

# 数目可变串联重复序列分子指纹分型法鉴定北京基因型结核分枝杆菌

金嘉琳 姜昕 翁心华 胡忠义 张文宏

**【摘要】 目的** 探讨数目可变串联重复序列(VNTR)分子指纹分型法在北京基因型结核分枝杆菌菌株识别中的价值,并与间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)法进行比较。**方法** 对50株临床结核分枝杆菌行核酸抽提后,以12个VNTR位点引物分别扩增,对所得的指纹图谱进行分析,并与Spoligotyping结果比较。**结果** 本研究中采用的12个VNTR位点均具有多态性。Spoligotyping分型有88%(44/50)菌株为北京基因型。相同Spoligotyping基因型的43株菌用VNTR可分为24种基因型。VNTR的各个多态性位点中对北京基因型菌株辨别力最高的是MIRU26位点。**结论** VNTR可作为结核分枝杆菌分子流行病学调查的初筛方法,结合Spoligotyping可进行北京基因型菌株的识别。

**【关键词】** 结核分枝杆菌;数目可变串联重复序列;间隔区寡核苷酸分型;北京基因型

**Identification of Mycobacterium tuberculosis strains of Beijing genotype with variable number of tandem fingerprinting typing** JIN Jia-lin, JIANG Xin, WENG Xin-hua, HU Zhong-yi, ZHANG Wen-hong. Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: ZHANG Wen-hong, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the value of variable number of tandem repeats (VNTR) fingerprinting typing in the recognition of Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis and compare the genotype with traditional Spoligotyping. **Methods** DNA of 50 clinical Mycobacterium tuberculosis strains were amplified by 12 pairs of primers corresponding to 12 VNTR sites and genotypes, the results were compared with Spoligotyping. **Results** There were 88% (44/50) of MTB strains in this research were Beijing genotype with Spoligotyping. All of 12 VNTR locus were polymorphic and the repeated copy numbers varying from 2 to 7. Fifty strains were divided into 29 groups by VNTR, 22 groups of which contain only one unique strain, another 7 groups

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.04.001

基金项目:国家“十一五”科技攻关计划资助项目(2008ZX10003-003)

作者单位:200040 上海市,复旦大学附属华山医院传染科(金嘉琳、张文宏、翁心华);上海市复旦大学遗传所(姜昕);上海市肺科医院(胡忠义)

通讯作者:张文宏,Email:zhangwenhong@fudan.edu.cn

contained two or more than two strains called "cluster" which stood for epidemically related strains. The biggest cluster contained 16 strains. MIRU26 was the most polymorphic for Beijing strains, the Polymorphic Index (PI) was 0.390. All of 43 Beijing strains with the same spoligotyping genotype could be further divided into 24 different groups. **Conclusions** Characterized by easy, rapid and may be standardized, VNTR can be used as the screening method for molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and could identify Beijing genotype strains if combined with Spoligotyping.

**【Key words】** Mycobacterium tuberculosis; Variable number of tandem repeats (VNTR); Spoligotyping; Beijing strains

分子指纹图谱分析研究发现在结核耐药菌株的感染与传播中,北京基因型菌株是主要组成成份,约占全世界结核分枝杆菌菌株的 1/4,在中国更是占了 80% 以上的比例<sup>[1]</sup>。由于北京基因型菌株常与耐多药菌株的流行相关,早期识别十分重要。IS6110-RFLP 分型技术被认为是结核分枝杆菌基因分型的金标准,是基于基因组中 IS6110 插入序列的数目和位置差异而区分不同菌株,已证明有较高的分辨率和重复性。但是由于其需要高质量和较多数量的 DNA,操作复杂,实际应用受到一定限制。近年来发展起来的数目可变串联重复单元(variable number of tandem repeats, VNTR) 指纹分型法建立在多态性的基础上,是一种新型的结核分枝杆菌指纹分型法,具有简单、快速、分辨率较高等特点。但 VNTR 分型法与北京基因型结核分枝杆菌识别的关系尚不清楚。本文应用 VNTR 方法对临床结核分枝杆菌菌株进行分型,探讨 VNTR 分型法在北京基因型结核分枝杆菌识别中的应用,并与另一种间隔区寡核苷酸分型法(Spoligotyping)进行比较。

## 材料与amp;方法

### 一、菌株来源

本研究所用的 50 株结核分枝杆菌菌株由上海市肺科医院菌株库提供。

### 二、基因组 DNA 提取

患者痰标本处理消化后接种于改良的罗氏培养基上,37℃ 培养一个月后,取少量细菌 60℃ 水浴过夜灭活。应用上海华舜生物技术有限公司的小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(W6511),提取 DNA 溶液约 100 μl。

### 三、VNTR 法分型

1. 多态标记 VNTR 位点及引物:选取文献报道多态性比较高的 12 个位点<sup>[2]</sup>,各位点重复序列长度在 51 ~ 77 bp,在 H37Rv 基因组的位置为 577 172 ~ 4348 401 bp。合成相应位点两翼的引物,引物序列如见表 1,由上海博亚生物技术有限公司合成。

表1 多态标记的 VNTR 引物序列

引物名称	引物序列
ETR-CF	5'-GACTTCAATGCGTTGTTGGA-3'
ETR-CR	5'-GTCTTGACCTCCACGAGTGC-3'
ETR-DF	5'-CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC-3'
ETR-DR	5'-GCCGATCGGCCAGCGACTCCTC-3'
MIRU40F	5'-AAGCGCAAGAGCACCAAG-3'
MIRU40R	5'-GTGGGCTTGTACTTGCGAAT-3'
MIRU10F	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3'
MIRU10R	5'-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT-3'
MIRU16F	5'-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3'
MIRU16R	5'-CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC-3'
ETR-AF	5'-ATTTCGATCGGGATGTTGAT-3'
ETR-AR	5'-TCGGTCCCATCACCTTCTTA-3'
ETR-BF	5'-GCCAACACCAGGACAGCATCATG-3'
ETR-BR	5'-GGCATGCCGGTGATCGAGTGG-3'
MIRU23F	5'-CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC-3'
MIRU23R	5'-CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT-3'
MIRU24F	5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3'
MIRU24R	5'-GGGCGACTTGAGCTCACAGAA-3'
MIRU26F	5'-CCCCTTCGAAACGTCGCT-3'
MIRU26R	5'-TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA-3'
MIRU31F	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3'
MIRU31R	5'-GTGCCGACGTGGTCTTGAT-3'
MIRU39F	5'-CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC-3'
MIRU39R	5'-CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT-3'

2. PCR 反应:菌株分别以 12 对引物在不同反应体系中进行扩增。采用 50  $\mu\text{l}$  扩增体系,包括上游及下游引物各 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , dNTP 200  $\mu\text{mol/L}$ , 重组 Taq DNA 聚合酶 2.5 U (TaKaRa), 模板 DNA 2  $\mu\text{l}$ 。于 Mastercycler personal (Eppendorf) PCR 循环仪上扩增。

3. 片段大小及基因型分析:PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中,7 V/cm 电压,90 min 电泳后,经 0.5 mg/ $\mu\text{l}$  溴化乙啶(EB)染色,紫外光下观察。每 5 个泳道加 100 bp DNA ladder 及 H37Rv 标准株以相同引物进行 PCR 扩增的产物作为对照,直接观察并判读条带的大小。与 H37Rv 标准株比较并根据各位点重复片段大小推断等位片段中重复单位的数目。各位点等位片段数目组合成 VNTR 指纹图谱。

#### 四、Spoligotyping 分型法

参照文献方法稍作修改<sup>[3]</sup>。以寡核苷酸引物行 PCR 扩增 DR 区域。采用 25  $\mu\text{l}$  反应体系,反应条件如下:96 $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min;96 $^{\circ}\text{C}$  1 min,55 $^{\circ}\text{C}$  1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,30 个循环。扩增产物与一套由 43 个膜固定的寡核苷酸杂交,每一个均对应 DR 位点内唯一的间隔 DNA 序列。杂交后在以 2  $\times$  SSPE [1  $\times$  SSPE 即 0.18

mol/L 氯化钠、10 mmol/L 磷酸二氢钠以及 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]配制的0.5% 十二烷基硫酸钠溶液(SDS)中 60℃ 洗膜 2 次,共 10 min。然后在 1:4000 稀释的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(Isogen Bioscience 公司产品) 42℃ 孵育 45 ~ 60 min。在以 2 × SSPE 配制的 0.5% SDS 中 42℃ 洗膜 2 次,共 10 min,室温下 2 × SSPE 中漂洗 5 min。杂交的 DNA 以增强的化学发光法检测(Amersham 公司产品)。

### 五、统计学处理

应用 Microsoft office Excel 2003 软件分析和处理结果。VNTR 数据分析采用 SPSS 8.0 软件,系统聚类分析(Hierarchical cluster analysis)采用最大距离法(Furthest neighbor),组间距离按绝对值距离(Block)进行计算。

## 结 果

### 一、VNTR 和 Spoligotyping 法基因分型

对 50 株临床分离的结核分枝杆菌以 VNTR 方法进行基因分型。选取 12 个文献报道的可变重复序列扩增位点,在本研究中的菌株中均具有多态性,各个位点观察到的等位片段中重复序列数目从 2 ~ 7 个不等。基因分型凝胶电泳见图 1 ~ 2。等位片段大小及所含重复单位数目可从中推断出来。例如,由图中可以看出样品 1 等位片段在 MIRU31 位点为 757 bp,而 H37Rv 标准株在此位点的等位片段为 651 bp(3 个重复片段),重复单位序列长度为 53 bp,因此样品 1 中含有 5 个重复单位。

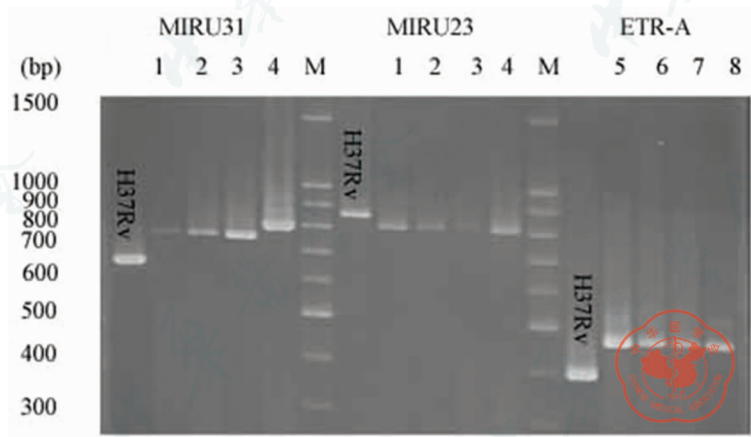


图 1 基因分型凝胶电泳图

注:图示 PCR 产物凝胶电泳部分结果, DNA 样品(包括 H37Rv 标准株)分别从左到右以 MIRU31、MIRU23、ETR-A 三个位点的引物扩增,100 bp DNA ladder marker 作为参照,1 ~ 8 为样品编号



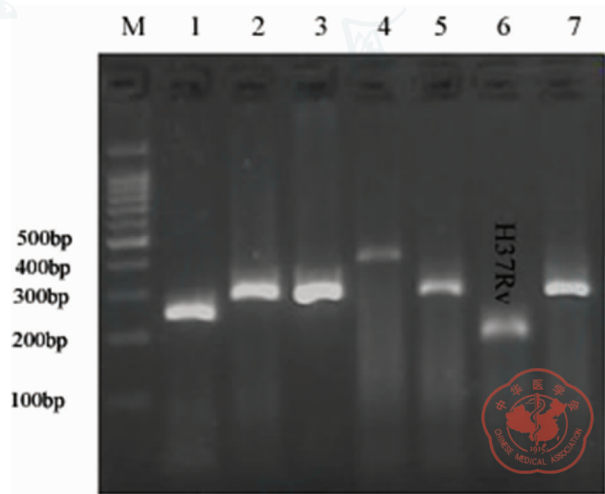


图2 基因分型凝胶电泳图示等位片段大小及所含重复序列数目对应关系

注:该图为 MIRU40 位点各等位片段,泳道 7 为 H37Rv 株的扩增产物(199 bp),对应重复序列数目为 1;泳道 1 菌株的等位片段大小为 253 bp,对应重复序列数目为 2;泳道 2、3、5、7 菌株的等位片段大小为 307 bp,对应重复序列数目为 3;泳道 4 菌株的等位片段大小为 415 bp,对应重复序列数目为 5。M:100 bp DNA ladder

VNTR 数字化结果以每个位点所含重复单位数目表示并顺次排列,如 H37Rv 标准株的基因型为 441323361332。50 株细菌 VNTR 方法共分为 29 种基因型,其中 22 种基因型只含有一个菌株,7 种基因型含有 2 株或 2 株以上菌株称为“簇”,最大的一簇含有 16 株细菌。

以 Spoligotyping 方法分型有 44 株(44/50,88%)为北京基因型菌株,分为两个基因型,其中一个基因型只含 1 株细菌,另一个基因型含 43 株细菌。43 株 Spoligotyping 分型为北京基因型的菌株以 VNTR 法分为 24 个基因型,其中 18 个基因型只含有一个菌株,其他 6 个基因型中的菌株成“簇”,最大一簇含有 16 株细菌,见图 3 和表 1。

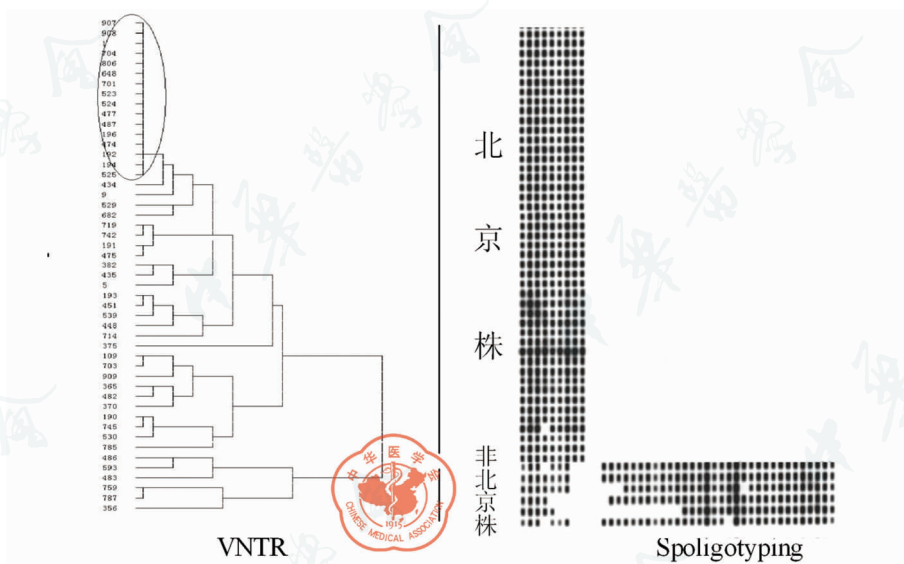


图3 50 株临床结核分枝杆菌的 VNTR 方法和 Spoligotyping 方法分型结果

注:Spoligotyping 方法分型有 44 株(88%)菌株为北京基因型;Spoligotyping 基因型相同的 43 株菌株以 VNTR 方法可分为 24 种不同的基因型

## 二、VNTR 分型法与北京基因型菌株的相关性

各个 VNTR 位点的多态性在北京基因型菌株和非北京基因型菌株中是不同的。北京基因型菌株中多态性最高的位点为 MIRU26, 多形性指数 (polymorphic Index, PI) 为 0.390; PI 指数最低的为 0, 位点在 ETR-B。北京基因型菌株中大多数位点的 PI 值均较低 (< 0.2)。而非北京基因型菌株中除 ETR-E、MIRU10、MIRU23 和 MIRU24 位点的 PI 值为 0 外, 其余位点 PI 值相对较高 (> 0.2), 见表 2。

表 2 VNTR 位点基因多态性与北京基因型菌株的相关性

VNTR 位点	位点别称	等位基因多态性 PI		
		北京基因型菌株 (44 株)	非北京基因型菌株 (6 株)	所有菌株 (50 株)
ETR-A	0.127	0.444	0.241	
ETR-B	0	0.444	0.077	
ETR-C	0.088	0.278	0.115	
ETR-D	MIRU4	0.088	0.611	0.187
ETR-E	MIRU31	0.280	0	0.428
MIRU10	0.129	0	0.302	
MIRU16	0.089	0.444	0.147	
MIRU23	0.129	0	0.115	
MIRU24	0.044	0	0.039	
MIRU26	0.390	0.500	0.514	
MIRU39	0.088	0	0.274	
MIRU40	0.249	0.611	0.349	

注: PI 为多形性指数, 计算公式为:  $1 - \sum f^2$  (f 即菌株中等位片段频率)

## 讨 论

北京基因型结核分枝杆菌家族的描述首次出现于 1995 年<sup>[1]</sup>, 之所以这样命名是由于中国北京地区 85% 以上的结核分枝杆菌属于这个家族, 在本研究中以 Spoligotyping 法进行基因分型发现有 88% (44/50) 菌株属于北京基因型家族。可见目前北京基因型菌株仍是中国主要流行的基因型。Spoligotyping 法进行基因分型对北京型菌株的识别十分明确, 与“金标准”IS6110-RFLP 法相比对 DNA 质量和数量的要求相对较低, 操作也比较方便, 能够更加普遍地应用。但其缺点是对北京基因型菌株的分辨率较低。VNTR 法在所有菌株中的多形性指数 (PI) 为 0.888, 在北京基因型菌株中的 PI 指数为 0.848, 而 Spoligotyping 在北京基因型菌株中的 PI 仅为 0.044。本研究中的 44 株北京基因型菌株用 Spoligotyping 方法分型分为 2 个基因型, 其中一个基因型包含一株菌株, 另 43 株菌表现为同一种 Spoligotyping 基因型, 而以 VNTR 法可分为 24 种不同基因型。因此, VNTR 法因其较高的分辨率, 可弥补 Spoligotyping 不足, 将菌株进一步区分, 利于对菌株来源、传播关系等分析, 获得有用的信息。

VNTR 可作为高度多态性的遗传标记<sup>[6]</sup>。与 IS6110-RFLP 相比, 其最大优点

是简便、快速(PCR速度),并且可以标准化,便于不同实验室间进行比较<sup>[4,5]</sup>。但目前不同研究中所采用的VNTR位点还未实现统一和标准化,有比较大的随意性。各位点PI差别比较大,除了与选取菌株本身的特性有关,还和各位点本身的分辨率有关。这些VNTR位点对北京基因型菌株的分辨率也有所不同。本研究中,在所有菌株中分辨率较高的位点为MIRU31(PI值为0.428)和MIRU26(PI值为0.514)。在北京基因型菌株中分辨率最高的是MIRU26(PI值为0.390),最低的为ETR-B(PI值为0)。针对特定地区和人群,应选取分辨率较高的位点,所以有必要进行本地区的流行病学调查<sup>[7]</sup>。

鉴于其方便、快速以及较高分辨率的优点,VNTR可作为结核分枝杆菌流行病学调查中的初筛工具,不仅可进行基因型确认,还可结合Spoligotyping法鉴定北京基因型菌株。但由于VNTR分辨率的局限性,精确分型还得通过IS6110-RFLP进行确认。

#### 参 考 文 献

- 1 Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9):4040-4049.
- 2 Le Flèche P, Fabre M, Denoeud F, et al. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol*, 2002, 27, 2(1):37-48.
- 3 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4):907-914.
- 4 Kremer K, Au BK, Yip PC, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1):314-320.
- 5 Yun KW, Song EJ, Choi GE, et al. Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea by *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats*. *Korean J Lab Med*, 2009, 29(4):314-319.
- 6 Reyes JF, Tanaka MM. Mutation rates of spoligotypes and variable numbers of tandem repeat loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(7):1046-1051.
- 7 Ojo OO, Sheehan S, Corcoran DG, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Southwest Ireland. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(7):1110-1116.

(收稿日期:2009-11-04)

(本文编辑:孙荣华)

金嘉琳,姜昕,翁心华,等.数目可变串联重复序列分子指纹分型法鉴定北京基因型结核分枝杆菌[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(4):376-382.