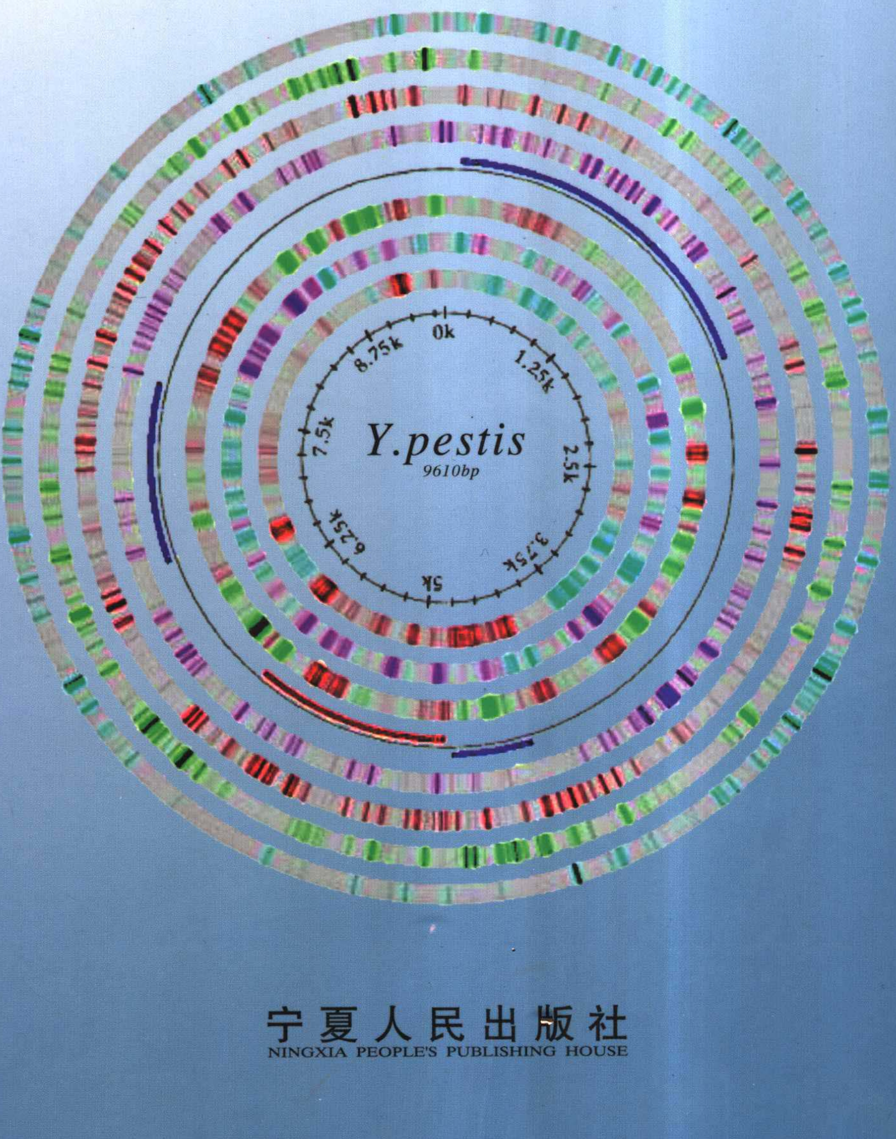
鼠疫高级细菌学

SHUYI GAOJI XIJUN XUE

张 涛 冯志勇 邱俊荣 主编

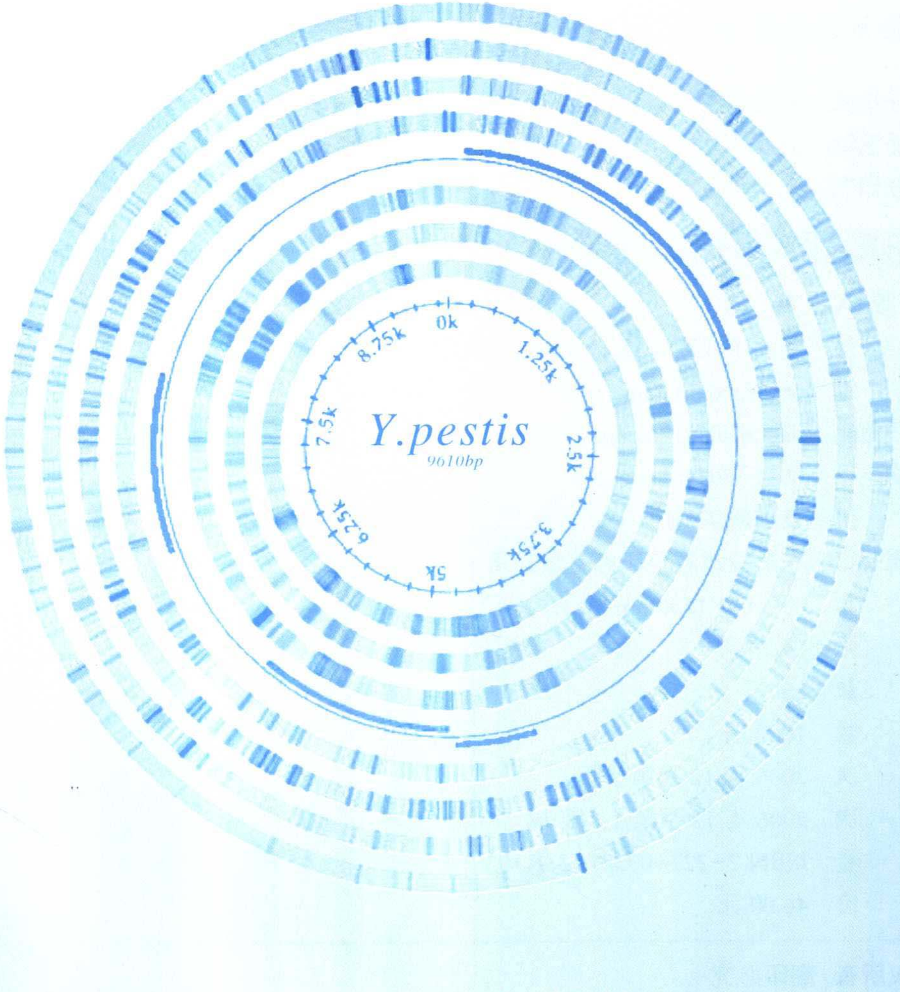


宁夏人民出版社
NINGXIA PEOPLE'S PUBLISHING HOUSE

鼠疫高级细菌学

SHUYI GAOJI XIJUN XUE

张 涛 冯志勇 邱俊荣 主编



宁夏人民出版社
NINGXIA PEOPLE'S PUBLISHING HOUSE

图书在版编目(CIP)数据

鼠疫高级细菌学 / 张涛, 冯志勇, 邱俊荣主编. —银川: 宁夏人民出版社, 2006. 12
ISBN 7-227-03381-3

Ⅰ.鼠... Ⅱ.①张...②冯...③邱... Ⅲ.鼠疫—细菌学 Ⅳ. R516. 8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 161978 号

鼠疫高级细菌学 张 涛 冯志勇 邱俊荣 主编

责任编辑 吴月霞
封面设计 万明华
责任印制 来学军

宁夏人民出版社 出版发行

出 版 人 高 伟
地 址 银川市北京东路 139 号出版大厦(750001)
网 址 www.nxcbn.com
电子信箱 nxcbmail@126.com
邮购电话 0951-5044614
经 销 全国新华书店
印刷装订 宁夏捷诚彩色印务有限公司
开 本 880mm×1230mm 1/16
印 张 14.25
字 数 350 千
印 数 1000 册
版 次 2006 年 12 月第 1 版
印 次 2006 年 12 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 7-227-03381-3/R·93
定 价 46.00 元

版权所有 翻印必究

作者简介

张涛，男，汉族，公共卫生主任医师。1965年6月生，宁夏中宁县人，1988年毕业于青海医学院医学系鼠疫专业。现任广东省湛江鼠疫防治研究所副所长，参与起草和修订《中华人民共和国鼠疫行业标准》和《中华人民共和国炭疽行业标准》。1988年8月~2004年3月在宁夏疾病预防控制中心工作，曾任鼠疫预防控制科（代）科长。主要从事鼠传疾病及有害生物控制的研究工作。在核心医学期刊上发表论文40余篇。作学术报告及讲座30余场，培训1000多人次。中国预防医学科学院第二届鼠疫高级研究班毕业。1997年被卫生部授予地方病专业第一批“跨世纪优秀科技工作者”的荣誉称号，并给予相应的资金支持。1998~1999年与日本开展国际间课题的合作研究：致病性耶尔森氏菌的分布调查。2003年获宁夏科技进步三等奖一项；同年在SARS防治工作中受到宁夏回族自治区党委和人民政府的嘉奖。目前参与两项国家“十五”科技攻关项目。曾多次组织参与人间和动物间疫情的现场调查和处理工作。先后从事过鼠疫、流行性出血热、麻疹、流感、SARS以及食物中毒的暴发调查及处理工作。解决实际工作中的疑难问题多起，如猪链球菌的分离、培养，类鼻疽、耶尔森氏菌的快速鉴别诊断等。参与起草《生物反恐、毒鼠强等急性剧毒灭鼠剂中毒应急预案》和《鼠疫应急预案》等。

作者简介

冯志勇，男，汉族，副研究员。1964年11月生，广东省梅州市人，1986年毕业于中山大学生物系动物学专业，同年分配到广东省农业科学院植物保护研究所工作。现任广东省农业科学院植物保护研究所媒介动物防控研究室主任，主要从事农业鼠类生态学及控制技术研究，还开展养殖业人畜传染病的啮齿动物控制策略以及鼠疫等人畜共患疾病领域的防控技术研究。先后参与了“七五”、“八五”、“九五”和“十五”国家重点科技攻关项目的研究，累计发表学术论文59篇，参与编写专著1本，获得各级科技进步奖6项，其中国家科技进步二等奖一项，省部级二等奖一项、三等奖三项。目前主持的在研课题有6项，包括国家农业科技成果转化资金项目1项、国家科技项目子专题1项、广东省重大科技专项1项、广东省自然科学基金1项、广东省科技三项费用项目1项和广东省农科院科技攻关项目1项；作为主要参加者承担的在研项目有3项（省重大科技专项1项、农业部项目1项、广东省农业推广项目1项）。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

前言

QIANYAN

SARS隐去,禽流感紧随其后,带给我们的反思是:其实一些传染病就在我们身边,只是人类先前没有涉足到一些边缘地区和自然疫源性疾病存在的地区;过去的诊断技术,不知将它们如何区分开来;当然,人类在进化,病原微生物也在进化,特别是一旦基因组的突变跨越了物种间相对单一寄生的模式,某种疾病就会在新的物种间暴发流行,灾难就会发生。对传染病的重新认识,带来了观念的转变。加强医院哨点监测,开发新一代疫苗,建立疾病发生过程的模型,研发病原体的快速诊断技术等,摆在了我们面前。

我国存在着世界上面积最大,最为复杂多样的鼠疫自然疫源地。现这些疫源地正处于高度活跃状态,我国面临着鼠疫的严重威胁。20世纪60年代开展的全民性的“灭鼠拔源”运动,曾一段时间使我国大部分疫源地处于隐伏状态。从90年代以来,我国的人间鼠疫事件,绝大多数都是在没有事先侦知动物间鼠疫流行的情况下发生的,这说明,我国的鼠疫监测离先期发现的目标还有相当的距离,特别是在快速诊断技术方面。为此应加强荧光免疫、免疫胶体金等诊断技术在鼠疫监测中的推广应用。

WHO推荐的鼠疫菌诊断“金标准”四步检验法以及鼠疫菌的分离培养技术都是沿用20世纪50年代的方法,我们很少真正能从健康的活鼠体内直接分离到鼠疫菌,绝大部分菌株的分离是在动物间鼠疫暴发流行时或出现大批自毙鼠时获取的。为此我们必须加强鼠疫病原学和血清学的研究,在病原学方面,以PCR技术和生物芯片技术为导向,才能大大提高鼠疫菌在自然界的检出率。在免疫学方面,要开展鼠疫菌多种特异性抗原或抗

前言

QIAN YAN

体标记方法的研究，克服 F_1 抗原检测技术的局限性。特别是在鼠疫单克隆抗体的应用研究方面，如 ELISA 和免疫胶体金快速诊断技术。本书就以上这些方面进行了论述，希望能给鼠疫控制及诊断工作带来一点启示，对鼠疫防治及其病原微生物的科研教学、鼠疫监测工作能有一定的促进作用。本书也可作为全国鼠疫专业人员继续医学教育的培训教材使用。

相信随着微生物基因组学和蛋白组学技术的进一步发展和对病原微生物致病及毒力基因的进一步认识，可将研究所获得的信息迅速地转化为生产力，将帮助人们培育出更好疫苗，来对付至今仍流行于世界范围的瘟疫。微生物感染性疾病的防治与诊断水平将会提高，微生物作为模式生物将进一步促进生物学和生命科学的发展。特别是生物信息学，将成为 21 世纪生物技术的核心。微生物是一把悬在我们头顶的双刃剑，在给自然界带来繁荣的同时也会带来灾难。它创造的不仅仅是财富，而且涉及到人类与自然的和谐共存。

由于编写仓促、水平有限，纰漏之处敬请各位同仁批评指正。

同时向支持本书出版的国家 CDC 传染病控制所和云南地方病防治研究所鼠疫室的同仁致谢。

张涛　冯志勇　邱俊荣

2006 年 8 月于广东

目录

MU LU

第一章 鼠疫病原学 / 1

第一节 概述 / 1
第二节 认识鼠疫 / 14
第三节 鼠疫菌在自然界的保存机制 / 16
第四节 鼠疫菌的发现及分类学的位置 / 23
第五节 鼠疫菌的生物学特性 / 26
第六节 鼠疫菌的质粒和 DNA 提取 / 48
第七节 鼠疫菌的变异 / 62
第八节 鼠疫菌 L 型 / 67
第九节 鼠疫菌的基因及生物分型 / 73
第十节 鼠疫的免疫 / 85
第十一节 鼠疫噬菌体 / 99
第十二节 鼠疫菌的细菌学检查 / 107
第十三节 疑似鼠疫材料采集、保存与运送 / 120

第二章 鼠疫血清学诊断 / 129

第一节 鼠疫细菌凝集试验 / 131
第二节 鼠疫间接血球凝集试验 / 132
第三节 鼠疫反向间接血球凝集试验 / 138
第四节 鼠疫放射免疫沉淀试验（RIP） / 140
第五节 ELISA 检测技术 / 142
第六节 免疫荧光染色技术（免疫荧光组织化学技术） / 149
第七节 免疫印迹法在鼠疫抗体及抗原检测中的应用 / 153

目录

MU LU

第三章 鼠疫菌的鉴定 / 157

第四章 鼠疫实验室及生物安全 / 161

第五章 鼠疫菌检测新技术 / 171

第一节 PCR 技术的基本原理和方法 / 171

第二节 带有内部对照的鼠疫菌 PCR 检测试剂盒 / 184

第三节 胶体金标记检测技术 / 188

第四节 脉冲场电泳(PFGE)技术 / 190

第五节 生物芯片技术 / 197

第六章 鼠疫菌蛋白质的提取及分析 / 203

第七章 结语 / 218

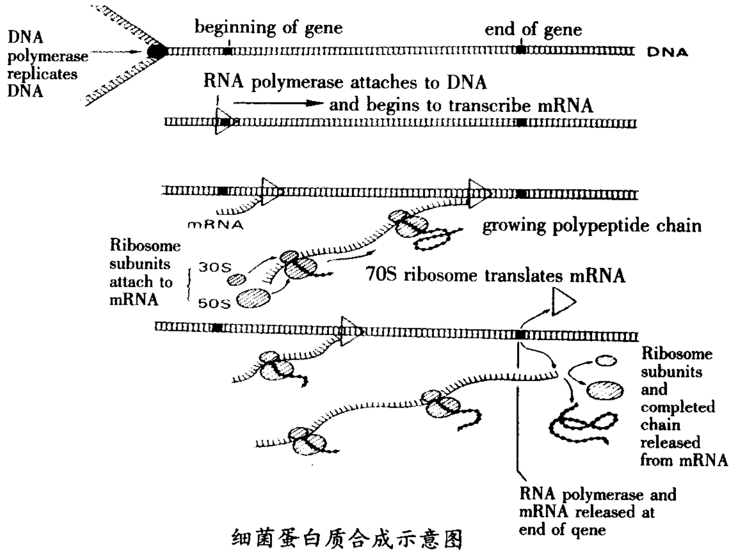
参考文献 / 221

第一章 鼠疫病原学

第一节 概 述

在自然界有4000余种病毒，人类只对其中的5%有所了解，尚有95%不为人类所知。如：SARS-Cov、西尼罗河病毒、人高致病性禽流感病毒、埃博拉病毒、马尔堡出血热、Lassa fever等。更可怕的是这些病毒一旦基因组的突变跨越了物种间相对局限寄生的模式，就可造成某种疾病在不同物种间的暴发流行。在自然界有100多万种细菌，人类只对其中的2000种做过定性。面对如此复杂的微生物世界，人类对它们的认识才刚刚开始。近700年来，随着世界范围内人口的剧增，人类活动边界的扩大和活动强度的加强，人类愈来愈多地深入到一些自然疫源性疾病的疫源地，环境污染，全球气温的变暖（温室效应等），抗生素、杀虫剂及激素类药物的滥用，家禽养殖业的不科学和不规范，沿江、河大坝的修建，新开农田，便捷的交通，世界的都市化，以及野生动物被当宠物或摆上餐桌都加速了全球疾病的暴发和流行。

细菌作为我们这个星球上最早出现的生命形式，在地球上已存活了30多亿年。在这一漫长的生命过程中，生物细胞形式从原核细胞向真核细胞进化。但作为原核细胞生命形式的典型代表——细菌，也在发生着变异。当然“嗜极生物”出现，意味着生命出现在地球上时，不是像达尔文和一些科学家理论中所说的那样来自温暖而受潮汐影响的水域，而是在含硫的炽热环境中。包括在沸腾的热水中、冰冷的极地里、含有放射性和有毒化学物质的环境下，一些微生物生活的很有滋味，很可能是它们引发了一场生物学的革命。



细菌蛋白质合成示意图

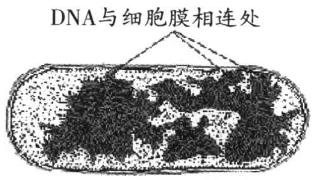
原核生物一般只有一条染色体且大都带有单拷贝基因，只有很少数基因（如rRNA基因）是以多拷贝形式存在，整个染色体DNA几乎全部由功能基因与调控序列所组成，几乎每个基因序列

都与它所编码的蛋白质序列呈线性对应状态。

细菌基因组比真核生物基因组要小得多，仅为人类基因组（31.647 亿碱基对）的 1%~1‰，而且没有内含子结构，是实验基因测序及分析的理想模式。细菌基因组是单一闭合环状的 DNA 分子，排列特征：一些基因可在染色体上单独存在，首先转录为 mRNA，再翻译成相应的蛋白质；而大多数情况下，在共同的一个操纵子上带有一小串基因组，自一个启动子开始，依次转录成相关的功能蛋白质。蛋白质平均分子量 45kDa，所需的基因平均长度 1.1kb。在细菌染色体中存在大量潜在的未知功能基因区，约占 1 / 3。目前已完成 90 多种病原菌的全基因测序，相信不久，数以千计的病原微生物基因图谱将被绘制出来。

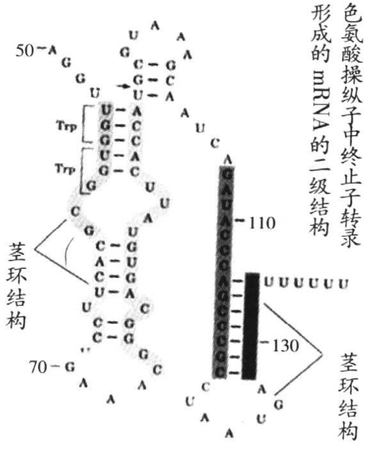
微生物进化过程中外源性基因的获取——适应模式的提出，为研究疾病和绘制细菌进化树提供了理论上的指导作用。细菌基因组在进化过程中发生的变化大致可分为四类：碱基突变、经 LGT（Later gene transfer）获得外源性遗传物质、基因剔除、基因组重组。其中 LGT 可一次性带来新的基因序列，赋予一种细菌新的生物学功能，包括适应生态位的能力，如突变的细菌开始感染不同宿主，引起不同的疾病等。耶尔森氏菌属的细菌在各自适应其独特的生态位进化过程中，基因组发生了相应的变化；而其中的一些变化就决定了这些细菌各自的疾病谱和宿主范围上的不同。同时鼠疫菌致病基因的表达完全受两套温度（在蚤体内≤28℃条件下和在宿主体内 37℃）调节系统控制，即一些基因只在媒介蚤体内表达，另一些基因只在宿主体内表达。鼠疫菌致病基因的表达完全受环境因素调节。

细菌和病毒一样同属原核生物，因而细菌基因组的结构特点在许多方面与病毒的基因组特点相似，而在另一些方面又有其独特的结构和功能。在细菌蛋白质的转录中，发现信使核糖核酸形成的脉冲以不规则的间隔时间打开和关闭，显示其能量利用及蛋白合成的最佳节约化。



大肠杆菌模式图
类核区示以深色

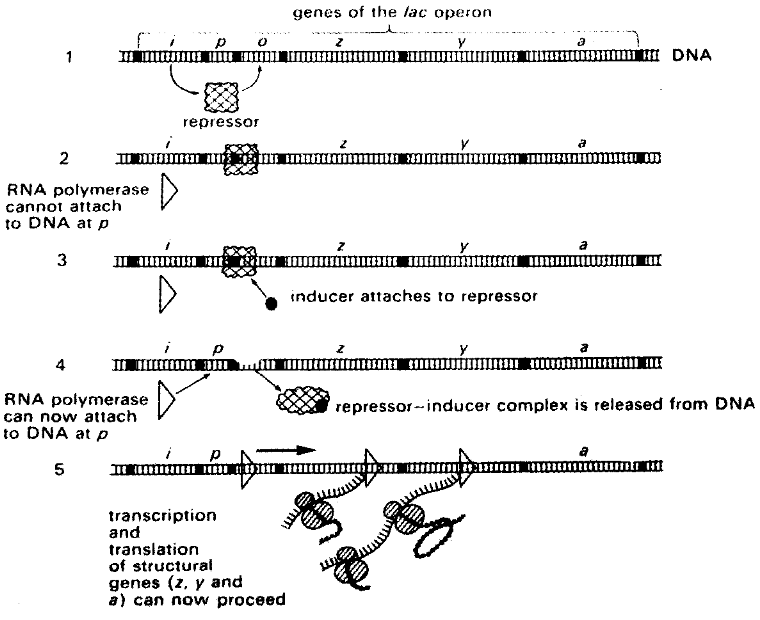
细菌染色体基因组结构的一般特点：（1）细菌的染色体基因组通常仅由一条环状双链 DNA 分子组成，细菌的染色体相对聚集在一起，形成一个较为致密的区域，称为类核。类核无核膜与胞浆分开，类核的中央部分由 RNA 和支架蛋白组成，外围是双链闭环的 DNA 超螺旋。染色体 DNA 通常与细胞膜相连，连接点的数量随细菌生长状况和不同的生活周期而异。在 DNA 链上的与 DNA 复制、转录有关的信号区域与细胞膜优先结合，如大肠杆菌染色体 DNA 的复制起点（OriC）、复制终点（TerC）等。细胞膜在这里的作用可能是对染色体起固定作用，另外，在细胞分裂时将复制后的染色体均匀地分配到两个子代细菌中去。有关类核结构的详细情况目前尚不清楚。（2）具有操纵子结构的基因为多顺反子，即数个功能相关的结构基因串联在一起，受同一个调节区的调节。数个操纵子还可以由一个共同的调节基因即调节子所调控。（3）在大多数情况下，结构基因在细菌染色体基因组中都是单拷贝，但是编码 rRNA 的基因 rrn 往往是多拷贝的，这样可能有利于核糖体的快速组



色氨酸操纵子中终止子转录形成的 mRNA 的二级结构

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

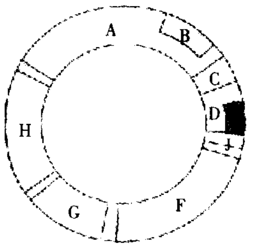
装，便于在急需蛋白质合成时，细胞可以在短时间内有大量核糖体生成。(4) 和病毒的基因组相似，不编码的 DNA 部分所占比例比真核细胞基因组少得多。(5) 具有编码同工酶的同基因，如在大肠杆菌基因组中有两个编码分支酸变位酶的基因，两个编码乙酰乳酸合成酶的基因。(6) 和病毒基因组不同的是，在细菌基因组中编码顺序一般不会重叠，即不会出现基因重叠现象。(7) 在 DNA 分子中具有各种功能的识别区域，如复制起始区 OriC，复制终止区 TerC，转录启动区和终止区等。这些区域往往具有特殊的顺序，并且含有反向重复顺序。(8) 在基因或操纵子的终末往往具有特殊的终止顺序，它可使转录终止和 RNA 聚合酶从 DNA 链上脱落。如大肠杆菌色氨酸操纵子后尾含有 40bp 的 GC 丰富区，其后紧跟 AT 丰富区，这就是转录终止子的结构。终止子有强、弱之分，强终止子含有反向重复顺序，可形成茎环结构，其后面为 polyT 结构，这样的终止子无需终止蛋白参与即可以使转录终止。而弱终止子尽管也有反向重复序列，但无 polyT 结构，需要有终止蛋白参与才能使转录终止。(9) 除了有些具有相关功能的基因在一个操纵子内由一个启动子转录外，大多数基因的相对位置可以说是随机分布的。如控制小分子合成和分解代谢的基因，大分子合成和组装的基因分布在细菌基因组的许多部位，而不是集中在一起。再如，有关糖酵解的酶类的基因分布在染色体基因组的各个部位。(10) 有些基因在操纵子的起始部位带有阻遏蛋白，需经体内特异因子激化后，mRNA 才能有效结合在操纵子起始序列位置，开始蛋白质的转录。



细菌的一些特殊蛋白质合成示意图

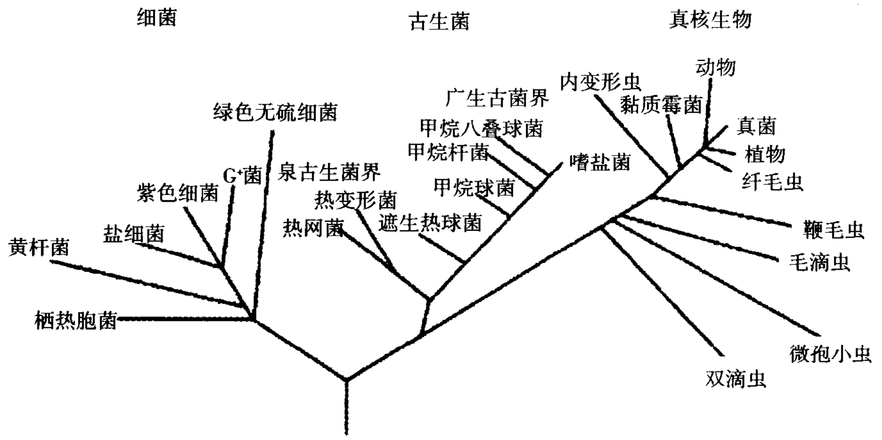
病毒基因组的结构和功能：病毒是最简单的原核生物，完整的病毒颗粒包括外壳蛋白和内部的基因组 DNA 或 RNA，有些病毒的外壳蛋白外面有一层由宿主细胞构成的被膜，被膜内含有病毒基因编码的糖蛋白。病毒不能独立地复制，必须进入宿主细胞中借助细胞内的一些酶类和细胞器才能使病毒得以复制。外壳蛋白（或被膜）的功能是识别和侵袭特定的宿主细胞并保护病毒基因组不受核酸酶的破坏。(1) 病毒基因组大小相差较大，与细菌或真核细胞相比，病毒的基因组很小，但是不同的病毒之间其基因组相差亦甚大。如乙肝病毒 DNA 只有 3kb 大小，所含信息量也较小，只能编码 4 种蛋白质，而痘病毒的基因组有 300kb 之大，可以编码几百种蛋白质，不但为病毒复制所涉及的酶类编码，甚至为核苷酸代谢的酶类编码，因此，痘病毒对宿主的依赖性较乙肝病毒小得多。(2) 病毒基因组可以由 DNA 组成，也可以

由 RNA 组成，每种病毒颗粒中只含有一种核酸，或为 DNA 或为 RNA，两者一般不共存于同一病毒颗粒中。组成病毒基因组的 DNA 和 RNA 可以是单链的，也可以是双链的，可以是闭环分子，也可以是线性分子。如乳头瘤病毒是一种闭环的双链 DNA 病毒，而腺病毒的基因组则是线性的双链 DNA，脊髓灰质炎病毒是一种单链的 RNA 病毒，而有些病毒的基因组是双链的 RNA 分子。一般说来，大多数 DNA 病毒的基因组是双链 DNA 分子，而大多数 RNA 病毒的基因组是单链 RNA 分子。（3）多数 RNA 病毒的基因组是由连续的核糖核酸链组成，但也有些病毒的基因组 RNA 由不连续的几条核酸链组成，如流感病毒的基因组 RNA 分子是节段性的，由 8 条 RNA 分子构成，每条 RNA 分子都含有编码蛋白质分子的信息；而肠道病毒的基因组由双链的节段性的 RNA 分子构成，共有 10 个双链 RNA 片段，同样每段 RNA 分子都编码一种蛋白质。目前，还没有发现有节段性的 DNA 分子构成的病毒基因组。（4）基因重叠即同一段 DNA 片段能够编码两种甚至 3 种蛋白质分子，这种现象在其他的生物细胞中仅见于线粒体和质粒 DNA，所以也可以认为是病毒基因组的结构特点。这种结构使较小的基因组能够携带较多的遗传信息。重叠基因是 1977 年 Sanger 在研究 ΦX174 时发现的。ΦX174 是一种单链 DNA 病毒，宿主为大肠杆菌，因此，又是噬菌体。它感染大肠杆菌后共合成 11 个蛋白质分子，总分子量为 25 万左右，相当于 6078 个核苷酸所容纳的信息量。而该病毒 DNA 本身只有 5375 个核苷酸，最多能编码总分子量为 20 万的蛋白质分子，Sanger 在弄清 ΦX174 的 11 个基因中有些是重叠的之前，这样一个矛盾长时间无法解决。重叠基因有以下几种情况：①一个基因完全在另一个基因里面。如基因 A 和 B 是两个不同基因，而 B 包含在基因 A 内。同样，基因 E 在基因 D 内。②部分重叠。如基因 K 和基因 A 及 C 的一部分基因重叠。③两个基因只有一个碱基重叠。如基因 D 的终止密码子的最后一个碱基是 J 基因起始密码子的第一个碱基（如 TAATG）。这些重叠基因尽管它们的 DNA 大部分相同，但是由于将 mRNA 翻译成蛋白质时的读框不一样，产生的蛋白质分子往往并不相同。有些重叠基因读框相同，只是起始部位不同，如 SV40DNA 基因组中，编码三个外壳蛋白 VP1、VP2、VP3 基因之间有 122 个碱基的重叠，但密码子的读框不一样。而小 t 抗原完全在大 T 抗原基因里面，它们有共同的起始密码子。（5）病毒基因组的大部分是用来编码蛋白质的，只有非常小的一部分不被翻译，这与真核细胞 DNA 的冗余现象不同。如在 ΦX174 中不翻译的部分只占 217 / 5375，G4DNA 中占 282 / 5577，都不到 5%。不翻译的 DNA 顺序通常是基因表达的控制序列。如 ΦX174 的 H 基因和 A 基因之间的序列（3906~3973），共 67 个碱基，包括 RNA 聚合酶结合位，转录的终止信号及核糖体结合位点等基因表达的控制区。乳头瘤病毒是一类感染人和动物的病毒，基因组约 8.0kb，其中不翻译的部分约为 1.0kb，该区同样也是其他基因表达的调控区。（6）病毒基因组 DNA 序列中功能上相关的蛋白质的基因或 rRNA 的基因往往丛集在基因组的一个或几个特定的部位，形成一个功能单位或转录单元。它们可被一起转录成为含有多个 mRNA 的分子，称为多顺反子 mRNA，然后再加工成各种蛋白质的模板 mRNA。如腺病毒晚期基因编码病毒的 12 种外壳蛋白，在晚期基因转录时是在一个启动子的作用下生成多顺反子 mRNA，



噬菌体 ΦX174 基因图，以 A、B、C 等标记基因，未标处是调控系列

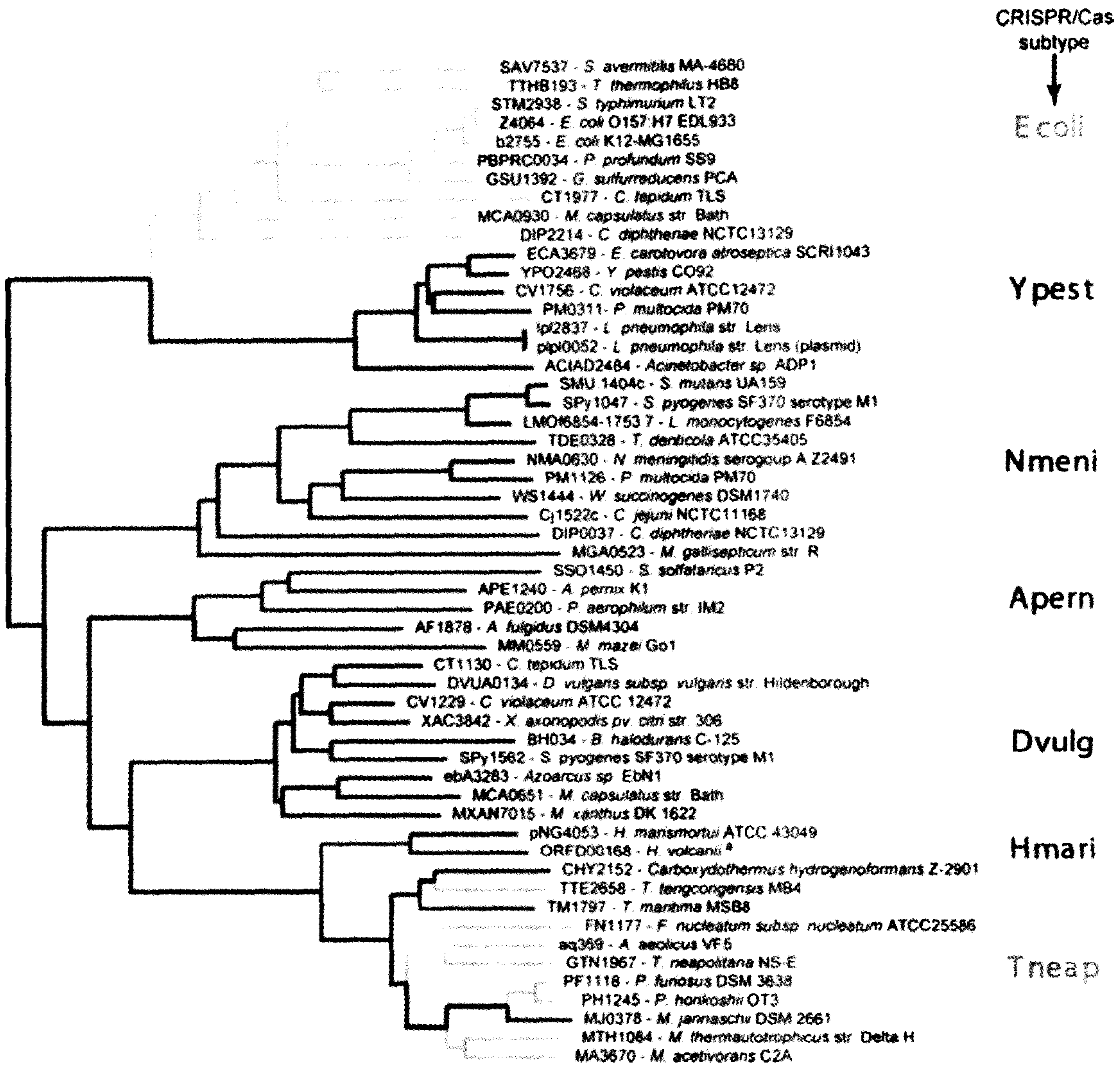
然后再加工成各种 mRNA，编码病毒的各种外壳蛋白，它们在功能上都是相关的；ΦX174 基因组中的 D-E-J-F-G-H 基因也转录在同一 mRNA 中，然后再翻译成各种蛋白质，其中 J、F、G 及 H 都是编码外壳蛋白的，D 蛋白与病毒的装配有关，E 蛋白负责细菌的裂解，它们在功能上也是相关的。（7）除了反转录病毒以外，一切病毒基因组都是单倍体，每个基因在病毒颗粒中只出现一次。反转录病毒基因组有两个拷贝。（8）噬菌体（细胞病毒）的基因是连续的；而真核细胞病毒的基因是不连续的，具有内含子，除了正链 RNA 病毒之外，真核细胞病毒的基因都是先转录成 mRNA 前体，再经加工才能切除内含子成为成熟的 mRNA。更为有趣的是，有些真核病毒的内含子或其中的一部分，对某一个基因来说是内含子，而对另一个基因却是外显子。如 SV40 和多瘤病毒的早期基因就是这样。SV40 的早期基因即大 T 和小 t 抗原的基因都是从 5146 开始反时针方向进行，大 T 抗原基因到 2676 位终止，而小 t 抗原到 4624 位即终止了，但是，从 4900 到 4555 之间一段 346bp 的片段是大 T 抗原基因的内含子，而该内含子中从 4900~4624 之间的 DNA 序列则是小 t 抗原的编码基因。同样，在多瘤病毒中，大 T 抗原基因中的内含子则是中 T 和 t 抗原的编码基因。



微生物进化树

一、鼠疫菌基因结构

鼠疫菌首先是在 500 万年前从某一肠杆菌株（共同的祖先）进化而来，大约在 300 多万年前分化为大肠埃氏菌、沙门氏菌属和植物病原菌属；接着在 100 多万年前，又从植物病原菌系（胡萝卜软腐欧文氏腐生菌）逐渐进化为小肠结肠炎耶尔森氏菌、假结核菌（包括从沙门氏伤寒杆菌中获取的一些全身致病性基因等）。最后是在 1500~20000 年间进化为鼠疫菌。当然进化过程中也从别的病毒和细菌获取了大量基因。其中一些基因是让鼠疫菌能在哺乳动物体内（血液中）存活，另一些基因则能使其寄生在媒介蚤体内，而不被各种蛋白消化酶所杀死，包括进一步在蚤的前胃中形成菌栓以及在蚤体中胃内特定条件下所产生的鼠毒素对自身的保护作用等；特别是磷脂酶 D（PLD）基因的获取，导致鼠疫菌疾病谱和宿主范围的不同，与别的耶尔森氏菌属的细菌相比，其生态位的改变，成为鼠疫的致命“杀手锏”。同时染色体中许多区域存在横向转移的岛状结构，与假结核、小肠结肠炎菌共有的 $_{p}$CD 质粒中，已



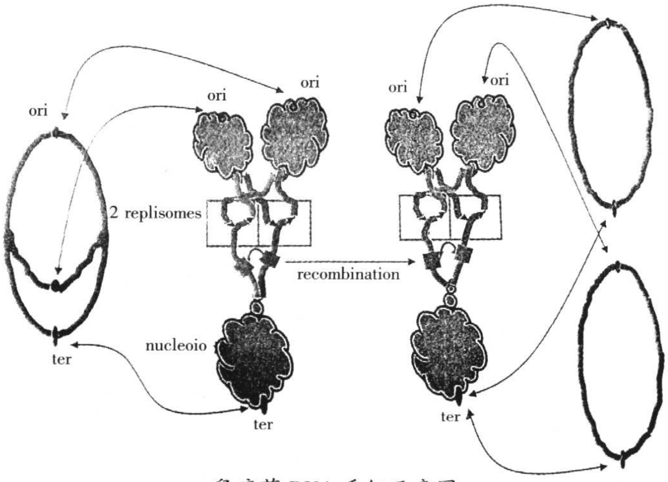
细菌进化树：其中胡萝卜软腐欧文氏黑腐亚种与鼠疫菌起源于同一祖先，为植物病原菌

存在着多个决定全身致病性的基因簇。鼠疫菌独特质粒中，更多编码决定全身致病性的基因，如 F_1、鼠毒素和鼠疫菌素。其中最大的质粒 $_pMT$ 由 3 种不同来源的 DNA 片段连接构成；最长的一部分来自伤寒杆菌的质粒，第二部分是由肠杆菌染色体上一些常见的基因构成。而最短的一部分，才是鼠疫菌独有的基因，编码了鼠疫菌的 F_1 抗原和鼠毒素。鼠疫菌具有嗜淋巴组织的特性，定居淋巴组织后进行细胞外繁殖。黏附、侵袭、对宿主免疫细胞间信息的干扰和毒性作用是微生物致病的四大要素。而鼠疫菌黏附、侵袭的位点基因都已突变和退化，但它可以借助蚤的叮咬或表皮及黏膜的破损直接进入皮下组织。鼠疫菌在经破损的表皮或蚤的叮咬直接侵入皮下组织时，常引起侵入部位的炎症反应（包括趋化因子和炎症细胞反应），大部分鼠疫菌会被前来参与炎症反应的细胞及其因子所杀死，少部分会被炎症反应中的吞噬细胞所吞噬而存活下来。一旦进入吞噬细胞，鼠疫菌就会进入“休眠状态”，停止繁殖和细胞间的有丝分裂，合成厚厚的荚膜。以吞噬细胞作为载体，从皮下组织直接进入淋巴管，再经淋巴

管到达局部淋巴结；然后再随吞噬细胞转移到肝、脾等免疫脏器繁殖，主要在细胞外繁殖。也就是说吞噬细胞在吞噬鼠疫菌后，并没有损伤鼠疫菌，而成为鼠疫菌在体内播散转运的载体，这也正是鼠疫的可怕之处。

鼠疫杆菌是由一种生活在动物肠道、危害性相对较小的微生物——假结核耶尔森氏菌进化来的，产生的历史只有几千年。假结核菌是与鼠疫菌近源关系最为接近的肠道致病微生物，研究表明，鼠疫菌 40%的岛状结构在假结核耶尔森氏菌并不存在。病菌迅速进化的关键是自然界中啮齿动物数量的剧增。菌株名称为 CO92，是从一位 1992 年死于肺炎型鼠疫的人身上收集的。研究发现，这一菌株的染色体约包含 465 万个碱基对，编码了 4198 个开放式读码结构，G+C Mol%为 47.6。

在鼠疫菌基因组中存在大量的重复序列，在一株 CO92 的鼠疫菌染色体上，至少存在 4 种插入序列（其中 IS100 存在 44 处、IS1661 存在 9 处、IS1541 存在 66 处、IS285 存在 21 处），插入序列的总数超过大多数其他细菌，其中约 3.7%的序列是重复序列。这些重复序列是造成鼠疫菌染色体重组变异与进化的关键。与肠杆菌的基因组相比较，可以发现许多同源部位的“看家基因”完全相同，具有高度相符的基因排列顺序，这些序列被称为“脊骨基因”。其中 53.7%的基因序列可确定为鼠疫菌脊骨基因，而 73%的脊骨基因位于可以和大肠杆菌并列的阶段内。鼠疫杆菌在进化过程中曾经频繁地从其他微生物上“偷取了大量基因”。本身的染色体片断也经常发生重组。鼠疫菌基因组具有高度可变性的流动特征，特别是在培养过程中。同时通过水平转移获得了多数可在全身致病性的特征基因。具有完善的 8 种铁离子和 2 种血红素转运系统机制。鼠疫菌没有运动性，其鞭毛和趋化基因簇中存在 6 处位点突变，与假结核菌相比，很难复位。



鼠疫菌 DNA 重组示意图

鼠疫菌还具有 3 个质粒，分别为 pFra 质粒（96200bases、每个鼠疫菌细胞含 1~2 拷贝，主要编码了 Ymt 和 Fra）、pYV 质粒（70300bases、每个鼠疫菌细胞含 4~8 拷贝，主要编码了 LcrS 一系列调节基因、Ⅲ型分泌机制等）、pPst 质粒（9600bases、每个鼠疫菌细胞含 100~200 拷贝，主要编码了 Pst、Pim 和 Pla 基因）。3 个质粒，虽没有发生接合机制，但肯定发生过水平转移，染色体中许多区域存在横向转移的岛状结构特征。鼠疫菌由最初的肠道致病菌进化

为靠跳蚤传播的疾病，在其染色体 DNA 上 149 个基因发生自然变异而失效，其中 51 个是由转位因子的直接插入造成的。这 149 个基因很可能是作为肠道致病菌所必需的基因。鼠疫菌缺乏大肠杆菌基因组中特征性的重复序列，即使存在，也与大肠杆菌缺乏相似性。

鼠疫菌的复制起始部位类似于 oriC，但缺失 dnaC。这可能是由于鼠疫菌分裂周期为 1.25h，不需要多复制叉同时开始的缘故。鼠疫菌基因组含有肠杆菌科细菌典型的能量代谢基因，可通过呼吸和酵解来获取能量，但缺乏大肠杆菌中 3 种不同的多亚单位氢化酶（镍酶）和含镍辅基的 ancillary 酶，也缺乏高亲和力的镍转运系统。在甲硫氨酸代谢过程中一处突变，可解释大多数鼠疫菌株的营养需求和代谢特点。鼠疫菌虽不产生尿素酶，但其基因基本完好，只要一次自发的单碱基删除就可恢复其基因的本能。

在鼠疫耶尔森菌基因组中初步鉴定出 22 个差异区段（DFR），基于 DFR 图谱，可初步将鼠疫耶尔森菌中国分离株分成 14 个基因组型。鼠疫耶尔森菌共有 21 个基因组岛，其中 18 个已存在于假结核杆菌中，余下 3 个为鼠疫耶尔森菌独有。各基因组岛在鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌间的差异分布，证明了鼠疫耶尔森菌的起源进化；鼠疫耶尔森菌基因组分型与各基因组型别间的系统发育关系，初步揭示了鼠疫耶尔森菌基因组的进化规律及其与鼠疫耶尔森菌生态位适应和鼠疫疫源地扩展之间的关系，基本探明了鼠疫耶尔森菌在中国的演化规律。

耶尔森氏菌强毒株都带有一毒力岛，其中鼠疫菌强毒株带有 35kb 的强毒力岛（HPI），G+C Mol%为 59。外缘与 asn-tRNA 相连，末端具有 DR17，一端有 IS100，与色素沉着区紧密连锁，共同构成了不稳定的 102kb 的 Pgm 位区。内含杆菌素的合成基因、摄取基因及调节基因，构成了杆菌素介导铁摄取系统。HPI 不能发生精确切除，通常是由 Pgm 位点两侧的 IS100 之间的同源重组而自发丢失的，发生的频率为 10^{-5}。基因结构上分色素沉着区（含有一个 IS100 和 4 个与聚集血红素有关的基因）、功能核心区（12 个基因）、可变区（含有一个 IS100 和 3 个可变性基因）。HPI 可随意整合在 3 个 asn-tRNA 基因的任意一处，但其中的整合酶 int 基因不受影响，未被终止密码子所干扰。在 HPI 的一端，带有噬菌体 P4 和 P2 蛋白编码的序列，这为 H 子受体蛋白基 P1 通过噬菌体水平转移提供了证据。同时毒力岛的发现和研究也为深入了解细菌的致病性、毒力因子及进化提供了有效途径。

人体内 ·种叫做 CCR5 趋化因子的突变，赋予了人类对 HIV 和另一种病原体鼠疫杆菌（*Y.pestis*）的抵抗力，14 世纪鼠疫曾使 40%的欧洲人灭绝。这个突变因保护携带者抵抗随后再次暴发的鼠疫而一直幸存至今。科学家发现，某些基因发生突变之后，有可能使人对一些传染性疾病产生抵抗能力。这种变异被称为“Delta32 突变”（注：通常写为“Δ32 突变”，指“受体基因发生缺失性变异，去了 32 个碱基”），通过实验了解它能否对抗鼠疫。初步的鉴定结果，Delta32 突变的确存在，证据相当确凿。在欧洲一些乡村，有 14%以上的村民带有这种变异基因。Delta32 突变原本是基因犯的一个错误，应该逐渐消失。除非，它的存在能给个体带来明显的生存优势。这种变异基因在欧洲出现的比率极高，说明它的优势非常突出。确定 Delta32 突变在欧洲迅速涌现的年代，以证明黑死病就是变异基因依然存在的直接原因。经过几个月的钻研，科学家们对全球基因数据库中的样本进行了分析。通过观察基因之间的细微差异，终于推算出了变异最初的出现时间。分析结果显示：这种变异基因大约于 700 年前大量出现在欧洲人群中，与黑死病入侵欧洲的时间完全吻合。HIV 进入体内只袭击特定的免疫

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com