

# 中国结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸分型方法 标准化操作程序的探讨

董海燕 吕冰 张媛媛 刘志广 赵秀芹 蒋毅 万康林

**【摘要】** 目的 探讨中国结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)的标准化方法,初步评价其应用价值。方法 采用核酸提取、聚合酶链反应(PCR)、反向线性点杂交等技术,结合 BioNumerics (Version 5.0)软件,对 224 株结核分枝杆菌临床分离株进行分型研究。结果 使用 Spoligotyping 标准化方法对 224 株中国结核分枝杆菌临床分离菌株进行基因分型,将其分为北京家族菌株和非北京家族菌株两大簇。其中北京家族菌株 129 株,为主要的流行菌株。结论 初步确定中国 Spoligotyping 标准化技术方案。该方法快速、简便、重复性好,能同时对结核分枝杆菌进行检测和分型,有利于结核病传染源的追溯和流行趋势的研究,尤其是在鉴定北京家族菌株上具有独特作用。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 间隔区寡核苷酸分型; 标准化操作程序; 北京家族

**Introduction to the standard operation program of Spoligotyping on *Mycobacterium tuberculosis* in China** DONG Hai-yan, LU Bing, ZHANG Yuan-yuan, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, JIANG Yi, 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 study and preliminarily evaluate the standard spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping) method and the application on *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*). **Methods** Spoligotyping on 224 *M.tuberculosis* strains was studied by the molecular biological techniques, including DNA isolation, PCR, reverse line blot hybridization, together with data analysis software BioNumerics (Version 5.0). **Results** Standardization on both Spoligotyping method and parameters in result analysis and the usage of the analysis software were studied. Through this method, 224 *M.tuberculosis* clinical strains were classified into 2 clusters including 129 Beijing family strains and 95 non-Beijing family strains. The predominant strains belonged to Beijing family. **Conclusion** Standard Spoligotyping method was preliminary determined in China, showing that it was a simple, rapid, and robust method for simultaneous detection and typing of *M.tuberculosis*. This method can be used for tracing the source of infection and understanding the epidemic trend of *M.tuberculosis*. Spoligotyping can also be served as a method for simultaneous detection and typing of *M.tuberculosis*, and to identify Beijing family strains.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Spacer oligonucleotide typing; Standard operation program; Beijing family

结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸(Spoligotyping)分型方法是一种独特的以 PCR 为基础的分子分型方法<sup>[1,2]</sup>,其基本原理是基于直接重复区(DR 区)的多态性。DR 区只出现于结核分枝杆菌复合群中,由若干个保守的长为 36 bp 的直接重复序列组成,并被间隔区分开,每个间隔区序列长为 35~41 bp<sup>[3]</sup>。该

方法选取 43 个 DR 位点间的间隔区序列,其中 6 个间隔区序列源自 *Mycobacterium bovis* BCG 的 DR 区域序列,其余的 37 个间隔区序列全部源自 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 的 DR 区域序列,设计各自特异的寡核苷酸探针,并固定在 Biotin C 膜上,用生物素标记的引物 PCR 扩增间隔区序列,扩增产物与膜上的 43 个寡核苷酸探针杂交,再通过 ECL 增强化学发光法检测<sup>[3]</sup>。由于不同菌株的间隔区序列不同,因此杂交的探针数量和种类也不同。该方法能非常容易的区别牛分枝杆菌和其他分枝杆菌,也常用于 IS6110 低拷贝数的菌株分型,操作简

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.019

基金项目: 国家自然科学基金(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

单,可直接检测临床标本<sup>[2]</sup>。我国目前还没有一家实验室建立完善的 Spoligotyping 标准操作程序,尤其是在结果处理比较方面,没有一个强大的数据库软件进行比较整理,不便于各实验室间结果的比较。本研究参照文献报道的 Spoligotyping 分型方法<sup>[2]</sup>,采用我国临床分离株 224 株,对 Spoligotyping 分型方法的操作步骤及结果整理进行探讨,并初步分析结核分枝杆菌的流行特点。

## 材料与方 法

1. 试验菌株:结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv、BCG、牛分枝杆菌购自中国药品生物制品检定所,224 株临床分离株由湖南省结核病防治所和安徽省肺科医院提供。

2. 主要试剂与仪器:Taq 酶(天根生化科技有限公司)、Biodyne C 膜(Pall Biosupport 公司)、streptavidin-peroxidase conjugate 和 CDP-star 检测液(Amersham 公司)、miniblotter(MN45, Immunetics 公司),生物安全柜、PCR 仪、杂交炉等仪器由中国疾病预防控制中心提供。

3. DNA 提取:取一菌环菌溶于 400  $\mu$ l TE 中,沸水中煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 3 min;取上清即为模板 DNA,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. 固定有 43 个间隔区寡核苷酸序列探针的膜的制备<sup>[2]</sup>:用新鲜配制的 16%EDAC 孵育 Biodyne C 膜 10 min,用水清洗后将膜置于 miniblotter 中;将寡核苷酸探针加到 150  $\mu$ l 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 值 8.4)中稀释到 1.25  $\mu$ mol/L;稀释后的探针依次平行加到 miniblotter 的槽中,室温下孵育 1 min;弃去寡核苷酸探针溶液,取出膜;室温下用 0.1 mol/L NaOH 孵育膜 10 min;用 2 $\times$ SSPE/0.1% SDS 在 50 $^{\circ}$ C 洗膜 10 min;用 20 mmol/L EDTA (pH 值 8)在室温下洗膜 15 min。

5. PCR 体外扩增间隔区 DNA 序列:上下游引物为 DRa:5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5' 端生物素标记);DRb:5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'。PCR 反应条件为预变性 96 $^{\circ}$ C 3 min;96 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环。

6. 杂交与检测:将膜置于 2 $\times$ SSPE/0.1% SDS 中 50 $^{\circ}$ C 洗膜 5 min;将膜放入 miniblotter 中,使槽和加入寡核苷酸样品时的方向垂直;将 20  $\mu$ l PCR 产物加入到 150  $\mu$ l 2 $\times$ SSPE/0.1% SDS 中,将稀释的 PCR 产物在 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min,然后立即在冰上冷却;将变性的 PCR 产物平行加到 miniblotter 中,50 $^{\circ}$ C 杂交

45 min;弃去样品,用 2 $\times$ SSPE/0.5% SDS 在 55 $^{\circ}$ C 洗膜两次,每次 10 min;在 10 ml 2 $\times$ SSPE/0.5% SDS 中加入 2.5  $\mu$ l streptavidin-peroxidase conjugate (500 U/ml),将膜置于该溶液中在 42 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;用 2 $\times$ SSPE/0.5% SDS 在 42 $^{\circ}$ C 洗膜两次,每次 10 min;用 2 $\times$ SSPE 室温下洗膜两次,每次 5 min;将 CDP-star 检测液均匀涂抹于膜 DNA 面,孵育 4 min;置化学发光仪中检测。

7. 膜的再使用:用 1%SDS 在 80 $^{\circ}$ C 洗膜两次,每次 30 min;用 20 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)室温洗膜 15 min;将膜密封于塑料袋中,置 4 $^{\circ}$ C 保存以备再次使用。

8. 统计学分析:用 BioNumerics (Version 5.0) 软件进行聚类分析<sup>[4]</sup>。

## 结 果

1. Excel 文件的创建:将图片结果(图 1)转化为数字结果,间隔区存在用“1”表示;间隔区缺失用“0”表示,建立 Excel 数据库(图 2)。每个 Excel 数据库包括菌株号、位点名称、实验结果。图 2 中的列名为各位点的名称,行名为菌株号。在 BioNumerics 软件中,菌株号的列名需要用 Key 表示,这一列数据是固定不变并且是惟一的,用于各个数据库间如实验结果和背景资料等数据的连接。

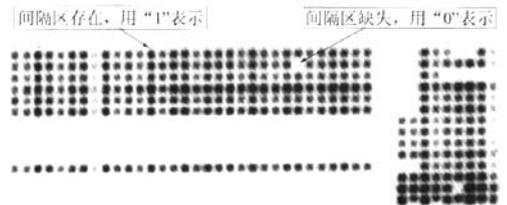


图 1 结核分枝杆菌 Spoligotyping 指纹图

2. 数据分析标准化:将 Excel 文件导入 BioNumerics 软件进行聚类分析,聚类方式用平均连锁聚类法(UPGMA),相似系数选用 Dice 系数。特征相同或相近的菌株就被分为一群。图 3 是 BioNumerics 软件的数据分析界面。

3. 结果聚类分析:图 4 为 224 株结核分枝杆菌 Spoligotyping 结果经过聚类分析后的聚类图。图 4 的左边是系统树图,中间是菌株 43 个间隔区序列的实验结果,右侧三列分别是菌株号、相同基因型的菌株数及基因谱系。按照预设的 Cluster-cutoff 值,软件自动分析将菌株分为 A、B 两簇,用虚线表示。发现 224 株结核分枝杆菌临床分离株中,北京家族菌

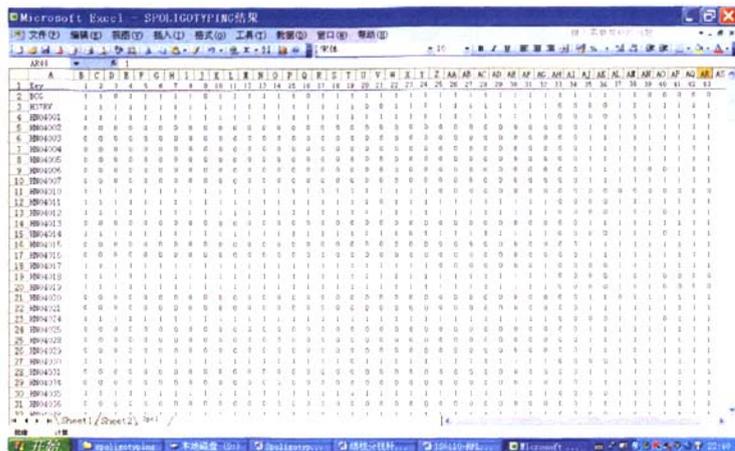


图2 结核分枝杆菌 Spoligotyping 指纹图的数字结果

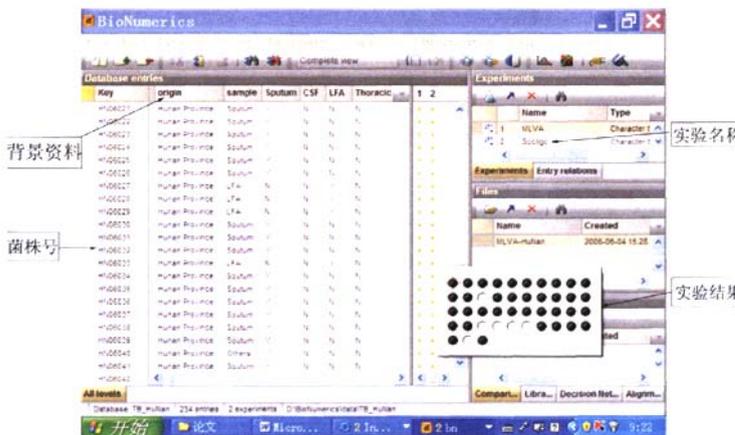


图3 BioNumerics 软件的数据分析界面

株 129 株,非北京家族菌株 95 株。根据 SpolDB4<sup>[5]</sup> 进行基因谱系的整理,非北京家族菌株中 T1 菌株 53 株;T2 菌株 6 株;T3 菌株 6 株;T4 菌株 1 株;X1 菌株 2 株;T1-T2 型菌株 1 株;T2-T3 型菌株 1 株;T2-T4 型菌株 1 株;H1 菌株 1 株;H3 菌株 2 株;LAM4 菌株 1 株;U 型菌株 1 株;未确定的菌株 19 株。

### 讨 论

Spoligotyping 分型方法中使用的短的、重复 DR 序列为结核分枝杆菌复合体所特有,并具有遗传稳定性和个体多样性的特点。与传统的 IS6110 指纹法相比,该方法只需少量 DNA,可用临床标本检测,例如痰、组织、支气管肺泡灌洗液等,并可在 2 日内报告结果;由于反向线性点杂交的应用<sup>[6]</sup>,一张膜上可以同时固定 43 个探针,且一张膜至少可以重复使

用 20 次,使得该方法经济实用,简便快速;Spoligotyping 的结果表示为每个间隔为阳性或阴性,可用一种数字形式表示;Spoligotyping 最重要的特点是可在同一试验中对结核分枝杆菌菌株同时进行检测和分型,北京家族菌株具有特定的 Spoligotyping 图谱,主要特征是 43 个寡核苷酸探针中 1~34 位呈现阴性反应<sup>[7-9]</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 也用作 IS6110 在 5 个拷贝以下的菌株的分型方法。将某地区的结果与全球 Spoligotyping 的数据进行比较可以为结核杆菌种群提供遗传学信息。

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、Excel 软件进行处理,但是这只适用于菌株数量很少的情况。当对大规模的菌株进行分析尤其是对全国各实验室间的结果进行比较时,这种方法就不适合了。本研究使用的 BioNumerics 软件是一个功能强大的数据库软件,该软件可以存储各种资料,包括菌株背景资料、实验室数据结果、图片结果、核酸序列等,并进行数据分析<sup>[4]</sup>。在 Spoligotyping 数据分析中,用该软件进行聚类分析,聚类方式用平均连锁聚类法(UPGMA),相似系数选用 Dice 系数。该软件还可以将菌株的 Spoligotyping 结果、IS6110-RFLP 结果和 MLVA 等结果进行综合分析,以提高菌株的分辨能力<sup>[11]</sup>。

本次研究中 224 株结核分枝杆菌分 2 簇 55 种基因型,通过与 SpolDB4 数据库进行比对<sup>[5]</sup>,其中北京家族菌株 129 株(57.59%),为主要的流行株;此外还有 19 株未确定基因谱系的菌株,需要进一步的分析鉴定,以确定其基因谱系。在本研究中,偶尔会发现一些微弱的杂交信号,可能是由于间隔区的序列发

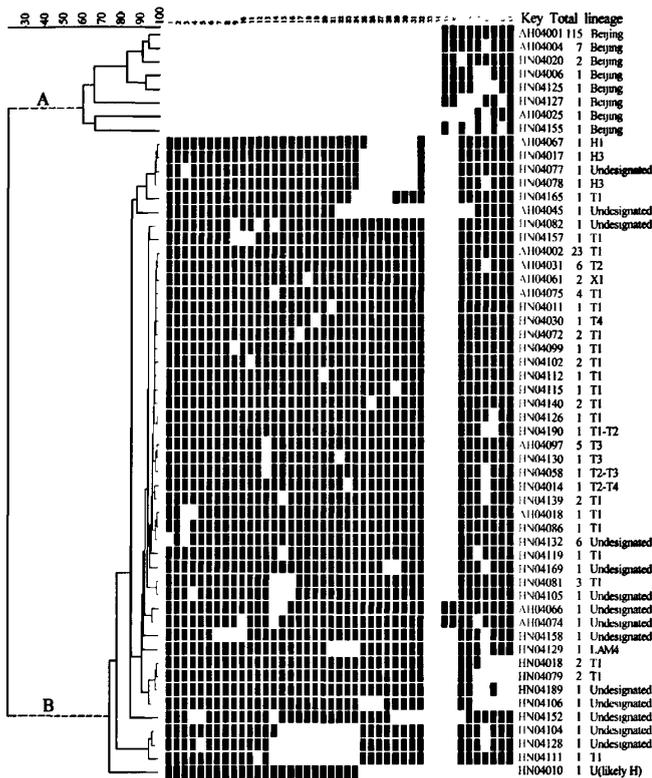


图4 224株结核分枝杆菌 Spoligotyping分型结果聚类分析系统树图

生了变化。这些微弱的信号解释起来可能会很含糊,我们可以记录下这些信号微弱的杂交点及其分布,以避免忽视具有同类型别的菌株。在一些实验室里,Spoligotyping 不仅用于动物 *M. bovis* 感染的流行病学研究,也用于结核分枝杆菌临床分离株的快速分型。我们已经建立了我国部分省市的结核分枝杆菌 Spoligotyping 数据库<sup>[11-15]</sup>,虽然这个数据库还处于开始阶段,但是已经发现了不同地区结核分枝杆菌间可能存在一定的流行病学联系,这对于结核病的预防控制具有重要的意义。

参 考 文 献

[1] Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*, 1993, 10(5):1057-1065.

[2] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (4) : 907-914.

[3] Hemans 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(8):2695-2705.

[4] Bionumerics Manual, version 3.5, Applied maths, Kortrijk, Belgium.

[5] Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 2006: 6-23.

[6] Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, et al. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 119(1-2):19-25.

[7] Soolingen V, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *M. tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(12): 3234-3238.

[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(6):1930-1937.

[9] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/ W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(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(8): 2602-2606.

[11] 董海燕, 谭云洪, 刘志广, 等. IS6110-RFLP、Spoligotyping 和 MLVA 在结核分枝杆菌基因分型中的应用研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(5):423-427.

[12] 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*, 2007, 27(8):711-718.

[13] 曹晓慧, 刘志广, 赵秀芹, 等. 220 株结核分枝杆菌北京临床分离株的基因分型研究. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(5): 412-417.

[14] 刘飞鹰, 刘志广, 王喜文, 等. Spoligotyping 对广西地区 208 株结核分枝杆菌临床分离株的基因分型. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(12):1226-1230.

[15] 董海燕, 刘志广, 赵秀芹, 等. 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. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(3):268-272.

(收稿日期:2008-09-24)

(本文编辑:张林东)