

# 多位点可变串联重复序列技术用于西藏地区结核分枝杆菌基因分型的初步研究

石荔 范昕建 万康林

**【摘要】** 目的 初步探讨多位点数目可变串联重复序列 (MLVA) 技术在西藏地区结核分枝杆菌基因分型中的应用和初步了解西藏地区结核分枝杆菌数目可变串联重复序列 (VNTR) 基因型种类及其分布。方法 在拉萨、山南、林芝、日喀则、那曲、昌都 6 个地区结核病防治中心收集结核分枝杆菌临床分离菌株,设计引物,采用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳技术对结核分枝杆菌 20 个 VNTR 位点进行检测,并通过 BioNumerics 4.5 软件进行 DNA 指纹图谱多态性分析。结果 共收集到 217 株结核分枝杆菌,分为 19 个不同的 VNTR 基因型,其中以 XI 型为主要基因型占 87.6% (属于北京家族),其次 VI 型、XV 型、XVI 型各占 1.38%, I 型、VIII 型、XIII 型各占 0.92%, 12 株结核分枝杆菌为单一的基因型。不同地区之间,以 XI 型为主要基因型,分别占各地区的 86.8%、91.3%、78.95%、88.2%、95.0%、89.3%。结论 西藏地区的结核分枝杆菌存在明显的基因多态性,主要流行型为 VNTR XI 型 (即北京家族基因型),初步研究结果显示北京家族基因型与卡介苗接种和耐药性无相关性。MLVA 分型方法简单、快速,可以有效地用于结核分枝杆菌的基因分型和病原监测。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 多位点可变串联重复序列技术; 基因分型

**Preliminary study on genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Tibet with multiple locus variable numbers of tandem repeats** SHI Li\*, FAN Xin-jian, WAN Kang-lin. State Key Laboratory for Infectious Disease's Prevention, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinses Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China. \*West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn; FAN Xin-jian, Email: Fanxj531008@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the application of the multiple locus variable numbers of tandem repeats (MLVA) in genotype *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Tibet, and to understand the characteristics of genotype and distribution. **Methods** 217 *M. tuberculosis* strains were collected from six regions of Tibet. Twenty tandem repeats loci in the total genome of *M. tuberculosis* (MTB) were analyzed by PCR and agarose gel electrophoresis method. The characteristics on polymorphism of DNA fingerprinting of 217 MTB strains were analyzed with BioNumerics 3.0 software. **Results** 217 *M. tuberculosis* strains detected with 20 MLVA loci were classified to 19 genotypes with 87.6% of the stains belonging to Beijing genotype and the other 18 genotypes were scattered, accounted for 1.38% and 0.92% strains, respectively. Beijing genotype was not significantly associated with the resistance to all of the four drugs and BCG vaccination. **Conclusion** It is concluded that the strains of MTB isolated in Tibet present definite polymorphism and most of the epidemic strains belonged to Beijing family genotype and MTB genotyping. The Beijing genotype was not recognized as the one transferred from some of the drug resistance strains or from BCG vaccination. Being a fast and simple technique, MLVA method, seemed a better molecular typing method and could be used for genotyping in *M. tuberculosis* and monitoring pathogen.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Multiple locus variable numbers of tandem repeats; Genotyping

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471526)

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传染病预防控制国家重点实验室(石荔、万康林);四川大学华西医学院(范昕建)

第一作者现工作单位:610041 成都,四川大学华西临床医学院

通讯作者:万康林,Email:wankanglin@icdc.cn; 范昕建,Email:Fanxj531008@yahoo.com.cn

DNA 分型技术已成为结核病分子流行病学中的重要工具。其中基于插入序列 IS6110 限制性长度多态性分析 (IS6110-RFLP) 被公认为 DNA 分型方法中的“金标准”。但由于 IS6110-RFLP 有诸多缺点,限制了该方法的应用和普及<sup>[1,2]</sup>。多位点数目可变串联重复序列 (MLVA) 分型方法弥补了过去被视为“金标准”的 IS6110-RFLP 的不足,被检测菌株根据散在于基因组中的不同独立位点的数目可变串联重复序列 (VNTR) 重复单元拷贝数的多少来进行数字编码,然后根据每株菌数字编码的不同,利用相关软件通过计算机来对这些菌株进行自动分型。该方法操作简单,并能提供数字式的分型信息,重复性好,可比性强,具有对大量样本进行快速分析的能力,适合在基层推广应用,且可开展网络数据共享和分型鉴定,现已成为一个非常具有吸引力的细菌基因分型鉴定方法。西藏地区是我国结核病高发区,其菌株的分子特征、基因型分布及其主要流行型等均未见相关报道。为此,我们采用 MLVA 技术,选取结核分枝杆菌基因组中的 20 个 VNTR 位点,对西藏地区的结核分枝杆菌的临床分离株进行了分子分型分析。

### 材料与方 法

1. 临床菌株的收集:采用中国疾病预防控制中心传染病所提供的统一调查表,对到西藏地区结核病防治所就诊的拟诊结核病患者进行调查,并收集痰标本,用罗氏培养基常规分离培养结核分枝杆菌,收集阳性培养物,由中国疾病预防控制中心传染病所结核病室负责传代培养、鉴定和保藏。

2. 标准参照菌株:标准菌株 H37Rv 由中国疾病预防控制中心传染病所结核病室提供。

### 3. 临床菌株及其耐药性鉴

定:根据“结核病诊断细菌学检验规程”进行菌种鉴定。采取比例法对 217 株菌进行异烟肼 (INH)、利福平 (RFP)、乙胺丁醇 (EMB)、链霉素 (SM) 4 种药的药敏试验,4 种药物在罗氏培养基中的终浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 分别为 0.2、40.0、2.0 和 4.0,以耐药百分比  $>1\%$  为阳性。

4. VNTR 位点的选择:根据文献报道[3-9]和细菌基因数据库 (<http://minisatellites.upsud.fr>) 筛选 20 个串联重复基因位点 (表 1)。引物由赛百盛公司合成。

5. 菌株 DNA 的制备:将收集到的菌株接种于酸性 L-J 培养基,37℃ 孵育培养 2-4 周,至有菌落生长,取一菌环菌溶于 200  $\mu\text{l}$  TE (pH 值 8.0) 中,在旋

表 1 引物序列、重复片段大小及其在 H37Rv 中的重复次数

序号	名称	引物序列 (5'~3')	重复单位大小 (bp)	H37Rv 中重复次数	扩增片段大小 (bp)
1	ETR-A	L) ATTTTCGATCGGGATGTTGAT R) TCGGTCCCATCACCTTCTTA	75	3	397
2	ETR-B	L) GCGAACACCAGGACAGCATCATG R) GGCATGCCGGTGATCGAGATGG	57	3	292
3	ETR-C	L) GACTTCAATGCGTTGTGGA R) GTCTTGACCTCCACGAGTTC	58	4	346
4	ETR-D	L) GCGCGAGAGCCCGAACTGC R) GCGCAGCAGAAACGTCAGC	77	3	353
5	ETR-E	L) ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA R) GTGCCGACGTGGTCTTGAT	53	3	651
6	MIRU02	L) TGGACTTGCAGCAATGGCCAACT R) TATCGGACGCCGGCTCAAAAT	53	2	508
7	MIRU10	L) GTTCTTGACCAACTGAGTCGTCC R) GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	53	3	643
8	MIRU16	L) CCGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA R) CCCGTGTCGAGCCCTGGTAC	53	2	671
9	MIRU23	L) CAGCGAAACGAACCTGTGCTATCAC R) CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	53	6	873
10	MIRU26	L) CCCGCCTTCGAAACGTCGCT R) TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA	51	3	613
11	MIRU27	L) TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA R) GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	53	3	657
12	MIRU39	L) CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC R) CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	53	2	646
13	MIRU40	L) AAGCGCAAGAGCACCACAAAG R) GTGGGCTTGTA CTGCGAAT	54	1	199
14	Mtub01	L) GAGAAACAGGAGGGCGTTG R) TATTACGACGACCCTATGC	18	10	328
15	Mtub02	L) CGTGCACAGTTGGGTGTTTTA R) TTCGTT CAGGAACTCCAAGG	9	6	230
16	Mtub12	L) CTCCCACACCCAGGACAC R) CGGCCTACCCAAACATTCC	15	4	215
17	Mtub21	L) AGATCCCAGTTGTGTCGTCGTC R) CAACATCGCCTGGTTCTGTA	57	2	206
18	Mtub29	L) AACCCATGTCAGCCAGGTTA R) ATGATGGCACACCGAAGAAC	57	4	350
19	Mtub30	L) AGTCACCTTTCCTACCACTCGTAA R) ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAA	58	2	319
20	Mtub39	L) AATCACGGTAACTTGGGTTGTTT R) CACGGGGGAAAGCTTAGAC	58	5	479

涡混合器上混匀,沸水浴 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 置 -20℃ 保存备用。

6. 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTP、GoldView™ DNA 染料均购自华美生物工程公司。DNA Marker 100~1000 bp。

7. 聚合酶链反应(PCR): 扩增反应在 25 μl 反应体积中进行。反应体系中含上、下游引物各 10 μmol/L 1.5 μl, 1 mmol/L dNTP 5.0 μl, 10× Taq 酶 buffer 2.5 μl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 μl, Taq 酶 3 U/μl 0.5 μl, 被检 DNA 模板 5 μl, 三蒸水补充至反应体积。PCR 反应条件: 预变性 94℃ 10 min, 然后 94℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。

8. 琼脂糖凝胶电泳: 取 5 μl 扩增产物, 在 2% 琼脂糖 (Spanish 产品) 凝胶 (含 5 μl/ 100 ml GoldView™ DNA 染料) 上电泳。电泳结束后在紫外成像检测系统下观察结果, 并与 DNA Marker 比较确定 PCR 产物的相对分子质量( $M_r$ )大小。

9. 数据分析: 将检测菌株呈现的 PCR 扩增指纹经 Gel-Pro analyzer 3.1 软件数据化, 通过与 H37Rv 进行比较, 进一步确定每株菌每个 VNTR 特异位点重复单元的重复次数, 再用 BioNumerics (Version 3.0) 数据库软件进行聚类分析, 根据 cluster cut off 值确定 VNTR 基因分型。

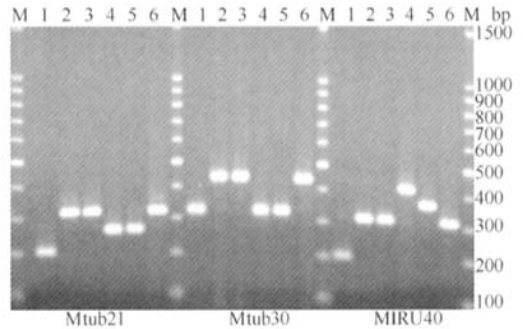
**结 果**

1. 一般情况: 来自西藏 6 个地区的结核病患者痰液中共分离到 217 株结核分枝杆菌, 包括拉萨地区 91 株, 山南地区 23 株, 林芝地区 19 株, 日喀则地区 35 株, 昌都地区 28 株, 那曲地区 21 株; 初治 108 株, 复治 109 株; 男性 118 株, 女性 99 株; 平均年龄 34.8 岁; 复治患者用药规则 40 例, 用药不规则 72 例; 接种 BCG 者 99 例, 未接种 BCG 者 118 例。

2. VNTR 多态性检测: 共选取了 20 个 VNTR 基因位点对西藏地区的结核分枝杆菌进行检测, 发现不同菌株的 DNA 指纹图谱呈现出多态性 (图 1、2)。

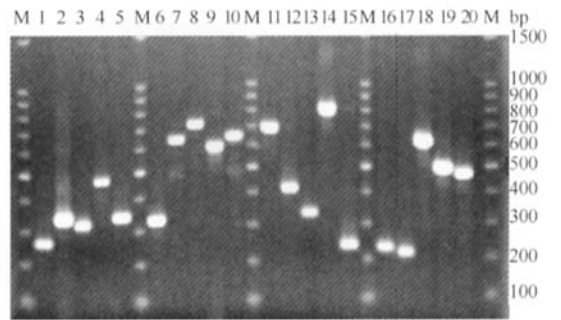
3. VNTR 基因分型分析: 分别对 217 株结核分枝杆菌的 20 个 VNTR 位点 DNA 进行了检测, 根据被检菌株扩增后电泳所呈现的片段分子量大小, 计算其重复次数, 再根据重复次数经基因聚类分析。本次所检菌株可分为 19 个基因型 (表 2, 图 3), 其中 12 株菌为单一基因型。其他 206 株结核分枝杆菌

分 7 个基因型别, XI 型所占比例最大为北京家族, 为 87.6% (190/217), 其他依次 VI 型、X V 型、X VI 型占 1.38% (3/217), I 型、VII 型、X III 型分别占 0.92% (2/217)。



M: 分子量标准; 1: H37Rv; 2: XZ06023; 3: XZ06063; 4: XZ06106; 5: XZ06107; 6: XZ06141

**图1** 西藏地区结核分枝杆菌菌株的 3 个不同 VNTR 位点的多态性检测结果



M: 分子量标准; 1: Mtub21; 2: Mtub29; 3: Mtub30; 4: ETR-A; 5: ETR-C; 6: ETR-D; 7: MIRU10; 8: MIRU16; 9: MIRU26; 10: MIRU27; 11: ETR-E; 12: MIRU-40; 13: Mtub01; 14: MIRU23; 15: ETR-B; 16: Mtub02; 17: Mtub12; 18: MIRU39; 19: MIRU02; 20: Mtub39

**图2** 西藏地区结核分枝杆菌菌株 XZ06109 的 20 个不同 VNTR 位点的多态性检测结果

4. 不同地区结核分枝杆菌菌株分布: 西藏 6 个地区间结核分枝杆菌 VNTR 基因型存在一定的差异 (表 2, 图 4), 但均以 XI 型 (北京家族基因型) 为主。拉萨地区有 11 个基因型, 分别为 II、IV、V、VI、VII、VIII、X、XI、X III、X V、X VII; 山南地区有 3 个基因型, 分别为 I、XI、X VI; 林芝地区有 4 个基因型, 分别为 I、IX、XI、X VI; 日喀则地区有 5 个基因型, 分别为 III、XI、XII、X IV、X VIII; 昌都地区有 4 个基因型, 分别为 VI、X、XI、X IX; 以 XI 为主; 那曲地区有 3 个基因型, 分别为 VII、XI、X III。

表2 217 株西藏结核分枝杆菌 VNTR 基因型及其地区分布

基因型	菌株数 (%)						合计
	拉萨	山南	林芝	日喀则	昌都	那曲	
I	0	1	1	0	0	0	2
II	1	0	0	0	0	0	1
III	0	0	0	1	0	0	1
IV	1	0	0	0	0	0	1
V	1	0	0	0	0	0	1
VI	2	0	0	0	1	0	3
VII	1	0	0	0	0	1	2
VIII	1	0	0	0	0	0	1
IX	0	0	1	0	0	0	1
X	0	0	0	0	1	0	1
XI	80	21	15	30	25	19	190
XII	0	0	0	1	0	0	1
XIII	1	0	0	0	0	0	1
XIV	0	0	0	1	0	0	1
XV	3	0	0	0	0	0	3
XVI	0	1	2	0	0	0	3
XVII	1	0	0	1	0	0	2
XVIII	1	0	0	0	0	0	1
XIX	0	0	0	0	1	0	1
合计	93	23	19	34	28	20	217

5. XI 型菌株特征: 在 XI 型菌株中, 64.02% (121/189) 耐药, 其中 56.6% (107/189) 的耐 INH, 51.32% (97/189) 耐 RFP, 48.68% (92/189) 耐 SM, 7.41% (14/189) 耐 EMB, 44.93% (85/189) 耐多药 (MDR), 但其耐药性与其他基因型的差异均无统计学意义, 且 XI 型菌株与其他基因型相比在是否接种 BCG、性别的差异均无统计学意义 (表 3)。

表3 西藏地区结核分枝杆菌 XI 基因型 (北京家族) 与 BCG 接种和耐药的相关性分析

特征	基因型		OR 值 (95% CI)	P 值
	XI	其他		
男	105	13	1.442 (0.651~3.198)	0.366
女	84	15		
BCG 接种				
无	103	15	1.038 (0.468~2.301)	0.927
有	86	13		
INH 耐药	107	20	0.522 (0.219~1.244)	0.138
敏感	82	8		
RFP 耐药	97	14	1.054 (0.477~2.332)	0.896
敏感	92	14		
EMB 耐药	14	4	0.480 (0.146~1.578)	0.218
敏感	175	24		
SM 耐药	92	10	1.707 (0.749~3.892)	0.200
敏感	97	18		
MDR 是	85	14	0.817 (0.369~1.809)	0.618
非	104	14		

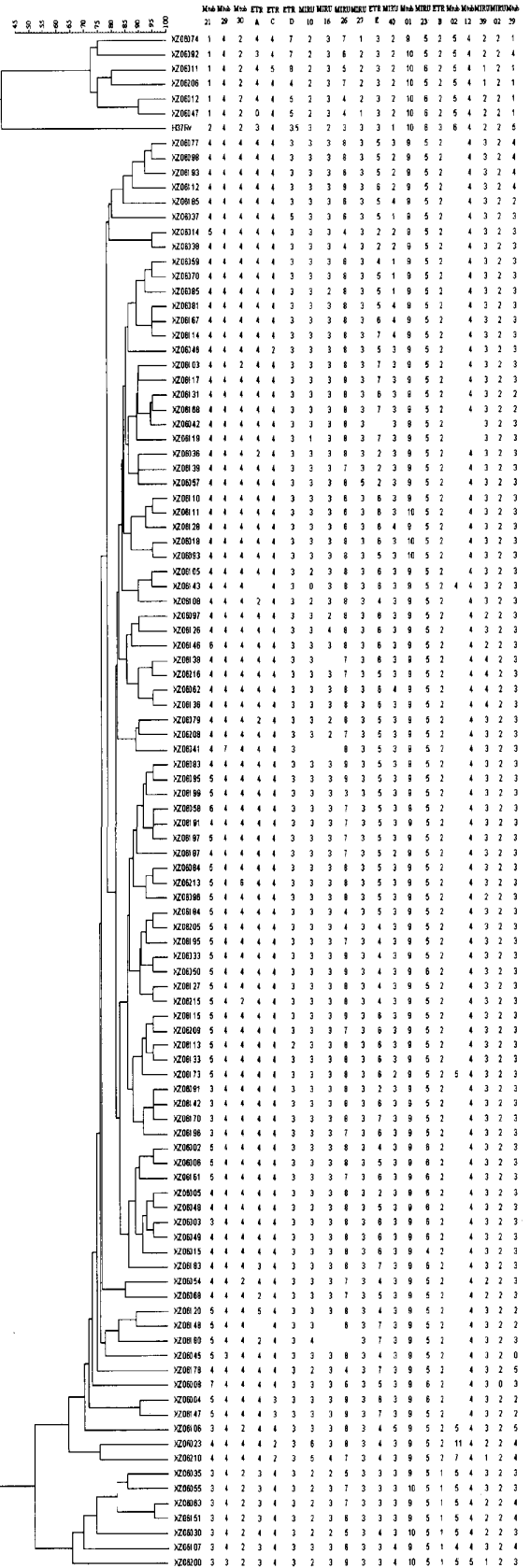


图3 217 株西藏结核分枝杆菌 VNTR 基因型聚类分析截图

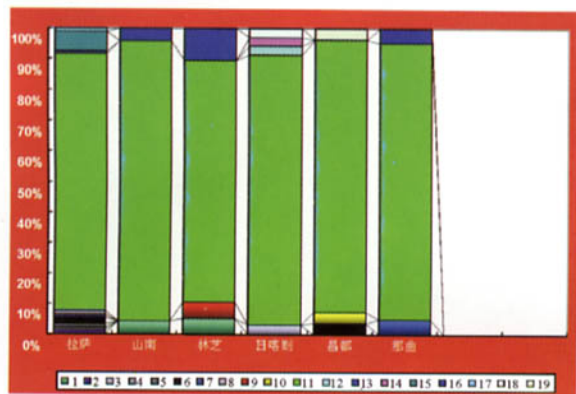


图4 西藏不同地区结核分枝杆菌的 VNTR 基因型构成分布

## 讨 论

本文对西藏地区 217 株结核分枝杆菌使用了 20 个位点的 VNTR 分型方法,得到明确的数字化分型结果,将 217 株菌共分成 19 种基因型,其中 11 株菌为单一基因型,认为是无关的临床分离株,可能具有独立的感染情况或是内源性复燃。其他 206 株结核分枝杆菌分属 8 个基因型,其中 3 个基因型含有 3 株结核分枝杆菌,4 个基因型含有 2 株结核分枝杆菌,一个占主导地位的基因型含有 189 株结核分枝杆菌,提示在此基因型的各菌株间存在一定的联系。说明西藏地区分离的结核分枝杆菌大部分属于一个亲缘关系很近的克隆系,是西藏地区的主要流行株。加强对此类菌株的研究和监测,对西藏地区的结核病疫情的控制能产生积极的影响。

北京家族菌株是来自共同祖先的一个密切相关的克隆传播群,该家族内的菌株常表现相同的 VNTR 类型(42435)<sup>[10,11]</sup>。在本研究的西藏地区 217 株结核分枝杆菌中,北京家族占主导地位(XI 型基因),占 87.1% (189/217)。van Soolingen 等<sup>[12]</sup>在 BCG 广泛应用的中国和突尼斯发现,结核分枝杆菌基因型变化比未应用 BCG 的地区如荷兰和埃塞俄比亚为少,中国毗邻的蒙古、韩国和泰国有类似的基因型较小的变化,提示具有选择性优势的基因型进化,近而产生一种假说:BCG 的使用可能引起优势克隆的选择。北京基因型的选择优势可能由接种 BCG 诱导所致。此类菌对 BCG 疫苗产生耐受,可能属于“逃逸突变株”<sup>[13]</sup>。本文研究显示,BCG 接种与感染 VNTR 主导类型菌株的联系未达到统计学意义,考虑北京家族的菌株可能与 BCG 的选择性压力无关。以往研究还表明北京家族占优势的另一种可能原因与其耐药性有关,在越南的耐药性与北京家族有联

系<sup>[13]</sup>。但在本研究中占主导地位的北京家族与 INH、RFP、SM 和 EMB 4 种药耐药性以及 MDR 的联系均未达到统计学的意义,故不能认为北京家族占优势来自对这些抗痨药的耐药。因而,耐药本身尚不能成为北京家族占主导的惟一解释。本次研究中,112 株结核分枝杆菌为复治患者,其耐药率达到 100%,考虑是由于不规则的服用抗痨药引起,故应加强西藏地区结核病健康教育。

## 参 考 文 献

- [1] Sola C, Ferdinand S, Mammina C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population based analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 1559-1565.
- [2] Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 647-651.
- [3] Barlow RE, Gascoyne-Binzi, Frothingham R, et al. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 69-74.
- [4] Hawkey PM, Smith EG, Evans JT, et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110 based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 3514-3520.
- [5] Kwara A, Schiro R, Cowan LS, et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 2683-2685.
- [6] Lee AS, Tang LL, Lim IH, et al. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high resolution minisatellite based typing. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 657-659.
- [7] Savine E, Warren RM, Van der Spuy GD, et al. Stability of variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4561-4566.
- [8] Sola C, Ferdinand S. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population based analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 1559-1565.
- [9] Supply P, Lesjean S. Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3563-3571.
- [10] Drobniw S, Balabanova Y, Ruddy M, et al. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 3132-3137.
- [11] Mokrousov I, Filioli I, Legrand E, et al. Molecular characterization of multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia and analysis of rifampin resistance using RNA/RNA mismatch analysis as compare to the line probe assay and sequencing of the rpoB gene. *Res Microbiol*, 2002, 153: 213-219.
- [12] van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, et al. Predominance of a single genotype of *M. tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 3234-3238.
- [13] Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis*, 2006, 6(3): 302-305.

(收稿日期: 2006-11-22)

(本文编辑: 张林东)