

· 实验研究 ·

三种不同的 DNA 分型技术在 158 株结核杆菌研究中的应用

郭艳玲 刘洋 王魁民 李传友

【摘要】 目的 评价 IS6110-限制性片段长度多态性(RFLP)、间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)及分枝杆菌散在重复单位(MIRU)三种分型方法在结核病流行病学研究中的应用。方法 对 158 株结核分枝杆菌临床分离株应用 IS6110-RFLP、Spoligotyping 及 MIRU 三种分型方法进行鉴定。结果 应用三种分型方法产生的类型数分别为 118、20 和 105 个。IS6110-RFLP 的分辨率大于 Spoligotyping, MIRU 的分辨能力与 IS6110-RFLP 接近。在 MIRU 的 12 个区中,重复区 4、10、26、40 具有较高的多态性。广东地区与其他地区成簇率和北京基因型所占比例差异有统计学意义($P < 0.05$),广东地区成簇率和北京基因型所占比例均显著低于其他地区。结论 应用 IS6110-RFLP、Spoligotyping 及 MIRU 三种分型方法进行结核病流行病学研究具有重要意义且非常有效,可以发现中国不同地区菌株的不同特点。

【关键词】 结核杆菌;分型;流行病学研究

The identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by DNA typing technique GUO Yan-ling, LIU Yang, WANG Su-min, LI Chuan-you. Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

【Abstract】 Objective To assess the application of IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP), Spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit(MIRU) in epidemiological studies of tuberculosis and to discuss the characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains in different regions in China. **Methods** *Mycobacterium tuberculosis* strains, with a total number of 158 isolates, were subjected to IS6110-RFLP, Spoligotyping and MIRU. **Results** The numbers of patterns produced by IS6110-RFLP, Spoligotyping, and MIRU typing were 118, 20 and 105 respectively. The discriminatory power of IS6110-RFLP was higher than that of Spoligotyping. However, when the copies of IS6110 were lower than 10, the discriminatory power of Spoligotyping improved obviously. The discriminatory power of MIRU typing was close to that of IS6110-RFLP for typing of *Mycobacterium tuberculosis*. In MIRU loci, there were four loci (loci 4, 10, 26, 40) with higher diversity. Significant differences among the *Mycobacterium tuberculosis* between Guangdong and other regions in clustered rate and the proportion of Beijing genotype ($P < 0.05$) were found. The clustered rates and the proportion of Beijing genotype in Guangdong were lower than that in other regions. **Conclusion** The results of this study indicated that either IS6110-RFLP, Spoligotyping or MIRU technique was useful for epidemiological studies on tuberculosis in China and the strains in different regions had different characteristics in China.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Typing; Epidemiology

DNA 分型技术已成为结核分枝杆菌分子流行病学研究中的重要工具。其中基于 IS6110 的限制性片段长度多态性方法(RFLP)被 Van Embden 等^[1]推荐为 DNA 分型方法中的“金标准”。IS6110 是一个只存在于结核分枝杆菌复合群基因组中的插入序列。不同菌株 IS6110 的数目和位置不同。间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)和近年来建立起来的分枝杆菌散在重复单位(MIRU)均是以聚合酶

链反应(PCR)为基础的分型方法,具有简单快速的特点。我们应用 IS6110-RFLP、Spoligotyping 及 MIRU 技术对国内不同地区 158 株结核分枝杆菌临床分离株进行分析,旨在揭示各地区菌株的特点及不同地区菌株之间基因型的差异。探讨这三种方法在我国结核病流行病学方面的应用前景。

材料与方 法

1. 菌株来源:收集 158 株结核分枝杆菌临床分

离株,其中内蒙古自治区 33 株,西藏自治区 23 株,黑龙江省 39 株,广东省 30 株,北京市 33 株。菌株的药敏实验结果,IS6110-RFLP 参比菌株 Mt14323 及 Spoligotyping, MIRU 分型质控菌株结核分枝杆菌标准株 H37Rv(ATCC 27294),均由北京市结核病胸部肿瘤研究所参比实验室提供。

2. 试验方法:

(1) IS6110-RFLP: 采用推荐标准的 IS6110-RFLP 方法^[1]。实验步骤包括 DNA 提取, Pvu II 酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 进行 Southern 转移和杂交检测。

(2) Spoligotyping 的建立: 采用推荐的 Spoligotyping 方法并做了适当改进^[2]: ① DNA 提取采用上海生工生物工程有限公司 DNA 提取试剂盒。② PCR 扩增直接重复区(DR 区): 引物为 DRa: 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3', 5'末端采用 DIG 标记; DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'。PCR 反应条件: 96℃ 3 min 变性后; 96℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 30 s 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。③ 杂交检测: PCR 扩增产物与已结合有 43 个寡核苷酸探针的制备好 Biotinylated C 膜杂交^[2]。杂交在 Miniblotter 45(Immunetics, USA)上进行。洗膜后杂交信号用化学发光法检测(DIG 标记和检测试剂盒 Roche)。

(3) MIRU 技术的建立: 依据 Supply 推荐的方法建立^[3,4]。具体方法为: ① 提取 DNA。PCR 扩增 12 个重复区。反应条件为 94℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 90 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。MIRU 技术各重复区扩增引物参照文献[4]。② 2% 琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 产物的长度。以 100 bp 间隔的 DNA ladder 做分子量标准; H37Rv 为阳性质控菌株。采用 Gel-pro analyzer 3.1 软件进行辅助分析。③ 依据各重复区片段长度确定各重复区序列的拷贝数。

3. 数据处理与统计学分析:

(1) 簇代表的是具有相同或高度相似 DNA 指纹特征的一组结核分枝杆菌。本研究 IS6110-RFLP 一簇包含 IS6110-RFLP 带型相似系数在 0.90~1.00 以内的所有菌株^[5]。

(2) 结核分枝杆菌北京基因型的定义^[6,7]: 具有较高的 IS6110 拷贝数; 具有相同的 Spoligotyping 结果, 表现为仅与 35~43 之间的 9 个间隔区杂交。

(3) 指纹分析: IS6110-RFLP 指纹图谱经扫描后

用 Gel Compar 4.1 软件进行分析, 采用 UPGMA 计算 Dice 相似系数, 并进行聚类分析。观察 Spoligotyping 结果并应用 Gel Compar 4.1 软件进行比较分析^[6]。

(4) 统计学分析: 应用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验并计算 OR 值和 95% 可信限(CI)。

(5) 分辨指数 Hunter-Gaston Index(HGI) 的计算公式^[8]:

$$HGI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

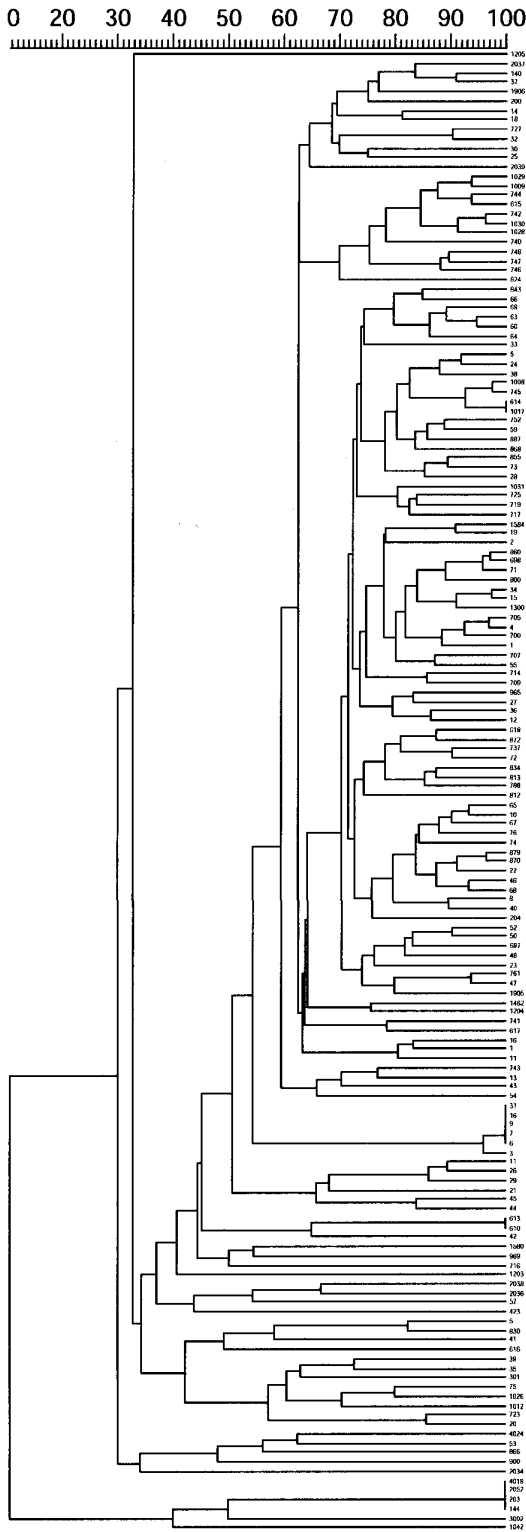
N 为菌株总数, n_j 是属于第 j 类型的菌株数。

结 果

1. IS6110-RFLP: 利用 Gel Compar 4.1 软件对五个地区 158 株结核分枝杆菌临床分离株的 IS6110-RFLP 指纹图谱进行聚类分析, 树状图见图 1。158 株临床分离株共分为 25 簇, 包含 65 个菌株, 占 41.1% (65/158)。共得到 118 个类型, 其中 93 个(78.8%)为独特类型, 25 个(21.2%)类型由 2 到 6 个菌株组成。其中相似系数为 100% 的菌株有 13 株(13/65), 分别在 4 个不同的簇内。1 簇为单拷贝簇, 包含 4 个菌株。IS6110 平均拷贝数为 14.7。仅有 7 个菌株 IS6110 拷贝数在 5 个以内。

2. Spoligotyping 分型结果: 应用 Spoligotyping 分型技术对 158 株临床分离株进行鉴定。共得到 7 簇 145 个菌株和 13 个独特类型, 其中最大的一簇包含 123 个菌株, 占 77.8% (123/158), 其特点为具有相同的 Spoligotyping 结果, 表现为仅与 35~43 之间的 9 个间隔区杂交, 与北京基因型的特点相符。该簇可被 IS6110-RFLP 分型进一步分成 23 簇, 87 个类型。另外有 5 株表现为仅与 35~43 之间的 8 个间隔区杂交, 即与北京基因型仅相差 1 个间隔区, 称为北京样基因型(Beijing-like)。同时本研究还对两株非结核分枝杆菌(草分枝杆菌, 瘰癧分枝杆菌)进行鉴定。结果既无扩增产物产生, 也无杂交点。对临床结核分枝杆菌定量 PCR 阳性的两个临床标本进行 Spoligotyping 测定, 结果均有扩增产物和杂交点产生。本研究还对一个临床分离株的原代、二代、三代菌株进行鉴定, 分型结果均相同。

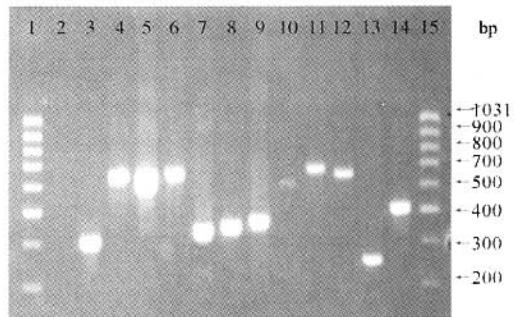
3. MIRU 分型: 除了 IS6110 单拷贝簇外, 所有 IS6110-RFLP 分型相似系数为 100% 的菌株, MIRU 分型后均表现为具有相同的重复区拷贝数。其中 4 个 IS6110 单拷贝菌株的一簇可被 MIRU 分型进一



注:横坐标为相似系数,纵坐标为菌株编号

图1 158株结核分枝杆菌临床分离株 IS6110-RFLP 聚类后的树状图谱

步分为 2 个菌株的一簇和两个独特类型,这与 Spoligotyping 的分型结果相同。在 MIRU 的 12 个区中,重复区 4、10、26、40 具有较高的多态性,均含有 4 个以上的等位基因,而一些重复区(如 20 和 24)则分辨力相对较差,仅含有 2 个等位基因。对部分 MIRU 重复区 PCR 产物进行测序后,其测序得出的重复区拷贝数与电泳片段确定的重复区拷贝数相同。并且可以看到 MIRU 重复区序列是高度同源的。H37Rv 各重复区 PCR 产物电泳结果见图 2。



1、15:100 bp 间隔分子量标准;2:阴性对照;3~14:为 MIRU 40、39、31、27、26、24、23、20、16、10、4、2 重复区

图2 H37Rv 的 MIRU 各重复区电泳结果

4. 用 HGI 对三种方法进行评价^[8]:总体来说, IS6110-RFLP 的分辨能力大于 Spoligotyping 分型。而 MIRU 的分辨能力与 IS6110-RFLP 接近。IS6110-RFLP 的分辨指数为 99.4%, Spoligotyping 的分辨指数为 39.1%, MIRU 技术的分辨指数为 97.8%。将三种方法结合起来分析时产生的独特类型数增加到 95 个,分辨指数达到 99.5%。当 IS6110 拷贝数 ≤ 10 个时, Spoligotyping 的分辨指数为 94.3%, IS6110-RFLP 的分辨指数为 98%, MIRU 的分辨指数达到 98.2%。三种方法的比较见表 1。

5. 比较不同地区之间的差别:对不同地域的菌株进行比较,广东地区与其他地区结核分枝杆菌菌株北京基因型所占比率差异有统计学意义,其他地区北京基因型所占比率更高;广东地区与其他地区菌株成簇率和北京基因型所占比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。广东地区菌株的成簇率和北京基因型所占比例均明显低于其他地区(表 2)。

讨 论

1. IS6110-RFLP 在结核分枝杆菌株水平鉴定上

表1 IS6110-RFLP、Spoligotyping 和 MIRU 分型三种方法的比较

类别	IS6110-RFLP		Spoligotyping		MIRU		IS6110-RFLP + Spoligotyping + MIRU
	全部	≤10个拷贝	全部	≤10个拷贝	全部	≤10个拷贝	
成簇菌株数	65	6	145	16	93	9	63
成簇数	25	2	7	6	40	4	25
类型数	118	23	20	17	105	22	120
最大一簇菌株数	6	4	123	6	6	3	6
独特类型数	93	21	13	11	65	18	95
HGI(%)	99.4	98.0	39.1	94.3	97.8	98.2	99.5
菌株总数	158	27	158	27	158	27	158

表2 比较不同地区之间的差别

基因型或成簇	其他地区	广东地区	P 值	OR 值(95% CI)
北京基因型	108	15	<0.001	5.4(2.3 ~ 12.7)*
非北京基因型	20	15		
成簇	58	7		
未成簇	70	23	<0.05	2.72(1.09 ~ 6.79)#
合计	128	30		

注:不同地区之间的比较采用 χ^2 检验并计算 OR 值和 95% CI; * 其他地区菌株北京基因型所占比率为广东地区的 5.4 倍; # 其他地区菌株成簇率为广东地区的 2.72 倍

的应用:研究结果表明,这些地区菌株绝大多数为多拷贝菌株,便于分型。因此,采用 IS6110-RFLP 分型对结核分枝杆菌流行病学研究是非常有效的^[9]。在所有分析的菌株中,有近 80% 的菌株之间相似系数在 50% 以上,具有较高的同源性。可见该基因型是这些地区流行的菌株。这一大群的菌株特征为 IS6110 拷贝数较多,具有共有带,符合北京基因型的特点。同时我们按菌株来源的地理分布进行比较,发现在广东地区菌株之间具有相对较高的多态性,近期传播比例较低,而在其他地区菌株之间则具有相对较高的一致性,近期传播比例较高,二者差异有统计学意义。这种差别一方面可能由于人口流动性因素;另一方面可能由于不同地域的气候环境等因素存在差异。另外,本实验中有 13 株的 IS6110-RFLP 在各自簇内分型结果完全相同,流行病学调查发现,除 4 株为单拷贝株外,其余属于同一簇的菌株分布于 2 个小范围地区内,说明该地区可能有小范围的传播。

2. Spoligotyping 在结核分枝杆菌株水平鉴定上的应用:Spoligotyping 是一种以 PCR 为基础的 DNA 分型技术。本实验结果表明,该方法较稳定,敏感性较好,特异性较强。由于所有的 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG 菌株都缺乏 39~43 间隔区而含有 33~38 间隔区这一特征,利用 Spoligotyping 技术还可以从结核

分枝杆菌复合群中分辨出 *M. bovis* 和 *M. bovis* BCG。可见,Spoligotyping 技术不但可以对结核分枝杆菌进行菌株水平的鉴定,还可以在特定条件下进行菌种鉴定。

本研究中最大的一簇包含 123 个菌株,表现为仅与 35~43 之间的 9 个

间隔区杂交,即所谓的北京基因型^[10]。一些研究认为北京基因型的优势传播与 BCG 疫苗接种有关。有些研究认为北京基因型与结核菌耐药有关。从而导致该基因型的广泛传播。由于本研究的样本量相对较少,故无法证实这些结论。

本研究中 Spoligotyping 成簇的菌株有 50% 以上的菌株可被 IS6110-RFLP 进一步分型,说明 Spoligotyping 的分辨力不如 IS6110-RFLP。当 IS6110 拷贝数在 10 个以内时,Spoligotyping 的分辨能力明显提高,与 IS6110-RFLP 分型的分辨指数接近。并且 IS6110-RFLP 分型的一簇 4 个菌株的单拷贝簇可被 Spoligotyping 分型进一步分成 2 个菌株的一簇和 2 个独特类型。因此,Spoligotyping 方法可以作为快速的初筛(适用于 IS6110 多拷贝菌株)或进一步分型(适用于 IS6110 低拷贝菌株)方法,与 IS6110-RFLP 分型结合起来,可以对结核分枝杆菌的鉴定得出更为准确的结果。

3. MIRU 分型技术在结核分枝杆菌株水平鉴定上的应用:MIRU 分型技术是近几年发展起来的以 PCR 为基础的新的技术。MIRU 分型的一个突出优点是结果以数字表示,便于比较研究。将本次实验 MIRU 分型与 IS6110-RFLP 分型及 Spoligotyping 的分辨指数进行比较后可知 MIRU 分型与 IS6110-RFLP 分型分辨能力接近,高于 Spoligotyping 的分辨力。IS6110-RFLP 分型一个 4 菌株的单拷贝簇可被 MIRU 分型进一步分成 2 个菌株的一簇和两个独特类型,这与 Spoligotyping 对这一 IS6110 单拷贝簇的分型结果相同。本实验所选菌株在 MIRU 的 12 个区中,重复区 4、10、26、40 具有较高的多态性,而一些重复区则具较少改变,分辨力相对较差,说明 MIRU 各区进化的分子钟有所不同。采用较少改变的重复区对于发现更高水平的进化可能有重要的提示作用。

总之, IS6110-RFLP 分型分辨力高, 为推荐的标准方法, 但需菌量大 (约 2 μg), 操作较复杂, 对 IS6110 拷贝数少的菌株分辨能力较差。Spoligotyping 是一种以 PCR 为基础的方法, 它操作简单, 快速, 需菌量小, 可以直接用于临床标本的检测, 且结果易于判定, 尤其是对 IS6110 拷贝数少的菌株, 分辨力较高。被认为是进一步检测和鉴定结核分枝杆菌复合群非常有价值的方法。目前新的间隔区序列已被用于 Spoligotyping 中^[11], 这些都提高了 Spoligotyping 的分辨能力, 使这一方法得以优化。MIRU 技术的分辨力与 IS6110-RFLP 接近, 且优于 IS6110-RFLP 的方面在于它是 PCR 为基础的, 方法易于建立, 获得结果只需一天, 无需特殊仪器, 从而便于实验室直接进行比较研究。目前, 自动的 MIRU 分型技术也已建立起来, 这就加快了菌株鉴定的速度, 为大规模的结核分枝杆菌基因分型提供了一个有利的工具^[4]。有研究者建议对结核分枝杆菌菌株的基因分型采取两步法的策略。即 MIRU 分型作为一线的分析方法来定义簇, 以 Spoligotyping 补充。采用 IS6110 RFLP 作为二线的分析方法来证实菌株之间潜在的流行病学联系。这种两步法的策略有希望提高近期传播调查的准确度同时加快结核病流行病学研究的步伐。

参 考 文 献

- 1 Van Embden JA, 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.
- 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, 35:907-914.
- 3 Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite-like regions in *Mycobacterium tuberculosis* genome. Molecular Microbiology, 2000, 36:762-771.
- 4 Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol, 2001, 39:3563-3571.
- 5 王惠民. 结核分枝杆菌 DNA 指纹技术及其应用研究. 中华检验医学杂志, 2001, 24:76-78.
- 6 Toungousova 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.
- 7 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.
- 8 Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26:2465-2466.
- 9 Van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1993, 31:1987-1995.
- 10 van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J Clin Microbiol, 1995, 33:3234-3238.
- 11 van der Zanden AGM, Kremer K, Schouls LM, et al. 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:2004-07-19)

(本文编辑:尹廉)

· 书 讯 ·

《实用传染病防治》现已出版

《实用传染病防治》一书已由学苑出版社于 2005 年 3 月出版, 书号 ISBN7-80060-233-8。该书由华北煤炭医学院吕宝成教授、上海市疾病预防控制中心康来仪教授等主编, 全国各省市 60 余位专家参编, 内容新颖、实用。全书共 120 万字, 大 16 开, 精装 600 页。总论 14 章, 包括信息管理、互联网、突发事件应对以及调查评价等方法学; 各论包括 37 种法定传染病防治, 并附卫生部有关标准。系各级疾病预防控制中心必备工具。适用各级人员学习培训。邮购办法: 邮编 100013, 北京和平里邮局 38 信箱 李瑞珍。每本 180 元(包括书款 168 元, 邮挂 12 元), 第一次印刷存书有限, 欲购从速。