

利用串联重复序列研究炭疽芽胞杆菌的基因分型

田国忠 海荣 俞东征 魏建春 马凤琴 蔡虹 张建华 郑玉红 付秀萍
张志凯 张恩民 徐冬蕾

【摘要】 目的 应用基因组中多位点串联重复序列遗传标记对不同地区 88 株炭疽芽胞杆菌进行基因分型。方法 炭疽芽胞杆菌染色体 DNA 基因组中存在着串联重复序列。在串联重复序列两侧设计引物, PCR 扩增, 琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶影像分析软件对 PCR 扩增产物碱基含量进行测算, 并与测序结果进行比较, 计算出串联重复拷贝数, 对拷贝数进行聚类分析。结果 (1) 聚类分析发现, 88 株菌株可分为三大群, 45 个基因型, 基因型与生态环境存在一定的关系。就某一地区炭疽暴发而言, 其可变数目串联重复序列遗传标记具有相似性。(2) 研究发现, A16R 疫苗株作为中国的疫苗株具有代表性。结论 炭疽芽胞杆菌基因组中的串联重复序列具有遗传稳定性和特异性, 可作为炭疽芽胞杆菌基因分型的指标, 在炭疽暴发和生物恐怖事件中的病原体溯源上具有重要的意义。

【关键词】 炭疽芽胞杆菌; 串联重复序列; 基因分型

Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Bacillus anthracis* TIAN Guo-zhong, HAI Rong, YU Dong-zheng, WEI Jian-chun, MA Feng-qin, CAI Hong, ZHANG Jian-hua, ZHENG Yu-hong, FU Xiu-ping, ZHANG Zhi-kai, ZHANG En-min, XU Dong-lei. Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: HAI Rong, Email: hairong@icdc.cn

【Abstract】 Objective To study the genotyping of *Bacillus anthracis* based on multiple-locus variable-number tandem repeats (VNTR) in the *B. anthracis* genome. **Methods** We selected 13 VNTR loci (which cited from published articles) to study 88 strains of *B. anthracis* isolated from China. The methods used were: (1) Selecting the primers which were at both ends of the tandem repeat locus; (2) Amplifying the sequence of the locus by PCR; (3) Detecting the PCR products by agarose gel and polyacrylamide electrophoresis; (4) Analyzing the PCR products and computing the molecular weight by analysis software of gel images; (5) Double-checking with sequencing results; (6) Reckoning the repeat numbers and study the VNTRs loci characters. **Results** (1) We used multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) to characterize 88 *B. anthracis* isolates from diverse geographic locations which were divided into 45 MLVA genotypes and 3 groups through cluster analysis. The genotypes was relative to restricted geographical region. It seemed clear that the multiple isolates from the same anthrax outbreak frequently having identical genotypes. (2) Results from VNTR analysis showed that A16R vaccine strain isolated from China was having the nature of representativeness in the country. **Conclusion** Analysis showed that the VNTR patterns was an appropriate study method for *B. anthracis* genetic diversity from different geographical areas and different time. Isolates from the same anthrax outbreak had identical VNTR genotyping.

【Key words】 *Bacillus anthracis*; Variable number tandem repeats; Genotyping

目前炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 作为生物武器愈来愈受到重视。由于炭疽芽胞杆菌 DNA 高度保守以及目前使用的分子生物学技术分辨率不高, 对该菌基因分型的研究进展不大。1997 年

Keim 等用扩增片段长度多态性技术, 从该菌染色体中鉴定出约 30 个可变区, 认识到菌株染色体 DNA 中存在着多样性; 在 1999 年利用 *B. anthracis* 菌株 DNA 上的 8 个不同的可变数目串联重复序列 (VNTR) 位点, 将世界不同地区的 426 株 *B. anthracis* 菌株用 MLVA 法将其分为 88 个基因型, 聚类分析分为 6 个主要基因群, 并且认为基因型

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

通讯作者: 海荣, Email: hairong@icdc.cn

与地理分布存在着相关性。本研究应用炭疽芽胞杆菌基因组中的 13 个串联重复序列遗传标记对来自中国不同地区炭疽芽胞杆菌进行了分析。

材料与与方法

1. 菌株来源: 中国 17 个省 85 株菌和 3 株疫苗株, 共 88 株菌。

2. 主要设备: PCR 基因扩增仪 (Stratagene[®] 公司 Robocycler[®] Gradient 40 型), UVIpro GAS7001X 凝胶影像分析系统 (UVI 公司), 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), 水平电泳仪 (北京东方仪器厂), 垂直电泳系统 (Bio-Rad 公司), 附有冷凝设备的垂直电泳系统 (OWL 公司)。

3. 主要试剂: TaqDNA 聚合酶、dNTP、100 bp Marker 购自华美生物工程公司, 质粒提取试剂盒购自基因公司, PCR 产物纯化试剂盒购自赛百盛生物制品公司。丙烯酰胺 (Bioasia Ltd), N'-N-亚甲基双丙烯酰胺 (北京化工厂产品), 50 bp Marker 购自 Promega 公司。AgNO₃ 染色所用试剂均为国产的分析纯试剂。

4. 方法:

(1) 基因组 DNA 提取: 用常规的蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿提纯。

(2) 引物: 参照文献 [1, 2] 上已发表的引物序列。

(3) PCR 扩增: 25 μl 反应体系中含 10 × PCR buffer 2.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μl, 10 nmol/L 引物各 1 μl, DNA 模板 1 μl, 去离子水 14.5 μl。95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

(4) 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测: 取 2 μl PCR 反应液, 加 0.5 μl 溴酚蓝载样缓冲液混合, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 150 min, 硝酸银染色后, 用读胶仪分析结果。

(5) 产物分子量测定: UVIpro GAS7001X 凝胶影像分析系统中带一个分子量计算软件, 利用此软件对分子量进行计算, 计算结果与测序结果比较。

(6) 测序: PCR 扩增片段长度 < 500 bp, 用 PCR 产物直接测序。对测序结果不理想的菌株, 进行克隆测序, 测序工作由上海博亚生物公司和上海生工生物工程技术有限公司完成。

(7) PCR 产物的克隆: 使用 Invitrogen 公司的 TOPO TA Cloning[®] Kit, 该试剂盒自带载体 pCR[®]

2.1-TOPO[®]和感受态细菌 One Shot[®]TOP10。

(8) 序列的比较分析: 使用 DNA Star 序列分析软件, 将测序结果与发表序列之间进行比较。

(9) 重复数目的确定: 根据菌株的测序结果确定基础重复数, 其他菌株 VNTR 的 PCR 扩增片段大小与之比较, 得出重复数目。

(10) 使用 Bionumeris 软件聚类分析, 统计方法为 Ward's, 遗传学关系用相似度表示。

结 果

1. 不同的 VNTR, 其拷贝数目有差异, 表现在多态性信息指数不同, 即某一位点的串联重复序列拷贝数多, 且分散于各菌株间, 其多态性信息指数就大, 反之, 如果拷贝数少, 且集中于某一拷贝上, 则多态性信息指数偏小, 表 1 归纳了炭疽芽胞杆菌基因组中 13 个 VNTR 遗传标记特征。

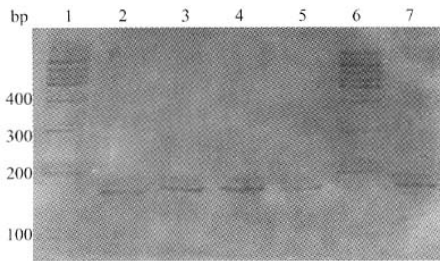
表1 13 个 VNTR 遗传标记特征

VNTR 遗传标记	串联重复单位碱基数	拷贝数	等位基因数	多态性信息指数
VrrA	12	7, 8, 9	3	0.07
VrrB1	9	15	1	0.00
VrrB2	9	6, 7	2	0.03
VrrC1	36	4, 7, 9, 10	4	0.64
VrrC2	18	12, 16, 20	3	0.27
CG3	5	3, 4	2	0.30
DC3	15	24, 26, 27, 28, 29	5	0.58
DC13	9	16, 22, 23, 54, 62, 67, 113	7	0.73
VrrE	39	4, 5, 6, 7	4	0.48
VrrF	15	5	1	0.00
VrrG	18	12, 23, 25	3	0.09
VrrK	27	12, 16, 18, 19, 21, 24	6	0.36
VrrM	42	8, 10	2	0.04

注: 多态性信息指数(D^o) 计算方法是 1 - Σ(等位基因频率)²

2. 为了验证凝胶仪分子量分析软件分析 PCR 产物 DNA 片段碱基数的正确性, 对 38 株菌 13 个 VNTR 位点具有差异的 DNA 片段进行了测序, 测序的结果与电泳的结果一致, 即核苷酸的碱基数一致。图 1 为 VNTR01 位点 5 株炭疽芽胞杆菌 PCR 扩增产物, 应用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱, 泳道 2 与 3, 4, 5 相差 5 bp; 2 泳道为 153 bp, 3~7 泳道为 158 bp。可以看出每株菌的电泳条带都是惟一的, 即串联重复序列在基因组中具有特征性。图 2 为泳道 2, 3 和炭疽芽胞杆菌测序菌株 (NC-003997) 序列比对结果, 与电泳结果一致。在验证菌株 DNA 基因组中 VNTR 的遗传稳定性时, 我们做了两方面的工作, 一是对 88 株菌的 DNA 至少重复 2 次 PCR 扩增, 凝胶电泳; 二是选择了 30 株菌进行二次传菌、

提取 DNA、PCR 扩增、凝胶电泳,结果证实串联重复序列在传代培养、DNA 提取和储存、PCR 扩增过程中不会发生变异。



注:1,6:100 bp的 DNA 标准分子量; 2~5,7:PCR 扩增产物的 DNA 片段

图1 VNTR CG3 部分菌株凝胶电泳图谱

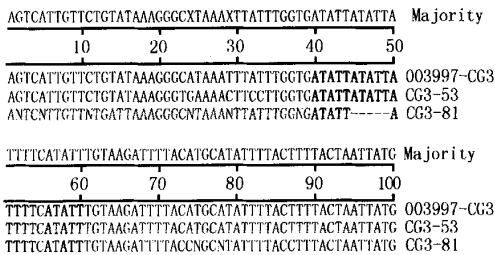


图2 VNTR CG3 测序序列对比结果

3. 聚类分析:基因型的分型标准是,13 个遗传标记串联重复数完全相同的归为一类,13 种组合中有一个遗传标记不同的就归为另一类。分析发现 88 株炭疽芽胞杆菌以相似度为 4 时,可分为 A、B 和 C 三大群,45 个基因型,结果见图 3。新疆菌株 79%(26/33)在 A 和 B 两大群内,广西菌株 67%(14/27)在 C 群中;以相似度为 40 时,A 群又可分为 A1 和 A2 两个亚群;C 群可分为 C1 和 C2 两个亚群。A1 亚群内 20 和 61 号菌株与其他菌株遗传距离较远,20 号菌株是 1991 年从新疆皮毛厂生皮中分离到的菌株,61 号菌株是 1993 年广西一头病牛中分离菌。PASTUER 疫苗株在 A2 亚群内;A2 亚群内 81 号菌株与其他菌株遗传距离较远;C 群的 C1 亚群中菌株来源复杂,基因型多样,19 株炭疽芽胞杆菌分别来自 10 个地区;C2 亚群中第 40 基因型包括 16 株菌,分别来自甘肃、广西、内蒙古、广东、河

北、贵州 7 个省(自治区),是中国炭疽芽胞杆菌菌株的主要基因型,其中包括 A16R 疫苗株,这株疫苗株是来自中国。聚类分析结果见图 3。

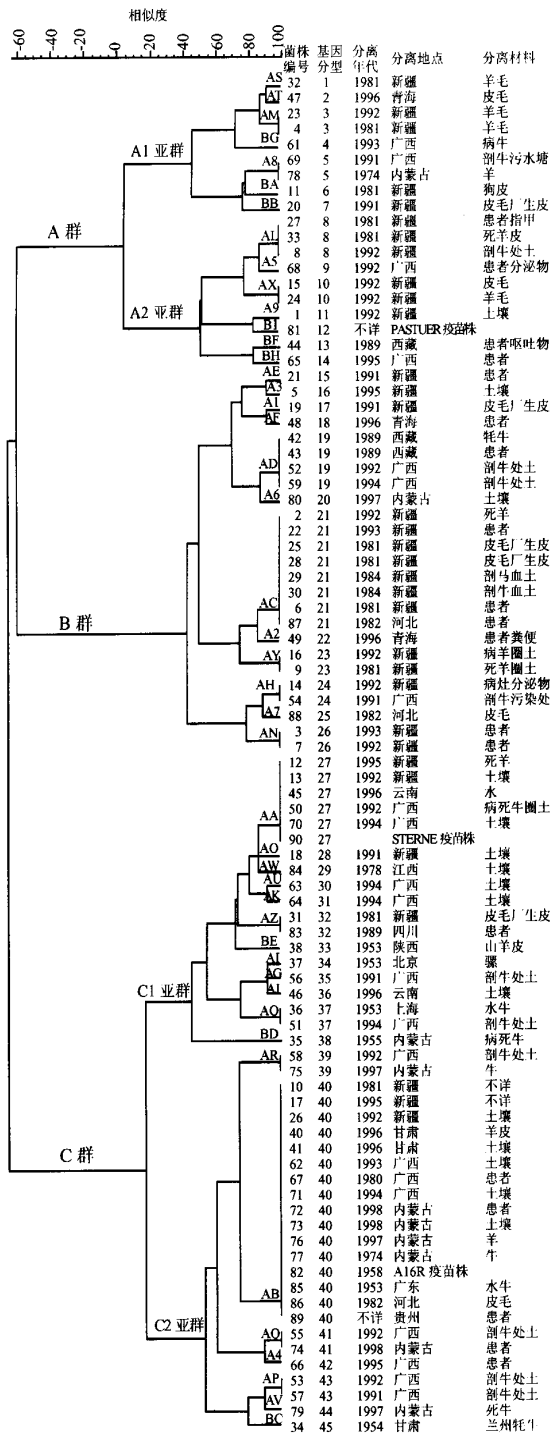
4. 局部地区炭疽暴发分离菌 VNTR 分析见表 2。1989 年西藏昌都县炭疽暴发患者与病畜分离到的菌株,13 个 VNTR 的拷贝数完全一致。青海省湟中县 1996 年炭疽暴发患者与分离材料分离的菌株,其 VNTR 差异较小,13 个位点上,只在 VNTR D4 和 VrrA 位点上串联重复拷贝数有差别。

讨 论

MLVA 技术作为一种新的基因分型方法应用于鼠疫耶尔森菌、金黄色葡萄球菌、结核分支杆菌、布鲁氏菌基因分型等方面^[3-6]。王秉翔等^[7]利用炭疽芽胞杆菌基因组中的 8 个串联重复序列对 193 株菌进行了研究,结论是菌株 DNA 的多样性有明显的地理分布规律。我们应用已经发表的炭疽芽胞杆菌 DNA 中 13 个串联重复序列分析了我国不同地区、不同年代的 85 株炭疽芽胞杆菌。在这些菌株中,其串联重复序列依据结构、位置和重复数的不同而呈多态性。就某一地区的菌株,其 VNTR 分布有其规律性,如新疆和广西分离到的菌株大部分集中在某一群内。对我国部分炭疽暴发地区分离到的菌株进行 MLVA 聚类分析,发现某些暴发地区病例分离菌与当地污染的土壤和病畜分离菌 VNTR 是一致的,说明他们是来自于同一克隆株。MLVA 技术在炭疽感染事件中追溯传染源,甚至菌株的鉴定方面,是一种很好的分析方法。2001 年美国“9.11”炭疽恐怖事件,Hoffmaster 等^[8]应用 MLVA 技术分析了来自炭疽事件标本分离到的 135 株菌,所有的菌株都为同一基因型,并且与实验室使用的 Ames 菌株一致,进一步对其中的 42 株菌保护性抗原基因 *PagA* 进行测序,结果与 Ames 菌株 *PagA* 序列完全一致。Keim 等^[9]应用 MLVA 技术对日本奥姆真理教炭疽事件中的菌株进行了回顾性研究,发现 48 株菌有一致的基因型,与 Sterne 菌株的基因型一致,建立我国的炭疽芽胞杆菌菌株 VNTR 数据库资料,对于炭疽的暴发或者生物恐怖事件病原体的溯源具

表2 西藏昌都县和青海湟中县炭疽暴发患者与病畜分离菌 VNTR 比较

编号	年代	地区	材料	A	B1	B2	C1	C2	CG3	DC3	D4	E	F	G	M	K
42	1989	昌都	牦牛	7	15	7	4	16	4	29	62	7	5	23	19	10
43	1989	昌都	患者	7	15	7	4	16	4	29	62	7	5	23	19	10
48	1996	湟中	患者	7	15	7	4	16	4	29	23	7	5	23	19	10
49	1996	湟中	患者粪便	9	15	7	4	16	4	29	67	7	5	23	19	10



注:分型方法采用UPGMA,以聚类相似性系数4、40、100时对88株炭疽芽胞杆菌分别进行分群、亚群和基因分型

图3 88株炭疽芽胞杆菌VNTR聚类分析图

有重要意义。

聚类分析发现来自同一地理区域菌株的VNTR基因型不是完全相同,或者能够归类到主要的基因

型中,有些地区的菌株VNTR存在差异的情况,被分在遗传关系较远的类型中。分析其原因,可能存在于下面几方面的原因:一是,炭疽主要发生于食草动物中,在牲畜的买卖和运输过程中,造成了地区间菌株的流动和分布的不均衡;二是,由于炭疽芽胞杆菌在自然环境中能形成稳定的芽胞,所以炭疽在每一次爆发性流行之后,如果形成了一定的突变体,那么它们随着形成的芽胞而稳定的存在于土壤环境中。因此,在多次爆发性流行之后,土壤环境中将会存在着多种多样的变异株,它们根据不同的生存条件各自繁殖和进化,形成了同一地区存在着菌株的多态性,由于上述的原因造成了基因分型的复杂性。

A16R疫苗株所在的VNTR基因型是我国炭疽芽胞杆菌菌株主要的基因型,包含了来自我国7个省的16株菌,占研究菌株的20%,因此,A16R疫苗株在我国的菌株中具有代表性。适合作为我国人群疫苗应用的菌株。

参考文献

- Keim P, Price BA, Klevytska M, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol, 2000, 182: 2928-2936.
- Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol, 2001, 1: 2.
- Alexandre MK, Lance BP, James MS. Identification of characterization of variable number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. JCM, 2001, 39: 3179-3185.
- Sabat A, Jolanta KR, Strzalka W. New method for typing staphylococcus aureus: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. JCM, 2003, 41: 1801-1804.
- 刘敬华, Christine Pourcel, 赵秀芹, 等. 7个VNTRs用于65株中国分离的结核分支杆菌基因多态性的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24: 733-737.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. Brucella 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol, 2003, 3: 15.
- 王秉翔, Smith KL, Keys C, 等. 中国的炭疽杆菌DNA分型及其地理分布. 微生物学免疫学进展, 2002, 30: 14-17.
- Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, et al. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States-bioterrorism-related anthrax. Emerg Infect Dis, 2002, 8: 1111-1116.
- Keim P, Smith KL, Keys C, et al. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo Anthrax release in Kameido, Japan. J Clin Microbiol, 2001, 39: 4566-4567.

(收稿日期:2005-10-13)

(本文编辑:尹廉)