

· 实验室研究 ·

IS6110 限制性片段多态性分析标准方法的建立及其在结核分枝杆菌分子分型中的应用

刘敬华 Kristin Kremer Christine Pourcel Arnout Mulder 刘志广 赵秀芹 万康林

【摘要】目的 建立 IS6110 限制性片段多态性分析 (IS6110-RFLP) 标准方法并评价该方法的分型能力。**方法** 采用核酸提取、PCR、限制性内切酶分析、Southern 杂交、琼脂糖凝胶电泳等技术, 结合 Gel-Pro analyzer 3.1 和 BioNumerics (Version 5.0) 软件, 对 78 株结核分枝杆菌插入序列 IS6110-RFLP 进行分析。**结果** 确定标准化的 IS6110-RFLP 技术, 包括核酸提取、PCR、限制性内切酶分析、Southern 杂交、琼脂糖凝胶电泳等实验步骤及标化参数的相关数据分析软件的使用; 采用该技术, 将 78 株结核分枝杆菌分为 75 个不同的基因型, 分别归属于 11 个基因簇, 其中有 52 株归属于同一个基因簇, 占菌株总数的 66.7% (52/78)。**结论** 建立标准化的 IS6110-RFLP 技术方案, 该方法具有很强的基因分型和株水平鉴定能力, 可用于结核病的病原学监测。

【关键词】 结核分枝杆菌; IS6110 限制性片段多态性分析; 评价

Establishment and application of a standard IS6110-RFLP method in the study of molecular genotyping analysis on *Mycobacterium tuberculosis* LIU Jing-hua*, Kristin Kremer, Christine Pourcel, Arnout Mulder, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, WAN Kang-lin. *State Key Laboratory for Infectious Diseases 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 develop a standardized IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, used for evaluating the capacity of genotyping. **Methods** IS6110-RFLP of 78 *Mycobacterium (M.) tuberculosis* strains were studied by bio-molecular techniques including DNA isolation, PCR, restriction endonuclease enzyme analysis, southern blotting, agarose gel electrophoresis, together with data analysis by software Gel-Pro analyzer 3.1 and BioNumerics (Version 5.0). **Results** IS6110-RFLP method was established and standardized successfully, including DNA isolation, PCR, restriction endonuclease enzyme analysis, southern blotting, agarose gel electrophoresis and usage of the analysis software with standard parameters. By this method, 78 *M. tuberculosis* isolates were classified into 75 genotypes which belonged to 11 different clusters. Of all the isolates, 66.7% (52/78) belonged to a main cluster. **Conclusion** Standard IS6110-RFLP method was established successfully. This method had powerful capacity for genotyping and strain level identification and could be used for the surveillance on pathogens of *M. tuberculosis* in China.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Standard IS6110-restriction fragment length polymorphism method; Evaluation

结核分枝杆菌 (MTB) 基因组中插入序列 6110

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471526); 欧盟基金资助项目 (012166)

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 (刘敬华、刘志广、赵秀芹、万康林); Mycobacteria Reference Unit, Diagnostic Laboratory of Infectious Diseases and Perinatal Screening, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands (Kristin Kremer, Arnout Mulder); Christine Poure Genome, Polymorphism, and Minisatellites (GPMS), Institute of Genetics and Microbiology (IGM), France (Christine Pourcel)

通讯作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

(insertion sequence 6110, IS6110) 含有 1361 bp 的核苷酸和 28 bp 的反向末端重复序列, 属于插入序列 IS3 家族的一个成员^[1]。通过限制性内切酶 Pvu II 酶切, 以 Pvu II 酶切位点右侧的 DNA 片段作为探针, 大小为 245 bp, 形成 IS6110 指纹图谱, 并采用 MTB Mt14323 和卡介苗 P3-BCG 标准株为外对照, Super Coiled Ladder DNA/Pvu II 与 Φ X 174DNA/Hae III 两个核苷酸相对分子量标准为内对照, 电泳后, 二次 Southern 杂交、显影, 建立 MTB 基因分型鉴定的 IS6110-RFLP。MTB 复合群 DNA 指纹图谱

是基于临床分离株之间的拷贝数和 IS6110 染色体位置变异产生的多态性,为每一株 MTB 提供了一种独特 DNA 指纹图谱。van Embden 等^[2]推荐标准的 IS6110-RFLP,并证实其有较强的 MTB 菌株水平鉴定能力,已广泛应用于结核病分子流行病学研究领域^[3-10]。但是在我国,尚没有一家实验室建立起完善的 IS6110-RFLP 标准操作方法,不便于在国际及不同实验室间对 MTB 的分型及流行趋势研究结果进行比较。为了探讨我国 MTB 分子分型的标准化 IS6110-RFLP 技术及其在基因分型鉴定中的应用,为我国结核病的病原分子监测提供基础,本研究依照 IS6110-RFLP 分型方法国际标准方案,采用来自我国安徽、湖南、广西、江苏 4 省(自治区)的临床分离株,对 IS6110-RFLP 具体操作步骤进行标准化研究,验证 IS6110-RFLP 标准方法的分型能力,并初步确定我国 MTB 的流行特点。

材料与方 法

1. 菌株来源: MTB 标准菌株 Mt14323、卡介苗 P3-BCG 由荷兰国家公共卫生与环境研究所(RIVM)提供,78 株 MTB 临床分离株分别来自安徽省肺科医院(10 株)、江苏省疾病预防控制中心(5 株)、湖南省结核病防治所(45 株)、广西壮族自治区疾病预防控制中心(18 株)。按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分枝杆菌分离培养,菌种鉴定。

2. 主要试剂:蛋白酶 K、Lambda/Hind III、Phi X 174/Hae III 购自 Boehringer 生物公司; Supercoiled ladder 购自 BRL 生物公司, Hybond N⁺ 膜、ECL 标记及检测试剂盒、ECL 检测液、Hyperfilm ECL 购自 Amersham 生物工程公司, DNA 胶回收试剂盒 购自 BBI 公司。

3. 菌株分型分析:采用核酸提取、PCR、限制性内切酶分析、Southern 杂交、琼脂糖凝胶电泳等技术^[11],结合 Gel-Pro analyzer 3.1 和 BioNumerics (Version 5.0) 软件,对 78 株 MTB 的插入序列 IS6110-RFLP 进行分析。

结 果

1. IS6110-RFLP 标准方法的建立^[11]:对 78 株 MTB 按照 IS6110-RFLP 标准操作方案进行基因分型,以 MTB 标准株 Mt14323 和卡介苗 P3-BCG 为参照株,同时设立内对照和外对照,具体方法如下:

(1) 细菌 DNA 的制备(CTAB 法^[11]):①生理盐

水洗脱 L-J 培养基上生长良好的 MTB, 80℃ 灭菌 30 min;② 离心收集菌体, 400 μl TE 重新悬菌后, 加入 50 μl 溶菌酶(10 mg/ml), 混匀, 37℃ 孵育过夜;③ 65℃ 预热 CTAB/NaCl, 加入 75 μl 10% SDS/蛋白酶 K 混合液(70 μl 10% SDS 和 10 μl 蛋白酶 K), 混匀, 65℃ 孵育 10 min;④ 加入 100 μl 5 mol/L NaCl、100 μl CTAB/NaCl, 旋涡混匀至液体变为乳白色, 65℃ 孵育 10 min;⑤ 加入 750 μl 氯仿/异戊醇, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min;⑥ 将上清液移入另一离心管, 加入 0.6 倍体积(450 μl) 异丙醇以沉淀 DNA, -20℃ 放置 30 min; 12 000 r/min 离心 15 min;⑦ 弃液体, 用 1 ml 70% 冰乙醇洗涤 DNA 沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 尽量弃去管中液体, 37℃ 干燥 10 min 左右;⑧ 30 μl TE 溶解 DNA 沉淀, 4℃ 保存备用。

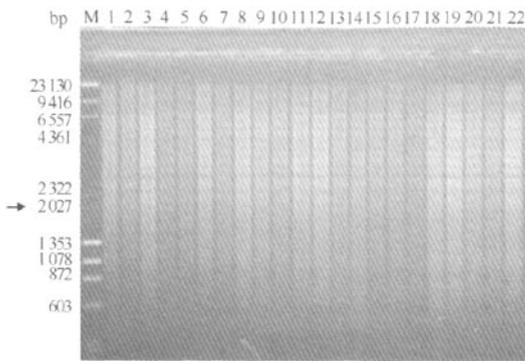
(2) 染色体 DNA 的消化: 实验中酶切体系成分包括 1×buffer, Pvu II 10 U, 染色体 DNA 4.5 μg, 三蒸水补足酶切体系 20 μl。37℃ 水浴 > 1 h。

(3) 消化后标本 DNA 浓度的确定: 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(1×TBE), 每孔上样量为 5 μl, 100 V 电压电泳 25 min(6.5 V/cm), 以标准菌株 Mt14323 为参照(上样量为 10 μl), 根据紫外线下电泳条带的明亮程度, 确定其他菌株上样量的大小。按照上样量的不同用三蒸水调整好酶切产物的终体积, 按 5 倍稀释比例加入 DNA 样本缓冲液和内部分子质量标准的混合液。

(4) Southern 杂交凝胶的制备: 准备 0.8% 琼脂糖凝胶(1×TBE), 凝胶大小为 16 cm×20 cm, 第一孔中加入 5 μl λ-Hind III & PhiX174/Hae III, 其余上样孔中加入检测标本 DNA(消化后); 100 V 电泳 5 min, 20 V 电泳过夜, 直到 Marker 中 2 kb 的片段电泳到距加样孔 7.0 cm±0.4 cm 左右时停止电泳。紫外线观察并照相(图 1)。

(5) 杂交前凝胶预处理: 电泳结束后凝胶紫外线照射 5 min, 0.25 mol/L HCl 浸泡胶 10 min, 然后蒸馏水冲洗胶块, 0.4 mol/L NaOH 浸泡胶 20 min, 再用蒸馏水冲洗胶块, 最后再用 0.4 mol/L NaOH 洗胶一次, 20 min, 再用蒸馏水冲洗干净。

(6) Southern 杂交: 准备 20 cm×20 cm 尼龙膜, 将尼龙膜和凝胶按次序在真空转膜仪中放好, 用干净的吸水纸吸干凝胶上水分, 将琼脂糖凝胶封边及上样孔; 倒入 10×SSPE 到转膜仪中, 以没过凝胶 1 cm 以上为准, 200 mbar 转膜 30 min。



注: M: Marker; 1: 标准参照株 Mt14323; 2~21: 临床分离株, 其菌株号依次为 AH113, AH312, AH501, AH505, AH506, AH507, AH608, AH643, AH653, AH663, JS001A, JS03-216, JA08-065, JS09-130, JS27, HN2074, HN2079, HN2176, HN2221, HN2247; 22: 卡介苗 P3-BCG

图1 MTB 实验菌株全基因组 DNA *pvu* II 酶切产物电泳图

(7) 转膜后尼龙膜的处理: 用 0.4 mol/L 的 NaOH 浸湿 Whatmann 滤纸, 将转膜完毕的尼龙膜放到滤纸上 2 min; 用 $5 \times$ SSC 洗膜 10 min。

(8) 探针的制备: ① IS6110 探针的制备: PCR 扩增 IS6110 片段: PCR 扩增的引物序列为: 上游引物 INS1 5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3', 下游引物 INS2 5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3', 扩增探针长度为 245 bp。采用 50 μ l PCR 反应体系, 其中包括模板 DNA 2 μ l、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2 mmol/L dNTP、上下游引物各 50 pmol 和 3 U Taq DNA 酶。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}C$ 5 min; 循环 94 $^{\circ}C$ 1 min, 62 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 共 35 个循环; 最后延伸 72 $^{\circ}C$ 10 min。② PCR 产物的回收纯化: 0.8% 琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其他 DNA 尽可能分开, 然后用干净的手术刀割下含所要回收 DNA 的琼脂块, 放入 1.5 ml 离心管中; 然后使用 BBI 公司割胶回收试剂盒回收纯化。③ DNA Marker 探针的制备: 将分子质量标准 Supercoiled ladder (未消化) 和 PhiX174/Hae III 混合均至终浓度 5 ng/ μ l。

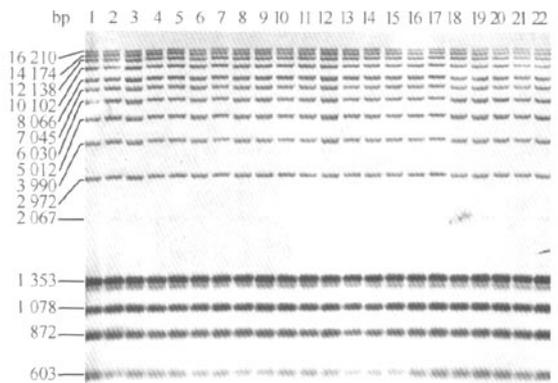
(9) 探针的标记 (DNA Marker 探针): 用 ECL-kit 提供的纯水将探针按稀释到要求浓度 10 ng/ μ l; 99 $^{\circ}C$ 5 min, 冰浴 2 min, 加入等体积的 DNA labeling reagent, 混匀; 加入等体积的戊二醛, 涡旋混匀; 37 $^{\circ}C$ 孵育 10 min。

(10) 杂交: 42 $^{\circ}C$ 预热杂交液 10 ml, 将尼龙膜置于杂交瓶中 42 $^{\circ}C$ 预杂交 10 min; 将已标记的分子质量标准探针加入到杂交液中混匀, 10 ml 杂交缓冲液

中加入探针量为 100 ng, 42 $^{\circ}C$ 杂交过夜。

(11) 杂交后洗膜: 倒掉杂交液, 50 ml primary wash buffer (360 g 尿素、4 g SDS、25 ml $20 \times$ SSC 加三蒸水定容到 1 L) 42 $^{\circ}C$ 洗膜 20 min, 再用 primary wash buffer 重复洗膜一次; 将膜放到一个干净的塑料盒中, 用 500 ml secondary wash buffer ($2 \times$ SSC) 室温洗膜 5 min, 再用 secondary wash buffer 重复洗膜一次。

(12) 检测: 洗膜完毕后, 将尼龙膜放到一个干净的塑料盒中, 充分混合 10 ml ECL-detection reagent 1 和 10 ml ECL-detection reagent 2, 将混合液倒入尼龙膜表面, 混合液与膜作用 1 min; 用塑料膜将尼龙膜包好, X 线曝光 5-120 min; 显影、定影 (图 2)。



注: 各泳道菌株与图 1 中的各泳道相对应

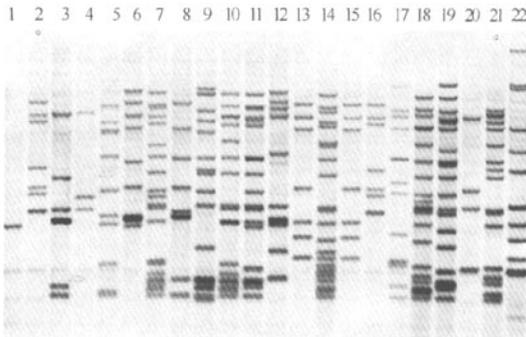
图2 IS6110-RFLP 分析内对照标准分子质量

(13) 尼龙膜上探针的洗脱: 置膜于 65 $^{\circ}C$ 洗脱液 ($0.1 \times$ SSC 和 0.1% SDS) 中浸泡 30 min, 即可重复使用。

(14) 二次杂交: 将探针换成 IS6110 探针, 重复 (8)~(13) 的操作 (图 3)。注意杂交时 10 ml 杂交液中加入 IS6110 探针量为 200 ng。

(15) 相关数据的建立、软件分析: ① 应用 Gel-Pro analyzer 3.1 软件确定实验菌株 IS6110-RFLP 电泳图谱; ② 应用 BioNumerics (Version 5.0) 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 进行处理, 识别图像条带, 建立图像和指纹数据以及菌株相应背景资料数据, 主要包括电泳图像经统一的内对照分子质量标准进行校准, 标定条带位置; 聚类图类型根据非加权配对算术平均法 (UPGMA) 构建; 不同菌株的电泳条带的相似性系数选用 Dice 系数 (F 值 \times 100%) 表示, F 值反映不同菌株电泳条带的相似性

程度,范围在0~1之间,0代表完全不相关,1代表完全相同。



注:各泳道菌株与图1中的各泳道相对应

图3 部分 IS6110-RFLP 分析结果

(16)聚类分析:根据电泳条带数量及位置的不同将实验菌株分成不同的基因型,再根据 cluster cutoff 值将实验菌株归属于不同的基因簇。

2. 78 株 MTB 临床分离株检测结果:经采用上述标准方案,78 株 MTB 临床分离株经 IS6110-RFLP方法分型后呈现出很好的多态性,可分为 75 个不同的基因型,分别归属于 11 个基因簇,其中有 52 株归属于同一个基因簇,占总菌株数的 66.7%(52/78)。对所研究菌株进行不同地区的分层分析,此型菌株在广西、湖南两地所占比例较高,分别为 77.8% 和 71.0%。而在安徽、江苏省只占 40%。其他基因簇所占比例较小,其总和仅占总菌株数的三分之一。分型结果见图 4。

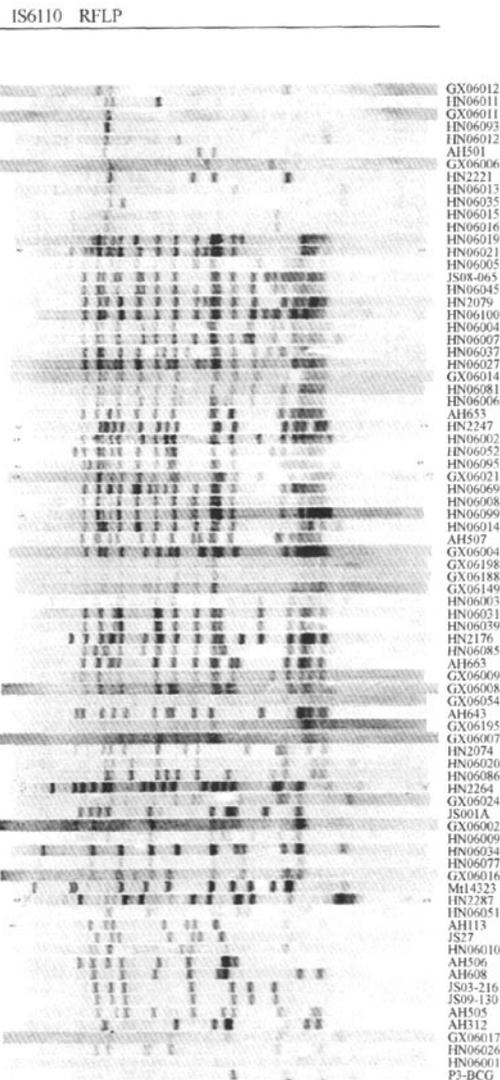
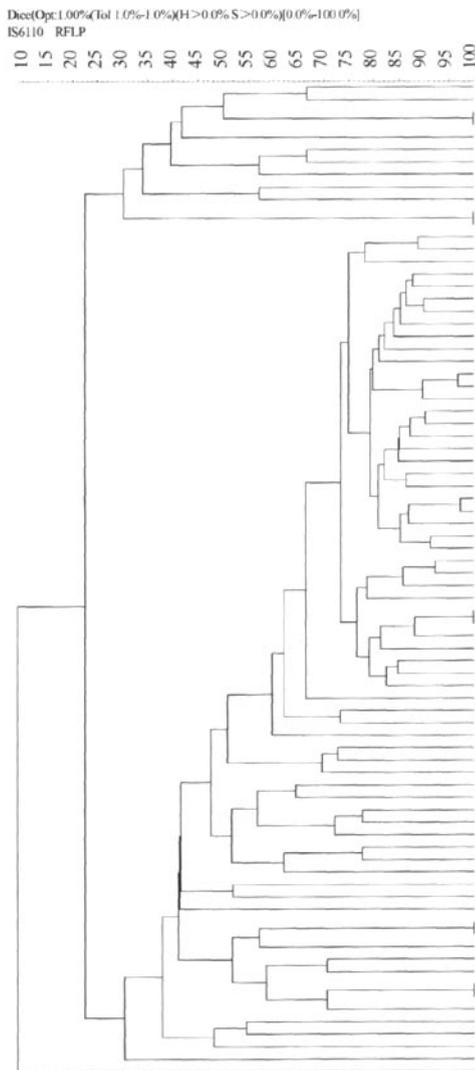


图4 4 个地区临床分离 78 株 MTB 聚类分析树状图

讨 论

IS6110-RFLP 标准方法的建立使各实验室对 MTB 分离株进行大规模的分析及与以前的图谱或各实验室间进行比较成为可能,促进了全球范围内对结核病大规模的分子流行病学研究,并在爆发性流行、医院感染和实验室污染调查等方面取得重大的进展^[3-10],应用前景广阔。

虽然 IS6110-RFLP 标准方法具有很强的菌株分型鉴别能力,并得到广泛的应用,但该方法对 IS6110 拷贝数少或无拷贝的菌株分型能力差,难以对这部分菌株进行株水平的鉴定。因此,人们在 IS6110 指纹图谱标准方法的基础上又逐步研制开发出一些新的插入序列或重复序列替代 IS6110 作为分型的标志物,对标准检测技术起到很好的补充。如多位点的 VNTR 分析 (MLVA)^[12]、间隔区寡核苷酸探针分型 (Spoligotyping)^[13]、大片段多态性分析 (LSPs)^[14]、单核苷酸多态性 (SNP)^[15] 以及采用插入序列 IS1081 作为分子标志物对牛型 MTB 进行分型鉴定^[16] 等。但 IS6110-RFLP 方法建立时间早,研究时间长,其多年来所积累的数据库资源仍具有不容忽视的参考价值。

本研究在建立我国 IS6110-RFLP 分型技术标准操作方案的同时,对广西、湖南、安徽、江苏 4 省(自治区)分离的 78 株 MTB 临床分离株进行分型研究,分为 11 个基因簇 75 个不同的基因型,株水平鉴定率达 96.15%。研究结果显示,我国存在一个主要流行型,占所研究菌株的 66.7%。此型菌株表现为显著的多拷贝 IS6110 限制性片段多态性。从分布情况来看,此型菌株在不同省份分离的菌株中所占比例存在差异,其中广西最高(77.8%),其次是湖南(71.1%),安徽、江苏两省所占比例相对较低,只有 40%,这也可能与这两个省所分离菌株较少,样本量不足有关,但其所占的比例仍不容忽视。在我国,这种多拷贝 IS6110 菌株占优势的特点尤其适用于 IS6110-RFLP 方法的分型分析。因此,IS6110-RFLP 标准方法在我国具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(12): 2668-2673.
- [2] van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 406-409.
- [3] Krishnan MY, Radhakrishnan I, Joseph BV, et al. Combined use of amplified fragment length polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Infect Dis*, 2007, 28(7): 86.
- [4] Chanhan DS, Sharma VD, Parashar D, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. *Indian J Med Res*, 2007, 125(4): 577-581.
- [5] Kurepina N, Likhoshvay E, Shashkina E, et al. Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains among clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2148-2154.
- [6] Dirraa O, Elmdaghri N, Laaboudi L, et al. IS6110 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from an area of Casablanca, Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(11): 1294-1296.
- [7] Cave MD, Yang ZH, Strefanova R, et al. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(3): 1228-1233.
- [8] Eilers PH, Van Soolingen D, Thi Ngoc Lan N, et al. Transposition rates of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(6): 2461-2464.
- [9] Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4): 1277-1282.
- [10] Abbadi S, Rashed HG, Morlock GP, et al. Characterization of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and mechanisms of antimicrobial resistance for multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from a major reference hospital in Assiut, Egypt. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(6): 2330-2334.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [12] Le Fleche P, Fabre M, Denoeuf F, et al. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol*, 2002, 2: 37.
- [13] Gori A, Bandera A, Marchetti G, et al. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(8): 1242-1248.
- [14] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3185-3191.
- [15] Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, et al. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendation for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol*, 2006, 188(2): 759-772.
- [16] Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *J Mol Evol*, 2001, 53(6): 680-689.

(收稿日期: 2008-02-03)

(本文编辑: 张林东)