

突发疫情中炭疽芽孢杆菌的分离及鉴定

王争强, 何君, 苏裕心, 朱虹, 端青*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要 对疑似炭疽感染病牛牛肉标本和牛血污染土壤标本进行了病原菌分离, 经菌落形态和菌体形态观察、血清学实验和生化鉴定, 证明分离到的细菌为炭疽芽孢杆菌。为进一步了解其特性, 分别用保护性抗原、水肿因子和荚膜基因特异性引物对 2 株菌进行 PCR 扩增。结果显示, 这两株菌有两个毒力相关质粒 pX01 和 pX02, 为有毒株。序列测定表明, 这两株菌基因间同源性达 99%, 这两株菌与 GenBank 中炭疽芽孢杆菌 A2012 株、Ames Ancestor 株和 A16R 疫苗株同源性达 99%。

关键词 炭疽芽孢杆菌; 分离; 生化鉴定; 基因克隆; PCR 扩增

中图分类号 Q939 R517.2 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2006)03-0460-03

炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)是人类历史上第一个被发现的病原菌^[1]。炭疽芽孢杆菌革兰氏染色呈阳性, 能以芽孢形态在土壤中长期存活, 是食草动物的一种重要致病菌, 并通过呼吸道、消化道和皮肤接触感染人类, 以皮肤型炭疽最常见。由于炭疽芽孢在环境中的抵抗力极强, 易生产, 在军事上一直被列为头号生物战剂^[2]。炭疽芽孢杆菌有两个毒力相关质粒 pX01 和 pX02。pX01 分子量为 110MDa (185kb), 携带 *cya*、*lef* 和 *pag* 基因, 分别编码水肿因子(EF)、致死因子(LF)和保护性抗原(PA); pX02 分子量为 60MDa (95kb), 携带 *capABC* 和 *dep* 基因, 分别编码荚膜和参与其生物合成的酶^[3-5]。以这两种质粒为模板进行聚合酶链式反应(PCR), 可以用于炭疽芽孢杆菌有毒株的检测。该方法灵敏度高, 特异性好, 可以快速得到结果。

2005 年 6~7 月我国河北承德市围场县发生了一起疑似炭疽的疫情。几名村民屠宰病牛后食用牛肉, 出现发热、伤口肿胀呈黑色坏死结痂、腋下淋巴肿大等症状。本实验对上述疫情的送检标本(一份牛肉标本和一份牛血污染土壤标本)进行了病原体分离, 并用生化和分子生物学方法对其进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 参考菌株 炭疽芽孢杆菌疫苗株 A16R 和弱毒株 17003-59 均由本实验室保存, 其中 A16R 为 pX01⁺/pX02⁻, 17003-59 为 pX01⁺/pX2⁺。

1.1.2 主要试剂及仪器 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA 切胶回收纯化试剂盒、pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司, X-gal 和 IPTG 购自 Amresco 公司, 热循环仪为 ABI 公司 GenAmp2700

型, 抗 DNA 胶体金溶液由本实验室制备, API 细菌生化鉴定仪和 API 50CHB/E 试纸条为法国梅里埃公司产品。

1.1.3 PCR 引物 ①保护性抗原(PA)基因引物序列如下^[6]: PA-1 5'-TTTCATTATGATAGAAATAAC-3'; PA-2: 5'-TTATCCTA TCTCATAGCCTTTTTTAG-3'; ②水肿因子(EF)基因引物序列如下^[2]: EF-1 5'-CAACGAAGTACAATACAAGAC-3'; EF-2: 5'-TAA ATCTACCTGTCATCTCC-3'; ③荚膜基因引物序列如下^[2]: CA-1 5'-TGCTTTAGCGGTAGCAGAGGCT-3'; CA-2: 5'-TGGACGCAT ACGAGACATAAT-3'。上述 3 对引物扩增产物分别为 423bp、494bp 和 397bp, 引物由北京奥科生物技术公司合成。

1.2 病原体的分离及鉴定

1.2.1 样本的处理及病原菌的分离 病牛牛肉标本和血污染土壤标本由承德市围场县疾病预防控制中心于 7 月 11 日送至本实验室。标本用无菌生理盐水浸泡, 充分振荡, 然后静置 15min, 取上清, 60℃ 加热 30min, 取上清划线接种血平板, 37℃ 培养 24h。挑选毛玻璃样、粗糙型单菌落用炭疽杆菌特异性抗体进行玻片凝集试验, 同时进行革兰氏染色。玻片凝集试验阳性和革兰氏阳性菌落扩大培养后进行下一步鉴定。

1.2.2 生化试验 挑取纯培养的菌落, 稀释菌液至 2 个麦氏单位, 使用 API 50CHB/E 试纸条进行生化鉴定, 详细步骤按使用说明书进行, 24h 后观察鉴定结果。

1.3 DNA 模板的提取

1.3.1 细菌的裂解 挑取菌落加入 100 μ L 生理盐水, 同时加入 100 μ L 6mol/L 碘酸钠, 煮沸 10min, 10000 \times g 离心 10min, 取 5 μ L 上清用作 PCR 反应的模板。

1.3.2 细菌 DNA 的纯化 取上述裂解液 200 μ L, 与 100 μ L 标记有抗 DNA 单抗的胶体金溶液混合^[7], 室温反应 30min, 12000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 30 μ L 无菌纯水重悬, 用

基金项目 国家科技攻关计划课题(2003BA712A05-03)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948560; E-mail: zduanq@nic.bmi.ac.cn

作者简介 王争强(1981-), 男, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: wangzq008@yahoo.com.cn

其他作者 宋立华

收稿日期 2005-08-22; 接受日期 2005-09-19; 修回日期 2006-02-10

作 PCR 反应模板。

1.4 PCR 扩增及序列分析

PCR 反应体系 经过胶体金纯化的模板 5 μ L, Taq DNA 聚合酶 1U, 10 \times PCR 反应缓冲液 2 μ L, dNTP (含 4 种核苷酸各 2.5mmol/L) 3 对基因的上下游引物 10 μ mol/L 各 0.4 μ L 加水至 25 μ L。PCR 反应条件: ① PA 和 EF 引物扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 2min 94 $^{\circ}$ C 40s 58 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 40s 35 个循环 72 $^{\circ}$ C 7min。② 荚膜基因引物扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 2min 94 $^{\circ}$ C 30s 48 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 45s 35 个循环 72 $^{\circ}$ C 7min。反应结束后 取 6 μ L 产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳 观察结果。

PCR 扩增产物纯化后与 T 载体连接 挑取阳性克隆测序, 测序结果与 GenBank 中序列进行 BLAST 比对 用 Clustal W 软件进行多重序列分析 比对结果用 GeneDoc 软件进行编辑。

2 结果

2.1 病原菌的分离及形态学观察

在血培养基上菌落呈灰白色, 粗糙毛玻璃状, 有突出的小尾, 不溶血。菌体革兰氏染色阳性, 长杆状, 呈链状排列,

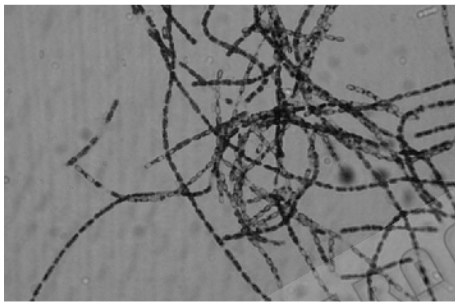


图 1 炭疽芽孢杆菌细胞的显微镜照片 (1000 \times)

Fig.1 Morphology of *Bacillus anthracis* under the light microscope (1000 \times).

为典型的炭疽芽孢杆菌形态。显微镜观察结果如图 1 所示。

2.2 生化鉴定

经过稀释的菌液用 API 50CHB/E 试纸条进行生化鉴定, 24h 后记录结果 并用 API V3.3.3 软件对结果进行分析。从分析结果可以得知, 分离菌株可发酵核糖、半乳糖、葡萄糖、N-乙酰-葡糖胺、熊果甙、七叶灵、柳醇、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、淀粉、肝糖, 分解利用赖氨酸、鸟氨酸、柠檬酸钠、精胺酸、硫代硫酸钠、尿素、明胶等 符合炭疽芽孢杆菌的生化特性。

2.3 PCR 反应结果

PA、EF 和荚膜基因 3 对引物分别对两株分离菌进行 PCR 扩增 结果显示分别在 423bp、494bp 和 397bp 处出现扩增条带, 阴性对照无扩增条带。PCR 产物与 T 载体连接后进行序列测定 并将测序结果与 GenBank 进行 BLAST 比对 结果发现两株分离菌与 GenBank 中已登录的炭疽芽孢杆菌 A2012 株^[8]、Ames Ancestor 株和 A16R 疫苗株相关基因同源性高达 99% PA 基因比对结果见图 2。两株分离菌相关基因序列经 Clustal W 分析 其基因同源性也高达 99%。

3 讨论

炭疽芽孢杆菌是炭疽病的病原体, 炭疽芽孢对外界抵抗力强, 可在土壤中长期存活。牛、羊等食草动物嚼食草根、翻动泥土时通过消化道或呼吸道感染土壤中的炭疽芽孢而发病 人类主要通过接触炭疽病畜毛皮和食肉而感染, 也可以通过吸入含有炭疽芽孢的粉尘或气溶胶而感染。人类感染炭疽后很少相互传播, 因而以散发病例和小暴发为主。人间炭疽病例以皮肤炭疽最为常见, 肺炭疽及肠炭疽病死率高^[9]。2005 年 6~7 月我国河北承德市围场县发生的这一起炭疽疫情 既几名村民剥解病死牛后感染。本实验室对围场县疾病预防控制中心送来的病死牛牛肉标本及杀牛处血土标本

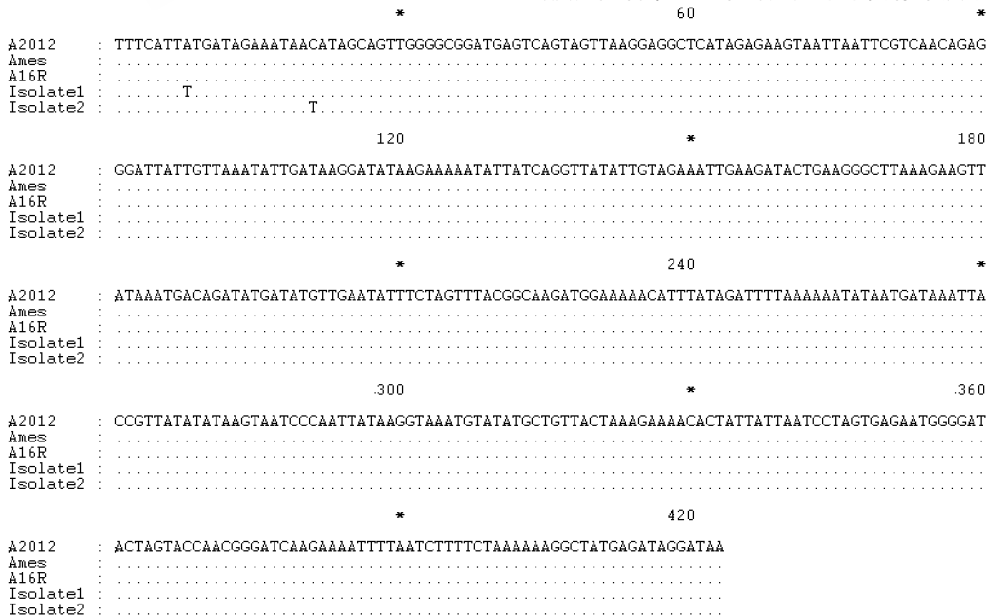


图 2 两株分离菌 PA 基因与参考菌株序列比对结果

Fig.2 Alignment result of PA gene of *Bacillus anthracis*.

进行了病原体分离,得到2株细菌。经菌落形态、菌株形态、血清学实验(待发表)和生化鉴定为炭疽芽孢杆菌。

为了进一步验证分离的菌株为炭疽芽孢杆菌,并证明为有毒株,我们用PCR方法对保护性抗原(PA)、水肿因子(EF)和荚膜基因进行了扩增。PA基因和EF基因位于质粒pX01上,而荚膜基因位于pX02质粒上。大部分炭疽芽孢杆菌携带这两种质粒,同时有可能发生突变,导致某一质粒丢失。以质粒基因为模板设计引物时,一定要设计两对以上针对不同质粒基因的引物才能保证不漏检^[2-5]。实验中,我们选取了炭疽芽孢杆菌疫苗株A16R(pX01⁺/pX02⁻)和弱毒株17003-59(pX01⁺/pX02⁺)作为阳性对照。PCR扩增结果和序列分析表明,我们分离到的2株细菌为炭疽芽孢杆菌,有pX01和pX02两种质粒,为有毒株;3个基因扩增产物序列与GenBank中的炭疽芽孢杆菌A2012株、Ames Ancestor株和疫苗株A16R序列同源性非常高,达到99%,证明该菌在环境中并未发生变异,2株菌相应基因扩增产物序列比对显示只有1~3个碱基的差异,证明牛肉和血土中分离到的2株菌为同一株。

炭疽芽孢杆菌为革兰氏阳性菌,不易用煮沸法直接裂解,即使加入NaI裂解菌体,仍不能直接进行PCR反应,可能是由于裂解液中含有较多的变性蛋白、RNA以及其它菌体成分^[10],抑制PCR反应。本实验中,我们将两份标本NaI裂解后的上清用标记有抗DNA抗体的免疫胶体金进行了纯化,PCR扩增结果显示两份标本分离菌出现目的条带。标有抗DNA抗体的免疫胶体金可以将DNA进行富集,并且可以通过洗涤有效去除抑制剂,提高PCR扩增的敏感性。

Isolation and identification of *Bacillus anthracis* in an accidental case

WANG Zheng-qiang, HE Jun, SU Yu-xin, ZHU Hong, DUAN Qing*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: During June to July 2005, a few farmers in Chengde county of Hebei province were got ill after eating beef of sick cattle. The cattle could be infected with *Bacillus anthracis*. One beef sample and one soil sample contaminated with cattle blood were collected and used for pathogen isolation and identification in laboratory. Two bacteria strains were isolated from beef and soil sample, respectively, and showed typical morphology of *Bacillus anthracis* on blood agar and under microscope with Gram stain. The two bacteria strains were also positive to standard positive serum of *Bacillus anthracis* by slide agglutination test. Biochemical characteristics of the two bacteria were tested using API CHB/E strip and analyzed by API software (version 3.3), result showed that the two isolated bacteria were *Bacillus anthracis*. Polymerase chain reaction (PCR) was used to further characterize the two isolated bacteria strains. Three pairs of primer were designed and used for PCR, and these primers exactly matched the protective antigen gene, edema factor gene and capsule gene, respectively. By analyzed on agarose gel, PCR products were 423bp, 494bp and 397bp, respectively, and this result showed that the two isolated bacteria contained two plasmids, pX01 and pX02, which encoded anthrax toxin and capsule, respectively. Anthrax toxin and capsule were very important virulent factors for *Bacillus anthracis*. PCR products were purified and then cloned to T vector, positive clone was chose and sequenced. By BLAST with GenBank, sequence of the three genes of the two bacteria strains had a similarity of 99% with *Bacillus anthracis* A2012 strain, Ames Ancestor strain and A16R strain.

Based on results of colonial morphology, serum test and biochemistry characterization, the two bacteria strains are *Bacillus anthracis*. They can encode anthrax toxin and capsule, and are virulent to animal and human.

Keywords: *Bacillus anthracis*; Isolation; Identification; Gene clone; PCR amplification

参 考 文 献

- [1] 何 湘,黄留玉. 炭疽杆菌治病性研究进展. 微生物学通报, 2004, 31(4):101-105.
- [2] 王 津,宋亚军,郭兆彪,等. 用复合PCR检测炭疽芽孢的研究. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(6):52-54.
- [3] Ramisse V, Patra G, Garrigue H, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pX01 and pX02 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 145(1):9-16.
- [4] Reif TC, Johns M, Pillai SD, et al. Identification of capsule-forming *Bacillus anthracis* spores with the PCR and novel dual-probe-hybridization format. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:1622-1625.
- [5] Pannifier AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, 2001, 414:229-233.
- [6] 葛 猛,徐俊杰,李 冰,等. 炭疽菌保护性抗原受体结合区的表达与纯化. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 10(24):799-801.
- [7] 裴杰萍,何 君,檀 华,等. 免疫胶体金法提取纯化环境标本中细菌DNA技术的建立. 微生物学通报, 2005, 32(2):87-90.
- [8] Read TD, Salzberg SL, Pop M, et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science*, 2002, 296:2028-2033.
- [9] 展德文,王 凡,王令春,等. 炭疽芽孢杆菌疫苗研究进展. 微生物学报, 2005, 45(1):149-152.
- [10] 杨瑞馥. 从土壤中分离DNA的研究进展. 微生物学免疫学进展, 2000, 28(2):57-61.