

## 两株炭疽芽胞杆菌 MLST 新序列型 (ST)

左庭婷, 李岩伟, 韩雪莲, 何君, 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:** 【目的】2 株炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 17003-14 和 17003-32 的多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 研究。【方法】选取 *B. anthracis* 基因组 7 个管家基因位点 *glpF*、*gmk*、*ilvD*、*pta*、*pur*、*pycA* 和 *tpi* 进行 PCR 扩增、测序, 与 MLST 数据库中的等位基因序列进行比对, 确定菌株的序列型 (sequence type, ST)。【结果】*B. anthracis* 17003-14 和 17003-32 的等位基因编号分别为 113、31、1、43、1、53、7 和 113、31、1、43、1、53、37, 比对结果显示这 2 株细菌的等位基因编号组合未见报道。【结论】17003-14 和 17003-32 为新 ST 菌株, 已被 MLST 数据库确认, 注册号 (pubMLST id) 分别为 id-1053 和 id-1054。

**关键词:** 炭疽芽胞杆菌, 多位点序列分型, 序列型, 基因分型

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 01-0120-04

多位点序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 是一种基于核酸序列测定的基因分型方法。该方法通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增多个“管家基因” (housekeeping gene) 内部片段并测定其序列, 分析菌株的变异。MLST 一般选取 6-10 个管家基因片段 (长度约为 400-600 bp) 进行扩增, 产物测序后经软件分析, 可得到各位点等位基因的种类编号, 不同的编号排列即为菌株的序列型 (sequence type, ST)<sup>[1]</sup>。

MLST 自 1998 年首次用于脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 的研究后, 已发展应用到 30 多种病原菌的进化、遗传、毒力、药敏及溯源鉴定研究中<sup>[1]</sup>。相对其它核酸分析方法, MLST 仅涉及 PCR 扩增和核酸测序技术, 便于实验室开展研究; 且在无细菌纯培养物的情况下, 可直接从临床样本中扩增出特定位点基因片段进行分析。MLST 能直观反映出等位基因的变异情况, 测序结果明确无歧

义、重复性好, 可使全球范围内的实验室实现数据交流与共享。随着核酸测序成本的逐渐降低, 该方法已得到广泛应用<sup>[2]</sup>, 目前 MLST 数据库已有几十种细菌和真菌的研究数据<sup>[3]</sup>。

炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 不仅是引发炭疽的病原菌, 还被联合国《禁止生物武器公约》列为生物战剂, 也是公认的生物恐怖剂。*B. anthracis* 的基因分型研究对于生物危害突发事件中菌株的溯源意义重大, 而 MLST 是重要的基因分型方法<sup>[4-7]</sup>。根据 MLST 数据库的资料和文献报道, 针对芽胞杆菌有 5 种不同的分析方案, 每种方案包含的等位基因不尽相同<sup>[4, 7-9]</sup>。其中 Priest 的方案应用最广, 有 7 个管家基因位点: *glpF*、*gmk*、*ilvD*、*pta*、*pur*、*pycA* 和 *tpi*, 被应用于该方案的菌株达 1092 株<sup>[3, 10]</sup>。参照 Priest 的方案对本实验室保藏的 *B. anthracis* 菌株进行 MLST 分型, 以作为今后菌株溯源的本底资料。分型结果显示, 17003-14 和 17003-32 为新 ST 菌

\* 通信作者。Tel: +86-10-66948560; Fax: +86-10-66948473; E-mail: duanq@nic.bmi.ac.cn

作者简介: 左庭婷 (1978-), 女, 重庆市人, 实验师, 博士, 研究方向为细菌检验及细菌分子生物学。E-mail: zuott0307@gmail.com

收稿日期: 2011-07-26; 修回日期: 2011-11-08

株, 本文对这 2 株细菌的 MLST 分型进行报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与培养基:** 菌株 17003-14 和 17003-32 从我国东北地区治病牛体中分离, 经生理生化分析、血清学分析、毒力基因检测, 鉴定为 *B. anthracis*, 分离菌株由本实验室保藏。培养基为英国 OXOID 公司普通营养琼脂。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PCR 扩增体系及相关试剂购于宝生物工程有限公司; 水平核酸电泳仪为美国 Pharmacia 生产的 EPS601; Veriti 96well PCR 仪购于美国 ABI 公司; 引物合成及测序由北京奥科生物

技术有限公司完成。

### 1.2 引物设计、PCR 扩增及测序

根据 MLST 数据库和文献报道<sup>[3, 7]</sup>, 确定 7 对针对 *B. anthracis* 的引物序列(表 1), 交付北京奥科生物技术有限公司进行合成。扩增体系为 EX *Taq* 50  $\mu$ L 体系: 10  $\times$  EX Buffer 5  $\mu$ L、dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L、模板 50 ng、上下游引物 (20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L、EX *Taq* (10 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min、30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳 (TAE 缓冲液体系, 8 V/cm) 检验各基因位点的扩增产物, 纯化后进行测序, 测序引物与扩增引物相同。

表 1 *B. anthracis* 基因组 7 个等位基因 MLST 扩增引物<sup>[3, 7]</sup>

Table 1 Primers for the seven loci of *B. anthracis*

Primer	Oligo (5'→3')	Size/bp	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	GC%	Amplified length/ bp
glpFa-F	GCGTTTGTGCTGCTGTAAGT	20	60.0	50.0	372b
glpF-R	CTGCAATCGGAAGGAAGAAG	20	60.0	50.0	
gmk-F	ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG	21	55.9	42.9	504
gmk-R	GCAATGTTCAACCAACCACAA	20	58.0	45.0	
ilvD-F	CGGGCAAACATTAAGAGAA	20	58.0	45.0	393
ilvD-R	GCTTCTGCTCGTTTCCATTC	20	60.0	50.0	
pta-F	GCAGAGCGTTTAGCAAAAAGAA	21	55.9	42.9	414
pta-R	TGCAATGCGAGTTGCTTCTA	20	58.0	45.0	
pur-F	CTGCTGCGAAAAATCACAAA	20	56.0	40.0	348
pur-R	CTCACGATTCGCTGCAATAA	20	58.0	45.0	
pycA-F	GCGTTAGGTGAAAACGAAAAG	20	60.0	50.0	363
pycA-R	CGCGTCCAAGTTTATGGAAT	20	58.0	45.0	
Tpi-F	GCCCACTAGCACTTAGCGAC	20	64.0	60.0	435
Tpi-R	CCGAAACCGTCAAGAATGAT	20	58.0	45.0	

<sup>a</sup> Abbreviations: *glpF*, glycerol uptake facilitator protein; *pta*, phosphate acetyltransferase; *pur*, phosphoribosyl aminoimidazolecarboxamide; *pycA*, pyruvate carboxylase; *tpi*, triosephosphate isomerase; *gmk*, guanylate kinase; *ilvD*, dihydroxy-acid dehydratase.

<sup>b</sup> The *glpF* fragment has been shortened from 381 (as originally published in Priest et al. 2004) to 372 bp by trimming the first 9 bp. This provides better sequencing reads, as the trimmed region is close to the primer used for PCR amplification and sequencing<sup>[3]</sup>.

### 1.3 等位基因特征的确定及 ST 分析

登录 MLST 数据库 (<http://pubmlst.org/bcereus>), 将扩增片段测序结果与数据库已知信息比对, 确定菌株的等位基因种类编号及 ST。

示, 这 2 株 *B. anthracis* 的等位基因编号为新组合, 即新 ST。

表 2 2 株 *B. anthracis* 基因组 7 个管家基因序列种类编号及 ST 特征

Table 2 Allele numbers at the seven loci assigned for entire genes

Strain No.	Allele No. at the following loci						
	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>
17003-14	113	31	1	43	1	53	7
17003-32	113	31	1	43	1	53	37

## 2 结果

### 2.1 管家基因 ST 分析

17003-14 和 17003-32 的 7 个管家基因扩增片段测序结果与 MLST 数据库等位基因信息比对, 得到 2 株细菌的序列种类编号(表 2)。比对结果显

我们将 17003-14 和 17003-32 的资料及各等位基因序列编号通过互联网录入 MLST 数据库, 已被

接收并确认为新 ST,注册号 (pubMLST id) 为 id-1053 和 id-1054。

## 2.2 等位基因突变点比较及多样性

利用 Vector NTI Advance 软件的 AlignX 模块分析各位点序列,结果显示,7 个等位基因中,除 *pur* 基因没有发生突变外,17003-14 和 17003-32 与 ST1 菌

株仅有 2 个等位基因 (*ilvD* 和 *pur*) 相同,其它 5 个均不相同:*glpF* 位点序列有 10 个突变点,*gmk* 有 7 个突变点,*pta* 有 10 个突变点,*pycA* 有 18 个突变点,*tpi* 有 5 个突变点;17003-14 和 17003-32 之间有 6 个相同,仅有 *tpi* 位点不同:有 1 个突变点。各位点的突变比例见表 3。

表 3 MLST 等位基因核苷酸突变位点信息

Table 3 Genetic diversity at the seven loci examined in the study

Locus	Fragment/bp	Average G + C/% *	Conserved nucleotide site (%)	Variable nucleotide site (%)
<i>glpF</i>	372	38.40	362/372 (97.3)	10/372 (2.7)
<i>gmk</i>	504	37.90	497/504 (98.6)	7/504 (1.4)
<i>ilvD</i>	393	45.00	393/393 (100)	0/393 (0)
<i>pta</i>	414	41.50	404/414 (97.6)	10/414 (2.4)
<i>pur</i>	348	39.40	348/348 (100)	0/348 (0)
<i>pycA</i>	363	39.40	345/363 (95.0)	18/363 (5)
<i>tpi</i>	435	44.00	430/435 (98.9)	5/435 (1.1)

\* Average G + C (%) equals the mean value of the fragment from 17003-14 and 17003-32.

## 3 讨论

MLST 数据库 (<http://pubmlst.org/bcereus/>) 是国际上公认的登载微生物序列分型信息的重要数据库,共登录 *B. anthracis* 34 株,其中 20 株为 ST1,包括 *B. anthracis* “金标准株”Ames。本研究将发现的 2 种新 ST 菌株 17003-14 和 17003-32 登录注册后,该库关于 *B. anthracis* 的 ST 更新为 7 种,分别是 ST1、ST2、ST3、ST134、ST135、ST552 和 ST553。

截止 2011 年 7 月,MLST 数据库中仅有 1 株 *B. anthracis* 来自中国(菌株号 K0610/A0034),由牛津大学的 Maiden 于 2002 年 6 月注册,该株细菌为 ST1,1990 年分离自患炭疽的家畜<sup>[3]</sup>。本研究中的 17003-14 和 17003-32 为未见报道的新 ST 菌株,分别为 ST552 和 ST553,注册号分别为 id-1053 和 id-1054。

## 参考文献

- [1] Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60:561-588.
- [2] Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (Web Server issue): W728-733.
- [3] <http://pubmlst.org/bcereus/> and <http://mlstoslo.uio.no/>.
- [4] Kim K, Cheon E, Wheeler KE, Youn Y, Leighton TJ, Park C, Kim W, Chung SI. Determination of the most closely related bacillus isolates to *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2005, 78 (1): 1-14.
- [5] Tourasse NJ, Helgason E, Klevan A, Sylvestre P, Moya M, Haustant M, Okstad OA, Fouet A, Mock M, Kolsto AB. Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology*, 2010, 28 (2): 236-244.
- [6] Tourasse NJ, Okstad OA, Kolsto AB. HyperCAT: an extension of the SuperCAT database for global multi-scheme and multi-datatype phylogenetic analysis of the *Bacillus cereus* group population. *Database (Oxford)* 2010, 2010:baq017.
- [7] Priest FG, Barker M, Baillie LW, Holmes EC, Maiden MC. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (23): 7959-7970.
- [8] Didelot X, Barker M, Falush D, Priest FG. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32 (2): 81-90.
- [9] Barker M, Thakker B, Priest FG. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245 (1): 179-184.
- [10] Tourasse NJ, Kolsto AB. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acids Research*, 2008, 36 (Database issue): D461-468.

## Two new sequence type isolates of *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing

Tingting Zuo, Yanwei Li, Xuelian Han, Jun He, Qing Duan\*

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

**Abstract:** [Objective] To define the sequence type (ST) isolates of *Bacillus anthracis* by multilocus sequence typing (MLST). [Methods] Fragments of seven housekeeping genes (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, and *tpi*) were amplified by PCR using the standard primers as described on the website for MLST of *Bacillus* and the sequences were compared with existing allele sequences on the MLST website. [Results] Two novel allele combinations of the seven loci were found in two isolates 17003-14 and 17003-32. [Conclusion] Two novel ST isolates of *B. anthracis* were identified by this study and confirmed by the MLST website, and the pubMLST ids were id-1053 and id-1054.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*, multilocus sequence typing, sequence type, genotyping

(本文责编:王晋芳)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948560; Fax: +86-10-66948473; E-mail: duanq@nic.bmi.ac.cn

Received: 26 July 2011 / Revised: 8 November 2011

### 《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起, 本刊采用“稿件远程处理系统”, 全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿: 请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿, 请先进行“注册”, 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿, 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码, 请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执: 编辑部看到远程投稿后, 当日或者次日给作者发“收稿回执”, 通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审: 编辑看到远程投稿后, 还要对稿件进行内审。内审会有 2 个结果, 直退或受理, 请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样: 为了保护知识产权, 务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板); 为了核实文中的图、表等内容, 还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费: 150 元审稿费(2011 年 3 月由原来的 100 元调为 150 元)。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理, 务必通过邮局汇款, 切忌夹在纸样材料中随信邮寄! 【为了便于查找, 请在汇款单上注明“稿件编号”。】