

# 间隔区寡核苷酸分型和多位点可变数量串联重复序列分析在结核分枝杆菌基因分型中的应用

董海燕 刘志广 赵秀芹 阳波 万康林

**【摘要】** 目的 评价间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)及多位点可变数量串联重复序列分析(MLVA)方法在结核分枝杆菌基因分型研究中的应用。方法 收集 224 株结核分枝杆菌临床分离株,分别采用 Spoligotyping 及 MLVA 方法进行基因分型,比较两种方法的分型效果,评价两种方法在结核分枝杆菌基因分型中的应用。结果 使用 Spoligotyping 方法,224 株结核分枝杆菌呈现出 55 种基因型,39 株具有独特的基因型,其余 185 株菌呈现出 16 种基因型;使用 MLVA 方法时,224 株结核分枝杆菌呈现出 160 种基因型,132 株具有独特的基因型,余下的 92 株菌呈现出 28 种基因型;当两种方法联合使用时,224 株结核分枝杆菌呈现出 179 种基因型,159 株结核分枝杆菌具有独特的基因型,余下的 65 株菌表现为 20 种基因型。湖南省和安徽省的菌株中北京家族菌株所占的比例差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),安徽省北京家族菌株所占的比例明显高于湖南省。结论 MLVA 在结核分枝杆菌株水平的鉴定方面,其分辨能力高于 Spoligotyping,但是 Spoligotyping 在鉴定北京家族菌株和 *M. bovis* 方面有一定的优势。将 Spoligotyping 方法作为一线分型技术,MLVA 作为二线分型技术联合应用时,将提高结核病的流行病学调查和病原学监测效果。不同地区的菌株有不同的特点。

**【关键词】** 结核分枝杆菌;间隔区寡核苷酸分型;可变数量串联重复序列;基因分型

**Application of Spoligotyping and MLVA analysis in genotype studies of *Mycobacterium tuberculosis***  
DONG Hai-yan, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, YANG Bo, WAN Kang-lin. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn

**【Abstract】** **Objective** To access the application of spacer oligotyping (Spoligotyping) and Multiple Locus VNTR (MLVA) in epidemiological studies of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** 224 clinical isolates of *M. tuberculosis* were collected and typed by Spoligotyping and MLVA respectively, to compare the results of both methods and to access their application in epidemiological studies of *M. tuberculosis*. **Results** Data from Spoligotyping showed that 224 strains presented 55 kinds of genotypes. Of these, 39 were represented by a unique isolate, with the remaining 185 isolates being grouped in 16 clusters whereas the result of MLVA showed that 224 strains presenting 160 kinds of genotypes. Of these, 132 were represented by a unique isolate, with the remaining 92 isolates being grouped in 28 groups. Data from the combination of Spoligotyping and VNTR showed that 224 strains presenting 179 kinds of genotypes. Of these, 159 were represented by a unique isolate, with the remaining 65 isolates being grouped in 20 groups. There was significant difference noticed among *M. tuberculosis* between Hunan and Anhui in the proportion of Beijing family ( $P < 0.001$ ). The proportion of Beijing family in Anhui was higher than that in Hunan. **Conclusion** Results from this direct comparison studies demonstrated that MLVA analysis was more effective than Spoligotyping in discriminating individual *M. tuberculosis* isolates. However, Spoligotyping had an advantage over MLVA in identifying Beijing family strains and *M. bovis*. Taking Spoligotyping as a first-line typing technique and VNTR as second-line typing technique, the arrangement would improve the effectiveness of epidemiological investigation and pathological inspection of tuberculosis. The strains in different regions seemed to have had different characteristics.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Spacer oligotyping; Variable number tandem repeats; Genotyping

基金项目:国家“十五”重点资助项目(2001DEA1007-4);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

通讯作者:万康林,Email:wankanglin@icdc.cn

目前,结核分枝杆菌的菌株鉴定已成为结核病流行病学研究的重要方法。IS6110-RFLP 方法是应用最广泛的基因分型方法,但该方法需要培养大量的细菌、实验操作繁琐、对 IS6110 低拷贝菌株难以进行菌株水平的鉴定,最重要的是实验室间的结果难以进行比较<sup>[1]</sup>。因此一些以 PCR 为基础的 DNA 指纹技术以其快速、简便、分辨率高的特点而备受关注。其中使用最广泛的有间隔区寡核苷酸分型 (Spoligotyping) 及多位点可变数量串联重复序列分析 (MLVA)。本研究利用 224 株结核分枝杆菌临床分离株,对这两种分型方法的分型效果进行了比较分析,评价其在结核分枝杆菌株水平鉴定方面的价值以及在结核分枝杆菌基因分型研究中的应用。

### 材料与方法

1. 菌株:结核分枝杆菌分离株由湖南省结核病防治所和安徽省肺科医院提供,其中湖南省菌株 154 株、安徽省菌株 70 株。对照菌株 H37Rv 购于中国药品生物制品检定所。

2. DNA 提取:用生理盐水从 L-J 培养基的斜面上洗脱菌体,80℃ 孵育 30 min,离心收集菌体,用 400 μl TE 悬菌,于沸水中煮沸 30 min,12 000 g 离心 3 min,取上清即为 DNA 模板。

3. Spoligotyping:①PCR 扩增:用一对引物扩增整个 DR 区,上下游引物为 DRa:5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3'<sup>[2]</sup>,5'端进行生物素标记;DRb:5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'。PCR 反应条件:96℃ 3 min,96℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 30 s,30 个循环。②固定有间隔区寡核苷酸探针的膜的制备:Biodyne C 膜具有 43 个 van Embden 推荐的共价结合的寡核苷酸,每一个寡核苷酸对应 DR 位点间的一个唯一的间隔区序列。其中 6 个间隔区序列源自 *M. bovis* BCG 的 DR 区域序列,其余的全部源自 *M. tuberculosis* H37Rv 的 DR 区域序列<sup>[3]</sup>。即先用新鲜配置的 16% 的 EDAC 孵育膜 10 min<sup>[2]</sup>,用水清洗一下膜,立即将膜置于 miniblotted 中;在 miniblotted 的凹槽中平行加入 150 μl 用 500 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 值 8.4) 稀释的 0.125 μm 的寡核苷酸溶液,室温孵育 1 min。将膜从 miniblotted 中取出,并用 100 mmol/L NaOH 孵育 10 min。将膜用 2×SSPE/0.1% SDS 于 50℃ 孵育 10 min,再用 20 mmol/L EDTA 室温孵育 15 min,然后密封于塑料袋中置 4℃ 保存备用。③PCR 产物的杂交与检

测:用 2×SSPE/0.1% SDS 于 50℃ 洗膜 5 min,将膜置 miniblotted 中,方向与制备杂交膜垂直。将 20 μl PCR 产物加到 150 μl 2×SSPE/0.1% SDS 中,100℃ 加热变性 10 min。将 150 μl 稀释的 PCR 产物加到凹槽中,55℃ 杂交 60 min。取出膜,用 2×SSPE/0.5% SDS 于 55℃ 洗膜 2 次,每次 10 min。然后用 streptavidin-peroxidase conjugate (2.5 μl streptavidin-peroxidase conjugate 加到 10 ml 2×SSPE/0.5% SDS 中)于 42℃ 孵育膜 30 min。洗膜并将杂交的 DNA 用 CDP-star 检测,曝光于 X 线 5 min。④数据分析:用 BioNumerics 软件对杂交模式进行分析。

4. MLVA:①VNTR 位点的选择:参照文献 [4-7] 和细菌基因数据库 ([http://minisatellites.upsud.fr]), 筛选 13 个串联重复基因位点。②PCR 扩增条件:预变性 94℃ 10 min,94℃ 1 min,62℃ 1 min,72℃ 1.5 min,40 个循环,72℃ 延伸 10 min。在 2% 琼脂糖 (Spanish 产品,含 5 μl/100 ml Gold view™ DNA 染料) 凝胶上电泳。电泳完毕,在紫外成像检测系统下观察结果,并与 DNA Marker 比较确定 PCR 产物的分子质量大小。实验中以 H37Rv 作为对照。③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个菌株每个 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,将检测菌株进行基因分型。

### 结果

1. Spoligotyping:224 株结核分枝杆菌呈现出 55 种基因型,其中 39 株菌具有独特的基因型,余下的 185 株菌分为 16 个簇,其中最大的一簇包含 115 株菌,占 51.3% (115/224),其特点为具有相同的 Spoligotyping 结果,表现为仅与 35~43 间的 9 个间隔区杂交,与北京家族的基因型特点相符。另外还有 4 株菌表现为仅与 35~43 间的 7 或 8 个间隔区杂交,与北京家族的基因型仅相差 1~2 个间隔区,称为北京样基因型。此外本研究还对 BCG 及牛分枝杆菌进行了鉴定,2 株菌都缺乏 39~43 间隔区而含有 33~38 间隔区。阴性对照无杂交点产生 (图 1、2)。

2. MLVA 分析:224 株结核分枝杆菌呈现出 160 种基因型,其中 132 株菌具有独特的基因型,余下的 92 株菌分为 28 个簇。包含的菌株数从 2~8

菌株不等。在本研究中的 13 个 VNTR 位点中, Qub11a、Mtub21、Qub11b 和 ETR-D 4 个位点的多态性较高,分别含有 13、10、8 和 7 个等位基因。而 Mtub 30 的多态性最低,仅含有 2 个等位基因(图 3、4)。

3. Spoligotyping 和 MLVA 方法确定的簇:用 Spoligotyping 和 MLVA 方法对 224 株结核分枝杆菌进行分析,可以分为 179 个基因型,其中 159 株菌具有独特的基因型,余下的 65 株菌可分为 20 个簇(表 1)。

表1 Spoligotyping 和 MLVA 方法对 224 株结核分枝杆菌的聚类分析

方法	基因型数	有独特基因型的菌株数	成簇的菌株数	成簇数
Spoligotyping	55	39	185	16
MLVA	160	132	92	28
Spoligotyping & MLVA	179	159	65	20

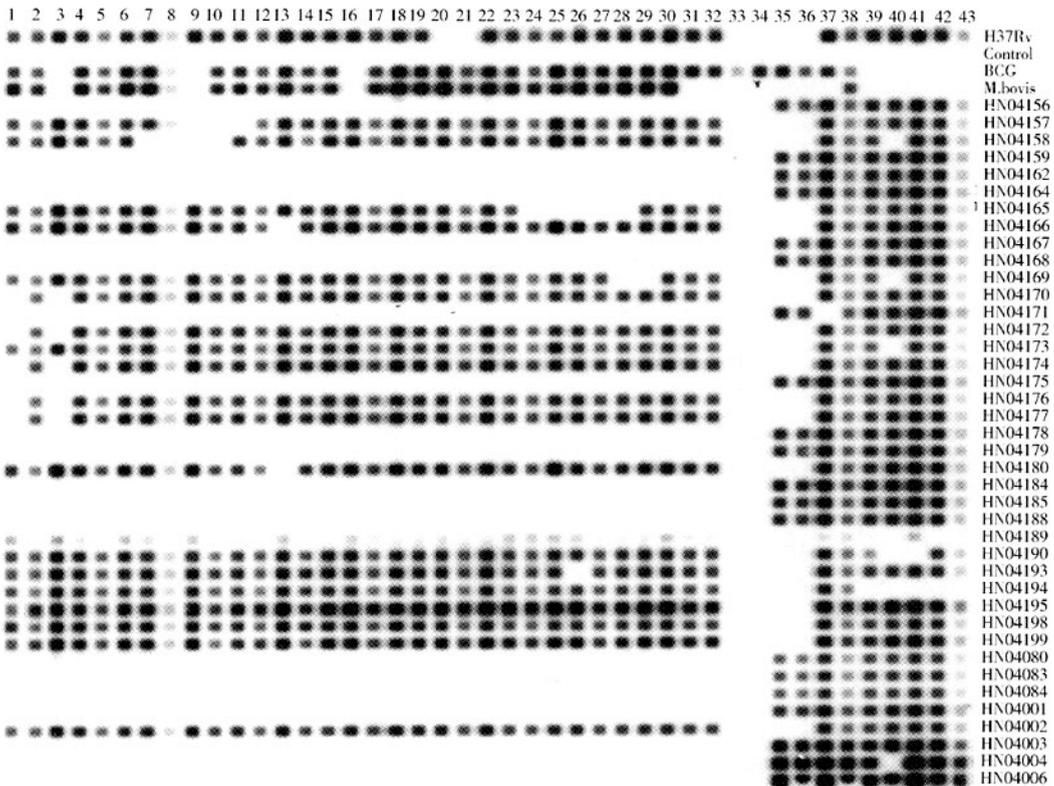
4. MLVA 方法对 Spoligotype 簇进行再次分型分析:Spoligotyping 方法对 224 株结核分枝杆菌进行分析,成簇的菌株数明显高于 MLVA 方法。有

108 株用 Spoligotyping 方法确定为成簇的菌株,用 VNTR 方法则具有独特的基因型。其中最大的一簇(北京家族菌株)用 MLVA 方法进行分析,可以分为 83 种基因型。

5. 安徽和湖南两省之间的差别:湖南省北京家族菌株有 69 株(65 株典型的北京家族菌株和 4 株北京样基因型菌株),非北京家族菌株 85 株;安徽省北京家族菌株 50 株,非北京家族菌株 20 株。将湖南和安徽两省之间的北京家族菌株所占的比率进行比较,经统计学  $\chi^2$  检验,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。安徽省北京家族菌株所占比率更高。

### 讨 论

本研究发现 224 株结核分枝杆菌临床分离株通过 MLVA 方法分析可以分为 160 个不同的基因型,而 Spoligotyping 方法只能分为 55 个不同的基因型。两种方法同时应用,224 株结核分枝杆菌可以分为 179 个基因型。通过两种方法直接比较的结果表明 MLVA 方法在结核分枝杆菌株水平的鉴定方面要比 Spoligotyping 方法好。



不同菌株的 PCR 产物与 43 个间隔区寡核苷酸序列杂交。黑色斑点表示间隔区存在,空白区表示间隔区缺失

图1 部分结核分枝杆菌 Spoligotyping 指纹图

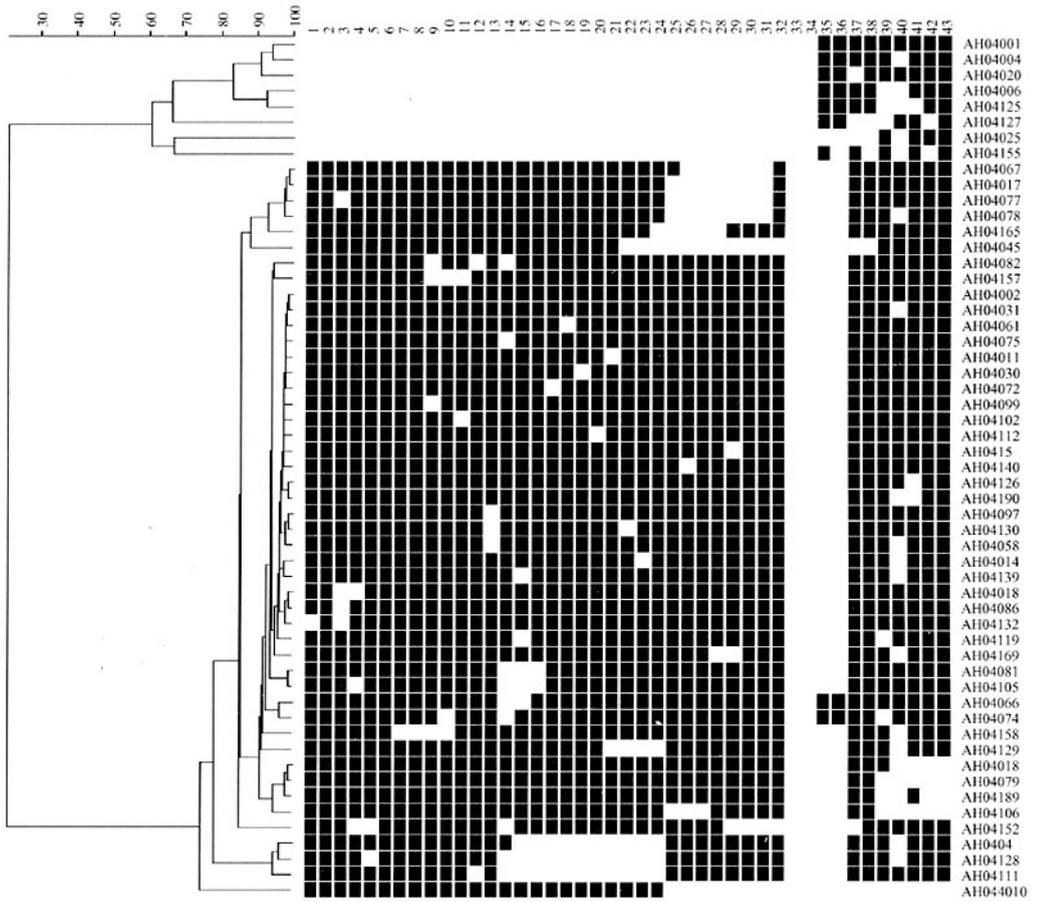
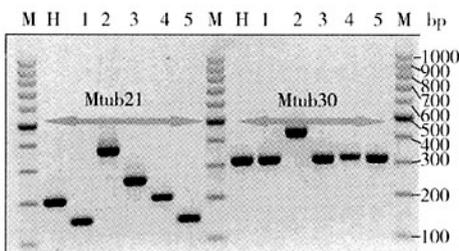


图2 结核分枝杆菌 Spoligotyping 基因分型聚类图



M: 100 bp DNA ladder; H: H37Rv; 1~5: HN04195, HN04197, HN04198, HN04199, HN04200

图3 部分菌株在 Mtb21 和 Mtb30 两个位点 VNTR 图谱

MLVA 方法是一种以 PCR 为基础的方法,该方法简单快速、可操作性强,适用于大规模的菌株基因型鉴定。且分辨率高,具有明确的数字化结果,便于各个实验室间结果的比较。进而通过互联网建立起全球的数据库,进行大规模的流行病学和结核分枝杆菌进化的研究。

Spoligotyping 也是一种以 PCR 为基础的方法,

该方法稳定、敏感性好、特异性高,由于反向线性点杂交的应用,一张膜上可以同时固定 43 个探针,而且一张膜至少可以使用 20 次,使得该方法经济实用,简便快速。由于北京家族菌株具有特定的 Spoligotyping 图谱,表现为仅与 35~43 之间的 9 个间隔区杂交<sup>[8,9]</sup>,因此利用该方法可以对北京家族菌株进行鉴定。此外,因为所有的 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG 菌都缺乏 39~43 间隔区而含有 33~38 间隔区,因此可以从结核分枝杆菌复合群中分辨出 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG,但这种方法还不能从 *M. bovis* BCG 中区分 *M. bovis*<sup>[10]</sup>。Spoligotyping 技术通常使用 43 个间隔区寡核苷酸为探针,van der Zanden 和 Kemerk Schouls 等<sup>[11]</sup>在这 43 个探针的基础上,再增加 51 个新的间隔区序列,结果表明通过引用这 51 个核苷酸后不但增强了 Spoligotyping 技术的分辨力,而且还可以在 Beijing 基因型内再进一步分型。Spoligotyping 方法的结果可以很容易的用手

工记录或用一些简单的 Word 软件处理程序。

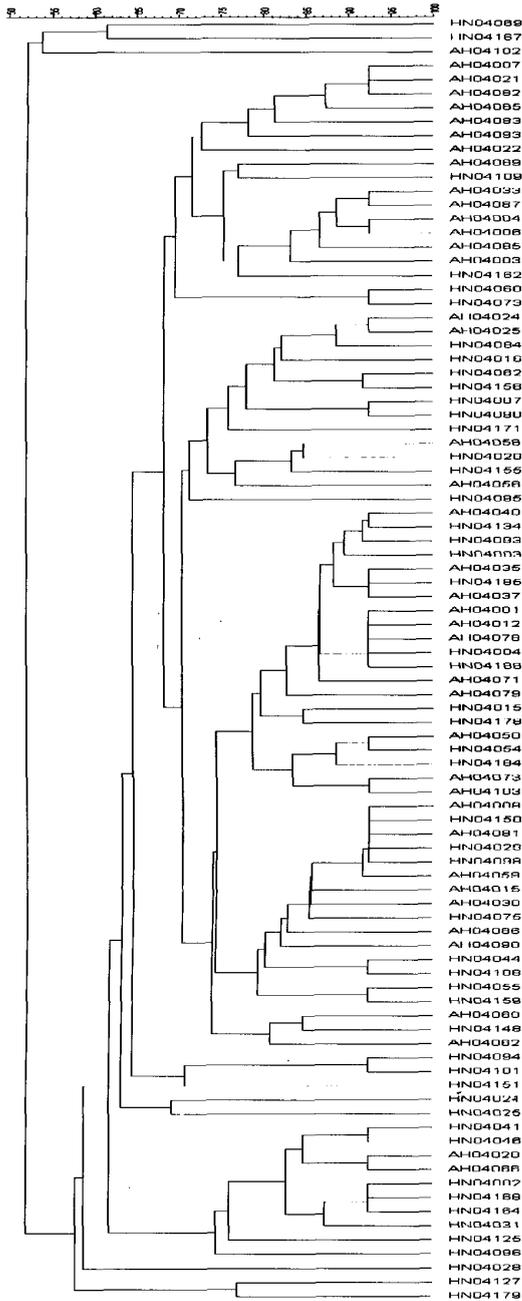


图4 结核分枝杆菌 MLVA 分型聚类截图

本研究还发现不论是安徽省还是湖南省,成簇率最高的都是北京家族菌株,说明北京家族菌株是这两个地区的主要流行株,但是安徽省北京家族的比率要明显高于湖南省。由于北京家族菌株在世界范围内广泛传播,并且是中国结核分枝杆菌的优势菌株。因此,我们应加强对北京家族菌株的研究。

总之,Spoligotyping 技术对结核分枝杆菌株水平的鉴定能力低于 MLVA 技术,该方法可以作为一线的分型技术。当菌株表现为同一 Spoligotyping 模式,则提示我们有必要采用二线的分型技术进行进一步的分型,如 MLVA 分型方法。两种方法联合应用的鉴别能力要比单独使用任何一种方法的鉴别能力强很多。同时我们还可以根据菌株的成簇情况确定主要的流行株以及追溯传染源和传播途径,这对及时有效的采取措施控制结核病的流行非常有用。

参 考 文 献

- [1] Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J Clin Microbiol, 1992, 31: 1615-1618.
- [2] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Submitted for publication, 1997, 35:907-914.
- [3] Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium tuberculosis* bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect Immun, 1991, 59:2695-2705.
- [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 lerial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4561-4566.
- [8] Toungoussova OS, Sandven P, Mariandyshv AO, et al. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. J Clin Microbiol, 2002, 40: 1930-1937.
- [9] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8: 843-849.
- [10] Bauer J. Usefulness of Spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2602-2606.
- [11] van der Zanden AGM, Kemerk Schouls LM. Improvement of differentiation and interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4628-4639.

(收稿日期: 2006-07-07)

(本文编辑: 王多春)