

可变数目串联重复序列技术用于中国 C 群脑膜炎奈瑟菌基因分型的研究

田国忠 邵祝军 李马超 高源 徐丽 崔志刚 任红宇 王艳华

【摘要】 目的 利用脑膜炎奈瑟菌基因组中可变数目串联重复序列(VNTR)特征,对中国 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株进行基因分型。方法 中国 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株 109 株,选择脑膜炎奈瑟菌 DNA 中 4 个 VNTR 位点,PCR 扩增含有串联重复序列的 DNA 片段,选择每一个 VNTR 位点有差别的 PCR 产物进行测序,序列比对,测算串联重复序列的拷贝数。Bio-Rad Gel Doc™ XR 凝胶成像分析系统计算 PCR 产物 DNA 片段的碱基含量,换算成串联重复数;对 109 株菌株 4 个位点的串联重复序列拷贝数进行聚类分析,依据聚类分析结果进行基因分型,并将 VNTR 基因分型结果与脉冲场凝胶电泳基因分型(PFGE)结果进行比较。结果 109 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株分为 22 个 VNTR 基因型,同一暴发来源的菌株具有相同 VNTR 特征;VNTR 基因分型方法与 PFGE 基因分型具有相关关系。结论 应用 VNTR 技术可以对中国 C 群脑膜炎奈瑟菌进行基因分型和分子流行病学方面的研究,VNTR 基因分型可较好地应用于追溯流行性脑脊髓膜炎暴发传染源。

【关键词】 C 群脑膜炎奈瑟菌;可变数目串联重复序列;基因分型

Study on the use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitidis* serogroup C isolates in China TIAN Guo-zhong, SHAO Zhu-jun, LI Ma-chao, GAO Yuan, XU Li, CUI Zhi-gang, REN Hong-yu, WANG Yan-hua. National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To study the variable number of tandem repeats(VNTR) genotyping of serogroup C *Neisseria meningitidis* strains discovered in China. **Methods** We randomly selected 109 serogroup C meningococci strains. Four VNTR loci in *Neisseria meningitidis* DNA genome were studied. The polymorphism numbers of copies in the four VNTR loci were studied by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products resulting from the amplification of the four VNTR for each isolate were electrophoresed and photographed under Bio-Rad Gel Doc™ XR imagery equipments. PCR products were analyzed and the molecular weight of gel images were computed and analyzed by software. To reckon the repeat numbers in each locus of every isolate, different DNA segments in each VNTR locus were sequenced. Using UPGMA cluster analysis techniques to study the genotyping of copies numbers in the four VNTR loci in C meningococci strains genome and to compare the result of VNTR typing with pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) typing from 105 isolates of the studied 109 isolates. **Results** 109 serogroup C meningococci isolates were divided into 22 VNTR genotypes. Identical types were distributed in the strains which associated with the same outbreaks. Correlation was observed between VNTR clusters and PFGE clusters. **Conclusion** As one of the molecular techniques, VNTR could be used for serogroup C meningococci isolates genotyping, in China. VNTR analysis might be used for fine typing of meningococcal isolates which belonged to the same clonal complex.

【Key words】 *Neisseria meningitidis*, serogroup C; Variable number of tandem repeats; Genotyping

流行性脑脊髓膜炎(流脑)是由脑膜炎奈瑟菌感染引起的以化脓性脑膜炎为主要症状的急性传染病。

根据脑膜炎奈瑟菌荚膜多糖抗原结构和免疫学的不同,将脑膜炎奈瑟菌分为 13 个血清群,A、B、C 是引起脑膜炎的主要菌群。我国历史上流脑的爆发性流行主要以 A 群为主,95% 的流脑病例是由 A 群引起,B 群和 C 群仅引起散发^[1]。2003 年开始,我国部分地区开始出现 C 群流脑的暴发,经脉冲场凝

基金项目:国家科技部攻关课题资助项目(2005BA711A09)

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:邵祝军,Email:shaozhujun@icdc.cn

胶电泳 (PFGE) 及多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 分析, 发现我国 C 群菌株 84% 为 PFGE AH1 型菌株, 并发现一种新的 ST-4821 序列型菌株^[2]。原核和真核生物基因组中广泛存在着可变数目串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTRs), 具有高度的多态性和相对稳定的特征。菌株基因组中 VNTR 拷贝数的差异可作为基因分型指标已应用于某些微生物的研究领域^[3-5]。我们选用 VNTR 分型技术, 对我国 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株进行基因分型和分子流行病学方面的研究。

材料与方法

1. 实验用菌株: 共 109 株, 其中 102 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株为 2003-2004 年流脑流行季节以及 2004-2005 年全国流脑流行病学调查中分离到的菌株; 7 株菌株为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所保存历年 C 群菌株。

2. 试剂和仪器: Taq 酶、dNTP (TaKaRa 公司)、琼脂糖 (Bio-instrument YiTO. Company Limitd)、100 bp DNA Ladder Marker 和 Goldview 替代染料 (华美生物工程公司); 引物由北京赛百盛公司合成, VNTR 引物序列引用文献 [6], VNTR01-F: 5'-GACGGGTCAAAGACGGAAG-3', VNTR01-R: 5'-GGCATAATCCTTTCAAACCTTCG-3'; VNTR02-F: 5'-CTCCCCGATAGGCCCGAAATACC-3', VNTR02-R: 5'-AAAGCGGCGGAATGACGAAGAGT-3'; VNTR03-F: 5'-GCAGAAACCCCGCAGACAGGATGG-3', VNTR03-R: 5'-CCGCGGCGCGGTGATGACTT-3'; VNTR04-F: 5'-GACCCTGACCGTCGGAAACC-3', VNTR04-R: 5'-ATACCGCCCTGCTGTTGTGC-3'; 本实验设计引物 T02、T03 分别为扩增脑膜炎奈瑟菌毛蛋白相关基因 (该基因未命名) 和旋转异构酶基因, 引物 T02-F: 5'-CCACACCGCTATCCGATTTACCTA-3', T02-R: 5'-ACAGCCATCTCTACAACCCATCT-3'; 引物 T03-F: 5'-TGCGGCGGAGGAAACGGACAATC-3', T03-R: 5'-TGATGGCGGGTTTGGGGTTGTGC-3'。基因测序由 TaKaRa 公司完成; Bio-Rad Gel DocTM XR 凝胶成像仪。

3. PFGE 基因分型: 本实验的 105 株脑膜炎奈瑟菌菌株脉冲场电泳分型 (PFGE) 结果见文献 [2]。

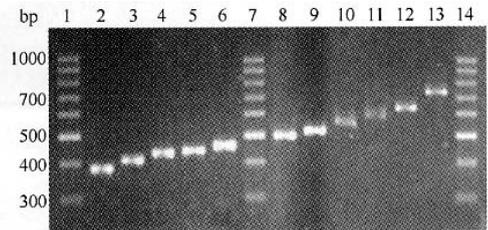
4. PCR 扩增: 引物 VNTR01-04, T02-03 引物扩

增体系, 50 μl 反应体系, PCR 扩增参数: 预变性 94℃ 5 min, 后续循环 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后延伸, 72℃ 5 min。2% 的琼脂糖凝胶 (Spanish 产品), 标准分子量 100 bp DNA Ladder Marker 作为参照。

5. PCR 产物分子量及序列测定、聚类分析: Bio-Rad Gel DocTM XR 凝胶成像分析系统中的分子量计算软件对 PCR 产物的 DNA 片段碱基含量进行测算; 选择每一个 VNTR 位点有差别的 PCR 产物进行测序, 进行序列比对, 发现串联重复序列的拷贝数。以串联重复序列拷贝数为变量, 采用 UPGMA 方法, 使用 BioNumerics (Version 3.0) 软件进行聚类分析。DNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成 (ABI PRISM TM 377 XL DNA Sequencer), DNASTAR 软件进行序列分析。

结 果

1. 引物 VNTR01-04 PCR 扩增: 同一引物对不同的菌株进行 PCR 扩增, 4 对引物扩增出不同分子量的 DNA 片段, 其分子量大小差异, 表明不同菌株中 VNTR 重复单位拷贝数的不同 (图 1)。109 株脑膜炎奈瑟菌串联重复序列拷贝数呈现多态性和独特的 VNTR 遗传特征, 4 个串联重复序列单位内的重复单位碱基数目分别为 VNTR01 (7 bp)、VNTR02 (13 bp)、VNTR03 (9 bp)、VNTR04 (9 bp) (表 1)。



1, 7, 14: 标准分子量 (bp), 最大 1000 bp, 最亮的条带为 500 bp, 最小 300 bp, 条带间隔 100 bp; 2~6, 8~13: 引物 VNTR01-F(R) 扩增 11 株不同的脑膜炎奈瑟菌电泳结果; PCR 扩增片段大小分别为 2: 396 bp, 3: 403 bp, 4: 424 bp, 5: 473 bp, 6: 487 bp, 8: 494 bp, 9: 522 bp, 10: 564 bp, 11: 599 bp, 12: 627 bp, 13: 719 bp

图1 VNTR01 位点不同脑膜炎奈瑟菌菌株 PCR 扩增 DNA 片段的琼脂糖电泳图

2. 脑膜炎奈瑟菌毛蛋白相关基因和旋转异构酶基因检测: VNTR02 和 VNTR03 位点分别位于编码脑膜炎奈瑟菌毛蛋白相关基因和旋转异构酶基因内, 实验中发现 1 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株用引

物VNTR02-F、R和VNTR03-F、R未扩增出电泳条带,根据 GenBank 中脑膜炎奈瑟菌菌毛蛋白相关基因和旋转异构酶基因序列,在基因两侧设计两对引物 T02 和 T03,对 VNTR02 和 03 引物 PCR 扩增阴性的菌株进行脑膜炎奈瑟菌菌毛蛋白相关基因和旋转异构酶基因检测,结果为阴性,提示该菌株缺失了这两个基因。

表1 VNTR 位点的遗传特征

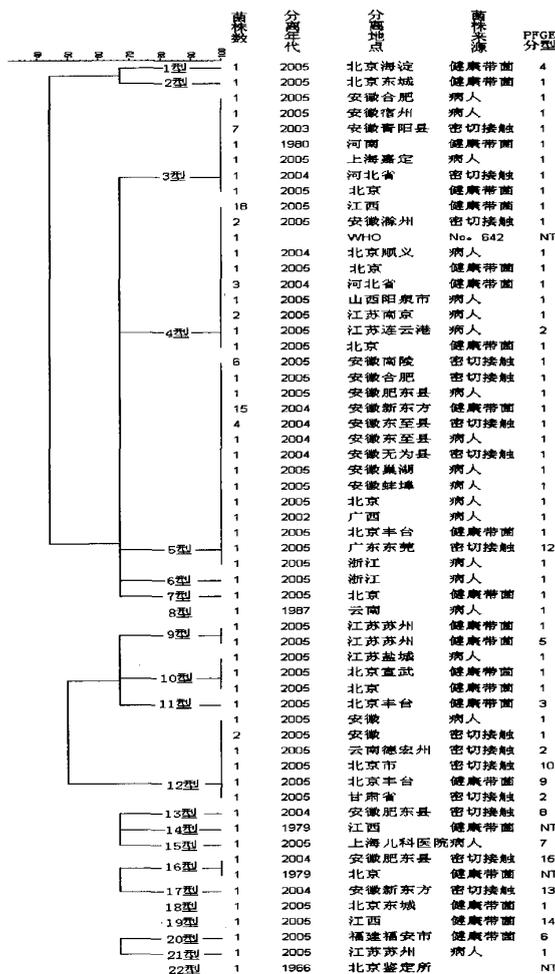
VNTR 位点	串联重复单位	VNTR 位点串联重复的拷贝数
VNTR01	CAAACAA	6,7,10,17,19,21,24,30,35,39,52
VNTR02	GGGCTGTAGAGAT	4,10,12,13,14,15,16,18,20
VNTR03	GGCAACTTT	7,9,11,13,16,17
VNTR04	GCCAAAGCT	4,5,6,7,8,9,12,13,15

3. VNTR 聚类分析:VNTR01 位点 PCR 扩增 DNA 片段差异(串联重复数目的差异)存在着复杂的多态性,不适合作为脑膜炎奈瑟菌 C 群菌株基因分型指标,故以 VNTR02、VNTR03、VNTR04 位点上重复单位拷贝数为变量进行聚类分析。遗传相似系数为 100 时,可将 109 株菌株分为 22 个基因型,其中 3 型(13 株)、4 型(31 株)、5 型(36 株)、12 型(7 株)为主要基因型,菌株占 79.8% (87/109)(图 2)。

不同地区的菌株 VNTR 基因型具有规律性。安徽省 48 株 C 群流脑菌株,89.5% (43/48) 菌株为 3 型(9 株)、5 型(31 株)、12 型(3 株)基因型。2003 年安徽省青阳县 C 群流脑暴发中密切接触者分离的 7 株菌均为 3 型;2004 年安徽省新东方烹饪学校共收集 16 株密切接触者 C 群流脑菌株,93.8% (15/16) 菌株为 5 型,另外 1 株为 17 型;安徽省南陵县的 6 株 C 群密切接触者流脑菌株为 5 型。2004 年安徽省东至县分离的 1 株患者菌株和 4 株密切接触者菌株同为 5 型;2005 年江西省健康人群携带者分离菌株 20 株,其中 18 株为 VNTR 基因型 4 型;2005 年北京市 15 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株较为分散,包括 1、2、3、4、5、7、10、11、12、16、18VNTR 基因型,其中北京铁路疾病预防控制中心分离到 5 株,分别属于 3 型(1 株)、4 型(2 株)、7 型(1 株)、10 型(1 株)4 个基因型;我国其他省市分离到的散发或健康人群携带 C 群流脑菌株分别属于不同的 VNTR 基因型。

从患者分离到 20 株菌株,分别属于 9 个基因型:3 型(1 株)、4 型(4 株)、5 型(7 株)、6 型(1 株)、8 型(1 株)、10 型(1 株)、12 型(1 株)、15 型(1 株)、21 型(1 株);4 型 4 株菌株分别来自 3 个不同省区;5

型 7 株菌株分别来自 4 个不同省区。



图左侧为 VNTR 基因型类型;分型方法采用 UPGMA,以聚类相似性系数为 100% 进行分型

图2 109 株 C 群脑膜炎奈瑟菌 VNTR 基因分型聚类分析

采用 PFGE,我国的 C 群流脑菌株可分为 15 个 PFGE 基因型(AH1-15)^[2]。本研究中 109 株 C 群流脑菌株中 105 株 C 群菌株分别为 PFGE 1~10, 12~15 共 14 个 PFGE 基因型。PFGE 基因型以 AH1 型菌株为主,占 89.5% (94/105),其他 13 个 PFGE 基因型除 2 型为 3 株菌株,各为 1 株菌株。

菌株在 VNTR 基因型与 PFGE 基因型间的分布规律:PFGE 基因型 88 株 AH1 型菌株主要存在于 5 个 VNTR 基因型内,即 3 型(13 株)、4 型(29 株)、5 型(35 株)、10 型(3 株)、12 型(3 株);PFGE 基因型 3、4、6、7、8、13、14 型分别与 VNTR 基因型 11、1、20、15、13、17、19 型相对应;VNTR 基因型 12

型有 7 株菌株,分别来自安徽省(3 株)、云南省(1 株)、北京市(2 株)、甘肃省(1 株),PFGE 分型将这 7 株菌分为 4 个不同的 PFGE 基因型(1、2、9、10 型)。

讨 论

VNTR 广泛存在于原核生物和真核生物基因组中,人类基因组 DNA 中的 VNTR 曾应用于指纹图谱分析,如法医鉴定、亲子鉴定及疾病谱分析等^[7,8]。对原核生物基因组中 DNA 研究发现,在相同的实验室条件下,同一菌株经多代培养,其基因组内的串联重复数稳定不变^[9,10]。因此,利用 VNTR 特征对菌株进行基因分型成为一种新的基因分型技术^[4,9,11,12]。而 PFGE 分型技术是依据基因组中的某种酶切图谱进行基因分型,具有较高的鉴别力,甚至被认为是不同菌株间鉴别的金标准,是一种分析暴发菌株和菌株传播的极好工具^[13-16],对研究微生物宏观进化具有一定意义。多位点序列分析(MLST)是分析基因组中 7 个管家基因序列的遗传变异规律,适合对来自不同地区的脑膜炎奈瑟菌长期流行病学研究^[17],具有可重复性和实验室间的可比较性。PFGE 和 MLST 是目前基因分型方面应用较为广泛的技术方法,其缺点是实验费用高,需要时间长。而 VNTR 分型技术是依据基因组中存在着串联重复序列的拷贝数差异进行基因分型,这种分析方法具有快速、经济和容易进行的特点,在传染病暴发菌株的基因分型和菌株鉴定方面具有一定的意义^[6]。另外有文献报道 VNTR 分型与 PFGE 分型结果具有较好的一致性^[18]。

我们应用 VNTR 技术分析我国 109 株来自不同地区的 C 群脑膜炎奈瑟菌 DNA 上 4 个 VNTR 位点 DNA 序列遗传变异规律,统计学方法可将这些菌株分为 22 个基因型,79.8% 的菌株存在 4 个基因型内(3、4、5、12 型),这 4 个基因型的菌株为我国 C 群脑膜炎奈瑟菌的主要流行株。同一地区的脑膜炎奈瑟菌菌株具有相同的 VNTR 基因型,如江西省 2005 年分离的菌株 94.7% 存在于 VNTR 基因型 4 型内;2004 - 2005 年安徽省分离的菌株 90% 属于 VNTR 基因型 3、5、12 型;安徽省青阳县 C 群流脑暴发中的 7 株菌株均为 3 型;安徽省新东方烹饪学校 16 株 C 群流脑菌株中 94% 为 5 型,同一次 C 群流脑暴发的菌株呈现 VNTR 型别的一致性,这种规律为疾病暴发的流行病学调查提供了实验室方面的依据。不同地区的菌株基因型也存在差别。我国其

他省区分离到的散发或健康人群携带 C 群流脑菌株分别属于不同的 VNTR 基因型。北京地区脑膜炎奈瑟菌菌株基因型具有多样性,9 株 C 群菌株分别属于 8 个 VNTR 基因型,这可能与该地区人员流动有一定的关系。

实验结果中我们发现,VNTR 基因型中 78.9% 的菌株存在 4 个基因型内,PFGE 基因型 89.5% 的菌株基因型为 AH1,其中 80% AH1 型菌株分布于 VNTR 基因型中 4 个主要基因型内,同时 VNTR 基因型有 7 个型的菌株与 PFGE 基因型 7 个基因型有对应关系,与文献报道一致^[18],说明这两种分型技术在反映菌株的遗传进化关系上具有一致性。从另一角度看,PFGE 基因型 AH1 型 88 株菌分布于 12 个 VNTR 基因型内,VNTR 基因型 12 型内包含了 4 个不同的 PFGE 基因型的菌株,由于这两种分型技术是根据 DNA 中的不同的遗传特征进行分类,所以,这两种分型技术结合起来分析菌株的遗传进化关系,意义更大。

关于 DNA 基因组中 VNTR 的形成原因,目前有两种观点,一种是 DNA 在复制滑移过程中由于核苷酸错配形成的^[19];另一种观点认为环境诱导选择,环境压力(包括宿主的改变)使基因组 DNA 组成发生了非连续的变异^[20,21]。VNTR 在重复区内的变异是 DNA 序列进化的因素之一^[22],Levinson 等^[23]的研究发现,串联重复单位的增加与删除的突变率为 1.2%,删除与增加重复序列的比率为 5:1;研究还发现,甲基化错配修复机制的作用使 90% 的突变得以修复。因此,VNTR 的变异在 DNA 序列进化上的作用是一个复杂的问题。我们的研究中,两个典型流脑暴发地区,安徽省肥东县分离的 3 株菌,处于 3 个不同的基因型内(5、13、16 型);安徽省新东方烹饪学校分离了 16 株菌,其中 15 株是 VNTR 基因型 5 型,1 株为 17 型,说明了菌株在遗传进化过程中具有相对稳定性的同时,也存在一定程度的变异。

参 考 文 献

- 1 Zhu P, Hu X, Xu L. Typing *Neisseria meningitidis* by analysis of restriction fragment length polymorphisms in the gene encoding the class 1 outer membrane protein; application to assessment of epidemics throughout the last 4 decades in China. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 458-462.
- 2 Shao ZJ, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria*

- meningitidis serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006, 367: 419-423.
- 3 Fouet, Smith KL, Keys C, et al. Diversity among French *Bacillus anthracis* isolates. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4732-4734.
- 4 Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. J Clin Microbiol, 2001, 39: 3179-3185.
- 5 Skuce R A, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology, 2002, 148: 519-528.
- 6 Yazdankhah SP, Lindstedt BA, Caugant DA. Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol, 2005, 43: 1699-1705.
- 7 李生斌. 人类 DNA 遗传标记. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 47-58.
- 8 郭瑞芳, 吕有勇. 微卫星标识在人类基因组研究及肿瘤相关基因克隆方面的应用. 华人消化杂志, 1998, 6: 441-444.
- 9 Fleche PL, Hauck Y, Onteniente LA. Tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol, 2001, 1: 2.
- 10 Keim P, Price B, Klevytska AM, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol, 2000, 182: 2928-2936.
- 11 Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, et al. DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA). Ann Clin Microbiol, 2003, 2: 1.
- 12 Shemer R, Weissman Z, Hashman N, et al. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. Microbiology, 2001, 147: 2021-2028.
- 13 Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1995, 33: 551-555.
- 14 Roberts RB, Lencastre AD, Eisner W, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J Infect Dis, 1998, 178: 164-171.
- 15 Roberts RB, Tennenberg AM, Eisner W, et al. Outbreak in a New York city teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. Microb Drug Resist, 1998, 4: 175-183.
- 16 Schlichting C, Branger C, Fournier JM, et al. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. J Clin Microbiol, 1993, 31: 227-232.
- 17 Zerouali K, Castelli P, Van Looveren M, et al. Use of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the study of serogroup B *Neisseria meningitidis* isolates from Casablanca (Morocco). Pathol Biol (Paris), 2006, 54: 166-170.
- 18 Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol, 2005, 43: 3095-3100.
- 19 Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, et al. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. Mol Microbiol, 1996, 20: 1211-1220.
- 20 Elena SF, Cooper VS, Lenski RE. Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. Science, 1996, 272: 1802-1804.
- 21 Render N, Licciardello L, Ijsseldijk C, et al. Variable numbers of tandem repeat loci in genetically homogeneous *Haemophilus influenzae* strains alter during persistent colonisation of cystic fibrosis patients. FEMS Microbiol, 1999, 173: 95-102.
- 22 Rodakis GC, Lecanidou R, Eickbush TH, et al. Diversity in a chorion multigene family created by tandem duplications and a putative gene-conversion event. J Mol Evol, 1984, 20: 265-273.
- 23 Levinson G, Gutman GA. High frequency of short frameshifts in poly-CA: GT tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 5323-5338.

(收稿日期: 2005-12-11)

(本文编辑: 张林东)