

# 青海省结核分枝杆菌临床分离株可变数目串联重复序列基因多态性研究

李斌 刘海灿 王兆芬 马永成 苏效东 蒋明霞 万康林  
刘寿 赵秀芹 瞿述根

**【摘要】 目的** 初步了解青海省结核分枝杆菌临床分离株基因多态性和基因分型特征。**方法** 2009—2012年收集青海省疾病预防控制中心分离的结核分枝杆菌临床分离株,提取DNA,对15个可变数目串联重复序列(VNTR)位点进行PCR扩增和产物电泳分析,使用BioNumerics软件对菌株进行聚类分析。**结果** 共检测251株结核分枝杆菌临床分离株的15个VNTR位点,显示这些菌株有明显的基因多态性,15个VNTR位点中Hunter-Gaston指数 $>0.6$ 的VNTR位点有6个,位点分辨能力最高的是MIRU26,经聚类分析,可分为4个基因群,238个基因型。4个基因群分别占4.9%、91.9%、1.6%和1.6%。**结论** 青海省流行的结核分枝杆菌菌株存在明显的VNTR基因多态性。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 基因分型; 多位点数目可变串联重复序列; Hunter-Gaston指数

**Study on VNTR diversity of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Qinghai** Li Bin<sup>1</sup>, Liu Haican<sup>2</sup>, Wang Zhao fen<sup>1</sup>, Ma Yongcheng<sup>1</sup>, Su Xiaodong<sup>1</sup>, Jiang Mingxia<sup>3</sup>, Wan Kanglin<sup>2</sup>, Liu Shou<sup>1</sup>, Zhao Xiuqin<sup>2</sup>, Qu Shugen<sup>1</sup>. 1 Medical School of Qinghai University, Xining 810001, China; 2 State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Qinghai Provincial Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: Wang Zhao fen, Email: kristy538@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81160356) and National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX10003006-002-001).

**【Abstract】 Objective** To investigate the variable number tandem repeats (VNTR) genetic polymorphisms, genotyping and distribution pattern of clinical *Mycobacterium (M.) tuberculosis* isolates from Qinghai province. **Methods** The clinical *M. tuberculosis* strains isolated from the patients with tuberculosis and related background data were collected from Qinghai Provincial Center for Disease Control and Prevention from 2009 to 2012. Genotyping was conducted by using multiple locus VNTR analysis (MLVA). Genomic DNA was extracted and 15 VNTR loci were amplified with PCR and the PCR products were detected with gel electrophoresis. The VNTR diversity and clusters of genotyping were analyzed with BioNumerics (Version 5.0). **Results** A total of 251 clinical *M. tuberculosis* isolates were analyzed with 15 VNTR loci showing that there were great genetic diversity in these isolates. Six of the 15 VNTR loci, showed that the Hunter-Gaston index (HGI) were higher than 0.6, in which the highest resolution was MIRU26. The clusters of genotyping showed that these isolates could be categorized into four gene clusters and 238 genotypes. The four gene clusters accounted for 4.9% , 91.9% , 1.6% and 1.6% of the clinical isolates, respectively. **Conclusion** The results showed that there is great variety of VNTR genetic polymorphisms in clinical *M. tuberculosis* isolates in Qinghai province.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Genotyping; Variable number tandem repeats; Hunter-Gaston index

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.10.026

基金项目: 国家自然科学基金(81160356); 国家科技重大专项(2013ZX10003006-002-001)

作者单位: 810001 西宁, 青海大学医学院公共卫生系(李斌、王兆芬、苏效东、刘寿、瞿述根); 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(刘海灿、万康林、赵秀芹); 青海省疾病预防控制中心传染病预防控制所(马永成、蒋明霞)

通信作者: 王兆芬, Email: kristy538@163.com

多位点数目可变串联重复序列分析(MLVA)是基于PCR的DNA指纹技术,利用基因组中特定位点上可变数目串联重复序列(VNTR)的多态性进行基因分型的研究<sup>[1]</sup>,被检测菌株根据不同位点的VNTR重复单元的拷贝数进行数字化编码,然后利用相关软件通过计算机对检测菌株进行自动分型<sup>[2]</sup>。结核分枝杆菌的全基因组序列中存在许多VNTR位点,但其侧翼序列具有高度保守性。为此本研究采用15个VNTR位点对青海省251株结核分枝杆菌临床分离株进行基因分型研究,初步了解其基因多态性。

### 材料与与方法

1. 菌株来源:251株结核分枝杆菌临床分离株为2009—2012年青海省疾病预防控制中心从结核病患者痰标本分离培养及鉴定后获得。对照标准菌株H37Rv由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(传染病所)结核病实验室提供。

2. 主要试剂:2×Taq Master Mix、100 bp DNA Ladder、琼脂糖均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

3. 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灭活,12 000 r/min离心3 min,弃上清收集菌体,用500 μl生理盐水充分悬浮,100℃水浴1 h,12 000 r/min离心5 min取上清即为PCR扩增模板。-20℃保存备用。

4. MLVA检测:①引物设计与合成:15个位点(表1)<sup>[3-4]</sup>的引物序列由传染病所提供,生工生物工程(上海)股份有限公司合成。②PCR反应体系及反应条件:采用25 μl反应体系,其中含上、下游引物各0.5 μl,2×Taq Master Mix 12.5 μl,DNA模板1 μl,灭菌水10.5 μl。PCR反应条件:预变性94℃ 5 min;变性94℃ 30 s,退火62℃ 30 s,延伸72℃ 45 s,35个循环;终延伸72℃ 10 min。③琼脂糖凝胶电泳:取10 μl PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,用100 bp DNA Marker确定其相对分子质量,以标准株H37Rv作为对照。

5. 结果分析:根据成像DNA片段的大小,与标准株H37Rv对比,从而得出每个检测菌株15个位点的重复拷贝数。应用Hunter-Gaston指数(HGI)分析各位点的多态性<sup>[5]</sup>,再用BioNumerics 5.0软件对菌株进行聚类分析。

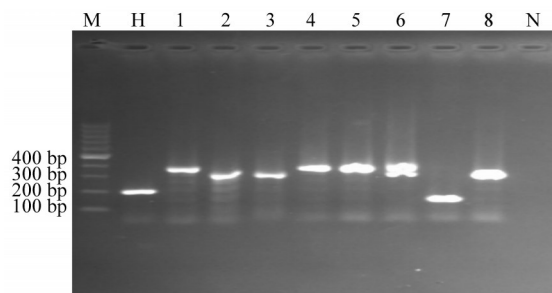
### 结 果

1. VNTR位点检测:251株结核分枝杆菌的PCR

表1 重复位点及其引物

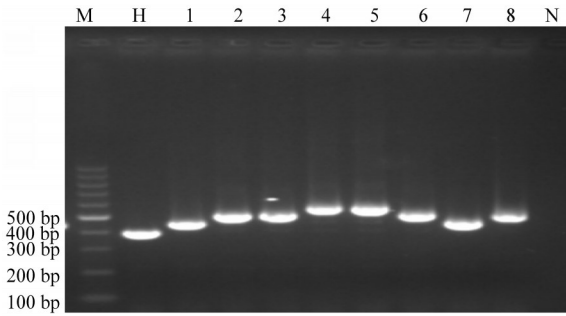
编号	位点	引物序列
1	ETRA	L: ATT TGG ATC GGG ATG TTG AT R: TCG GTC CCA TCA CCT TCT TA
2	ETRB	L: GCG AAC ACC AGG ACA GCA TCA TG R: GGC ATG CCG GTG ATC GAG TGG
3	ETRC	L: GAC TTC AAT GCG TTG TTG GA R: GTC TTG ACC TCC ACG AGT GC
4	ETRD	L: GCG CGA GAG CCC GAA CTG C R: GCG CAG CAG AAA CGT CAG C
5	ETRE	L: ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA R: GTG CCG ACG TGG TCT TGA T
6	MIRU10	L: GTT CTT GAC CAA CTG AGT CGT CC R: GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT
7	MIRU16	L: TCG GTG ATC GCG TCC AGT CCA AGT A R: CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC
8	MIRU23	L: CAG CGA AAC GAA CTG TGC TAT CAC R: CGT GTC CGA GCA GAA AAG GGT AT
9	MIRU26	L: CCC GCC TTC GAA ACG TCG CT R: TGG ACA TAG GCG ACC AGG CGA ATA
10	MIRU27	L: TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA R: GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A
11	MIRU39	L: CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC R: CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT
12	MIRU40	L: GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T R: GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA
13	Mtub21	L: AGA TCC CAG TTG TCG TCG TC R: CAA CAT CGC CTG GTT CTG TA
14	Mtub30	L: AGT CAC CTT TCC TAC CAC TCG TAA C R: ATT AGT AGG GCA CTA GCA CCT CAA G
15	Mtub39	L: AAT CAC GGT AAC TTG GGT TGT TT R: GAT GCA TGT TCG ACC CGT AG

产物凝胶电泳均可观察到15个位点。图1和图2分别为8株结核分枝杆菌临床分离株的Mtub21和MIRU40位点的PCR产物凝胶电泳结果。位点PCR产物长度不同说明位点重复次数不同,表明该位点存在基因多态性。



注:M:DNA Marker(100~1 000 bp);H:H37Rv;N:阴性对照;1~8:被检测菌株(QH81~QH88)

图1 8株结核分枝杆菌临床分离株的Mtub21位点基因多态性检测



注: M: DNA Marker(100 ~ 1 000 bp); H: H37Rv; N: 阴性对照; 1 ~ 8: 被检测菌株(QH193 ~ QH200)

图 2 8 株结核分枝杆菌临床分离株的 MIRU40 位点基因多态性检测

2. VNTR 位点的多态性: 为了比较不同位点的多态性, 应用 HGI 对各个位点的分辨能力进行分析。15 个 VNTR 位点 HGI 有较大差异, HGI 为 0.122 ~ 0.768, 其中分辨率 > 0.6 的 VNTR 位点有 6 个, 表明这些位点具有较高的分辨率, 且不同位点显示不同的分辨率(表 2)。

3. 基因型聚类分析: 经 BioNumerics 5.0 软件聚类分析(图 3), 251 株结核分枝杆菌分为 4 个基因群, 238 个基因型。4 个基因群分别占 4.9%、91.9%、1.6% 和 1.6%。所有的基因型与标准株 H37Rv 基因

表 2 251 株结核分枝杆菌临床分离株不同 VNTR 位点的 HGI

位点	重复次数(菌株数)	HGI
ETRA	0(19), 2(8), 3(18), 4(206)	0.316
ETRB	0(3), 1(10), 2(235), 3(3)	0.122
ETRC	0(2), 2(1), 3(16), 4(231), 5(1)	0.149
ETRD	0(29), 1(17), 2(3), 3(185), 4(17)	0.436
ETRE	0(50), 1(1), 2(22), 3(80), 4(93), 5(5)	0.716
MIRU10	0(62), 1(10), 2(41), 3(118), 4(20)	0.686
MIRU16	0(12), 1(6), 2(6), 3(222), 4(4), 5(1)	0.215
MIRU23	0(1), 5(234), 6(16)	0.127
MIRU26	0(85), 2(2), 3(4), 4(33), 5(70), 6(30), 7(26), 9(1)	0.768
MIRU27	0(70), 1(3), 2(12), 3(164), 4(2)	0.495
MIRU39	0(71), 1(14), 2(60), 3(91), 4(14), 5(1)	0.728
MIRU40	0(22), 1(18), 2(80), 3(123), 4(8)	0.647
Mtub21	0(4), 1(6), 2(10), 3(35), 4(118), 5(72), 6(6)	0.677
Mtub30	0(4), 2(17), 3(15), 4(215)	0.259
Mtub39	0(7), 2(2), 3(1), 4(180), 5(57), 6(3)	0.435

型均不相同。

### 讨 论

本研究采用青海省分离培养的 251 株结核菌, 选取 15 个 VNTR 位点进行 MLVA 分型, 并计算 15 个位点的分辨率, 应用 HGI 比较各位点分辨能力。结

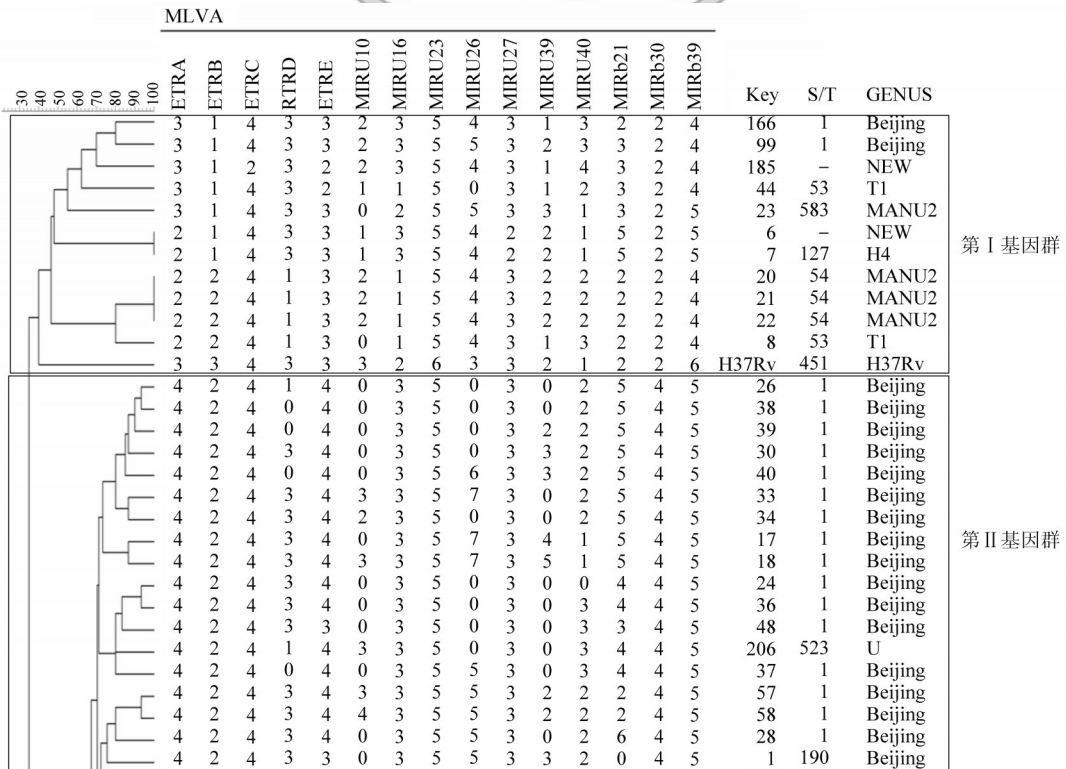


图 3 部分结核分枝杆菌菌株 BioNumerics 聚类分析

果显示各位点 HGI 存在较大差异,仅 3 个位点 (MIRU16、MIRU23 和 Mtub30) HGI 未超过 0.3,有 6 个 VNTR 位点 (ETRE、MIRU10、MIRU26、MIRU39、MIRU40 和 Mtub21) HGI > 0.6,表明这些位点适宜青海地区全部菌株的基因分型。分辨能力最强的是 MIRU26,这与李卓林等<sup>[3]</sup>报道的一致。而 Sun 等<sup>[6]</sup>对分离自新加坡 291 名患者的 303 株结核分枝杆菌应用标准 MIRU-VNTR 分型方法检测基因多样性,发现 12 个 MIRU 位点中, MIRU-10、26、31、39 具有较高的分辨能力。Mazars 等<sup>[7]</sup>也发现 12 个 MIRU 位点中分别具有不同的分辨能力,其中 6 个 (MIRU-10、16、23、26、31、40) 是带有高度多样性的位点,提示 MIRU26 位点在分辨能力上起到重要作用。本文 251 株结核菌临床分离株可分为 4 个基因群、238 个基因型,所有基因型与标准株 H37Rv 基因型均不相同。车洋等<sup>[8]</sup>对我国江苏省 168 株结核分枝杆菌分型显示,Ⅷ型为主要流行型。提示在不同地区结核分枝杆菌具有独特的分子特征。而青海省临床分离株则以第Ⅱ群为优势流行菌型,该菌群主要分布于西宁及海西两地区,为当地主要流行菌型。

#### 参 考 文 献

- [1] Cowan LS, Diem L, Monson T, et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 688-695.
- [2] Lv B, Liu M, Li ZN, et al. Analysis on genotyping of 159 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated clinically in some areas of China with MLVA-19-Loci [J]. *Dis Surveill*, 2009, 24(5): 359-362. (in Chinese)
- 吕冰, 刘梅, 李兆娜, 等. 中国部分地区 159 株结核分枝杆菌临床分离株 MLVA-19 分型分析 [J]. *疾病监测*, 2009, 24(5): 359-362.
- [3] Li ZL, Wang LL, Liu RH, et al. MLVA analysis of 110 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Jilin province [J]. *J Jilin Univ: Med Ed*, 2013, 39(2): 308-312. (in Chinese)
- 李卓林, 王璐璐, 刘日辉, 等. 吉林省 110 株结核分枝杆菌临床分离株 MLVA 基因分型 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2013, 39(2): 308-312.
- [4] Liu ZW, Lv B, Wang XM, et al. Analysis on the genotyping of 71 *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated from Zhejiang province with MLVA [J]. *Chin Prev Med*, 2008, 9(12): 1017-1020. (in Chinese)
- 柳正卫, 吕冰, 王晓萌, 等. 71 株浙江省结核分枝杆菌临床分离株 MLVA 基因分型研究 [J]. *中国预防医学杂志*, 2008, 9(12): 1017-1020.
- [5] Wan KL, Liu JH, Hauck Y, et al. Investigation on *Mycobacterium tuberculosis* diversity in China and the origin of the Beijing clade [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29190.
- [6] Sun YJ, Bellamy R, Lee ASG, et al. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 1986-1993.
- [7] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1901-1906.
- [8] Che Y, Dong HJ, Yu M. MIRU genotyping technology research progress in the molecular epidemiology of tuberculosis [J]. *Chin J Public Health Manage*, 2011, 27(5): 472-474. (in Chinese)
- 车洋, 董红军, 于梅. MIRU 基因分型技术在结核病分子流行病学中的研究进展 [J]. *中国公共卫生管理*, 2011, 27(5): 472-474.

(收稿日期: 2015-03-03)

(本文编辑: 张林东)