

文章编号: 1003-4692(2009)01-0055-02

【论著】

# 随机扩增多态性DNA技术用于青藏高原型鼠疫菌的比较

崔百忠

**【摘要】** 目的 对青海、西藏和甘肃省(自治区)境内不同宿主体内分离的21株青藏高原型鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)的基因进行分析,旨在比较不同宿主鼠疫菌之间的关系。方法 采用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术。结果 扩增产物在凝胶电泳上显示的条带,其中16007、28001、01080号菌株相同,且与其余18株菌株存在差别。结论 该实验中不同宿主体内检出的21株青藏高原型鼠疫菌在遗传学上属于同源。

**【关键词】** 随机扩增多态性DNA; 宿主; 青藏高原型鼠疫菌

中图分类号: R254.8 文献标识码: A

**Comparison of Qinghai-Tibet plateau strain of *Yersinia pestis* from different reservoirs by random amplified polymorphism DNA** CUI Bai-zhong. Institute for Endemic Disease Prevention and Control of Qinghai Province, Xining, Qinghai 811602, China

**【Abstract】 Objective** To study the gene of 21 Qinghai-Tibet plateau strains of *Yersinia pestis* isolated from the different reservoirs in Qinghai, Tibet and Gansu, and to know the relationship of these strains from the different reservoir. **Methods** Random amplified polymorphism DNA (RAPD) was used in this study. **Results** The electro-phoretic band of amplified products from 16007, 28001 and 01080 *Y.pestis* strains were similar, but there were difference between three strains and other sample strains. **Conclusion** 21 strains isolated from the different reservoir were homologous in genetics.

**【Key words】** Random amplified polymorphism DNA; Reservoir; Qinghai-Tibet plateau strain of *Yersinia pestis*

随机扩增多态性DNA(RAPD)技术是利用单一的任意序列引物,随机地扩增与靶序列完全或部分配对,以扩增出特异的DNA产物,然后进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,根据电泳条带的不同,即所谓的多态性就可进行基因定位、连锁图建立、品系(种)鉴别等<sup>[1,2]</sup>。由于该技术具有快速灵敏,程序简便等优点,因此在短时间内即被广泛应用于生物学研究领域。青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地位于我国的西南部,包括甘肃、新疆、西藏、青海等省(自治区)的75个县、市、镇(2003年),疫源地面积大,染疫动物种类多,并且鼠疫菌毒力强,是我国动物间和人间鼠疫流行最严重的疫源地之一。纪树立<sup>[3]</sup>(1982年)根据糖酵解能力、脱氮、营养型、Pgm<sup>+</sup>细胞突变为Pgm<sup>-</sup>细胞速率、鼠疫菌素产生、内毒素含量等12项指标,将我国鼠疫菌分为五大群17个型。本研究利用RAPD技术,对从该疫源地的青海、西藏和甘肃省(自治区)境内不同宿主体内分离的21株青藏高原型鼠疫菌的基因进行分析,根据核苷酸水平的多态性比较不同宿主鼠疫菌株之间

的关系,旨在从细菌的基因比较,阐明不同宿主同一生态型鼠疫菌之间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 试验所用21株菌株由本所国家鼠疫菌菌库提供(表1)。

**1.2 主要设备及试剂** PCR扩增仪(Biometra,德国产)、水平电泳仪(北京六一厂)、紫外透射分析仪(上海长明光学电子仪器厂)。Taq DNA聚合酶,上海生工生物工程技术有限公司提供;引物ERIC1(序列为5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')、ERIC2(序列为:5'-AAGTAAGTACTGGGGTGC GCG-3'),由上海生工生物工程技术有限公司合成;分子质量标准由军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验中心合成。一般生化试剂购自北京欣经科生物工程有限公司。

30 μl反应体系中,模板DNA(100 ng/μl)2 μl; Taq DNA聚合酶(上海生工生物工程技术有限公司,5 U/μl)0.5 μl; PCR-master mix 3 μl(100 mmol/L Tris-HCl, pH值8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1% BSA, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 配对引物各0.4 μmol/L, 600 μmol/L dNTPs); 去离子水25 μl。PCR循环条件:预变性94℃ 10 min; 变性94℃ 1 min; 复性37℃ 1 min; 延伸72℃ 1 min,

作者单位:青海省地方病预防控制所鼠疫预防控制科(西宁 811602)

作者简介:崔百忠(1963-),男,副研究员,从事鼠疫防治工作。E-mail:

cbzx@yahoo.com.cn

表1 菌株来源

原始菌号	地区	宿主	生态型
700289	青海省共和县	鼠疫患者	青藏高原型
01078	青海省共和县	鼠疫患者	青藏高原型
15039	青海省玉树县	藏原羚	青藏高原型
03001	青海省河南县	达乌尔鼠兔	青藏高原型
16007	青海省扎多县	猫	青藏高原型
17004	青海省治多县	猫	青藏高原型
28001	青海省昂欠县	獾	青藏高原型
01025	青海省共和县	蚤	青藏高原型
04023	青海省刚察县	蚤	青藏高原型
05013	青海省兴海县	虱	青藏高原型
19007	青海省乌兰县	蜚	青藏高原型
01080	青海省共和县	人蚤	青藏高原型
01081	青海省共和县	旱獭	青藏高原型
12006	青海省门源县	蚤	青藏高原型
31004	西藏自治区安多县	旱獭	青藏高原型
32001	西藏自治区聂荣县	鼠疫患者	青藏高原型
32002	西藏自治区聂荣县	旱獭	青藏高原型
33001	西藏自治区丁青县	旱獭	青藏高原型
35003	西藏自治区比如县	藏系绵羊	青藏高原型
71001	甘肃省阿克塞	旱獭	青藏高原型
72006	甘肃省甘南县	旱獭	青藏高原型

19个循环,然后,变性 94 °C 1 min;复性 45 °C 1 min;延伸 72 °C 1 min,34个循环,延伸 72 °C 5 min。

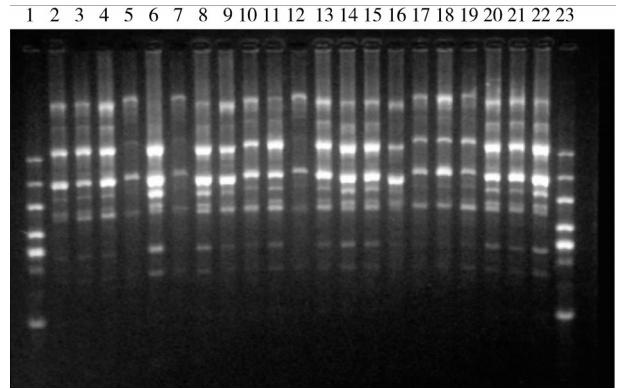
## 2 结果

通过对青海、西藏、甘肃省(自治区)不同宿主体内分离的21株鼠疫菌的DNA进行随机引物扩增,其凝胶电泳所显示的条带,除其中的3株菌略有不同外,其余菌株均相同(图1)。

由图1可以看出,2、3、4、6、8、9、10、11、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22号菌株的电泳条带相同,5、7和12号3株菌的电泳条带相同。

## 3 讨论

通过对青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地内不同宿主体内检出的21株鼠疫菌进行随机扩增,从结果可以看出,虽然实验所用21株鼠疫菌分别自人、啮



1、23. Marker; 2~22. 依次为 700289、01078、15039、03001、16007、17004、28001、01025、04023、05013、19007、01080、01081、12006、31004、32001、32002、33001、35003、71001、72006

图1 21株鼠疫菌随机扩增结果

齿动物、偶蹄目动物、食肉目动物及节肢动物体内检出,但凝胶电泳显示的条带除3株菌略有不同外,其余菌株均相同,并且鼠疫菌菌型的形成,是宿主、媒介甚至还有土壤、植被等外环境对鼠疫菌选择,诱变作用的结果<sup>[3]</sup>。从而说明不同宿主体内检出的青藏高原型鼠疫菌的基因在遗传学上属于同源,只是在长期的进化中,不同菌株间有些微小的变异,呈现菌株的微弱多样性<sup>[4]</sup>。上述结论对于今后青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地内鼠疫菌的判定、分型、疫情判定具有一定的参考意义。

(承蒙军事医学科学院微生物流行病学研究所全军微生物检验研究中心的指导和帮助,特此志谢)

## 参考文献

- [1] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990,18(22): 6531-6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990,18(24): 7213-7218.
- [3] 纪树立. 鼠疫[M]. 北京:人民卫生出版社,1988.
- [4] 崔百忠. 随机扩增多态性DNA技术检测不同地区田鼠型鼠疫耶尔森氏菌基因结构[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(4): 344-345.

[收稿日期:2008-07-27]