

45个可变数目串联重复序列位点用于中国结核分枝杆菌基因型鉴定的分辨力评价

吕冰 李兆娜 刘梅 刘志广 赵秀芹 万康林

【摘要】 目的 评价结核分枝杆菌基因组中串联重复序列(VNTR)位点在中国结核分枝杆菌临床分离株的分型鉴定的分辨力。方法 参考 <http://minisatellites.u-psud.fr>网站记载的位点选取其中VNTR位点,参照H37Rv结核分枝杆菌标准株全基因组序列,利用DNASar软件设计引物,采用PCR分别对中国结核分枝杆菌临床分离株和H37Rv标准株的VNTR位点进行检测,根据PCR凝胶电泳图片中各菌株相应位点扩增产物的大小,确定重复单元的重复次数。计算Hunter-Gaston指数来分析各位点的分辨能力,及各位点合并分辨力。结果 共检测135株中国结核分枝杆菌临床分离株和H37Rv标准株的45个VNTR位点。结果显示45个VNTR位点对136株菌的分辨力各不相同,Hunter-Gaston指数最大者为0.814(0.797~0.830),最小者为0.015(0.001~0.028),>0.5的有13个位点。位点的合并分辨力分析显示,随着位点数量增加,分辨力增强,如Qub11-b和Qub18两个位点合并分析,Hunter-Gaston指数为0.936,分组数为44组;Qub11-b、Qub18、Mtub21、Rv2372、MIRU26、Qub26、Qub4156c、Qub11-a和Qub15等9个位点合并分析,Hunter-Gaston指数已经达到1,组数为136组,表示已达到最大分辨力,即株水平分型。结论 不同VNTR位点具有不同的分辨力。其分型分辨力,多位点联合明显好于单位点。Qub11-b等9个位点的合并分型能力较好,这些位点有利于结核分枝杆菌的分型研究。

【关键词】 结核分枝杆菌;可变数目串联重复序列;基因分型

Discrimination power evaluation for 45 loci of variable number tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from China LU Bing, LI Zhao-na, LIU Mei, 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 evaluate the discriminatory efficiency of multiple loci of variable numbers of tandem repeats (VNTR) in *Mycobacterium tuberculosis* genome. Genotyping and identification on Chinese *M. tuberculosis* clinical strains were used to locate a series of high discriminated loci, so as to provide the basis for creating a standardized multiple loci VNTR analysis (MLVA) to distribute fast typing and identification on Chinese *M. tuberculosis*. **Methods** VNTR loci which were chosen from the website <http://minisatellites.u-psud.fr/> and referenced to the genome sequence of *M. tuberculosis* standard strain H37Rv were tested in Chinese *M. tuberculosis* clinical strains and H37Rv by means of PCR. The primers were designed by DNASar software. The repeat member of VNTR unit was estimated by the result of PCR. The discrimination power of single locus or multiple loci was confirmed by the Hunter-Gaston index. **Results** 45 VNTR loci were tested in 135 Chinese *M. tuberculosis* clinical strains and H37Rv. The discrimination power of these loci appeared different from each other, with the biggest Hunter-Gaston index as 0.814 (0.797-0.830), the smallest one as 0.015 (0.001-0.028), and there were 13 loci with which the Hunter-Gaston index was bigger than 0.5. Results showed that the discrimination power was increasing by different loci that associated with each other. The more loci that were combined, the bigger the Hunter-Gaston index was. For example, the Hunter-Gaston index of Qub11-b associated with Qub18 was 0.936, by which 136 strains could be divided into 44 groups. With the combination of 9 loci including Qub11-b, Qub18, Mtub21, Rv2372, MIRU26, Qub26, Qub4156c, Qub11-a and Qub15, the Hunter-Gaston index could have reached 1 and by which the 136 strains could be divided into 136 groups, also showing that the biggest discrimination power to strain identification, viz. strain level genotype were reached. **Conclusion** The discrimination power of different locus was different. The discrimination power of multiple loci was much more satisfied than that of single locus. It was satisfied the combine discrimination power of 9 loci including Qub11-b, Qub18, Mtub21, Rv2372, MIRU26, Qub26, Qub4156c, Qub11-a and Qub15, by which the qualified typing method could gain to facilitate research on molecular epidemiology with the Hunter-Gaston index analysis.

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

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.01.017

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771853)

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

通信作者:万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

结核分枝杆菌的DNA分子分型技术是近十几年发展起来的,其基因分型有许多种方法,插入序列(IS)分型是最初发展起来的分型方法^[1,2]。以此为基础的IS6110 RFLP分型方法已经被认为是国际上通用的标准分型方法。由于RFLP方法的自身缺点,并且随着结核分枝杆菌全基因组序列分析技术的进步,可变数目串联重复序列(VNTR)已经逐渐成为研究热点。VNTR分型不但分辨率高,操作简便,而且结果以数字化表示,易于记录分析,已经有取代RFLP-IS6110的趋势^[3-5]。本实验参考网站记载的结核分枝杆菌基因组多态性重复序列的位点,选取其中45个位点,对每个位点进行分辨力评价,希望能够找出一系列高分辨力的位点,建立结核分枝杆菌快速分型的系统方法。

材料与方法

1. 结核分枝杆菌临床分离株: H37Rv, 结核分枝杆菌标准株1株, 以及135株临床分离株均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核室提供。结核分枝杆菌临床分离株分别随机抽取自北京、甘肃、广西、河南、四川、新疆和西藏等省(自治区、直辖市)。菌株采集于2004—2006年, 患者年龄为2~84岁, 女性47人, 男性88人; 其中属于北京家族菌株占62%。

2. VNTR基因分型方法: VNTR分型方法参考<http://minisatellites.u-psud.fr/>网站记载的结核分枝杆菌基因组多态性重复序列的位点, 选取其中45个位点。参照H37Rv结核分枝杆菌国际参照株全基因组序列(NC000962), 利用DNASTar软件设计引物; 45位点情况见表1。关于位点的选择原则, 考虑到位点的PCR产物长度确定需要参照琼脂糖凝胶电泳图片, 所以为了尽量减少读图的误差, 所选择位点的重复单位长度均在50~100 bp。经过预试验, 选择扩增结果比较好的、能够产生比较稳定单一条带的45个位点。

(1) DNA模板制备: 生理盐水洗脱菌体, 80℃灭菌30 min; 离心收集菌体, 1 ml TE重新悬菌; 95℃水浴(或沸水浴)15 min, 12 000 r/min离心3 min; 取上清液-20℃保存备用。

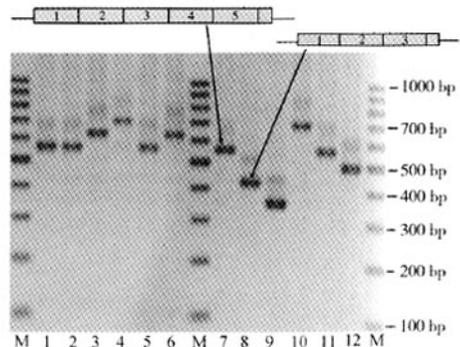
(2) PCR: PCR反应体系预混液中各成分的组成: 总体系14 μl, 其中上下游引物各1 μl, DNA模板5 μl, Taq酶预混液7 μl。PCR扩增程序: 预变性94℃ 5 min; 变性94℃ 30 s, 退火62℃ 30 s; 延伸70℃ 45 s; 35个循环; 最后延伸72℃ 10 min; PCR产

物4℃保存。

(3) 琼脂糖凝胶电泳: 配制的琼脂糖凝胶浓度为2%, 电泳电压采用1~10 V/cm的电压降(按两极间距离计算); 将凝胶放入浓度为0.5 μg/ml的EB染色液中, 放置水平摇床上染色30 min, 脱色15~30 min; 拍照, 读胶分析仪计算条带的产物大小。

3. 实验结果分析:

(1) 计算重复次数: 各菌株在每个位点的重复次数不同, PCR产物的大小不同, 在琼脂糖凝胶的位置就不同。根据在琼脂糖凝胶的位置计算产物的大小, 再根据位点重复单元的长度, 可计算出该菌株在这个位点的重复次数。如图1, 第7条泳道为H37Rv的PCR产物, 产物为563 bp, 有5.2个重复次数(表1), 而用读胶仪分析的泳道8的PCR产物为425 bp, 泳道8菌株在该位点的重复次数为 $(563-425)/69=3.2$ 。计算时, PCR产物碱基数由读胶仪分析软件确定, 应该考虑到读胶仪分析软件的误差。



注: M: DNA分子质量标准; 1, 7: 标准菌株H37Rv; 2~6、8~12: 临床分离株

图1 Qub11-b位点的PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

(2) 根据各位点重复次数计算位点的分辨力: 本实验采用计算Hunter-Gaston指数来分析各位点的分辨能力(discrimination)。分辨力用 D 表示, 数值在0~1之间, 表示分辨力的大小, 即实验总体中的2个无关样本能够分到不同型别中的能力。其计算公式^[6]:

$$D = 1 - 1/N(N-1) \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

公式中 N 为所有菌株数, s 为分型的型别数, n_j 表示在 j 型别中的菌株数。

(3) 计算各位点合并分辨力: 计算Hunter-Gaston指数来分析位点的合并分辨能力, 计算公式同上式。

结 果

1. 各位点分辨力:在表1中已表示出各个位点的 Hunter-Gaston 指数结果,及其可信区间,组数指的是用该位点 VNTR 分型产生的组数,分组结果一栏中前面的数字是该位点的重复次数,后面括号中的数字是有该重复次数的菌株数量。

表1中位点的顺序是按照 Hunter-Gaston 指数结果由大到小排列的。例如,第一行 Qub11-b 位点的 Hunter-Gaston 指数为 0.814,意义是在实验中的 136 株菌中,两个无关样本能够分到不同型别中的可能性为 0.814。该位点将 136 株菌分为 9 组,各组的重复次数分别为 0(12 株)、1.2(3 株)、2.2(9 株)、3.2(11 株)、4.2(11 株)、5.2(37 株)、6.2(40 株)、7.2(10 株)、8.2(3 株),重复次数为 0 是表示菌株在该位点无结果。菌株数最多的组占总菌株数为 29.4%(40/136); Hunter-Gaston 指数最低的位点是 Mtub29,为 0.015,该位点将 136 株菌株分成 2 组,各组的重复次数分别为 2.1(135 株)、3.1(1 株),菌株最多的组占总数的 99%(1/136)。分辨力理论最大值是 1,在表1中 Hunter-Gaston 指数最大值是 0.814,指数 >0.5 的有 13 个位点。

2. 位点的合并分辨率:表2中位点名称是按照表1中 Hunter-Gaston 指数的顺序从大到小排列; Hunter-Gaston 指数是该行的位点与该行以上的位点合并分型的结果。例如第三行的 Hunter-Gaston 指数表示 Rv1955、Rv1982、Rv2163b(Mtub21、Qub18、Qub11-b)3 个位点分型结果;其可信区间及组数 2 列同表1。

第二行的 Qub18 位点的 Hunter-Gaston 指数是用 Qub11-b、Qub18 两个位点分型的结果,指数为 0.936,分组数为 44 组,都较 Qub11-b、Qub18 两个位点单独分型计算的结果(分别为 0.814、0.752;9 组、12 组)好得多。

当 Rv2163b 至 Rv3155(Qub11-b ~ Qub15)共 9 个位点合并分型结果计算 Hunter-Gaston 指数已经达到 1,组数也已经 136 组,表示已经达到最大分辨力,即停止计算。

讨 论

结核分枝杆菌的基因分型方法最初在 1988 年提出,并在 1990 年代建立了以插入序列 IS6110-RFLP 指纹图谱分型的标准化分型方法^[1,2]。尽管目前国际上将 IS6110 方法作为结核分枝杆菌分型的

金标准,它存在的缺点也不可否认;IS6110 方法需要大量的结核分枝杆菌,试验操作繁琐,技术含量高,需要多种昂贵的仪器,并且实验结果不易分析,也不便于实验室间的比对。所以近年来各国的学者致力于研究一种简便易行的方法,用来代替 IS6110 方法^[3]。

VNTR 分型方法是一种以 PCR 技术为基础的方法,简单方便、易于推广使用,其数字化结果较易于实验室间的比对,更易于数据分析。同 IS6110-RFLP 方法相比,对 IS6110 低拷贝数的菌株能得到较好的分型结果^[5,7-9]。作为分子标识, VNTR 位点有着恰当的稳定性,在鉴别内源性感染和外源性感染,或是追踪慢性病患者及确定菌株的种系关系等方面有着很大的优势^[3,4]。在近几年中,国内的许多研究人员应用 VNTR 方法进行结核分枝杆菌分型,得到了比较好的结果^[10-12]。为达到良好的分型效果,很多学者还采用 VNTR 分型与 Spoligotyping 分型相结合的方式^[13,14]。虽然目前 VNTR 方法正在研究中,还没有一个完整的、明确的方案,但是增加位点可以提高 VNTR 的分辨力已经达到了各国学者的认同^[15,16]。然而增加位点虽然能够提高分辨力,也增加了实验室的工作量。选择足够的位点进行分型而又相对减少实验室的压力,是本研究的重点;所以选择了 45 个位点,评价分型价值。

对于分型方法的评价最重要的是该方法的分型能力、可重复性和分辨力。分型能力及可重复性比较容易去量化,只是简单的百分比数字即可表示。而分辨力指的是分型方法能够区分互无关联的菌株的能力,这是由分型方法能够分出的型别数及各型别中的菌株数量决定^[9]。本实验应用 Hunter-Gaston 指数公式计算分型方法的分辨力,可使实验总体中的两个无关样本能够分到不同型别中^[6]。

在本实验中,136 株结核分枝杆菌是从全国 3000 余株菌株中抽取,分别来自全国 7 个地区,菌株有一定的代表性。试验中计算出来 45 个位点的分辨力,又将分辨力由大到小排列,位点按照分辨力大小顺次累加,计算位点合并分型的分辨力,合并分型的分辨力较单个位点的分辨力要好的多。结果当 Rv2163b 至 Rv3155 等 9 个位点合并时分辨力达到 1,组数也达到了 136 组,即达到了最大。理论上用这 9 个位点将 136 株结核分枝杆菌分成 136 个型,每个菌株拥有自己独特的型别。这 136 株菌株在结核病流行传播中都带有独特的身份,利于流行病学者在疾病流行中追溯传染源、研究传播机制并且找出

表1 H37Rv全基因上45个VNTR位点的基本信息及136株结核分枝杆菌在45个位点的重复次数的Hunter-Gaston指数计算结果

位点名称	又名	全基因位置 (bp)	PCR产物 (bp)	单元长度 (bp)	重复次数	指数	95%CI	组数	136株菌重复次数结果 重复次数(菌株数)
Rv2163b	Qub11-b	2163731 ~ 2164092	563	69	5.2	0.814	0.797 ~ 0.830	9	0(12), 1.2(3), 2.2(9), 3.2(11), 4.2(11), 5.2(37), 6.2(40), 7.2(10), 8.2(3)
Rv1982	Qub18	1982874 ~ 1983351	700	78	6.1	0.752	0.725 ~ 0.780	12	0(24), 3.1(1), 4.1(1), 5.1(1), 6.1(9), 7.1(7), 8.1(9), 9.1(60), 10.1(6), 11.1(16), 12.1(1), 13.1(1)
Rv1955	Mtub21	1955536 ~ 1955741	206	51	2.0	0.698	0.674 ~ 0.722	8	0(1), 1(10), 2(4), 3(15), 4(40), 5(61), 6(4), 8(1)
Rv2372	-	2372435 ~ 2372614	774	57	3.2	0.693	0.676 ~ 0.710	5	0(54), 2.2(8), 3.2(24), 4.2(47), 5.2(3)
Rv2996	MIRU26	2996004 ~ 2996168	613	51	3.0	0.673	0.639 ~ 0.707	10	0(1), 1(3), 2(2), 3(3), 4(6), 5(23), 6(18), 7(72), 8(6), 9(2)
Rv4052	Qub26	4052971 ~ 4053549	709	111	5.2	0.648	0.615 ~ 0.681	9	0(6), 1.2(1), 2.2(2), 3.2(2), 5.2(4), 6.2(8), 7.2(33), 8.2(73), 9.2(7)
Rv4156	Qub4156c	4156799 ~ 4156967	169	59	2.9	0.628	0.600 ~ 0.656	6	0(38), 0.9(1), 1.9(2), 2.9(72), 3.9(6), 4.9(17)
Rv2163a	Qub11-a	2163322 ~ 2163530	306	69	3.0	0.593	0.559 ~ 0.627	10	0(5), 3(1), 4(1), 5(2), 6(36), 7(5), 8(2), 9(79), 10(4), 11(1)
Rv3155	Qub15	3155879 ~ 3156089	211	54	3.9	0.570	0.539 ~ 0.602	4	0(38), 1.9(12), 2.9(6), 3.9(80)
Rv4120	-	4120917 ~ 4121053	443	57	2.4	0.538	0.491 ~ 0.584	12	0(91), 1.4(1), 2.4(2), 3.4(10), 4.4(13), 5.4(5), 6.4(1), 7.4(2), 8.4(2), 9.4(5), 10.4(3), 12.4(1)
Rv3232	Qub3232	3232651 ~ 3232866	215	56	3.9	0.536	0.517 ~ 0.555	7	0(55), 0.9(1), 2.9(1), 3.9(2), 6.9(1), 8.9(1), 9.9(75)
Rv3192	ETRE	3192195 ~ 3192359	651	53	3.0	0.517	0.473 ~ 0.562	7	0(2), 2(6), 3(19), 4(7), 5(92), 6(9), 8(1)
Rv3820	-	3820387 ~ 3820589	507	57	3.5	0.517	0.508 ~ 0.527	4	0(64), 3.5(70), 5.5(1), 8.5(1)
Rv3171	Mtub34	3171468 ~ 3171626	158	54	2.9	0.483	0.452 ~ 0.514	4	0(41), 0.9(1), 1.9(5), 2.9(89)
Rv0424	Mtub04	424012 ~ 424143	132	132	2.6	0.470	0.424 ~ 0.516	7	0(4), 0.6(1), 1.6(2), 2.6(12), 3.6(17), 4.6(97), 5.6(3)
Rv0802	MIRU40	802353 ~ 802551	407/199	54	1.0	0.399	0.353 ~ 0.446	5	0(2), 1(5), 2(14), 3(104), 4(11)
Rv0959	MIRU10	960167 ~ 960323	643	53	3.0	0.393	0.348 ~ 0.438	7	0(1), 2(21), 3(104), 4(3), 5(3), 6(3), 9(1)
Rv1644	MIRU16	1644249 ~ 1644367	671	53	2.0	0.392	0.347 ~ 0.436	5	0(1), 1(5), 2(21), 3(104), 4(5)
Rv2165	ETRA	2165327 ~ 2165583	397	75	3.0	0.384	0.338 ~ 0.429	5	0(6), 2(5), 3(19), 4(105), 5(1)
Rv2401	Mtub30	2401817 ~ 2401927	319	58	2.0	0.375	0.332 ~ 0.418	6	0(3), 1(1), 2(24), 3(1), 4(105), 5(2)
Rv2703	-	2703892 ~ 2704015	855	57	2.2	0.369	0.331 ~ 0.407	4	0(30), 1.2(1), 2.2(104), 3.2(1)
Rv4348	MIRU39	4348704 ~ 4348824	646	53	2.0	0.355	0.315 ~ 0.396	4	0(1), 2(27), 3(106), 4(2)
Rv1895	Qub1895	1895345 ~ 1895591	246	57	4.4	0.352	0.303 ~ 0.400	9	0(1), 1.4(2), 2.4(10), 3.4(2), 4.4(109), 5.4(1), 7.4(2), 8.4(6), 10.4(3)
Rv3663	Mtub38	3663827 ~ 3663995	168	63	2.7	0.352	0.309 ~ 0.394	4	0(2), 0.7(107), 1.7(24), 2.7(3)
Rv3239	ETR-F	3239565 ~ 3239788	223	79	2.8	0.347	0.303 ~ 0.391	6	0(2), 0.8(3), 1.8(21), 2.8(108), 3.8(1), 4.8(1)
Rv4155	-	4155460 ~ 4155582	643	57	2.2	0.342	0.296 ~ 0.388	4	0(17), 1.2(5), 2.2(109), 3.2(5)
Rv3690	Mtub39	3690951 ~ 3691101	515	58	6.0	0.337	0.290 ~ 0.385	6	0(1), 2(11), 3(5), 4(110), 5(7), 6(2)
Rv1451	Qub1451	1451779 ~ 1451995	216	57	3.8	0.265	0.224 ~ 0.306	3	0(1), 1.8(115), 3.8(20)
Rv3594	-	3594249 ~ 3594458	836	56	3.7	0.252	0.208 ~ 0.296	5	0(13), 1.7(3), 2.7(1), 3.7(117), 4.7(2)
Rv2059	MIRU20	2059430 ~ 2059600	170	77	2.2	0.236	0.194 ~ 0.278	3	0(15), 1.2(3), 2.2(118)
Rv0580	ETRD	580563 ~ 580814	330	77	3.0	0.233	0.188 ~ 0.278	8	0(2), 1(3), 2(3), 3(119), 4(1), 5(6), 6(1), 7(1)
Rv3007	MIRU27	3007038 ~ 3007220	657	53	3.0	0.230	0.186 ~ 0.274	5	0(3), 1(1), 2(10), 3(119), 4(3)
Rv2461	ETRB	2461320 ~ 2461531	292	57	3.0	0.203	0.161 ~ 0.244	4	0(1), 1(11), 2(121), 3(3)
Rv0577	ETRC	577286 ~ 577496	346	58	4.0	0.155	0.115 ~ 0.194	7	0(1), 1(1), 2(5), 3(2), 4(125), 5(1), 6(1)
Rv0595	-	595336 ~ 595449	421	58	2.0	0.153	0.114 ~ 0.191	4	0(8), 1(1), 2(125), 3(2)
Rv1907	-	1907457 ~ 1907578	573	56	2.2	0.140	0.103 ~ 0.177	3	0(6), 2.2(126), 3.2(4)
Rv3351	-	3351091 ~ 3351214	473	56	2.2	0.140	0.103 ~ 0.177	5	0(1), 1.2(1), 2.2(126), 3.2(7), 5.2(1)
Rv2990	Mtub31	2990585 ~ 2990698	113	55	2.1	0.128	0.091 ~ 0.164	5	0(1), 1.1(2), 2.1(3), 3.1(127), 4.1(3)
Rv4087	-	4087480 ~ 4087619	356	57	2.5	0.127	0.091 ~ 0.164	4	0(3), 1.5(3), 2.5(127), 3.5(3)
Rv2531	MIRU23	2531893 ~ 2532225	873	53	6.0	0.114	0.079 ~ 0.148	5	0(1), 2(1), 4(1), 5(128), 6(5)
Rv2168	-	2168805 ~ 2169166	858	78	4.6	0.112	0.079 ~ 0.146	3	0(7), 3.6(1), 4.6(128)
Rv0154	MIRU2	154112 ~ 154239	127	53	2.4	0.044	0.021 ~ 0.066	3	0(1), 1.4(2), 2.4(133)
Rv1351	-	1351196 ~ 1351282	300	58	2.2	0.029	0.011 ~ 0.048	2	0(2), 2.2(134)
Rv1281	Qub1281	1281897 ~ 1282021	125	60	2.1	0.015	0.001 ~ 0.028	2	0(1), 3.8(135)
Rv2374	Mtub29	2347395 ~ 2347613	218	57	3.8	0.015	0.001 ~ 0.028	2	2.1(135), 3.1(1)

表 2 136 株结核分枝杆菌位点合并 Hunter-Gaston 指数、95%CI 及分组数

位点名称	又名	指数	95%CI	组数
Rv2163b	Qub11-b	-	-	-
Rv1982	Qub18	0.936	0.925 ~ 0.946	44
Rv1955	Mtub21	0.976	0.971 ~ 0.981	76
Rv2372	-	0.991	0.989 ~ 0.993	99
Rv2996	MIRU26	0.996	0.995 ~ 0.997	113
Rv4052	Qub26	0.998	0.997 ~ 0.999	121
Rv4156	Qub4156c	0.999	0.999 ~ 1.000	130
Rv2163a	Qub11-a	1.000	1.000 ~ 1.000	134
Rv3155	Qub15	1.000	1.000 ~ 1.000	136

结核病在人群中传播的危险因素^[3]。

在实践中,如果将分辨力高的一组位点标准化,有利于菌株分型结果在各个实验室之间的比对;在疾病暴发时,也可以很快的得到流行菌株的型别,这对于疾病预防控制工作有较深远的意义。但是在实际应用中,位点的选择还要考察其稳定性、可操作性等;也就是说,这 9 个位点是否有标准化的价值,还要进一步的研究。

本次研究中发现,分辨力较高的这一组 9 个位点以 Qub 位点占多数(6/9)。Qub 位点多位于基因的内部,对基因的表达或多或少的产生影响,其中 Qub11-b 与 Qub11-a 位于同一 ORF 中,编码 PPE 家族的 pUCB 蛋白^[6]。然而,国外的很多学者在进行分型时,ETR 位点、MIRU 位点及 Mtub 位点经常应用,而 Qub 却少有提及。2002 年 Le 等^[17]总结了 40 个位点的分型研究,其中包括 11 个 Qub 位点,但是他认为只有 Qub11-a 具有良好的分型能力及重复性。2004 年 Severine 等用 12 个 MIRU 位点将非洲菌株、北京家族、EAI 家族等结核分枝杆菌中比较大的家族分类区分开来。2006 年有学者认为多位点的结合将有利于分型,但他考虑的也是 ETR + MIRU + Mtub 位点, Qub 位点并不是首选^[16]。2006 年 Supply 等^[18]应用 VNTR 方法进行菌株分型,所选定的 12 个位点中只有 Qub11-b 一个 Qub 位点,而且在对各位点的评价中 Qub 的 5 个位点由于多态性过高、或是得不到 PCR 结果而放弃使用。由此关于对 Qub 位点的稳定性,在以后的研究中还会进一步考察。

参 考 文 献

[1] Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, et al. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1988, 26(11):2240-2245.

[2] Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids

Research, 1990, 18(1):188.

[3] Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res, 2004, 120(4): 233-247.

[4] Crawford JT. Genotyping in contact investigations: a CDC perspective. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(12):S453-457.

[5] Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. PNAS, 2001, 98:1901-1906.

[6] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26(11):2465-2466.

[7] Cowan LS, Mosher L, Diem L, et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol, 2002, 40(5):1592-1602.

[8] Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, et al. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol, 2001, 39(7):2453-2457.

[9] Kremer K, Au BK, Yip PC, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol, 2005, 43(1):314-320.

[10] 董海燕,王庆,刘志广,等. VNTR 技术用于安徽省耐药结核分枝杆菌基因分型的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(8):687-690.

[11] 曹晓慧,蒋毅,张媛媛,等. 13 个 VNTR 位点用于 113 株结核分枝杆菌的基因分型研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8):705-708.

[12] 蒋毅,张丽水,赵秀芹,等. MLVA 技术用于福建 105 株结核分枝杆菌基因分型的初步研究. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(1):1-4.

[13] Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with Spoligotyping. J Clin Microbiol, 2000, 38(7): 2520-2524.

[14] 石荔,杨敏,Christine Pourcel,等. MLVA 和 Spoligotyping 用于西藏地区 216 株结核分枝杆菌临床分离株的基因分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 27(8):711-718.

[15] Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology, 1998, 144:1189-1196.

[16] Vergnaud G, Pourcel C. Multiple Locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis, p83-104 of Stackebrandt, Erko (Ed.), Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes, 2006, XIV, 320 p. 56 illus, Hardcover, ISBN: 978-3-540-23155-4.

[17] Le Flèche P, Fabre M, Denoëud 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.

[18] Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2006, 44(12):4498-4510.

(收稿日期:2008-05-12)

(本文编辑:尹廉)