端有 IS100,结果为阴性的菌株其整个 102 kb pgm 基因座可能已经丢失,此种情况包括祁连山型、青藏高原型、冈底斯山型、滇西纵谷型等,其 pgm^+ 表型表现出不稳定。结论 鼠疫菌 102 kb pgm 基因座一侧缺失 IS100 的菌株,可具有较稳定的 pgm^+ 表型,而鼠疫菌 102 kb pgm 基因座两侧有 IS100 的菌株, pgm^+ 表型不稳定。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 102 kb pgm 基因座; 插入序列

Study on the relation between the absence of one IS100 in 102 kb pgm locus of *Yersinia pestis* and the stability of pigmentation phenotype ZHANG En-min, HAI Rong, ZHANG Zhi-kai, YU Dong-zheng. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To study the relation between the absence of one IS100 in the 102 kb pgm locus of *Yersinia pestis* and the stability of pigmentation phenotype (pgm^+). **Methods** We amplified the segment including IS100 in 102 kb pgm locus of *Yersinia pestis* that isolated from all ecotypes in China by polymerase chain reaction (PCR). There were 171 strains isolated from 18 ecotypes in this study. One strain was chosen to be cloned and sequenced. **Results** Besides the type of *Microtus brandti*, the types of East-North Tianshan, A and B of West-North Tianshan, *Microtus Qinghai* had one band with about 2560 bp. These strains lost one IS100 in 102 kb pgm locus of *Yersinia pestis*. Their pgm^+ phenotype was stable. Some strains of ecotypes from Qilian Mountain, Qinghai-Tibet Plateau, Gangdisi Mountain, West Yunnan Mountain had no bands in the PCR products. Negative strains would lose the whole 102 kb pgm locus. The others had one band with 4492 bp. These strains had two IS100 which flanked the 102 kb pgm locus but the pgm^+ phenotype was unstable. **Conclusion** *Yersinia pestis* which had only one IS100 would flank the 102 kb pgm locus and had stable pgm^+ phenotype while the *Yersinia pestis* that having two IS100 flanked the 102 kb pgm locus would have unstable pgm^+ phenotype.

【Key words】 *Yersinia pestis*; 102 kb pgm locus; Insert sequence

鼠疫菌在人工培养基上形成菌落时能够吸附氯化血红素或碱性芳香族染料,呈黑褐色的这种性质称作为 Pgm^+ 表型,而 Pgm^- 细胞,由于缺乏这种吸附能力,呈白色菌落。但 pgm^+ 表型很容易突变成 Pgm^- 。有文献报道决定鼠疫菌 pgm^+ 表型的调控基因位于 102 kb pgm 基因座,该基因座的两端各有

一个插入序列(IS)100,这两个结构正向排列的 IS100 可发生同源重组,使整个 102 kb pgm 基因座丢失, pgm^+ 也就突变成了 pgm^- [1,2]。利用鼠疫菌的这一特征,把 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 的突变率作为鼠疫菌分型的一项指标 [1-4],综合糖酵解、营养型、内毒素含量等多项指标将我国分离的鼠疫菌划分为 17 个生态型,其中锡林郭勒高原布氏田鼠型(布氏田鼠型)鼠疫菌的 pgm^+ 表型最稳定 [5,6]。我们对鼠疫菌 102 kb 基因座一端 IS100 的缺失与 pgm^+ 稳定性进

行了探讨,现将结果报道如下。

材料与amp;方法

一、材料

1. 菌株来源:实验所用鼠疫菌株包括全国 17 个生态型和青藏高原青海田鼠型的鼠疫菌株共 171 株,由青海省鼠疫菌种保存中心和内蒙古地方病防治中心提供(表 1)。

表1 实验菌株各生态型情况

生态型	菌株数	生态型	菌株数
祁连山型	11	黄土高原 B 型	3
青藏高原型	10	鄂尔多斯高原型	9
冈底斯山型	10	北天山东段型	14
帕米尔高原型	12	北天山西段 A 型	8
松辽平原 A 型	5	北天山西段 B 型	9
松辽平原 B 型	5	锡林郭勒高原布氏田鼠型	4
滇西纵谷型	12	昆仑山 B 型	3
昆仑山 A 型	10	滇闽居民区型	18
黄土高原 A 型	4	青藏高原青海田鼠型	24

2. 主要试剂:TOPO TA Cloning[®]Kit 为 Invitrogen 公司产品, Taq 酶, 琼脂糖, 分子量标准 DNA/ EcoR I + Hind III, dNTP, 质粒 DNA 小量提取试剂盒分别购自鼎国、赛百盛和华美生物工程公司。其余均为常规试剂。

3. 主要仪器设备:Robocycler[®] Gradient 40 型 PCR 基因扩增仪为 Stratagene[®] 产品、UVIpro GAS7001X 凝胶影像分析系统为 UVI 公司产品。

二、方法

1. 引物的设计和合成:参照文献 [1] 的第 5 对引物,由赛百盛生物工程公司合成,引物 5:上游:5'-GTA CGC GAC TGA ATC TGA TG-3';下游:5'-AGC TCT TTC AAG TGC AGC GG-3'。

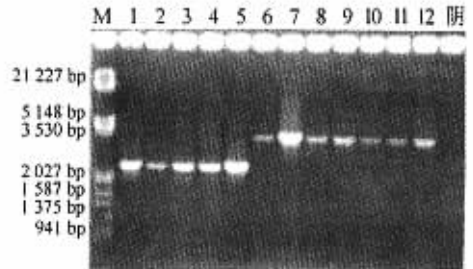
2. 聚合酶链反应(PCR)扩增:总反应体系为 25 μl,其中三蒸水 15.5 μl, 10× reaction buffer (MgCl₂-free) 2.5 μl, MgCl₂ 1.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl, 引物 2 μl, 模板 DNA 1 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl。反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。扩增后,在反应液中加入 6× 溴酚蓝载样缓冲液 5 μl, 混合均匀后电泳, EB 染色, 用凝胶成像系统观察结果。

3. PCR 产物的克隆测序:选取一株与布氏田鼠鼠疫菌的扩增产物相同的鼠疫菌,对其 PCR 产物应用 TOPO TA Cloning[®]Kit 试剂盒进行克隆。测序

由上海博亚生物工程公司完成。

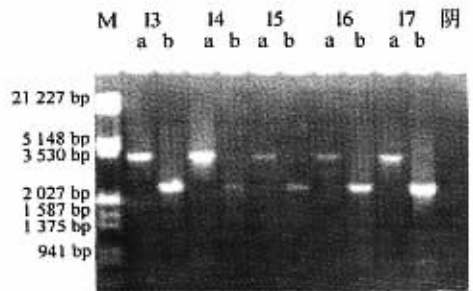
结果

1. PCR 扩增结果:1~17 号菌株各生态型(昆仑山 B 型除外)的扩增结果见图 1、2。



M λDNA EcoR I + Hind III Markers; 阴 阴性对照; 1:锡林郭勒高原布氏田鼠型; 2:北天山东段型; 3:北天山西段 A 型; 4:北天山西段 B 型; 5:青藏高原青海田鼠型; 6:祁连山型; 7:冈底斯山型; 8:青藏高原型; 9:黄土高原 A 型; 10:黄土高原 B 型; 11:滇西纵谷型; 12:松辽平原 A 型

图1 引物 5 扩增 1~12 号菌株结果



M λDNA EcoR I + Hind III Markers; 阴 阴性对照; 13:松辽平原 B 型; 14:帕米尔高原型; 15:鄂尔多斯高原型; 16:滇闽居民型; 17:昆仑山 A 型

图2 引物 5 扩增 13~17 号菌株结果

从扩增的结果上看,有以下几种情况:①只能扩增出约 2560 bp 的条带,且该型的菌株都能扩增出这一结果的是布氏田鼠型、北天山东段型、北天山西段 A、B 型、青海田鼠型;②只能扩增出约 4492 bp 的条带,且该型的菌株都能扩增出这一结果的是黄土高原 A 型;③只有一部分菌株能够扩增出约 4492 bp 的条带,而另一部分菌株的扩增结果为阴性,此种情况为祁连山型、青藏高原型、冈底斯山型、松辽平原 A 型、滇西纵谷型、黄土高原 B 型;④既有能扩增出约 2560 bp 又有能扩增出约 4492 bp 条带的菌株,有松辽平原 B 型;⑤既有能扩增出约 2560 bp 又有能扩增出约 4492 bp 条带的菌株,也有扩增结果为阴性的菌株,包括昆仑山 A 型、帕米尔高原型、鄂尔多斯高原型、滇闽居民型;⑥扩增的结果均为阴性,有昆仑山

B 型。根据序列分析,那些扩增出 2560 bp 条带的菌株,其 102 kb *pgm* 基因座色素沉着这一端 IS100 的片段缺失;而能扩增出 4492 bp 条带的菌株在这一端有 IS100,那些扩增结果为阴性的菌株可能其整个 102 kb *pgm* 基因座已经丢失,也就是在其 102 kb *pgm* 基因座两端都有 IS100。各生态型扩增结果统计见表 2。

表 2 引物 5 扩增结果

菌株类型	菌株数	扩增出条带菌株数		未扩增出条带的菌株数	$\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 突变率 (%) (第 10 代)
		2560 bp	4492 bp		
锡林郭勒高原布氏田鼠型	4	4	0	0	0
北天山东段型	14	14	0	0	0~30
北天山西段 A 型	8	8	0	0	0~20
北天山西段 B 型	9	9	0	0	0
青藏高原青海田鼠型	24	24	0	0	N
黄土高原 A 型	4	0	4	0	0~50
祁连山型	11	0	4	7	85~100
青藏高原型	10	0	5	5	85~100
冈底斯山型	10	0	3	7	80~95
松辽平原 A 型	5	0	4	1	30~100
滇西纵谷型	12	0	5	7	75~100
黄土高原 B 型	3	0	1	2	85~100
松辽平原 B 型	5	2	3	0	0~20
昆仑山 A 型	10	1	2	7	100
鄂尔多斯高原型	9	1	5	3	75~100
帕米尔高原型	12	1	4	7	85~100
滇闽居民区型	18	2	2	14	100
昆仑山 B 型	3	0	0	3	-

N 未查到此项资料; - 参照文献由于菌株无 pgm^+ 细胞而未作实验

2. 克隆和测序的结果: 北天山东段型, 北天山西段 A、B 型, 青海田鼠型鼠疫菌扩增的条带与布氏田鼠鼠疫菌扩增的大小差不多, 且结果相当稳定, 选择一株北天山东段型的菌株, 将其扩增产物进行克隆测序, 通过 DNA star 4.03 软件, 把北天山东段型鼠疫菌、布氏田鼠鼠疫菌(张志凯测序)的扩增序列和 GenBank 发表的 102 kb *pgm* 基因座序列相比较, 结果发现这两型的鼠疫菌的 102 kb *pgm* 基因座的一端即色素沉着部分缺失了一插入序列 IS100。而北天山东段型鼠疫菌和布氏田鼠鼠疫菌也有不同之处, 张志凯等^[5]报道的有一可变数量串联重复序列 CTTTCTAT, 布氏田鼠鼠疫菌要比北天山东段型多出 5 个拷贝, 也就是北天山东段鼠疫菌和 GenBank 发表的 102 kb *pgm* 基因座序列的拷贝数相同, 都是 5 个拷贝。还有一类似于可变数量串联重复序列 CAAGTAAT, 北天山东段型有 3 个拷贝, 布氏田鼠型有 2 个拷贝, 而已发表的 102 kb *pgm* 基因座序列有 4 个拷贝。

讨 论

PCR 扩增结果显示: 我国除锡林郭勒高原布氏田鼠型鼠疫菌外, 还有北天山东段型、北天山西段 A、B 型, 青海田鼠型鼠疫菌株能扩增出的约 2560 bp 的条带来, 测序结果表明, 北天山东段型和布氏田鼠型鼠疫菌 *pgm* 基因座这一端的没有 IS100。根据扩增产物可以推测出北天山西段 A、B 型和青海田鼠型鼠疫菌 *pgm* 基因座这一端也没有 IS100。一般地说, 鼠疫菌 102 kb *pgm* 基因座的两端均有一个 IS100, 这两个 IS100 之间的同源重组可使这个基因座自发的缺失。当这个基因座缺失时, 其 pgm^+ 细胞将突变为 pgm^- 细胞^[1,7]。从表 2 我们可以看到这几个生态型的鼠疫菌 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 第 10 代的突变率都非常小, 这可能是由于 102 kb *pgm* 基因座两侧仅一端有插入序列 IS100, 不能发生同源重组, 使 102 kb *pgm* 基因座保留下来, pgm^+ 表型也就非常稳定。但这还不能完全解释在这几个生态型的菌株中, 仍然有 pgm^+ 突变为 pgm^- 的菌株, 这些现象仍有待于进一步的证实。

都能扩增出结果的生态型还有黄土高原 A 型和松辽平原 B 型。扩增的结果表明, 黄土高原 A 型的全部菌株和松辽平原 B 型半数以上的菌株, 102 kb *pgm* 基因座这一端有 IS100, 但 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 第 10 代的突变率相对不是很高, 只有 0%~50% 和 0%~20%。其 pgm^+ 表型的稳定的原因有待于进一步的研究。

本实验所使用引物的上游在 102 kb *pgm* 基因座的外侧, 而下游则在 102 kb *pgm* 基因座内部, 如果 IS100 同源重组 102 kb *pgm* 基因座丢失, 那么下游引物则在染色体上找不到结合位点, 也就扩增不出结果。那些未扩增出结果的菌株, 很有可能 IS100 发生了同源重组, 也就使 pgm^+ 细胞突变成了 pgm^- 细胞。在有部分菌株扩增不出结果的生态型中, 例如祁连山型、青藏高原型、冈底斯山型、松辽平原 A 型、滇西纵谷型、黄土高原 B 型、昆仑山 A 型、帕米尔高原型、鄂尔多斯高原型、滇闽居民型等均表现出 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 第 10 代的突变率较高。昆仑山 B 型由于无 pgm^+ 细胞而没有 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 第 10 代的突变率的资料, 同时 PCR 扩增均为阴性, 有可能在分离这几株菌时其 102 kb *pgm* 基因座就发生了丢失, 该型菌株原来的 102 kb *pgm* 基因座的两端都有 IS100。这说明了鼠疫菌 102 kb *pgm* 基因座

两个 IS100 同时存在可使 pgm^+ 表型的稳定性降低。但这些又很难解释这样的现象: 昆仑山 A 型和滇闽居民型 $\text{pgm}^+ \rightarrow \text{pgm}^-$ 第 10 代的突变率高达 100%, 而又有能扩增出约 2560 bp 条带的菌株。虽然这样的菌株很少, 但这显然是矛盾的, 因此还有待于进一步的研究。

同一个生态型中既有能扩增出约 2560 bp 又有能扩增出约 4492 bp 条带的菌株, 可能是该生态型正处于一个过渡的阶段, IS100 的插入或缺失也许会使鼠疫菌的某些特征表现的不稳定。比较各型菌株中的分离年代, 未发现规律性。

锡林郭勒高原布氏田鼠型、北天山东段型、北天山西段 A、B 型和青藏高原青海田鼠型鼠疫菌在生化特性上与其他生态型的主要区别是能够酵解鼠李糖, 很有可能是 102 kb pgm 基因座一侧 IS100 的缺失或者该位置自始至终就没有 IS100, 使调控酵解鼠李糖的基因保持了原来的完整状态, 这几个生态型就表现出酵解鼠李糖这一特征^[5]。其他生态型由于 IS100 的插入使这个基因断列, 也就丧失了酵解鼠李糖的这一特征。因此这段基因是否与鼠李糖酵解有关还有待于进一步的证实。

通过我们的研究表明, 鼠疫菌 102 kb pgm 基因座一侧没有 IS100 的菌株, 可具有较稳定的 pgm^+ 表型, 而鼠疫菌 102 kb pgm 基因座两侧有 IS100 的菌株, pgm^+ 表型不稳定。随着分子生物学的发展, PCR 的方法已经广泛的应用到生命科学领域的各

个方面, 具有方便、省时等优点。这相对于 pgm^+ 细胞突变为 pgm^- 细胞突变率测定的方法更具优势, 如果用 PCR 的方法扩增特异性片段代替 pgm^+ 细胞突变为 pgm^- 细胞突变率测定将大大的提高工作效率, 节省人力物力, 同时也会促进鼠疫菌的分型工作。

参 考 文 献

- 1 Fetherston JD, Schuetz P, Perry RD. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102-kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 2693-2704.
- 2 张春华, 俞东征, 主编. 鼠疫病病原学. 中国地方病防治杂志, 1999, 94-101.
- 3 纪树立, 张峻, 刘云鹏, 等. 中国鼠疫菌分型及其生态学流行病学意义. 中华流行病学杂志, 1990, 11 特刊 1 号: 60-66.
- 4 朱锦沁, 张志贵, 姚桂珠, 等. 鼠疫菌 pgm 细胞组成及 pgm^- 细胞突变为 pgm^- 速率的研究. 鼠疫论文专刊. 北京: 鼠疫菌分型鉴定委员会, 中国医学科学院学报, 1983, 31-35.
- 5 张志凯, 俞东征, 张建华, 等. 布氏田鼠鼠疫菌 102 kb pgm 基因座结构研究. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 291-295.
- 6 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.
- 7 Fetherston JD, Perry RD. The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6⁺ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Mol Microbiol*, 1994, 13: 697-708.

(收稿日期 2003-03-20)

(本文编辑: 尹廉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对统计学符号及统计学方法的要求

按 GB 3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写, 常用如下 (1) 样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数仍用 M); (2) 标准差用英文小写 s ; (3) 标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊文小写 ν ; (9) 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值, 如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。关于资料的统计学分析: 对于定量资料, 应根据实验或调查设计类型和资料的条件选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据实验或调查设计类型、列联表中定性变量的性质和分析目的选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 χ^2 检验; 对于回归分析, 应结合专业知识和散布图选用合适的回归类型, 不能盲目套用简单直线回归分析。

本刊编辑部